

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



Efecto in vitro de los corticoides sobre
la replicación del virus C

Efecto in vivo de los corticoides a dosis bajas y
prolongadas sobre la hepatopatía crónica
por virus C

TESIS DOCTORAL

MARTA ROMERO GUTIÉRREZ

2012

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



Efecto *in vitro* de los corticoides sobre
la replicación del virus C

Efecto *in vivo* de los corticoides a dosis bajas y
prolongadas sobre la hepatopatía crónica
por virus C

TESIS DOCTORAL presentada por D^a. Marta Romero Gutiérrez
para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de
Alcalá de Madrid

DIRECTOR: Prof. Dr. D. Rafael Bárcena Marugán

RAFAEL BÁRCENA MARUGÁN, Jefe de Sección de Hepatología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid y Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad de Alcalá de Madrid,

CERTIFICA QUE

El trabajo de investigación presentado por **D^a. Marta Romero Gutiérrez** titulado **“Efecto *in vitro* de los corticoides sobre la replicación del virus C. Efecto *in vivo* de los corticoides a dosis bajas y prolongadas sobre la hepatopatía crónica por virus C”** ha sido realizado bajo mi dirección y reúne los requisitos científicos, metodológicos, formales y de originalidad suficientes para ser defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal que legalmente proceda.

Y para que conste donde proceda, se firma la presente en Madrid a diecinueve de junio de dos mil doce.

Fdo. Rafael Bárcena Marugán

Sé perseverante,
porque el agua horada la roca
a base de caer sobre ella.
Prosigue y no desmayes,
y ten en mucho lo poco conseguido,
pues la llovizna no es abundante,
y sin embargo, cala.

Aben Hazam

A Carlos

A mis padres y a mi hermana

AGRADECIMIENTOS

Escribir los agradecimientos supone un momento muy especial de reflexión, para pensar en todas aquellas personas que han hecho posible este trabajo.

En primer lugar agradecer al Dr. Rafael Bárcena Marugán que confiase en mí para este proyecto. Gracias por darme esta oportunidad, por tu cercanía, por tu calidad humana, y por transmitirme siempre tu espíritu de trabajo, y la sensación de que, con esfuerzo y dedicación, esta Tesis Doctoral sería posible.

A Santos del Campo Terrón, por su inestimable ayuda, y por todas las horas que hemos compartido en el laboratorio. Gracias Santos por tu paciencia y tu apoyo durante estos años.

A Gloria Moraleda García por sus conocimientos y su colaboración en el desarrollo del trabajo de laboratorio.

A la Dra. Ana Zamora Moreno, por su apoyo sobre todo en los momentos finales de este trabajo, en los que la meta parecía aún lejana y consiguió darme aliento para alcanzarla.

Con mucho cariño a los que fueron mis adjuntos durante mi etapa de residente, por sus enseñanzas tanto de aspectos teóricos y técnicos como humanos. Todos ellos me enseñaron a intentar ser buen médico, buena persona, y hacer las cosas lo mejor posible. Especialmente agradecer al Dr. Juan José Sánchez Ruano y al Dr. Tomás Artaza Varasa su crucial colaboración y sus consejos, sin los que este trabajo no hubiese sido posible; al Dr. Alejandro Repiso Ortega, su valiosa labor como tutor de residentes, y la motivación que supuso para mí para iniciar este proyecto; y al Dr. Rafael Gómez Rodríguez haberme acercado al campo de la Hepatología.

A mis compañeros de residencia, por compartir tantos momentos únicos.
A los residentes que se incorporan cada año, su ilusión por aprender hace que no se apague la llama de la motivación.

A todas las personas del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid y del Hospital Virgen de la Salud del Complejo Hospitalario de Toledo, que con su generosa cooperación permitieron empezar y finalizar este trabajo.

Siempre agradecida a Carlos, quién comenzó a compartir su vida conmigo al mismo tiempo que empecé a conocer la Medicina. Gracias por tu paciencia, tu calma, tus palabras de ánimo, por hacerme reír, soñar, y seguir sorprendiéndome, por acompañarme durante tantas y tantas horas de estudio, y por hacerme feliz.

A mi hermana Elena, a quien admiro, y con quien tantos momentos de estudio y de diversión he compartido; y a mi sobrina Irene, que despierta una sonrisa en mí sólo con pensar en ella.

Y por último a mis padres, quienes siempre me han mostrado la importancia del esfuerzo, de la constancia, de la empatía y de la humanidad. Sois mi ejemplo de trabajo y de generosidad. Gracias por vuestro apoyo incondicional y por enseñarme a disfrutar de los buenos momentos.

ABREVIATURAS

VHC: virus hepatitis C

HNANB: hepatitis no A no B

IFN: interferón

PEG-IFN: interferón pegilado

RBV: ribavirina

RVS: respuesta viral sostenida

TVP: telaprevir

BOC: boceprevir

ARN: ácido ribonucleico

nm: nanómetro

ORF: marco de lectura abierto (*open reading frame*)

5'NTR: región terminal 5' no codificante

3'NTR: región terminal 3' no codificante

IRES: sitio interno de entrada del ribosoma (*internal ribosome entry*)

CHC: carcinoma hepatocelular

CMSP: células mononucleares sanguíneas periféricas

EMCV: virus de la encefalomiocarditis

Huh: células de hepatoma humano

TH: trasplante hepático

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

Ig: inmunoglobulina

Anti-VHC: anticuerpos frente VHC

ELISA: enzimoimmunoanálisis

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

RIBA: inmunotransferencia con antígenos recombinantes

bADN: amplificación de la señal mediante sondas de ADN ramificado (*branched* ADN)

ADN: ácido desoxirribonucleico

UI: unidades internacionales

FDA: *Food and Drug Administration*

ml: mililitro

TAN: técnicas de amplificación del ácido nucleico

TMA: transcripción mediada por amplificación
ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
Eq: equivalentes
BOE: Boletín Oficial del Estado
RVR: respuesta viral rápida
RVPC: respuesta viral precoz completa
RVPP: respuesta viral precoz parcial
log: logaritmo
pg: picogramo
IAH: índice de actividad histológica
F: fibrosis
kPa: kiloPascales
APRI: *aspartate transaminase to platelets ratio index*
g: gramo
IMC: índice de masa corporal
µg: microgramo
mg: miligramo
nM: nanomolar
BVDV: virus de la diarrea bovina viral
MMF: mofetil micofenolato
µM: micromolar
HBsAg: antígeno de superficie ligado a la hepatitis B
VHB: virus de la hepatitis B
HAI: hepatitis autoinmune
FR: factor reumatoide
ANA: anticuerpos antinucleares
CM: crioglobulinemia mixta
EMTC: enfermedad mixta del tejido conectivo
EIIc: enfermedad inflamatoria intestinal crónica
SMA: anticuerpos anti-músculo liso
LKM: anticuerpos anti-microsomales
MEM: medio de cultivo mínimo esencial
IFNα: interferón alfa

AZA: azatioprina

HCl: ácido clorhídrico

DMSO: dimetilsulfóxido

PBS: tampón fosfato salino

ng: nanogramo

U: unidades

MMLV: Virus de la Leucemia Murina de Moloney (*Moloney Murine Leukemia Virus*)

Ct: ciclo umbral (*cycle threshold*)

SLA/LP: antígeno soluble del hígado

pANCA: anticuerpos anticitoplasma de los neutrófilos perinuclear

ASGPR: anticuerpos del receptor asialoglicoproteínas

LC-1: anticuerpos citosol hepático tipo 1

AST: aspartato aminotransferasa

ALT: alanino aminotransferasa

IQR: rango intercuartil

ADVP: adicción a drogas vía parenteral

HC VHC: hepatopatía crónica por virus de la hepatitis C

DE: desviación estándar

IC: intervalo de confianza

p: probabilidad

Kg: kilogramo

NS: no significativo

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. SUMMARY	24
2. INTRODUCCIÓN	28
2.1 ESTRUCTURA Y REPLICACIÓN.....	30
2.1.1 Estructura	30
2.1.2 Replicación	33
2.1.3 Replicones subgenómicos	35
2.2 EPIDEMIOLOGÍA.....	38
2.3 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	41
2.3.1 Pruebas serológicas	42
2.3.1.1 Enzimoimmunoanálisis (ELISA)	42
2.3.1.2 Inmunotransferencia con antígenos recombinantes (RIBA)	45
2.3.2 Detección de ARN-VHC.....	46
2.3.2.1 PCR.....	49
2.3.2.2 TMA.....	49
2.3.2.3 bADN.....	50
2.3.3 Detección de antígeno <i>core</i> del virus C	55
2.3.4 Genotipo	56
2.3.5 Biopsia hepática.....	58
2.3.6 Elastografía unidimensional (Fibroscan®)	60
2.4 FIBROSIS HEPÁTICA	63
2.5 CORTICOIDES Y VIRUS C	65
2.6 AZATIOPRINA Y VIRUS C	69
2.7 USO DE CORTICOIDES CON O SIN AZATIOPRINA EN LA HEPATITIS POR VIRUS C.....	70
2.8 INFECCIÓN POR VHC Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES	72
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	78
3.1 HIPÓTESIS.....	78
3.2 OBJETIVOS.....	79
4. MATERIAL Y MÉTODO	82
4.1 OBJETIVO 1: ESTUDIO BIOLÓGICO EN UN MODELO CELULAR DE REPLICÓN DEL VIRUS C.....	82
4.1.1 Cultivos celulares.....	82
4.1.2 Viabilidad celular.....	84
4.1.3 RT-PCR para el análisis de ARN	84
4.1.4 Análisis estadístico	85
4.2 OBJETIVO 2: ESTUDIO CLÍNICO	87
4.2.1 Pacientes	89
4.2.2 Recogida de datos	94
4.2.2.1 Monitorización de los pacientes previamente y tras comenzar tratamiento con corticoides	94
4.2.2.2 Monitorización de los pacientes tras suspender los corticoides	99
4.2.3 Grupo control	101
4.2.4 Análisis estadístico	103

5. RESULTADOS	107
5.1 OBJETIVO 1: ESTUDIO BIOLÓGICO EN UN MODELO CELULAR DE REPLICÓN DEL VIRUS C.....	107
5.1.1 Efecto de la prednisona sobre la replicación del virus C <i>in vitro</i>	108
5.1.2 Efecto de la azatioprina sobre la replicación del virus C <i>in vitro</i>	109
5.2 OBJETIVO 2: ESTUDIO CLÍNICO	114
5.1.1 Datos de los pacientes.....	114
5.1.2 Efecto del tratamiento con corticoides con o sin azatioprina	116
5.2.2.1 Efecto sobre la bioquímica hepática.....	118
5.2.2.2 Efecto sobre el ARN-VHC	121
5.2.2.3 Efecto sobre el IAH de Knodell y la fibrosis hepática	124
5.2.2.4 Análisis del efecto de los corticoides con/sin azatioprina en pacientes con hepatopatía crónica virus C y HAI	131
5.1.3 Efecto de la suspensión de corticoides.....	136
5.2.3.1 Efecto sobre la bioquímica hepática.....	138
5.2.3.2 Efecto sobre el ARN-VHC	141
6. DISCUSIÓN	146
7. CONCLUSIONES	163
8. BIBLIOGRAFÍA	166

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Genoma del VHC: regiones no codificantes, estructurales y no estructurales.....	31
FIGURA 2. Estructura del replicón subgenómico del VHC en comparación con el genoma del VHC	36
FIGURA 3. Esquema de la secuencia temporal de anticuerpos anti-VHC, ARN-VHC y antígeno <i>core</i> del VHC en la infección aguda y en la infección crónica.....	42
FIGURA 4. Representación del genoma del VHC y localización de los antígenos empleados en las distintas pruebas serológicas de ELISA	43
FIGURA 5. Esquema de tratamiento de la hepatitis crónica VHC.....	52
FIGURA 6. Estructura de los replicones subgenómicos VHC Clone A y Ava.5	86
FIGURA 7. Experimento 1: efecto <i>in vitro</i> de IFN+RBV, prednisona y azatioprina.....	110
FIGURA 8. Experimento 2: efecto <i>in vitro</i> de IFN+RBV, prednisona y azatioprina.....	112
FIGURA 9. Comparación del IAH de Knodell antes y durante/después del tratamiento con corticoides con/sin azatioprina.....	125
FIGURA 10. Comparación del estadio de fibrosis antes y durante/después del tratamiento con corticoides con/sin azatioprina en cada paciente.....	126
FIGURA 11. Comparación de la fibrosis en kPa antes y durante/después del tratamiento con corticoides con/sin azatioprina	127

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Conversión de unidades no estandarizadas a UI de ARN-VHC según las distintas técnicas de cuantificación	47
TABLA 2. Métodos diagnósticos moleculares aprobados por la FDA	47
TABLA 3. Técnicas moleculares de detección del ARN-VHC en suero	48
TABLA 4. Aplicaciones prácticas de los marcadores virales	57
TABLA 5. Índice de Actividad Histológica de Knodell.....	59
TABLA 6. Sistema METAVIR	60
Tabla 7. Puntos de corte del FibroScan® para el diagnóstico de fibrosis según el sistema METAVIR.....	61
TABLA 8. Factores asociados/no asociados con la progresión de la fibrosis	64
TABLA 9. Manifestaciones extrahepáticas de la infección crónica por VHC	73
TABLA 10. Prevalencia de infección por VHC en diferentes enfermedades autoinmunes.....	74
TABLA 11. Solvente y concentración final en cultivo	83
TABLA 12. Protocolo de monitorización de los datos analíticos.....	95
TABLA 13. Datos analíticos disponibles según el algoritmo de monitorización	96
TABLA 14. Número de exploraciones disponibles para la comparación de IAH y/o fibrosis de los casos.	98
TABLA 15. Número de pacientes que disponen de datos para valorar efecto de la suspensión de los corticoides con/sin azatioprina	100
TABLA 16. Características basales de los pacientes del estudio (casos) y los pacientes control.....	102
TABLA 17. Experimento 1: Número de ciclos (Ct) que se precisan para detectar ARN a cada concentración.....	111
TABLA 18. Experimento 2: Número de ciclos (Ct) que se precisan para detectar ARN a cada concentración.....	113
TABLA 19. Participación de los distintos grupos de pacientes del estudio en el análisis del efecto de los corticoides con/sin azatioprina.....	116
TABLA 20. Comparación entre AST previa y durante el tratamiento con corticoides con/sin azatioprina	118
TABLA 21. Comparación entre ALT previa y durante el tratamiento con corticoides con/sin azatioprina	118
TABLA 22. Comparación entre el primer valor de AST obtenido durante el tratamiento y los valores posteriores obtenidos durante el tratamiento.....	119
TABLA 23. Comparación entre el primer valor de ALT obtenido durante el tratamiento y los valores posteriores obtenidos durante el tratamiento.....	119
TABLA 24. Comparación entre dos determinaciones de transaminasas del grupo control	120
TABLA 25. Comparación entre ARN-VHC previo y durante el tratamiento con corticoides con/sin azatioprina.....	121
TABLA 26. Comparación entre el primer valor de ARN-VHC obtenido durante el tratamiento y los valores posteriores obtenidos durante el tratamiento	122
TABLA 27. Comparación entre dos determinaciones de ARN-VHC del grupo control	123

TABLA 28. Comparación entre IAH de Knodell antes y durante/después el tratamiento con corticoides con/sin azatioprina	124
TABLA 29. Comparación kPa previos y durante/tras corticoides	127
TABLA 30. Unidades de fibrosis por año en casos y controles	129
TABLA 31. Comparación HAI – no HAI en las transaminasas previas a corticoides con/sin azatioprina	132
TABLA 32. Comparación HAI – no HAI en el ARN-VHC previo a corticoides con/sin azatioprina	132
TABLA 33. Comparación HAI – no HAI en el estadio de fibrosis previo a corticoides con/sin azatioprina	132
TABLA 34. Evolución de AST con corticoides respecto al valor basal en pacientes con/sin HAI	133
TABLA 35. Evolución de ALT con corticoides respecto al valor basal en pacientes con/sin HAI	133
TABLA 36. Evolución de AST durante el tratamiento con corticoides en pacientes con/sin HAI	134
TABLA 37. Evolución de ALT durante el tratamiento con corticoides en pacientes con/sin HAI	134
TABLA 38. Evolución del ARN-VHC con corticoides respecto al valor basal en pacientes con/sin HAI	134
TABLA 39. Evolución del ARN-VHC durante el tratamiento con corticoides en pacientes con/sin HAI	135
TABLA 40. Evolución del estadio de fibrosis con corticoides en pacientes con/sin HAI	135
TABLA 41. Número de pacientes que disponen de datos para valorar el efecto de la suspensión de los corticoides	137
TABLA 42. Evolución de las transaminasas con la suspensión de los corticoides respecto al valor previo al inicio del tratamiento	138
TABLA 43. Evolución de las transaminasas tras menos de 6 meses de la suspensión de corticoides respecto a los valores durante tratamiento	139
TABLA 44. Evolución de las transaminasas tras más de 6 meses de la suspensión de corticoides respecto a valores durante tratamiento	140
TABLA 45. Evolución del ARN-VHC con la suspensión de los corticoides respecto a valores previos al inicio del tratamiento	141
TABLA 46. Evolución del ARN-VHC tras menos de 6 meses de la suspensión de corticoides respecto a valor previo al inicio del tratamiento ...	142
TABLA 47. Evolución del ARN-VHC tras más de 6 meses de la suspensión de corticoides respecto a valores durante tratamiento	142

1. SUMMARY

Background and Aims

There are multiple clinical entities which need long-term, low-dose oral corticosteroids. The prevalence of hepatitis C virus (HCV) infection in general population is high and, therefore, it is not infrequent to use corticosteroids with or without azathioprine in HCV-infected patients for different diseases which sometimes are associated to the virus itself. However, there is no information enough to consider corticosteroids as beneficial or harmful drugs on natural history of chronic hepatitis C.

The aims of this study were: 1) to study the *in vitro* effect of prednisone and azathioprine on HCV replication in a subgenomic replicon; 2) to evaluate the effect *in vivo* (variation in AST, ALT, HCV RNA and liver fibrosis) of low-dose corticosteroids for prolonged time with or without azathioprine in patients with chronic hepatitis C receiving this therapy for other reasons.

Material and Methods

Aim 1: subgenomic replicon Ava.5 and human hepatoma cell line Huh.7 were used. Huh.7 cells harbouring a subgenomic HCV replicon system were cultured with different doses of prednisone, azathioprine and ribavirin plus interferon- α . We measured HCV RNA by reverse transcriptase PCR. β -actin mRNA was quantified and used as an endogenous reference.

Aim 2: retrospective-prospective observational study of 28 patients with chronic hepatitis C treated with corticosteroids at low-doses (≤ 30 mg/day) with or without azathioprine for more than 6 months. AST, ALT, HCV RNA and liver fibrosis were determined, and results were compared with a control group of non-treated chronic hepatitis C patients.

Results

Aim 1: prednisone did not produce any effect on HCV replication while ribavirin plus interferon- α inhibited HCV replication. Azathioprine led to cell death.

Aim 2: mean age was 47.2 ± 10.4 years. 42.9% were male. Mean dose of prednisone was 9.1 ± 4.9 mg/day (range: 2.5 – 30mg/day). Mean treatment time was 76.3 ± 79.6 months (range: 7.4 – 349.4 months). 35.7% received concomitant azathioprine. Transaminases decreased significantly only within the first three months of treatment (AST from 93.7 ± 99.6 to 55.2 ± 42.9 UI/ml, $p=0.006$; ALT from 135.1 ± 149.1 to 82.8 ± 77 UI/ml, $p=0.002$), with non-significant changes thereafter. Corticosteroids led to a non-significant increase in HCV RNA, and a non-significant increase in fibrosis: from 2.11 to 2.25 ($p=0.42$) - mean follow-up 123.6 ± 88 months (range: 22.3 – 329.1 months), as compared to non-treated subjects: from 1.77 to 2.02 ($p = 0.007$) - mean follow-up 21.6 ± 7.9 months (range: 12.2 – 41.6 months). When fibrosis progression was adjusted considering the time between examinations in years, progression was also lower in treated cases (0.054 ± 0.25 units versus 0.196 ± 0.6 units, $p=0.26$).

Conclusion

Corticosteroids *in vitro* did not affect HCV replication. Corticosteroid *in vivo* caused a significant initial decrease in transaminases, non-significant changes in HCV RNA, and a trend to a slower fibrosis progression in comparison to a control group. Therefore, corticosteroids did not accelerate progression of chronic hepatitis C.

2. INTRODUCCIÓN

El virus de la hepatitis C (VHC) fue descubierto en 1989 (1), como principal agente responsable de la hasta entonces denominada hepatitis no A, no B (HNANB) (2-4). Previamente a su identificación, ya se realizaban estudios en cuanto a la eficacia de diferentes tratamientos, principalmente interferón (IFN) y corticoides, sobre pacientes con este tipo de hepatitis.

A partir de su descubrimiento se han ido conociendo su estructura, epidemiología, historia natural y métodos diagnósticos, lo que ha permitido crear sistemas de cribado para evitar su transmisión a través de transfusiones (5). De igual forma se comenzó a investigar sobre aspectos terapéuticos, hasta alcanzar el esquema de tratamiento que combina interferón pegilado (PEG-IFN) y ribavirina (RBV). Este tratamiento, aplicado sobre pacientes *naïve*, obtiene porcentajes de respuesta viral sostenida (RVS) del 42-46% para los genotipos 1 y 4 tratados durante 48 semanas, y del 76-82% para los genotipos 2 y 3 tratados durante 24 semanas (6, 7). Para mejorar estos resultados y minimizar los efectos secundarios y los costes, diferentes estudios analizaron los resultados obtenidos con esquemas terapéuticos más individualizados, en los que según las características del paciente, del virus y de la respuesta al tratamiento, reflejada en la cinética viral, la duración del tratamiento varía entre 12-72 semanas (8-21). Actualmente en pacientes genotipo 1 existe la posibilidad de añadir un tercer fármaco antiviral inhibidor de la proteasa NS3/NS4A, es decir realizar una triple terapia con telaprevir (TVR) o boceprevir (BOC). Este esquema de tratamiento ha aumentado la tasa de RVS, al 67-75% en pacientes *naïve*, 85-97% en recidivantes, 50-55% en respondedores parciales y 30-37% en respondedores nulos, con los inconvenientes de más efectos secundarios, interacciones y un mayor coste económico (22-31). Por lo

tanto su indicación debe considerarse de forma personalizada en cada paciente. El esquema de aplicación de cada tratamiento aparece reflejado posteriormente en la figura 5.

Recientemente se ha descrito que polimorfismos en la región del gen IL28B, que codifican para IFN- λ 3, están significativamente asociados con el aclaramiento espontáneo de la infección aguda por el virus C y con la respuesta a la terapia antiviral. Este es por tanto un dato de gran relevancia clínica, pues permite una estrategia terapéutica más personalizada (32-40).

Además, para optimizar el manejo de pacientes con hepatitis C, resulta esencial conocer el efecto que diferentes tratamientos administrados por enfermedades concomitantes, pueden causar sobre el virus y secundariamente sobre su enfermedad hepática. Sin embargo, son varios los fármacos sobre los que aún desconocemos su influencia real sobre este virus, como es el caso de los corticoides.

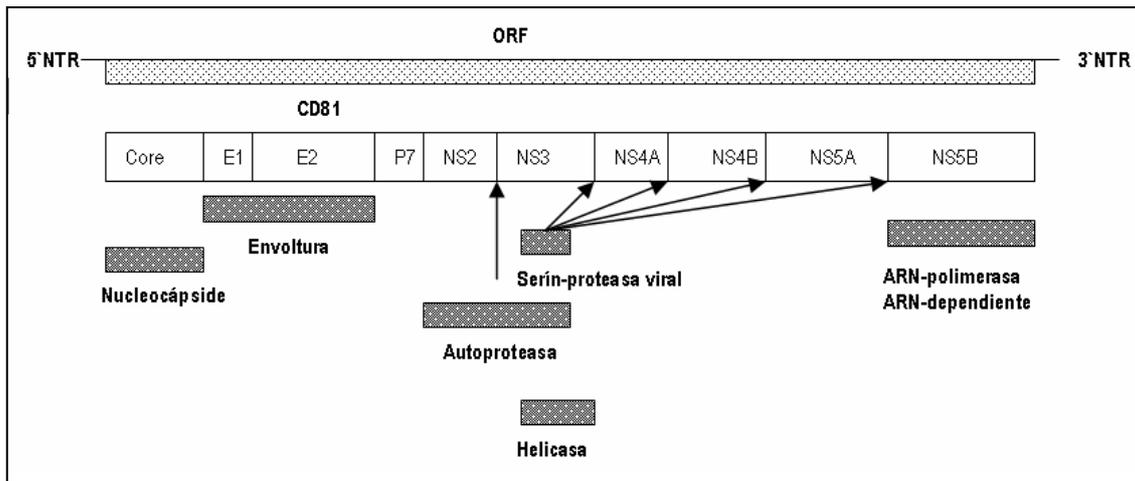
2.1 ESTRUCTURA Y REPLICACIÓN

2.1.1 Estructura

Lo que conocemos actualmente del VHC es que se trata de un virus formado por una cadena positiva de ácido ribonucleico (ARN) rodeada por el *core* (nucleocápside) que, a su vez, está cubierta por dos proteínas de envoltura (E1 y E2). En el interior del virión, la molécula se halla superenrollada y plegada en una estructura terciaria compleja. Se le considera el único representante del género *Hepacivirus* dentro de la familia Flaviviridae (41, 42).

El genoma del VHC tiene un tamaño de 50 a 60nm y contiene alrededor de 9600 nucleótidos con un solo marco de lectura abierto (*open reading frame*, ORF), capaz de codificar un gran polipéptido viral precursor de 3010 a 3033 aminoácidos, variando su longitud de forma leve según el VHC aislado. En el extremo aminoterminal de la región 5' de esta ORF están los genes que codifican las proteínas estructurales: el *core* o nucleocápside [C,p21] y las proteínas de la envoltura 1 [E1, gp31] y de la envoltura 2 [E2, gp70], hipervariables y con capacidad de sufrir mutaciones responsables de la persistencia de los mecanismos de escape a la respuesta inmune (43). En el extremo 3' se sitúan los genes no estructurales (NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a y NS5b), que codifican distintas proteínas. Así vemos que se distinguen en el virus nueve regiones (44, 45) (figura 1).

FIGURA 1. Genoma del VHC: regiones no codificantes, estructurales y no estructurales



ORF: Open Reading Frame; 5'NTR: región terminal 5' no codificante; 3'NTR: región terminal 3' no codificante; Core: proteína del core; E1: glicoproteína E1; E2: glicoproteína E2; NS: proteínas no estructurales.

- Regiones no codificantes: región terminal 5' no codificante (5'NTR) y región terminal 3' no codificante (3'NTR).

La 5'NTR y porciones de la 3'NTR son las partes más conservadas del genoma del VHC y contienen señales para la replicación y la traducción. La 5'NTR de 349 a 352 pares de bases tiene una estructura de ARN secundaria muy compleja, con cuatro estructuras troncales principales y un sitio interno de entrada del ribosoma (*internal ribosome entry*, IRES). Su función es unirse a la subunidad 40S del ribosoma para iniciar la traducción del ARN, por lo tanto se trata de una región esencial para la síntesis de proteínas virales y es probable que también lo sea para la replicación. La 3'NTR está formado por tres zonas: un segmento hipervariable de unos 40 nucleótidos, seguido de una secuencia poli-U/polipirimidinas de tamaño variable, y una región muy conservada adicional que contiene alrededor de 100 nucleótidos. A diferencia de la 5'NTR, la 3'NTR tiene una estructura secundaria muy estable. Al igual que la 5'NTR esta región parece ser esencial para la traducción y la replicación (46, 47).

- Regiones estructurales: proteína del *core* y proteínas de la envoltura.

Son las proteínas que forman parte de la partícula viral. La primera de ellas, la proteína del *core*, una vez madura se une al ARN viral para formar la nucleocápside. Se trata de una proteína muy conservada que interacciona con numerosas proteínas celulares, afectando algunas funciones de la célula hospedadora, como la modulación de la respuesta inmune del huésped y la supresión de la síntesis de proteínas que precede al inicio de la replicación del genoma. Además algunos autores la han asociado con la inducción de esteatosis y de carcinoma hepatocelular (CHC) (48, 49). Esta nucleocápside viral es envuelta por dos glicoproteínas (E1 y E2), que median en la adsorción de los viriones a la membrana celular y en la fusión de las células infectadas.

- Regiones no estructurales: NS2, NS3, NS4, NS5.

La molécula NS2 junto con el primer tercio N-terminal de la NS3 conforman una autoproteasa zinc-dependiente que induce el corte entre NS2 y NS3. La región aminoterminal de NS3 codifica una serín-proteasa viral esencial para el clivaje postraducciona l de los péptidos virales. El extremo carboxiterminal de NS3 funciona como helicasa, importante para desenrollar el ARN viral durante la replicación. NS4b se halla involucrada en el proceso de formación del complejo de replicación viral. La proteína NS5b funciona como ARN-polimerasa ARN-dependiente, mientras que el papel de la proteína NS5a se desconoce, si bien estudios recientes sugieren que pueda desempeñar un papel en la regulación viral de la replicación.

Es decir, NS5 es la ARN-polimerasa, mientras que las otras tres (NS2, NS3, NS4), son enzimas que participan en la replicación del genoma y en el procesamiento de la poliproteína que resulta de su transcripción (50, 51).

La investigación de nuevas terapias antivirales tienen como dianas principales la NS3 serín-proteasa y la NS5b ARN-polimerasa, dado su papel fundamental en la replicación del virus.

2.1.2 Replicación

El VHC se replica fundamentalmente en los hepatocitos, pero puede también replicarse en células mononucleares sanguíneas periféricas (CMSP) (52, 53). Esto sugiere la existencia de fuentes extrahepáticas del virus durante la infección persistente.

Los estudios de la cinética del VHC en pacientes han mostrado que el recambio del virus es rápido, con alta producción de virus *in vivo* en el orden de 10^{10} - 10^{12} viriones por día. Estas altas tasas de recambio pueden explicar la rápida aparición de diversidad viral en pacientes con infección crónica y la frecuente persistencia de la infección, debido al escape inmunológico, después de la exposición aguda.

Los acontecimientos iniciales de la unión del virus a la superficie del hepatocito aún se conocen escasamente. Se sabe que el mecanismo de entrada del VHC en la célula es tanto clathrin (54), como pH dependiente (55, 56). Y se han propuesto receptores celulares diferentes para el VHC, entre los que destacan las lipoproteínas de baja densidad y el receptor de membrana celular CD81 (57). Esta es una proteína de la superficie celular llamada tetraspanina que tiene cuatro cadenas (dos extracelulares y dos intracelulares)

y se expresa en la mayor parte de las células humanas, excepto en los glóbulos rojos y en las plaquetas. Se ha demostrado que la proteína E2 de la envoltura del VHC se une de forma específica con CD81, lo que sugiere que CD81 podría ser el receptor del VHC. Posteriormente, las partículas penetran en la célula por un proceso de endocitosis en el que la fusión de las membranas podría estar mediada por la gp37 (E1).

Tras alcanzar el citoplasma, el ARN viral es traducido por los ribosomas, proceso mediado por la acción de IRES y de secuencias situadas en el extremo 5' NTR. Como se menciona previamente, el resultado de la traducción es una polipoproteína precursora de 3000 aminoácidos, cuyo procesamiento es efectuado por proteinasas y señalasas celulares, por NS 2-3 proteinasa y NS 3-4a proteasa presentes en el precursor y por la serín-proteasa viral (p72). El procesamiento comienza en el extremo N-terminal con la acción de los enzimas celulares, que liberan primero las proteínas estructurales y la proteína p7, y a continuación las proteínas no estructurales.

Los productos derivados de este proceso se asocian a las membranas del retículo endoplásmico formando el complejo replicativo típico de los virus ARN de sentido positivo. La ARN-polimerasa viral (p70) es el componente clave para la replicación del genoma, que sucede a través de un ARN intermediario en sentido negativo que sirve como molde para la síntesis de las nuevas copias del genoma.

La ausencia de sistemas *in vitro* capaces de generar cantidades significativas de viriones completos, limita mucho nuestros conocimientos sobre los procesos de ensamblaje, maduración y liberación de las partículas víricas. Algunos datos sugieren que el ensamblaje comienza con la interacción entre la

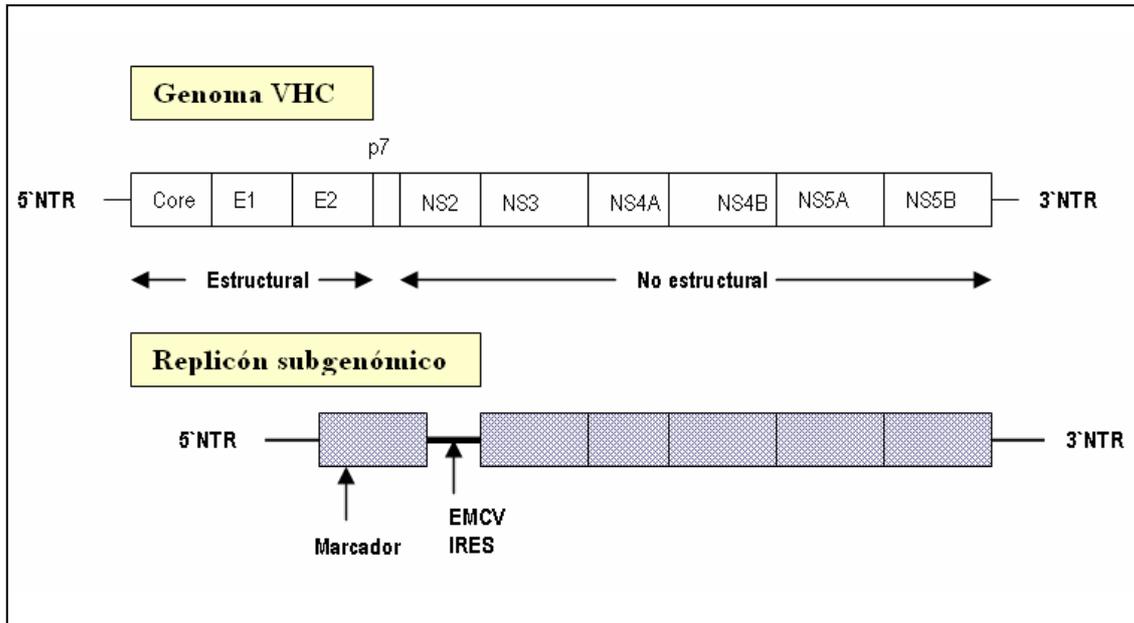
proteína del *core* y el extremo 5'NTR del ARN viral, que induciría el empaquetamiento de la cadena positiva e inhibiría la funcionalidad del IRES, cesando así la síntesis de proteínas. Asimismo, las moléculas de la proteína del *core* interaccionarían entre sí a través del extremo N-terminal, formando la cápside en torno al genoma empaquetado. Paralelamente, las proteínas E1 y E2 se retendrían en la luz de las cisternas del retículo endoplásmico y la maduración de las partículas se produciría al brotar las nucleocápsides hacia el interior, adquiriendo de esta manera la envuelta. Las partículas completas se exportarían fuera de la célula por tránsito a través del aparato de Golgi, aunque lo cierto es que el VHC muestra una fuerte tendencia a permanecer asociado a componentes celulares.

2.1.3 Replicones subgenómicos

La ausencia de un sistema de cultivo eficiente del virus para su estudio *in vitro*, ha obligado a buscar alternativas, como son los virus replicones, capaces de amplificar ARN pero no de producir virus maduros (58).

Los replicones subgenómicos contienen sólo las proteínas no estructurales del virus para la replicación del ARN, un gen (como son el gen de la neomicina fosfotransferasa o el gen de la luciferasa) que permiten la detección de la replicación en las células transfectadas, y a continuación la región del IRES del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) para poder dirigir la transcripción de las proteínas no estructurales del replicón (59) (figura 2).

FIGURA 2. Estructura del replicón subgenómico del VHC en comparación con el genoma del VHC



Core: proteína del *core*; E1: glicoproteína E1; E2: glicoproteína E2; NS: proteínas no estructurales; NTR: región no codificante; IRES: sitio interno de entrada del ribosoma; EMCV: virus de la encefalomiocarditis.

El sistema replicón se basa por lo tanto en la replicación autónoma de un minigenoma VHC genéticamente manipulado, y que tras su transfección a células de hepatoma humano Huh-7 se ha comprobado que es capaz de producir ARN y proteínas (58, 60-62).

Este tipo de ARN subgenómico puede generarse en cantidades prácticamente ilimitadas y en él se pueden introducir modificaciones para el análisis genético de diversas funciones esenciales del ciclo biológico del virus. Así este sistema ha proporcionado un modelo sobre el que poder estudiar tanto el mecanismo de replicación viral, como la influencia que pueden ocasionar diferentes agentes terapéuticos sobre la replicación (63).

La primera generación de replicones VHC se basó en clones del genotipo 1b. Posteriormente se han realizado trabajos de replicones originados

de los genotipos 1a y 2a (64, 65), lo que permite el estudio de sistemas de replicación específicos de genotipos.

2.2 EPIDEMIOLOGÍA

La hepatitis por virus C afecta a más de 100 millones de personas en el mundo (66) y en la actualidad es la principal causa de hepatopatía crónica (67), cirrosis, CHC (45, 68) y trasplante hepático (TH) (69, 70). Dada la alta tasa de infecciones hasta su descubrimiento en 1989, se estima que en los próximos años, la mortalidad causada por este virus se incrementará dos o tres veces (67). Además, un estudio realizado en EE.UU por Wong y colaboradores, estima que durante los años del periodo comprendido entre 2010 y 2019 el coste del tratamiento de la patología producida por el VHC se encontraría en el rango de los 6,5 – 13,6 mil millones de dólares (71). Otros trabajos realizados en EE.UU (72) y Francia (73), corroboran una situación epidémica y de alto coste similar.

Aunque se trata de una enfermedad extendida mundialmente, existe una gran variabilidad geográfica en su distribución. Los países con mayor prevalencia se encuentran en África y Asia (66). En España, los estudios realizados en diferentes grupos poblacionales, sitúan la prevalencia de la infección por VHC entre el 1% y el 2,5% (66, 74-76).

En EE.UU se ha descrito una mayor prevalencia en personas entre los 30 y los 49 años y un ligero predominio en varones (3, 70, 77). Mientras que en el Sur de Europa, la mayor prevalencia se ha detectado en el grupo de edad de mayores de 65 años (74).

Se han descubierto seis genotipos mayores y múltiples subtipos del VHC en base a aspectos moleculares (78). El genotipo 1 es el más frecuente, representando aproximadamente el 40-80% de la población mundial (79), pero la distribución de los genotipos varía principalmente según el área geográfica,

pero también según la edad del afectado y los factores de riesgo asociados (80, 81). En EE.UU el 70-75% de los pacientes con VHC son genotipo 1; representando los genotipos 2 y 3 prácticamente el resto de casos. En Europa y Japón, el genotipo 1 sigue siendo el más frecuente, pero la prevalencia de los genotipos 2 y 3 es más elevada que en EE.UU. El genotipo 4 es el más común en Egipto y varias áreas del Medio Este. El genotipo 5 se encuentra principalmente en Sudáfrica y el 6 en Hong Kong y otras áreas del Sudeste asiático.

La influencia de cada una de las vías de transmisión del virus, se modificó desde el descubrimiento del VHC, y la aplicación sistemática de controles serológicos en los donantes, ya que esto produjo un claro descenso en el número de casos transmitidos a través de transfusiones sanguíneas. Por lo tanto, esta vía de contagio, que anteriormente era la principal, pasó a ocupar un lugar marginal entre los factores de riesgo de infección, al igual que el uso de material contaminado, excepto en países en vías de desarrollo, donde no se llevan a cabo técnicas de esterilidad y cribado adecuadas (66). En la actualidad la vía de transmisión predominante es el uso de drogas, principalmente las de vía parenteral, pero no de forma exclusiva; y en menor medida, la transmisión nosocomial (82), habiéndose descrito casos de transmisión durante procedimientos médicos técnicos como la colonoscopia (83), la diálisis (84), y la inadecuada manipulación de catéteres endovenosos durante procedimientos anestésicos (85), así como durante intervenciones quirúrgicas, en las que se ha descrito el contagio médico-paciente (86). Se han documentado otras vías de transmisión poco frecuentes, como son la sexual, ocupacional y vertical (3, 45, 87), cuyo riesgo de transmisión se incrementa en caso de coinfección por virus

de la inmunodeficiencia humana (VIH), tanto para la vía sexual, como para la vertical (88).

Por lo tanto, los hechos que han precipitado principalmente en los últimos años un cambio epidemiológico en la infección por virus C, son un control de seguridad más óptimo en las transfusiones sanguíneas, una mejora en las condiciones de profilaxis sanitarias, una expansión en el uso de drogas vía parenteral y los cambios migratorios (74).

Sin embargo, a pesar de que cada vez existe un mejor conocimiento del VHC, aún hay casos en los que no se han identificado factores de riesgo (89).

2.3 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

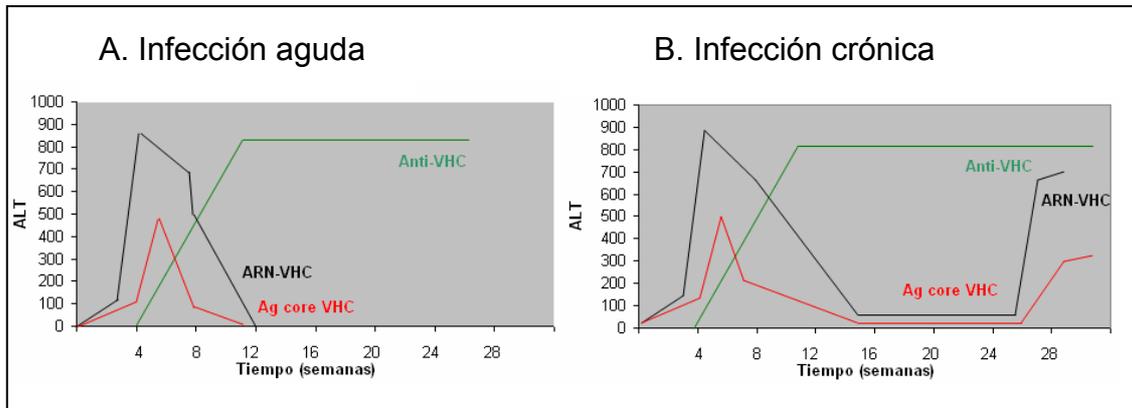
El diagnóstico de la hepatitis crónica por virus C se basa en pruebas serológicas, basadas en la detección de anticuerpos específicos contra el VHC y moleculares, basadas en la detección del ARN-VHC. Otras pruebas, como la determinación del genotipo y la realización de la biopsia hepática o elastografía unidimensional (FibroScan®, Echosens, París, Francia), aportan información del pronóstico y de la respuesta al tratamiento (45).

La aplicación progresiva de estas pruebas diagnósticas permitió determinar que la infección por VHC era la principal causa de la HNANB (90, 91) y empleadas como método de cribado en los donantes de sangre, hicieron disminuir drásticamente las cifras de HNANB postransfusionales (2).

En cuanto a la hepatitis aguda por virus C la respuesta humoral con inmunoglobulinas IgM no es exclusiva de la primoinfección, ya que se detectan anticuerpos IgM en el 50-93% de los pacientes con infección aguda y en el 50-70% de los pacientes con hepatopatía crónica. Por ello, este marcador es ineficaz tanto en el diagnóstico precoz de la infección aguda, como en la diferenciación entre infección aguda y crónica por el VHC (92), por lo que la evolución nos dirá si se trata de uno de los casos dentro del 15% de las infecciones que no se cronifican (67, 93), en cuyo caso se negativizará espontáneamente el ARN-VHC.

En la figura 3 se observa el comportamiento en el tiempo de los anticuerpos frente VHC (anti-VHC), ARN-VHC y antígeno *core* (los cuales se explican a continuación), según se trate de una infección aguda o crónica.

FIGURA 3. Esquema de la secuencia temporal de anticuerpos anti-VHC, ARN-VHC y antígeno *core* del VHC en la infección aguda y en la infección crónica



2.3.1 Pruebas serológicas

Se trata del primero escalón en el algoritmo diagnóstico del estudio de pacientes con sospecha de infección por el VHC, dada su simplicidad, bajo coste y su adecuada sensibilidad.

Se basan en la detección de anticuerpos dirigidos frente a diferentes antígenos estructurales y no estructurales del VHC. En los pacientes con resolución espontánea de la infección, los anticuerpos pueden ser detectables durante toda la vida, o ir disminuyendo gradualmente, hasta hacerse indetectables (94). En los pacientes con evolución hacia la cronicidad, los anticuerpos podrán ser detectados de forma indefinida durante toda la vida, aunque podrían ser indetectables en caso de inmunodepresión marcada. Existen dos tipos de técnicas:

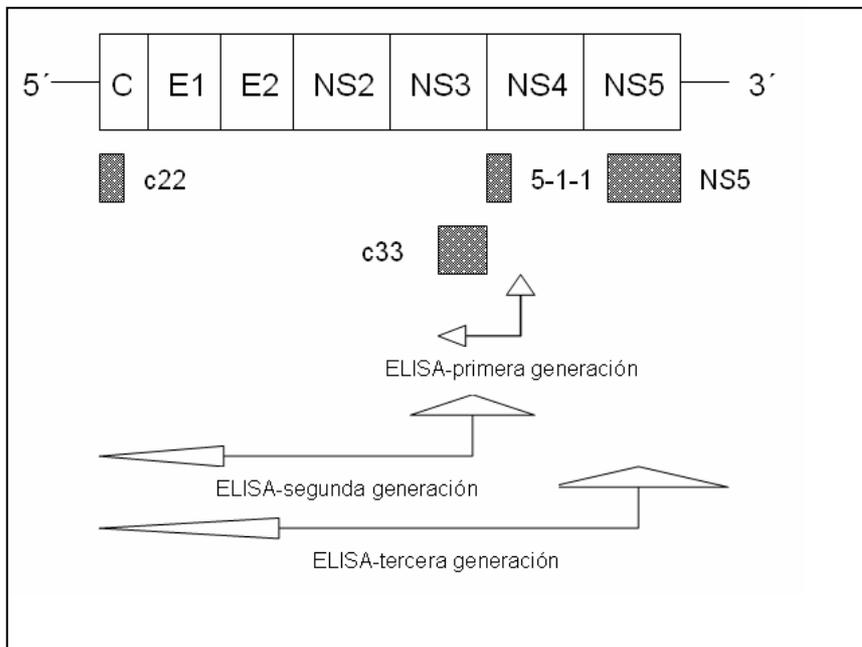
2.3.1.1 Enzimoimmunoanálisis (ELISA)

Se han desarrollado tres técnicas basadas en el ELISA, que incorporan antígenos recombinantes (obtenidos por ingeniería genética) o péptidos sintéticos (mediante síntesis química) del VHC, que son fijados a micropocillos

de una microplaca. Este formato permite la unión específica de anticuerpos séricos, para una posterior detección mediante una reacción enzimo-colorimétrica. Es sencillo de realizar, parcial o totalmente automático y fácilmente disponible (95).

La figura 4 muestra una representación esquemática del genoma del VHC, señalizándose la localización de los antígenos contra los que aparecen los anticuerpos que se detectan en estas pruebas serológicas.

FIGURA 4. Representación del genoma del VHC y localización de los antígenos empleados en las distintas pruebas serológicas de ELISA



2.3.1.1a.- ELISA de primera generación: estudiado en 1990, detecta anticuerpos frente al producto del clon 5-1-1, un antígeno denominado C100-3 correspondiente a la región genómica no estructural NS4 del VHC (2, 50). En 1991 se comprobó que con la aplicación de cribado con ELISA de primera generación en los donantes, disminuía la incidencia de HANANB postransfusional (5).

2.3.1.1b.- ELISA de segunda generación: incluye proteínas recombinantes derivadas de *core* y de la región no estructural NS3.

Este método aporta un incremento significativo de la sensibilidad y especificidad, frente al método de ELISA-1 (en una población de alto riesgo presenta una sensibilidad mayor del 95%, frente al 70-80% y un valor predictivo positivo del 88-95% frente al 70-85%) y reduce el periodo ventana serológico (10 semanas frente a 16) (96), detectando por lo tanto un mayor número de hepatitis agudas y la mayoría de las crónicas.

2.3.1.1c.- ELISA de tercera generación: disponible desde 1995, incorpora un nuevo péptido de la región NS5 codificado por la región no estructural del mismo nombre del genoma vírico. Presenta un periodo ventana serológico de 2-3 semanas y una ligera mayor especificidad en los donantes de sangre (96), por lo que este método se utiliza para cribado diagnóstico en los Bancos de Sangre, habiendo demostrado gran eficacia en la prevención de la transmisión del VHC a los receptores de transfusiones, de modo que en EE.UU el riesgo de transmisión a través de transfusiones para pacientes con anticuerpos anti-VHC negativos es menor de 1 de cada 103.000 unidades de sangre transfundidas (97), el cual disminuye con la aplicación de métodos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) si el resultado es positivo (98).

Son más probables los resultados falsamente positivos en las pruebas de ELISA de primera generación, pero también pueden producirse en las versiones más recientes, principalmente en caso de que se apliquen a una población con baja prevalencia de infección por VHC. Estos resultados falsos positivos, pueden obtenerse al tener lugar interacciones inespecíficas entre Ig

séricas y antígenos del VHC empleados en las pruebas serológicas (como en pacientes con enfermedades autoinmunes y anticuerpos circulantes) (99), o en caso de resolución espontánea de la infección. Los pacientes inmunodeprimidos, dada su dificultad para producir anticuerpos, suelen tener resultados falsamente negativos, como en coinfectados por VIH, receptores de trasplantes sometidos a medicación inmunosupresora y pacientes con insuficiencia renal crónica en hemodiálisis (100).

2.3.1.2 Inmunotransferencia con antígenos recombinantes (RIBA)

Es un inmunoblot que detecta los mismos anticuerpos frente a los mismos antígenos estructurales y no estructurales del VHC, pero las proteínas recombinantes están fijadas en tiras de nitrocelulosa, a las que se adhieren los anticuerpos. Al unirse los anticuerpos al antígeno, aparece en la tira una banda que varía de posición en función de cada antígeno. Se considera que la prueba es positiva si se detecta reactividad frente a dos o más bandas, indeterminada si sólo una banda es reactiva y negativa cuando no existe reactividad para ninguna banda.

Se creó como una prueba más específica, utilizada para confirmar un resultado positivo del ELISA (95, 101). Pero se encuentra en desuso, dada la alta especificidad de la prueba de ELISA de tercera generación (102) y debido a la elevada disponibilidad de los métodos de detección de ARN-VHC como prueba de confirmación diagnóstica. Así en la actualidad, sólo tiene utilidad para diferenciar, en caso de pacientes con ELISA positivo y ARN negativo, entre un falso positivo, en los que el RIBA también sería negativo, y una infección resuelta, en los que el RIBA sería positivo. Pero este aspecto

raramente es relevante en la práctica clínica, por lo que no suele ser necesario (103).

2.3.2 Detección de ARN-VHC

La infección activa se define por la presencia de ARN-VHC que puede detectarse entre la primera y la tercera semanas después de la exposición aguda. Durante la infección crónica los niveles de ARN son muy estables y no se correlacionan con la gravedad de la lesión hepática (104, 105).

Se han desarrollado varias técnicas de biología molecular que detectan el ARN-VHC en suero o plasma, inicialmente tan solo cualitativas, pero gracias al desarrollo de métodos como el sistema “branched ADN” (bADN) de amplificación de la señal mediante sondas de ácido desoxirribonucleico (ADN) ramificado, se comenzó a cuantificar el ARN-VHC de los pacientes infectados. De forma independiente fueron proliferando distintas pruebas para medir el ARN-VHC, con diferente sensibilidad y especificidad, que en ausencia de estandarización y protocolos, produjo que con el análisis de la misma muestra de sangre por diferentes laboratorios se obtuvieran resultados dispares. Por ello se estableció la aplicación de unidades internacionales (UI) estandarizadas y la aprobación de varios test virológicos por la U.S. Food and Drug Administration (FDA), lo que proporcionó al cabo de unos años una homogeneidad y reproducibilidad en los resultados de la cuantificación del VHC (106, 107), como la que existe actualmente.

La tabla 1 muestra la conversión de la carga viral según las diferentes técnicas cuantitativas, previas a la estandarización en UI (95) y la tabla 2 los métodos diagnósticos moleculares aprobados por la FDA hasta la actualidad

(108). El 25 de junio de 2010, la FDA aprobó el empleo de *OraQuick VHC Rapid Antibody Test (OraSure technologies, Inc)*, una prueba diagnóstica que se aplica a pacientes mayores de 15 años con factores de riesgo o con síntomas o signos de infección por hepatitis C, que permite obtener el resultado en 20 minutos. Su uso como cribado en la población general no está aprobado (109).

TABLA 1. Conversión de unidades no estandarizadas a UI de ARN-VHC según las distintas técnicas de cuantificación

TÉCNICA*	CONVERSIÓN 1 UI/ml
Amplicor VHC V.2.0	0,9 copias/ml
Cobas amplicor VHC V.2.0	2,7 copias/ml
Versant ARN VHC V.3.0	5,2 copias/ml
LCx ARN VHC	3,8 copias/ml
SuperQuant	3,4 copias/ml

Tabla adaptada de Pawlotsky (95).

*Amplicor VHC Monitor versión 2.0 y Cobas Amplicor Monitor VHC versión 2.0 (Roche Molecular System, Branchburg, NJ); Versant ARN VHC versión 3.0 (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY); LCx ARN VHC (Abbott Diagnostics, Chicago, IL); SuperQuant (National Genetics Institute, Los Ángeles, CA).

TABLA 2. Métodos diagnósticos moleculares aprobados por la FDA

- SuperQuant (National Genetics Institute, Los Ángeles, CA)
- COBAS AmpliScreen VHC Test (Roche Molecular Systems, Inc)
- Procleix VIH-1/VHC Assay (Gen-Probe, Inc)
- Versant TMA (GenProbe, Inc)
- RT-PCR VHC (BioLife PlasmaServices, L.P)

Metodología para la determinación del ARN-VHC:

La cantidad de ARN circulante en suero es limitada, por lo que para su detección es necesario emplear técnicas de amplificación del ácido nucleico (TAN). Dentro de estas diferenciamos las que se basan en la amplificación genómica, como son la PCR y la transcripción mediada por amplificación (TMA), que son sistemas para amplificar la diana; y las que se basan en la amplificación de la señal, como el sistema bADN de amplificación de la señal mediante sondas de ADN ramificado.

En la tabla 3 aparecen los métodos de detección del ARN-VHC existentes y el rango dinámico de cada una de las técnicas (95, 110).

TABLA 3. Técnicas moleculares de detección del ARN-VHC en suero

TÉCNICA*	MÉTODO	LÍMITE INFERIOR DE DETECCIÓN (UI/ml)	LÍMITE SUPERIOR DE DETECCIÓN (UI/ml)
Técnicas cualitativas			
Amplicor VHC v.2.0	RT-PCR manual	50	No aplicable
Versant	TMA	10	No aplicable
Técnicas cuantitativas			
Cobas Amplicor VHC Monitor v.2.0	RT-PCR semiautomático	600	$8,5 \times 10^5$
Versant ARN VHC v.3.0	bADN semiautomático	615	$7,7 \times 10^6$
LCx ARN VHC	RT-PCR semiautomático	25	$2,63 \times 10^6$
SuperQuant	RT-PCR semiautomático	2	2×10^6
Taq48	RT-PCR	10	7×10^6

Tabla adaptada de Pawlotsky (95) y Ferreira-González (110)

*Amplicor VHC versión 2.0, Cobas Amplicor VHC Monitor VHC versión 2.0 y Taq48 (Roche Molecular System, Branchburg, NJ); Versant TMA (GenProbe); Versant ARN VHC versión 3.0 (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY); LCx ARN VHC (Abbott Diagnostics, Chicago, IL); SuperQuant (National Genetics Institute, Los Ángeles, CA).

2.3.2.1 PCR

Se emplean diferentes temperaturas y un enzima ADN-polimerasa termoestable.

- a. **PCR con sistema de transcriptasa inversa:** al ser el VHC un virus ARN, primero debe realizarse una retrotranscripción, convirtiéndose el ARN en ADN complementario (ADNc). Después se amplifica un fragmento de ADN que queda delimitado entre 2 cebadores, que son secuencias del ácido nucleico diana previamente seleccionado.
- b. **PCR en tiempo real (RT-PCR):** a diferencia de la PCR clásica, en la que el producto amplificado es detectado al final de la reacción tras un número de ciclos fijos, en la RT-PCR el producto se detecta a medida que se va produciendo cada ciclo. Para ello se intercala una sonda de ADNc a la secuencia problema que se marca con un fluorocromo. Según se producen los ciclos, aumenta la cantidad de fluorescencia.

2.3.2.2 TMA

Se trata de un método de amplificación isotérmica basada en la transcripción.

Se basa en la amplificación de secuencias de ARN mediante la síntesis de ADNc y ARN, utilizando una mezcla enzimática compuesta por una transcriptasa reversa y una enzima con actividad ADN-polimerasa. Es un proceso secuencial, de modo que las nuevas hebras de ARN se transcriben de nuevo a ADNc, del que se obtienen más ARN (111).

2.3.2.3 bADN

Consiste en la hibridación de una secuencia específica del ARN a una sonda de oligonucleótidos complementaria a la secuencia diana, que se encuentra fijada a un soporte sólido. La estrategia de detección del producto hibridado se basa en la unión de sondas de detección marcadas enzimáticamente con las que reaccionará posteriormente un sustrato para dar lugar a una reacción quimioluminiscente cuya intensidad es proporcional al ARN de la muestra.

El sistema bADN es técnicamente más sencillo, posee una menor variabilidad y menor posibilidad de contaminación, sin embargo su sensibilidad es menor, detectando 200×10^3 Eq genomas/ml, frente a las 100-1000 copias/ml de la PCR (10-30% de los pacientes con ARN-VHC positivo por PCR tienen ARN-VHC indetectable en bADN) (112).

Por lo tanto, dada la elevada sensibilidad y reproducibilidad de la PCR, es el método cuantitativo de elección, especialmente la que permite detectar como mínimo 50 UI/ml (113). La técnica de referencia actualmente es la RT-PCR, con un límite inferior de detección de ARN-VHC de 10 UI/ml. Como se ha dicho anteriormente, en esta técnica los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior, variando el tiempo de reacción desde 30 minutos a 2 horas, según el equipo empleado; mientras que en la PCR convencional, tras la extracción y purificación de los ácidos nucleicos del virus de la muestra biológica, se amplifica un segmento seleccionado del genoma mediante PCR y posteriormente se lleva a cabo la detección de los fragmentos amplificados en

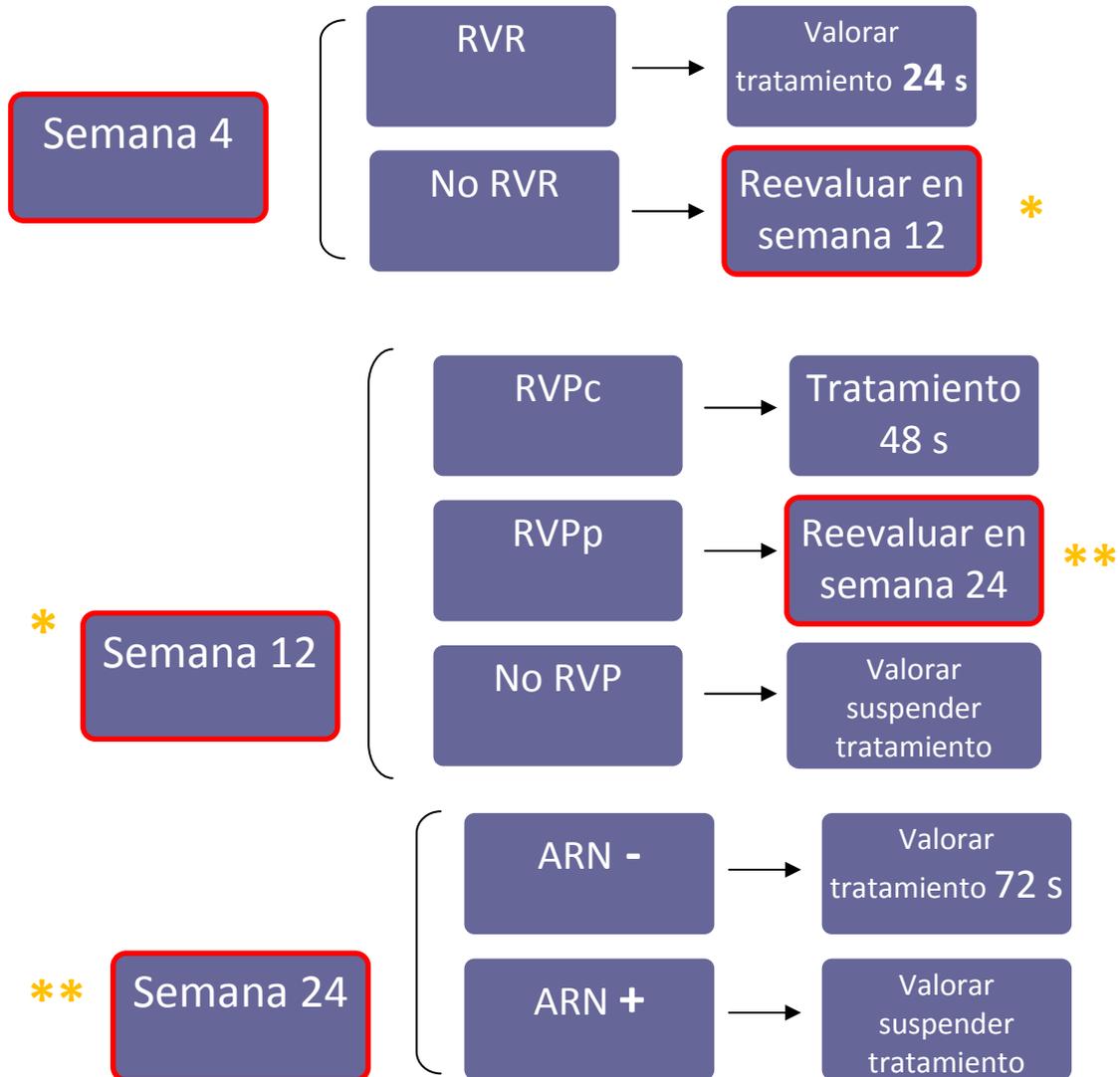
la PCR (amplicones), con una duración aproximada de este procedimiento de 24 horas.

De esta forma se obtienen las principales ventajas de la RT-PCR frente a la convencional, que son su rapidez, puesto que no necesita ningún proceso adicional de detección, su mayor sensibilidad, la disminución del riesgo de contaminación, por el empleo de sistemas cerrados, y su sencillez y precisión (114).

Estos sistemas de detección del ARN-VHC se emplean para confirmar la infección por VHC después de hallar un resultado positivo en una prueba de anticuerpos, como es el caso de pacientes con sospecha epidemiológica, clínica o analítica de infección, o en cribado de donantes de sangre (obligatorio desde la publicación del Boletín Oficial del Estado (BOE) del 20 de septiembre de 2005) (115), y como análisis cuantitativo de la viremia. Para este segundo objetivo se determina antes, durante y tras el tratamiento, constituyendo una herramienta fundamental para evaluar la respuesta al mismo (105) (figura 5), pues el ARN-VHC no varía a lo largo del tiempo de evolución de la enfermedad y no se correlaciona con la severidad de la inflamación hepática ni el estadio de fibrosis, pero sus cambios son de gran importancia como factor predictivo de la respuesta viral al tratamiento antiviral o para analizar la influencia, positiva o negativa, de otros fármacos sobre la infección (110), como es el objetivo de la presente Tesis Doctoral.

FIGURA 5. Esquema de tratamiento de la hepatitis crónica VHC

FIGURA 5A. Tratamiento con PEG-IFN y RBV según genotipo y cinética viral (8-21, 29)

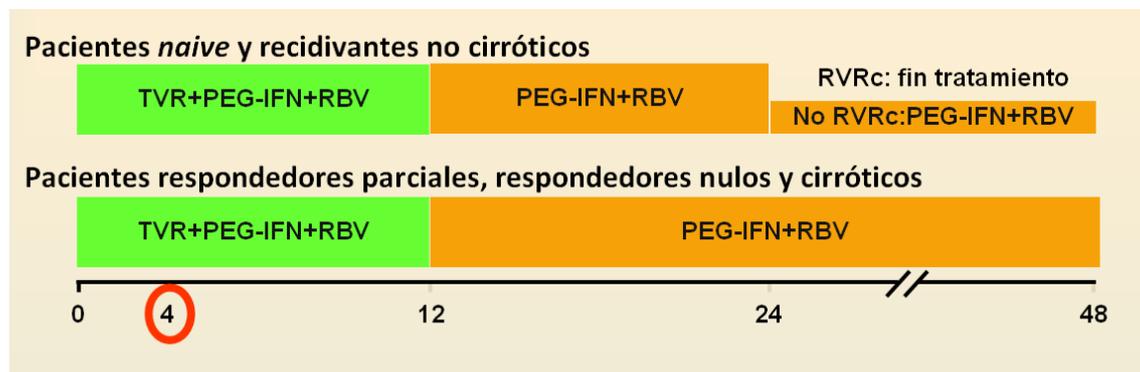
Genotipos 1 y 4. Esquema general: PEG-IFN+RBV 48 semanas**Genotipos 2 y 3. Esquema general: PEG-IFN+RBV 24 semanas**

Suspender tratamiento en cualquier genotipo: si carga viral disminuye menos de 2 \log_{10} IU/ml en la semana 12 o no es negativa en la semana 24.

(RVR: respuesta viral rápida, es decir negativización de la carga viral en la semana 4 de tratamiento; RVPc: respuesta viral precoz completa, es decir negativización de la carga viral en la semana 12 de tratamiento; RVPp: respuesta viral precoz parcial, es decir disminución de la carga viral al menos 2 \log_{10} IU/ml en la semana 12 de tratamiento; ARN: ácido ribonucleico).

FIGURA 5B. Esquema de tratamiento de la hepatitis crónica VHC genotipo 1 con triple terapia (PEG-IFN+RBV+inhibidor de las proteasas)

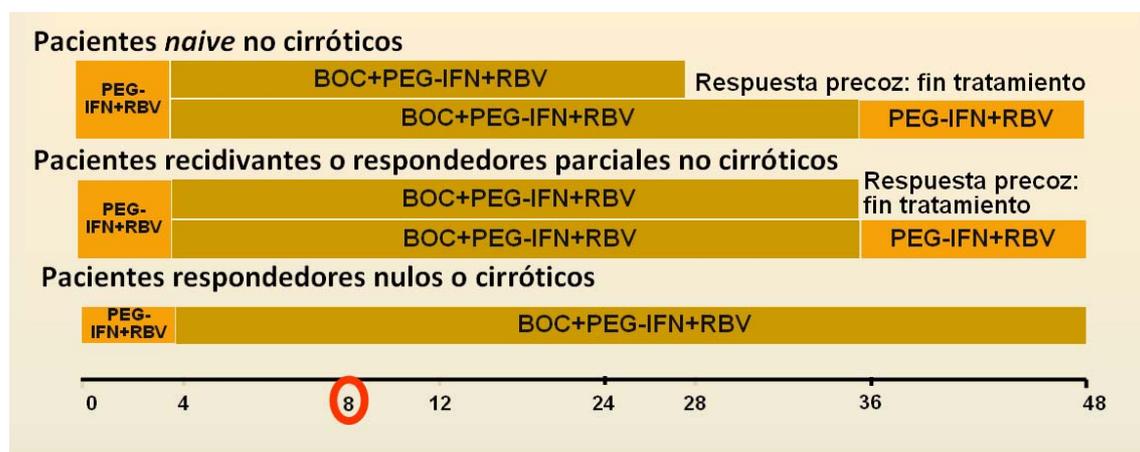
1B.1. Telaprevir (22, 24, 26, 29, 116)



Reglas para suspender tratamiento:

- Semana 4 ó 12. ARN-VHC > 1000 UI/ml: suspender todo el tratamiento
- Semana 24. ARN-VHC detectable: suspender PEG-IFN+RBV
- Cualquier semana. Suspensión de PEG-IFN+RBV por cualquier motivo: suspender TVR

1B.2. Boceprevir (26-29)



*La Agencia Española del Medicamento recomienda tratamiento con dosis fijas para todos los no respondedores: *lead in* 4 semanas + 12 semanas BOC+PEG-IFN+RBV + 12 semanas PEG-IFN+RBV

Reglas para suspender tratamiento:

- Semana 12. ARN-VHC > 100 UI/ml: suspender todo el tratamiento
- Semana 24. ARN-VHC detectable: suspender todo el tratamiento
- Cualquier semana. Suspensión de PEG-IFN+RBV por cualquier motivo: suspender BOC

(TVR: telaprevir; PEG-IFN: interferón pegilado; RBV: ribavirina, BOC: boceprevir; RVRc: respuesta viral rápida completa, evaluada en la semana 4 con telaprevir; respuesta precoz, evaluada en la semana 8 con boceprevir; ARN: ácido ribonucleico)

Además es de utilidad, su forma cuantitativa como cualitativa, para el diagnóstico precoz de la hepatitis aguda C en la fase de periodo ventana serológico, pues el ARN-VHC se identifica de forma más precoz que los anticuerpos, así como para la infección perinatal por VHC y para el diagnóstico de la infección crónica en pacientes con serología negativa (infrecuente, pero posible en pacientes con inmunodepresión grave).

Diversos estudios han comparado diferentes técnicas moleculares para analizar si existen variaciones en la determinación de la carga viral en un mismo paciente, según el método empleado. Este aspecto se ha desarrollado comparando por genotipos, ya que la estandarización a UI y la calibración de la sensibilidad de las pruebas se efectuó en base al genotipo 1a (106, 107). En el estudio de Vermehren y colaboradores, se comparan dos técnicas de PCR (RealTime VHC y CAP/CTM) y una técnica de bADN, observando que al comparar RealTime VHC y bADN existe una muy buena correlación para todos los genotipos (pues las variaciones están por debajo de $\pm 0,3 \log_{10}$ UI/ml), pero al comparar RealTime VHC con CAP/CTM o bADN con CAP/CTM, existe una buena concordancia para los genotipos 2, 3 y 5, pero no para 1 y 4 (117). Estos resultados son similares a los obtenidos en otros trabajos, en los en el genotipo 1 la cuantificación al aplicar CAP/CTM era mayor que la obtenida con bADN y RealTime VHC, con una diferencia de 0,5 a 0,7 \log_{10} UI/ml (118, 119); si bien en la publicación del grupo de Chevaliez se obtuvo una sobreestimación similar de 0,6 \log_{10} UI/ml, pero en todos los genotipos (120).

Por lo tanto, si se emplean distintas pruebas virológicas para la cuantificación de ARN, modificaciones entre 0,5 a 0,7 \log_{10} UI/ml pueden deberse a variaciones de la técnica y no a cambios reales en la cuantificación

del ARN-VHC. Así, en caso de ser técnicamente posible, en un mismo paciente, se recomienda emplear a lo largo del tratamiento antiviral el mismo sistema para la medición de la carga viral. Sin embargo, incluso empleando la misma técnica variaciones inferiores a $0,5 \log_{10}$ UI/ml no deben tenerse en cuenta, pues pueden deberse a la variabilidad intrínseca del método. De este modo, de forma global, se consideran significativos cambios mayores a $1 \log_{10}$ UI/ml.

2.3.3 Detección de antígeno core del virus C

El nivel de antígeno (expresado en picogramos/ml) es un marcador indirecto de la replicación del VHC que se correlaciona adecuadamente con el ARN circulante, estimando que 1 pg de antígeno equivale a un promedio de 8000 UI de ARN, aunque esta relación es muy variable entre pacientes (121). Es una técnica sencilla, específica, precisa, reproducible e independiente del genotipo, pero con una menor sensibilidad respecto a las técnicas moleculares directas. El primer sistema que se creó de detección de antígeno *core* del virus C (trak-C, Ortho Clinical Diagnostics), tiene un límite de detección de ARN de aproximadamente 20.000 UI/ml (105, 110, 122). Más recientemente se desarrolló otro sistema (Architect VHC Ag, Abbott Diagnostics) con un menor límite de detección de ARN de 600-1000 UI/ml (123), pero aún así inferior a las técnicas moleculares de PCR. Por lo tanto, a pesar de sus ventajas, su utilidad en la práctica clínica es limitada, pudiendo emplearse principalmente donde no se disponga de recursos e infraestructura adecuada para determinar ARN (122, 124).

2.3.4 Genotipo

Existen 6 genotipos mayores y múltiples subtipos del VHC (78).

El genotipo viral debe determinarse siempre antes de indicar el tratamiento antiviral, porque según el genotipo varía la probabilidad de respuesta al tratamiento, de recidiva y determina el tiempo que debe tratarse (125).

En la práctica clínica el genotipo puede determinarse por dos tipos de métodos moleculares:

- Método de hibridación inversa en tira: el producto amplificado de las regiones 5'NTR y *core* obtenido mediante técnica de PCR, se hibrida a las distintas sondas específicas de los diferentes genotipos inmovilizadas en tiras de nitrocelulosa. Dos pruebas comerciales disponibles son INNO-LiPA VHC II (Innogenetics, Ghent, Bélgica), la cual es la más comúnmente empleada; y Versant VHC Genotyping Assay (Bayer Health Care).
- Método de secuenciación de ácidos nucleicos: basado en la secuenciación de la región 5'NTR. Trugene 5'NC VHC Genotyping Kit (Bayer Health Care Diagnostics Division, Tarrytown, NY) es uno de los métodos disponibles, con un coste similar al de la hibridación en tira, pero en general son más caros y complejos, por lo que se utilizan escasamente en los laboratorios diagnósticos (126).

Para la determinación de cuasiespecies, las regiones del genoma más empleadas son E y NS5 (81, 127). Existen técnicas que permiten identificar el número de cuasiespecies virales, pero su complejidad y alto coste limitan su disponibilidad a escasos laboratorios especializados.

En resumen, los marcadores virales del VHC poseen las aplicaciones prácticas que aparecen reflejadas en la tabla 4 (124).

TABLA 4. Aplicaciones prácticas de los marcadores virales

Indicación	Objetivo	Método recomendado
1. DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN ACTIVA		
• Donantes de sangre	Identificación donantes en periodo ventana	- Anti-VHC - ARN cualitativo - Antígeno <i>core</i>
• Hepatitis aguda	Diagnóstico precoz Diagnóstico diferencial	- Anti-VHC - ARN cualitativo - Antígeno <i>core</i>
• Recién nacidos madre portadora	Diagnóstico de transmisión	- Anti-VHC 18 meses - ARN cualitativo
• Aumento ALT en inmunodeprimidos	Diagnóstico infección anti-VHC negativa	- ARN cualitativo o cuantitativo
• Exposición a sangre contaminada accidental	Diagnóstico precoz	- ARN cualitativo o cuantitativo sensible*
2. TRATAMIENTO ANTIVIRAL		
• Pretratamiento	Confirmación replicación Carga basal de referencia	
• RVR	Programar duración del tratamiento	- ARN cuantitativo - Antígeno <i>core</i>
• RVP	Interrupción precoz del tratamiento si no respuesta	
• Respuesta final de tratamiento	Diagnóstico precoz de recidiva	- ARN cualitativo o cuantitativo sensible*
• Respuesta final de seguimiento	Confirmación de RVS	

* Técnicas cuantitativas sensibles son las que poseen un límite de detección $\leq 50\text{UI/ml}$.
RVR: respuesta viral rápida; RVP: respuesta viral precoz; RVS: respuesta viral sostenida.

2.3.5 Biopsia hepática

La biopsia hepática se considera “el patrón de oro” para la valoración de la fibrosis hepática. Sin embargo, esta técnica tiene un papel limitado en la actualidad, ya que aunque el estudio histopatológico del hígado es fundamental para evaluar el grado de actividad necroinflamatoria, lo cual nos orienta sobre la velocidad del proceso, y para conocer el estadio de fibrosis, y con ello saber en qué fase evolutiva se encuentra la enfermedad, esta información no es necesaria en todos los pacientes ni en todas las circunstancias (128). Además es una técnica invasiva, dolorosa y que puede producir complicaciones (129, 130) (como sangrado, infecciones o perforación de otros órganos, entre otras), por lo que ante la aparición de nuevos métodos de evaluación de la fibrosis más seguros y sencillos, como es la elastografía unidimensional o FibroScan®, el uso de la biopsia hepática ha disminuido. De esta forma su indicación se limita a determinados casos, como aquéllos que no pueden ser evaluados mediante FibroScan® (obesidad, espacios intercostales estrechos o presencia de ascitis), en los que los datos obtenidos con la biopsia hepática condicionarán el tratamiento, o se desee conocer el pronóstico; pacientes en los que se pretenda estudiar la coexistencia, junto al VHC, de otros factores etiológicos de hepatopatía (rasgos de autoinmunidad, posibilidad de enfermedad de Wilson...); o para detectar la presencia de esteatosis y sobrecarga férrica hepatocelular, factores que se asocian a una progresión de la fibrosis más rápida y que pueden condicionar la respuesta al tratamiento (131-133).

Así, esta recomendación puede tener un amplio margen de interpretación, por lo que la decisión de biopsiar debe tomarse valorando el beneficio de cada paciente.

Se han establecido diferentes clasificaciones para evaluar las lesiones histológicas. En 1981 Knodell publicó su índice de actividad histológica (IAH) (134), que valora de forma semicuantitativa la actividad de la enfermedad (tabla 5). El rango de puntuación varía de 0 a 22 puntos. Pero tiene inconvenientes, como no separar la puntuación de la fibrosis (estadio) de la lesión necroinflamatoria (grado).

TABLA 5. Índice de actividad histológica de Knodell

HALLAZGO HISTOLÓGICO	PUNTOS
1. Necrosis periportal +/- puentes	
• Ausencia	0
• NP leve	1
• NP moderada: < 50% circunferencia portal	3
• NP marcada: > 50% circunferencia portal	4
• NP moderada+puentes	5
• NP marcada+puentes	6
• Necrosis multilobulillar	10
2. Necrosis focal y degeneración	
• Ausencia	0
• Leve (< 1/3 lobulillo)	1
• Moderada (1/3 – 2/3 lobulillo)	3
• Marcada (> 2/3 lobulillo)	4
3. Inflamación portal	
• Ausencia	0
• Leve (< 1/3 espacio porta)	1
• Moderada (1/3 – 2/3 espacio porta)	3
• Marcada (> 2/3 espacio porta)	4
4. Fibrosis	
• Ausencia	0
• Expansión porta fibrosa	1
• Fibrosis en puentes (porto-portal o porto-central)	3
• Cirrosis	4

NP: necrosis periportal

Posteriormente se desarrollaron otros sistemas, entre los que destacan los propuestos por Scheuer e Isaac (135, 136).

El sistema METAVIR fue diseñado para evaluar la lesión histológica de pacientes con hepatitis crónica C de forma específica (137), y es el más empleado en la actualidad con este fin. Se trata de un sistema más simple, que describe cuatro estadios teniendo en cuenta por una parte la actividad histológica según la necrosis *piecemeal* y necrosis lobular (lesión necroinflamatoria) y el grado de fibrosis, según la clasificación que se refleja en la tabla 6.

TABLA 6. Sistema METAVIR

A. Actividad histológica	F. Fibrosis
A0: No actividad	F0: No fibrosis
A1: Actividad leve	F1: Fibrosis portal sin septos
A2: Actividad moderada	F2: Fibrosis portal con algún septo
A3: Actividad grave	F3: Numerosos septos de fibrosis sin cirrosis
	F4: Cirrosis

Tanto el sistema METAVIR como el IAH de Knodell poseen una escasa correlación interobservador e intraobservador, pero es ligeramente mejor en el sistema METAVIR, y alcanza valores más óptimos para la categoría de fibrosis (coeficiente Kappa de 0,8) (138).

2.3.6 Elastografía unidimensional (Fibroscan®)

Se trata de un método no invasivo de cuantificación de la fibrosis hepática, que se determina a través de señales de ultrasonidos que permiten hallar la propagación y velocidad de la onda elástica, relacionándola

directamente con la elasticidad tisular hepática, medida en kiloPascales (kPa). Ha obtenido buenos resultados principalmente en la diferenciación entre grados avanzados de fibrosis (F2-F4) frente a estadios iniciales (F0-F1), lo que permite detectar de forma precoz a los pacientes con riesgo elevado de complicaciones como la hipertensión portal y el CHC, y seleccionar a los candidatos al tratamiento (139-142).

En la tabla 7, se muestran los diferentes puntos de corte de elasticidad hepática, que corresponden a cada estadio de fibrosis según el sistema METAVIR y su sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo (143).

Tabla 7. Puntos de corte del FibroScan® para el diagnóstico de fibrosis según el sistema METAVIR

VALOR	F ≥ 2	F ≥ 3	F ≥ 4
Punto de corte (kPa)	7,1	9,5	12,5
Sensibilidad (%)	67	73	87
Especificidad (%)	89	91	91
Valor predictivo positivo (%)	95	87	77
Valor predictivo negativo (%)	48	81	95

Sus principales ventajas son su sencillez, inocuidad, rapidez, capacidad de repetición, escasa variabilidad interexplorador y su mayor valor como representatividad de la totalidad del tejido hepático (100 veces superior a la biopsia hepática). Y sus principales inconvenientes su incapacidad para hallar otras alteraciones del parénquima hepático, como es el grado de inflamación y su menor sensibilidad para determinar estadios intermedios de fibrosis (144, 145).

La combinación del FibroScan® con marcadores bioquímicos, como el APRI (*aspartate transaminase to platelets ratio index*) o el FibroTest, permite

una mayor fiabilidad en la detección del estadio de fibrosis hepática, evitando así la realización de biopsia hepática en un gran número de pacientes (143). Sin embargo, la biopsia hepática sigue siendo necesaria en caso de discordancia o resultados indeterminados usando estos métodos (146).

2.4 FIBROSIS HEPÁTICA

En la historia natural de la infección por el VHC, la fibrosis hepática es el parámetro fundamental para definir la severidad de la enfermedad (147-151). El trabajo transversal en 2235 pacientes realizado por Poynard y colaboradores en 1997, definió la progresión de la fibrosis por año como el cociente del estadio de fibrosis según el sistema METAVIR entre la duración de la infección, obteniendo una mediana de 0,133 unidades/año. Para validar este método indirecto lo comparó con otros, entre los que se encuentra el método directo de las biopsias hepáticas pareadas, que consiste en el cálculo de la diferencia entre los estadios de fibrosis de dos biopsias hepáticas dividido por el tiempo transcurrido entre ambas biopsias (en años), con lo que obtuvo una mediana de 0,183 unidades/año. En esta lenta evolución identificó tres factores independientes asociados a una mayor progresión: edad a la que se adquiere la infección mayor de 40 años, consumo de alcohol superior o igual a 50 g/día y sexo masculino. Y estimó una media de duración de la infección de 30 años para la progresión a cirrosis hepática. Asimismo, dada la distribución asimétrica de este cociente sugirió la presencia de tres grupos de pacientes: fibrosadores rápidos, fibrosadores intermedios, y fibrosadores lentos, por lo tanto considera que hay diferencias interindividuales, de forma que el 33% de los casos progresan a cirrosis en menos de 20 años y el 31% tras más de 50 años o nunca progresarán a cirrosis (152).

Trabajos posteriores corroboraron estos datos (149, 153-157), y diferencian cuatro etapas en la evolución de la fibrosis: la primera denominada muy lenta, fase inicial estable de unos 10 años de duración; la segunda lenta, que consiste en una evolución progresiva y regular a lo largo de unos 15 años;

la tercera intermedia, de unos 10 años con un aumento de la velocidad de progresión; y la cuarta rápida, último periodo más veloz de aproximadamente 5 años (154, 156).

Se excluyen como factores relacionados con la progresión de la fibrosis el genotipo y la carga viral (149).

La coinfección por VIH se asocia igualmente a una progresión más rápida, especialmente en aquéllos casos con un recuento bajo de células CD4 (153, 157). Se estima que un paciente coinfectado con un recuento CD4 menor de 200 células/ml y con un consumo de alcohol superior a 50 g/día progresará a cirrosis en una media de 16 años; mientras que será de 36 años para pacientes con más de 200 CD4/ml y consumo inferior a 50 g etanol/día (158).

Factores metabólicos como la esteatosis, la obesidad y la diabetes han sido relacionados con la fibrosis (159-164), habiendo incluso establecido una dudosa relación entre el genotipo 3 y una mayor progresión de la fibrosis, que podría deberse a su asociación con la esteatosis (165).

La tabla 8 recoge los factores relacionados, dudosamente relacionados y no relacionados con la fibrosis mediante análisis multivariante (147, 166).

TABLA 8. Factores asociados/no asociados con la progresión de la fibrosis

Factores asociados	Factores dudosamente asociados	Factores no asociados
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Estadio de fibrosis ▪ Edad a la que se adquiere la infección ▪ Duración de la infección ▪ Consumo alcohol ≥ 50g/día ▪ Coinfección VIH ▪ Recuento CD4 < 200/ml ▪ Sexo masculino ▪ Necrosis ▪ IMC y/o diabetes y/o esteatosis 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Grado de inflamación ▪ Hemocromatosis ▪ Tabaquismo ▪ Consumo alcohol moderado ▪ Genotipo 3 ▪ Esquistosomiasis 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Carga viral ▪ Genotipo no 3 ▪ Vía de transmisión

IMC: índice de masa corporal

2.5 CORTICOIDES Y VIRUS C

El efecto de los corticoides sobre el VHC ha sido escasamente estudiado. Son tres los estudios *in vitro* publicados a este respecto, cuyos hallazgos exponemos a continuación.

En el trabajo de Magy y colaboradores (167), se estudia el efecto de los corticoides *in vitro* sobre un modelo de replicación del VHC en CMSP que analizaron previamente (53). Para ello añaden al medio de cultivo celular prednisona, metabolito activo de la cortisona (Cortancyl®; Cooperative Pharmaceutique Melun), a dosis entre 4 µg/ml y 40 µg/ml, lo que representa entre 10 y 100 veces la concentración máxima de prednisona libre obtenida después de una dosis oral de 200 mg de Cortancyl® (168, 169).

En este estudio encuentran que concentraciones en el medio de 40µg/ml de prednisona eran tóxicas para las CMSP infectadas con VHC, mientras que concentraciones de 4µg/ml no tenían ningún efecto sobre la replicación del VHC. Al emplear concentraciones de 20µg/ml y cuantificar el ARN-VHC por bADN a lo largo de 28 días de cultivo celular, encuentran que en las células control aparece un pico de ARN-VHC a los 11 días ($5,9 \times 10^3$ Eq genomas/ml) y en las células cultivadas con corticoides aparecen dos pico sucesivos con valores de $6,9 \times 10^6$ Eq genomas/ml a los 7 días y 7×10^6 Eq genomas/ml a los 10 días, siendo las diferencias en estos dos momentos entre las dos condiciones de cultivo significativas ($p < 0,05$). No detectaron cambios en la supervivencia celular con relación a las células cultivadas sin corticoides y a las CMSP sin infección por virus C, por lo que esto no influyó en el efecto detectado.

Pero debemos tener en cuenta que el VHC se reproduce fundamentalmente en los hepatocitos y aunque parece que las CMSP son permisivas para la replicación del VHC, el nivel de replicación es muy bajo (53), por lo que es difícil interpretar los resultados del estudio anterior en modelos *in vivo* y su repercusión en la práctica clínica.

En el estudio del grupo de Henry (170), se investiga *in vitro* el efecto directo de los corticoides sobre la replicación del virus C. Para ello emplean un modelo de replicación Huh-7 basado en la luciferasa (60, 171, 172) al que añaden dexametasona y prednisolona a concentraciones bajas, pero clínicamente relevantes (1-10 nM). La replicación del VHC se analiza sobre la expresión de la luciferasa (luminescence), observando que no existe aumento de la replicación del VHC, sino que se produce una ligera reducción de la actividad relativa de la luciferasa, lo cual fue independiente del incremento del contenido celular proteico. Para corroborar este efecto se empleó un modelo de replicación Huh-6 Con1 que carece de la proteína de la luciferasa, en el que tras 18 horas de cultivo con dexametasona y prednisolona se cuantificó del ARN-VHC mediante RT-PCR. Con este modelo se confirmó la reducción de la replicación celular, mostrando más del 41% de disminución de los niveles de ARN-VHC al compararlo con las células no tratadas con corticoides. Así concluyen que *in vitro* los corticoides no causan una estimulación directa sobre la replicación del VHC.

Por último, el estudio recientemente publicado por Ciesek y colaboradores (173), analiza *in vitro* la influencia de los corticoides en el ciclo completo de la replicación del VHC. Se emplea prednisolona a dosis de 50, 100 y 200 µg/ml en cultivos celulares de hepatoma humano Huh-7.5 (174), lo cual

corresponde a administrar dosis de 250, 500 y 1000 mg, respectivamente (168, 169). En este trabajo observaron que los corticoides disminuyen ligeramente la replicación del ARN-VHC, pero incrementan su infectividad, ya que se observó una estimulación de la propagación del VHC que dependía de la dosis de esteroides empleada. Este efecto se asocia a una estimulación en la regulación de la expresión de dos factores esenciales para la entrada del VHC (occludina y el receptor *scavenger* tipo 1 clase B) a través de los receptores de los corticoides. Este efecto se constató tanto en cultivos celulares Huh 7.5 infectados con Jc-1, como cultivos de hepatocitos humano también inoculados con Jc-1 y con suero de pacientes infectados por el virus C.

Así los autores sugieren que el tratamiento con bolos de corticoides a altas dosis en paciente trasplantados hepáticos infectados por VHC, podría incrementar la diseminación del virus a través de la facilitación de la entrada del VHC en los hepatocitos, lo cual agravaría la recurrencia del VHC en el postrasplante.

Resumiendo los hallazgos de estos tres estudios, podemos concluir que:

- los trabajos realizados sobre modelos de replicación del VHC basados en células de hepatoma humano muestran un descenso en la replicación del VHC al administrar corticoides;
- incluso aunque consideráramos aplicable *in vivo* los efectos observados en el modelo de replicación del VHC en CMSP, con la administración de corticoides a la dosis más baja que aplicaron en los cultivos celulares (4 µg/ml), no se detectó efecto sobre la replicación del VHC;

- el incremento en la entrada del VHC en los hepatocitos, y con ello el efecto favorable sobre la diseminación del virus, sólo ha quedado constatado al emplear dosis altas de corticoides en bolos.

Por lo tanto, ninguno de los estudios publicados en la actualidad sobre el efecto de los corticoides en la replicación del VHC *in vitro*, ha demostrado que la administración de estos fármacos a dosis bajas favorezca la replicación viral, y con ello empeore el curso de la enfermedad hepática, como se ha considerado clásicamente.

2.6 AZATIOPRINA Y VIRUS C

Más escasos son aún los estudios realizados en pacientes con infección crónica por VHC y azatioprina. *In vivo*, se trata mayoritariamente de trabajos sobre pacientes trasplantados renales (175-181) y trasplantados hepáticos (182, 183). *In vitro*, tan sólo se ha publicado un estudio sobre el efecto de la azatioprina en la replicación del VHC. En este trabajo, se empleó el virus de la diarrea bovina viral (BVDV), al estar estrechamente relacionado con el VHC, por pertenecer a la familia de los Flaviviridae, para comparar el efecto de dos inmunosupresores ampliamente utilizados, la azatioprina y el mofetil micofenolato (MMF). Sobre este medio se demostró que la azatioprina tiene una mayor actividad antiviral que el MMF, ya que disminuyó la replicación del BVDV diez veces más que el MMF. Además se comparó el efecto de la RBV y la azatioprina sobre un modelo de replicación Huh-7 (62), sobre el que se añadían 100µM de azatioprina o 100µM de RBV, determinando posteriormente los niveles de ARN-VHC por RT-PCR en tiempo real. De esta forma se comprobó el efecto antiviral que posee la azatioprina sobre el modelo de replicación del VHC, siendo este al menos tan grande como el de la RBV (184).

Así vemos que el único estudio realizado *in vitro* sobre la influencia de la azatioprina en la replicación del VHC, demuestra el efecto antiviral de este fármaco inmunosupresor.

2.7 USO DE CORTICOIDES CON O SIN AZATIOPRINA EN LA HEPATITIS POR VIRUS C

Inicialmente las hepatitis crónicas se trataban con corticoides con o sin azatioprina (185-194). Con el descubrimiento del antígeno Australia, más tarde conocido como antígeno de superficie ligado a la hepatitis B (HBsAg) (195, 196), las hepatitis crónicas se dividieron en dos grupos, HBsAg positiva y HBsAg negativas (197), y sólo estas segundas se continuaron tratando con corticoides y azatioprina (198-205), con una menor tasa de efectos secundarios por los corticoides, manteniendo la misma eficacia al asociar este segundo fármaco (204). Las hepatitis HBsAg positivas dejaron de tratarse con corticoides al demostrarse el efecto deletéreo de este fármaco sobre este tipo de hepatitis, pues al tener el virus de la hepatitis B (VHB) un receptor en su membrana para los glucocorticoides quedó claramente demostrado el efecto estimulante de los corticoides sobre su replicación (206-208), con el consiguiente empeoramiento de la evolución de la enfermedad (209-211), ya que aumentaba las complicaciones y disminuía la supervivencia, tanto si se administraba durante cortos periodos, como a largo plazo a dosis bajas (212, 213).

En 1973, el virus de la hepatitis A se identificó como causa de hepatitis aguda (214), y poco después fue posible distinguir serológicamente entre hepatitis A y B. Posteriormente se observó que existían muchos casos de ictericia en personas adictas a drogas vía parenteral, además de hepatitis asociadas a transfusiones, sin marcadores de hepatitis A ni B, lo que pasó a denominarse HNANB (215-217), cuyo diagnóstico inicialmente se realizaba con

la exclusión de otras etiologías, y cuya propensión hacia la cronicidad era mayor que en la hepatitis B (218).

Con la identificación del VHC, se descubrió que éste era el principal agente causal de las HNANB (2), y otras pocas eran hepatitis autoinmunes (HAI). De esta forma, muchas de las hepatitis crónicas C fueron tratadas con corticoides con o sin azatioprina, hasta que Hoofnagle demostró el efecto beneficioso del IFN sobre ellas (219-221), sin que se demostrara aún un claro efecto deletéreo o de mayor progresión con el uso de corticoides (222-225), a diferencia de las HBsAg positivas que evolucionaban peor.

Por todo ello el efecto de los corticoides sobre el VHC no está claramente establecido, como demuestra el análisis de Cochrane de 2004, revisado en 2009, con las mismas conclusiones en ambas ediciones: no existen pruebas a favor ni en contra del tratamiento con corticoides para la hepatitis viral C. No hay pruebas suficientes para confirmar o descartar efectos beneficiosos o perjudiciales de los corticoides en la hepatitis C. Además las pruebas son inciertas en cuanto a la posibilidad de administrar sin riesgo el tratamiento con corticoides para otras enfermedades en pacientes con hepatitis C concomitante (226, 227).

2.8 INFECCIÓN POR VHC Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Los fenómenos de autoinmunidad y el VHC están asociados de forma significativa. En un estudio francés realizado con 321 pacientes con infección crónica por el VHC se determinó que hasta el 70% tenía al menos un anticuerpo y las manifestaciones de autoinmunidad más frecuentes fueron la crioglobulinemia (56%) y la presencia de los siguientes anticuerpos: factor reumatoide (FR) (38%), anticuerpos antinucleares (ANA) (41%), anticardiolipina (27%) y tiroglobulina (13%) (228). Además casi un 2% de los pacientes con enfermedades autoinmunes y hepatitis C, tiene más de una patología autoinmune (229).

La infección por VHC está relacionada con las enfermedades autoinmunes sistémicas de tres modos (230-233):

- 1) Por un parte la infección crónica por el VHC se asocia a numerosas manifestaciones extrahepáticas (tabla 9) (234). Muchas de ellas son de patogenia inmunológica o autoinmune y otras linfoproliferativa. Su manejo es complejo, por lo que debe hacerse de forma individualizada y multidisciplinar, y se basa fundamentalmente en dos estrategias: 1) disminución de la carga viral circulante con tratamiento antiviral convencional; 2) tratamiento de los factores inmunológicos y autoinmunes empleando fármacos inmunosupresores, agentes citotóxicos y/o plasmaféresis (225, 234-236).

TABLA 9. Manifestaciones extrahepáticas de la infección crónica por VHC

1. Asociaciones con clara evidencia científica	
<ul style="list-style-type: none"> • Crioglobulinemia mixta (CM) <ul style="list-style-type: none"> - Vasculitis cutánea crioglobulinémica - Glomerulonefritis crioglobulinémica - Manifestaciones reumatológicas asociadas a CM • Autoanticuerpos 	
2. Asociaciones probables o no claramente establecidas	
<ul style="list-style-type: none"> • Hematológicas <ul style="list-style-type: none"> - Linfoma no-Hodgkin B - Trombocitopenia idiopática - Anemia hemolítica - Síndrome antifosfolípido - Gammapatía monoclonal • Renales <ul style="list-style-type: none"> - Glomerulonefritis sin CM • Dermatológicas <ul style="list-style-type: none"> - Porfiria cutánea tarda - Liquen plano - Eritema multiforme - Eritema nodoso - Malacoplaquia - Urticaria - Prurito • Endocrinas <ul style="list-style-type: none"> - Tiroiditis autoinmune - Autoanticuerpos tiroideos - Diabetes mellitus 	<ul style="list-style-type: none"> • Oculares y salivares <ul style="list-style-type: none"> - Sialoadenitis - Úlcera corneal de Mooren - Uveítis • Musculoesqueléticas <ul style="list-style-type: none"> - Fibromialgia - Artralgias/artritis - Artritis reumatoide - Dermatopolimiositis - Síndrome de fatiga crónica • Pulmonar <ul style="list-style-type: none"> - Fibrosis pulmonar idiopática • Neurológicas <ul style="list-style-type: none"> - Síndrome de Guillain-Barré - Leucoencefalopatía multifocal progresiva • Miscelánea <ul style="list-style-type: none"> - Poliarteritis nodosa - Síndrome de CREST - Lupus eritematoso sistémico

CM: crioglobulinemia mixta

2) Por otro lado, la elevada prevalencia del VHC en la población general conlleva que un numeroso grupo de pacientes con enfermedades autoinmunes esté infectado por el VHC, por una relación casual no necesariamente etiológica.

En el trabajo realizado por Agmon-Levin en 1322 pacientes con enfermedades autoinmunes el 8,7% presentaba anticuerpos anti-VHC (237). La

tabla 10 (230, 233, 237-264) muestra la prevalencia de infección por virus C en algunas de las enfermedades autoinmunes. E igualmente hay otras muchas enfermedades autoinmunes de las que desconocemos la prevalencia de la infección por VHC, pero sobre las que se han descrito series de casos, como la sarcoidosis (265-267), la enfermedad de Still del adulto (268), la enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC) (228) y la trombopenia autoinmune (269).

TABLA 10. Prevalencia de infección por VHC en diferentes enfermedades autoinmunes

• Crioglobulinemia	47%
• Síndrome de Sjögren	17,9%
• Lupus eritematosos sistémico	11,5%
• Artritis reumatoide	9,5%
• Poliarteritis nudosa	19,6%
• Miopatía inflamatoria	5,2%
• Enfermedad Behçet	1,2%
• Vasculitis (granulomatosis de Wegener, poliangeitis microscópica, vasculitis de Churg-Strauss)	17%
• EIIC	6%
• Pénfigo vulgar	14%

EIIC: enfermedad inflamatoria intestinal crónica

En cuanto al síndrome de *overlap* VHC y HAI, estudios realizados en EE.UU en pacientes con VHC detectaron la presencia de ANA en el 10-33%, anticuerpos anti-músculo liso (SMA) en el 13-66% y anticuerpos anti-microsomales (LKM) en el 0-3% (99, 270-272). Para este último anticuerpo se ha descrito que existe variabilidad geográfica (273), siendo algo mayores las cifras registradas en Europa, como es el caso de un estudio realizado en Francia, en el que se hallaron LKM en el 5% de los pacientes con hepatitis C (274).

- 3) Además, la administración de interferón alfa (IFN α) que forma parte del tratamiento antiviral de la hepatitis crónica C, ha demostrado capacidad para inducir manifestaciones autoinmunes, que aparte de requerir la retirada del fármaco, puede precisar la administración de corticoides (275-282).

Por todo ello, en pacientes con hepatopatía crónica virus C que también padecen otras patologías autoinmunes, aclarar el efecto perjudicial o no de los corticoides sobre la evolución de la enfermedad hepática es de gran trascendencia.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

1. No está aclarado el efecto de los corticoides ni de la azatioprina sobre la hepatitis crónica C.
2. Un grupo de pacientes con infección por virus C precisa usar corticoides por padecer otra patología cuyo tratamiento se basa en corticoides con o sin azatioprina.
3. Es trascendente analizar si el riesgo/beneficio de los corticoides en estos pacientes está justificado.

3.2 **OBJETIVOS**

1. Estudiar *in vitro*, en un modelo de replicón, el efecto de los corticoides y de la azatioprina sobre la replicación del VHC.
2. Analizar *in vivo* el efecto de la administración de corticoides con o sin azatioprina a dosis bajas y periodos de tiempo prolongados, en pacientes con hepatopatía crónica por virus C, sobre la evolución de la enfermedad valorada por su actividad bioquímica, carga viral y fibrosis hepática.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1 OBJETIVO 1: ESTUDIO BIOLÓGICO EN UN MODELO CELULAR DE REPLICÓN DEL VIRUS C

Estudiar *in vitro*, en un modelo de replicón, el efecto de los corticoides y de la azatioprina sobre la replicación del VHC.

Para cumplir este primer objetivo, y dada la inexistencia de cultivos celulares del VHC, empleamos un replicón subgenómico del virus C, cuya replicación se llevó a cabo en líneas celulares de hepatoma humano Huh7 (58, 60).

4.1.1 Cultivos celulares

Las líneas celulares de hepatoma Huh7 así como aquéllas que contienen los replicones del VHC: Huh7.b Clone A y Huh7.b Ava.5, fueron obtenidas a través de Apath Laboratories (St. Louis, MO) cedidas por el Dr. C. Rice (The Rockefeller University, NY).

Inicialmente se ensayaron los experimentos con ambos modelos de replicón. El replicón Clone A contiene los genes del virus C que codifican para las proteínas no estructurales del virus (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B), las regiones 5'NTR y 3'NTR, y el IRES. Asimismo incluye un gen de resistencia a G418 (resistencia a neomicina), que permite seleccionar el crecimiento en cultivo sólo de las células que contienen replicón, y un IRES procedente del EMCV. La traducción del gen de resistencia a G418 está controlado por el IRES procedente del VHC, y la de los genes NS2-NS5b mediante el IRES del EMCV.

El replicón Ava.5 contiene una estructura semejante al anterior, pero no incluye el gen NS2.

Las células Huh7 que contenían los replicones se cultivaron hasta la confluencia en medio de cultivo mínimo esencial (MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, aminoácidos no esenciales y L-glutamina en atmósfera con 5% CO₂ 98% de humedad y 20 µg/ml de G418 (Sigma) en placas de 12 pocillos (10⁵ células/0,5ml de cultivo por pocillo).

Las células se trataron con concentraciones crecientes de los fármacos durante 42 horas.

En las condiciones de cultivo óptimas descritas, con el replicón Ava.5, se realizaron finalmente los experimentos por duplicado, para mostrar la reproducibilidad del efecto detectado. El solvente que se empleó y la concentración final en cultivo de cada fármaco en cada uno de los experimentos se muestran en la tabla 11.

TABLA 11. Solvente y concentración final en cultivo

Fármaco	Nº	Solvente	Concentración final en cultivo			
Pred (Sigma P6254)	1	Etanol/HCl	1ng/ml (3nM)	10ng/ml (30nM)	100ng/ml (300nM)	
	2		1ng/ml (3nM)	10ng/ml (30nM)	100ng/ml (300nM)	1000ng/ml (3000nM)
AZA (Sigma A4638)	1	DMSO	1ng/ml (4nM)	10ng/ml (40nM)	100ng/ml (400nM)	
IFNα humano (Sigma I4276) + RBV (Sigma R9644)	1	IFN α en PBS; RBV en H2O	1U+ 40µM	10U+ 40µM	100U+ 40µM	
	2		10U+ 50µM	100U+ 50µM	10U+ 100µM	100U+ 100µM

Pred: prednisona; AZA: azatioprina; IFNα: interferón alfa; RBV: ribavirina; Nº: número del experimento; HCl: ácido clorhídrico; DMSO: dimetilsulfóxido; PBS: tampón fosfato salino.

4.1.2 Viabilidad celular

Para valorar la muerte celular producida por la exposición de las células Huh7 a los fármacos estudiados, se determinó de modo indirecto la viabilidad celular detectando el ARNm del gen de la β -actina mediante PCR cuantitativa.

Esta determinación se realizó en paralelo con la del replicón, pero en reacciones independientes.

4.1.3 RT-PCR para el análisis de ARN

Posteriormente se cuantificó la producción de ARN-VHC del replicón en los cultivos sin fármacos y con fármacos a diferentes concentraciones.

Las células con replicón se recuperaron por tratamiento con tripsina y se determinó su concentración. El ARN total se aisló mediante TriPure Isolation kit® (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante a partir de un mismo número de células. El ADNc se sintetizó utilizando la retrotranscriptasa del Virus de la Leucemia Murina de Moloney (*Moloney Murine Leukemia Virus* MMLV) (Invitrogen) siguiendo protocolos estándar. La detección del ARN del replicón mediante RT-PCR se realizó utilizando los siguientes *primers* dirigidos a la región 5'-NTR del genoma viral (283):

VHC_Directo 5'-TAGTGGTCTGCGGAACCGGT-3' y

VHC_Reverso 5'- GGAGGTCTCGTAGACCGTGCA-3'

La cuantificación de las muestras se efectuó con LightCycler ® FastStart DNA Master SYBR Green en un sistema LightCycler 1.5 (Roche).

Como control interno se detectó en las mismas condiciones el ARN de la β -actina utilizando los *primers* (284):

β -actina_Directo 5'-CGTACCACTGGCATCGTGAT-3' y

β -actina_Reverso 5'-GTGTTGGCGTACAGGTCTTTG-3'

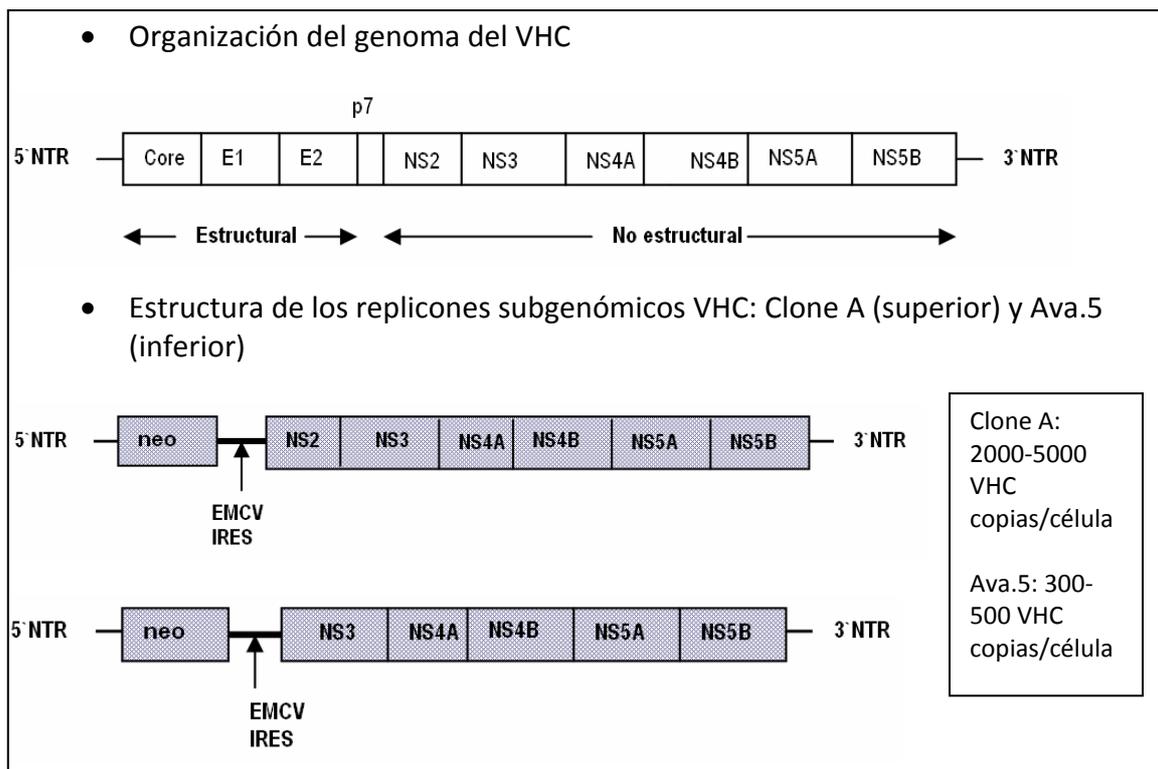
De esta forma se obtuvo el número de ciclo umbral o *cycle threshold* (Ct) que se precisa para detectar ARN a cada concentración de cada fármaco, con lo que se pudo calcular el efecto neto de las diferentes concentraciones de corticoides y azatioprina sobre el ARN-VHC en los cultivos, y deducir de esta forma su efecto sobre la replicación del VHC.

4.1.4 Análisis estadístico

Para analizar el efecto de la prednisona y la azatioprina sobre la replicación del virus C en el cultivo con replicón se cuantificó el efecto de las distintas concentraciones de los fármacos en el cociente Ct replicón/Ct β -actina. Se compararon los valores obtenidos con el cociente obtenido con el Ct inicial, es decir, sin fármaco. Y los resultados obtenidos con prednisona se contrastaron con el efecto inhibitorio del IFN+RBV.

Asimismo se empleó el coeficiente de correlación de Rho de Spearman entre los valores Ct del cultivo con replicón y del cultivo de β -actina, con un nivel de significación estadística de 0,05 bilateral.

FIGURA 6. Estructura de los replicones subgenómicos VHC Clone A y Ava.5



Core: proteína del *core*; E1: glicoproteína E1; E2: glicoproteína E2; NS: proteínas no estructurales; NTR: región no codificante; IRES: sitio interno de entrada del ribosoma; EMCV: virus de la encefalomiocarditis; neo: gen de la neomicina.

4.2 OBJETIVO 2: ESTUDIO CLÍNICO

Analizar *in vivo* el efecto de la administración de corticoides con o sin azatioprina a dosis bajas y periodos de tiempo prolongados en pacientes con hepatopatía crónica virus C, sobre la evolución de la enfermedad valorada por su actividad bioquímica, carga viral y fibrosis hepática.

Para cumplir este segundo objetivo diseñamos un estudio clínico en pacientes con hepatitis crónica virus C que por otra comorbilidad requiriesen indefectiblemente el uso de corticoides con o sin azatioprina, sobre los que evaluar el efecto del tratamiento con esteroides con o sin azatioprina respecto a la actividad bioquímica, la carga vírica y la evolución de la fibrosis. Para poder evaluar el efecto del tratamiento sobre la historia natural de la hepatitis crónica C, comparamos los parámetros analizados en este grupo de pacientes (denominado grupo de casos) con los mismos parámetros analizados en un grupo control compuesto por pacientes con hepatitis crónica C sin tratamiento, con características semejantes.

Por lo tanto se trata de un estudio observacional retrospectivo-prospectivo en pacientes con hepatitis crónica C tratados con bajas dosis de corticoides con o sin azatioprina, durante periodos superiores a 6 meses, para conocer la evolución de la enfermedad, comparándola con un grupo control de pacientes con hepatitis crónica C.

El grupo de casos se compone a su vez de dos subgrupos:

- Subgrupo 1: pacientes que ya están en tratamiento con corticoides con o sin azatioprina cuando empezamos el seguimiento.
- Subgrupo 2: pacientes en los que comienza su seguimiento al inicio del tratamiento con corticoides con o sin azatioprina.

Para componer el grupo control, se seleccionaron pacientes con hepatitis crónica virus C, sin tratamiento antiviral frente al VHC ni ningún fármaco inmunosupresor durante el periodo de seguimiento ni en los 12 meses previos, con características no diferentes del grupo de casos en cuanto a sexo, edad, genotipo, estadio de fibrosis hepática y nivel de ARN-VHC (punto de corte para definir carga viral baja / alta 800.000 UI/ml). Se incluyeron dos controles por cada caso (2:1).

4.2.1 Pacientes

Los pacientes incluidos en el estudio pertenecen a las consultas monográficas de hepatopatía crónica por virus C de dos hospitales terciarios de España, el Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid y el Hospital Virgen de la Salud del Complejo Hospitalario de Toledo.

El periodo de inclusión comprende desde noviembre de 1991 hasta mayo de 2011.

Los criterios de inclusión fueron:

- Pacientes diagnosticados de hepatopatía crónica por VHC, que hayan recibido tratamiento con corticoides con o sin azatioprina como tratamiento de cualquier patología concomitante o asociada.
- Dosis de corticoides bajas ($\leq 30\text{mg/día}$ de prednisona u otro esteroide a dosis equivalentes) con o sin tratamiento con azatioprina a cualquier dosis.
- Tiempo de tratamiento con corticoides mínimo de 6 meses.

El diagnóstico de VHC se basó en la detección de anticuerpos frente al VHC y determinación del ARN-VHC séricos. El método empleado para la detección de anticuerpos fue el ELISA de tercera generación en ambos centros hospitalarios. Las técnicas para la cuantificación del ARN-VHC fueron Cobas Amplicor VHC Monitor v.2.0 (Roche Molecular System, Branchburg, NJ) para las determinaciones previas a enero de 2007 en el centro hospitalario de Toledo, y previas a mayo de 2004 en el centro hospitalario de Madrid; y RT-

PCR con la técnica de Taq48 (Roche Molecular System, Branchburg, NJ) para las determinaciones posteriores a estas fechas.

Se incluyeron 28 pacientes (grupo de casos). La dosis de corticoides que recibían oscilaba desde 2,5mg/día hasta 30mg/día de prednisona u otro esteroide a dosis equivalente (dosis media $9,1\pm 4,9$). 10 de ellos (35,7%) recibieron tratamiento concomitante con azatioprina, a dosis de 50-150mg/día (dosis media $82,5\pm 31,3$ mg/día).

Las enfermedades por las que estos pacientes precisaron tratamiento con corticoides con o sin azatioprina fueron:

- HAI tipo 1 (un caso),
- HAI tipo 2 (seis casos),
- lupus eritematoso sistémico (dos casos, uno de ellos un paciente diagnosticado previamente de HAI tipo 1, y el otro de enfermedad mixta del tejido conectivo, pero siendo la indicación del tratamiento con corticoides en el periodo de seguimiento del estudio en ambos el lupus eritematoso sistémico),
- crioglobulinemia mixta esencial (siete casos, uno de ellos diagnosticado además de vasculitis tipo poliarteritis nudosa),
- esclerosis sistémica progresiva (un caso),
- artritis reumatoide (tres casos),
- poliartritis factor reumatoide positivo (un caso con glomerulonefritis membranoproliferativa tipo I coexistente),
- poliartritis seronegativa (un caso),
- espondilitis anquilosante (un caso).

- síndrome de Sjögren (un caso),
- anemia hemolítica autoinmune (un caso),
- síndrome de Evans (un caso de un paciente con bronquiolitis obliterante con neumonía organizativa),
- enfermedad pulmonar intersticial (un caso),
- cirrosis hepática con marcada actividad inflamatoria (un caso),

Por lo tanto 5 pacientes (17,9%) habían desarrollado dos patologías potencialmente tratables con corticoides.

En 8 casos (28,6%) coexistían la hepatitis crónica por virus C con hepatitis crónica autoinmune. El diagnóstico de HAI se basó en la presencia de elevación de enzimas hepáticas, junto con hipergammaglobulinemia policlonal, presencia de los anticuerpos séricos a título significativo correspondientes para cada tipo de HAI (ANA, SMA, F-actina, SLA/LP, pANCA, ASGPR, para el tipo 1; y LKM-1, LKM-3, LC-1, para el tipo 2) y/o hallazgos histológicos compatibles.

Los criterios de exclusión fueron:

- Tratamiento con esteroides como parte de una línea de tratamiento quimioterápico.
- Tratamiento con esteroides aplicado con otros fármacos inmunosupresores, salvo la azatioprina en algunos casos.
- Tratamiento esteroideo a dosis bajas pautado de forma intermitente con un periodo de continuidad menor de 6 meses.
- Coinfectados por VHB, excluida por la ausencia de antígeno de superficie de hepatitis B.

- Coinfectados por VIH, excluida por la ausencia de anticuerpos correspondientes.
- Coexistencia con otras causas de enfermedad hepática tales como hemocromatosis, cirrosis biliar primaria, enfermedad de Wilson, déficit de alfa-1 antitripsina, porfiria cutánea tarda, las cuales fueron excluidas mediante las correspondientes pruebas diagnósticas.
- Consumo excesivo de alcohol (> 80 gramos de etanol al día)
- Diagnosticados de CHC durante el periodo de observación o previamente.
- Tratamiento antiviral frente VHC durante el periodo de observación y/o en los 6 meses previos.

Doce pacientes (42,9%) no habían recibido tratamiento antiviral frente al VHC. 16 pacientes (57,1%) habían sido tratados con antivirales antes de iniciar corticoides con o sin azatioprina, 8 de ellos (50%) sólo con IFN α , 1 IFN α junto con RBV (6,3%) y 7 pacientes con PEG-IFN y RBV (43,8%). 14 pacientes (87,5%) no habían respondido y 2 pacientes (12,5%) habían recidivado. El tiempo medio entre finalizar el tratamiento antiviral e iniciar corticoides con o sin azatioprina fue de $71,6 \pm 57,7$ meses (rango 6 – 161,7 meses).

La distribución de los 28 pacientes del grupo de casos en los dos subgrupos que lo componen es la siguiente:

- Subgrupo 1. Pacientes con tratamiento con corticoides desde antes del inicio del seguimiento: 7 pacientes (25%). Se trataba de pacientes con niveles de transaminasas y viremia previos al inicio del seguimiento

desconocidos. En el hecho de que no se conociese este dato influyó que el tratamiento con corticoides se hubiese prescrito en otro servicio del hospital.

- Subgrupo 2. Pacientes con hepatitis crónica C de nuestras consultas monográficas en los que se inicia tratamiento con corticoides con o sin azatioprina, momento en el que comenzamos el seguimiento: 21 pacientes (75%), de los que se conocía la cifra de transaminasas y/o carga vírica previamente al inicio del tratamiento con corticoides con o sin azatioprina.

Con el objetivo de evaluar si la interrupción del tratamiento con corticoides influye en la viremia del VHC y la actividad bioquímica, analizamos la evolución de estos parámetros en 9 pacientes que suspendieron el tratamiento durante el periodo de observación. Realizamos un análisis estadístico, pero dada la escasez de datos de ARN-VHC en este sentido, analizamos también de forma descriptiva la magnitud de los cambios de la carga viral (pacientes con modificaciones de la viremia mayores a $1 \log_{10}$ IU/ml tras retirar los corticoides).

4.2.2 Recogida de datos

4.2.2.1 Monitorización de los pacientes previamente y tras comenzar tratamiento con corticoides

Se recogieron datos analíticos respecto a nivel de transaminasas y ARN-VHC, y datos de actividad necroinflamatoria y/o grado de fibrosis hepática mediante biopsia hepática y/o elastografía de transición (129, 139, 143, 285).

a. Determinaciones analíticas:

La determinación de las transaminasas (aspartato aminotransferasa o AST y alanino aminotransferasa o ALT) y la viremia se efectuó como se detalla a continuación en ambos grupos (tabla 12):

- Subgrupo 1 de casos: en los pacientes del subgrupo 1, definido como aquéllos que ya estaban en tratamiento con corticoides al comenzar el seguimiento, por lo que no disponemos de datos analíticos previos, se incluyeron 3 valores de transaminasas y ARN-VHC durante el periodo de tratamiento esteroideo, separados entre sí al menos por tres meses.

- Subgrupo 2 de casos: en los pacientes del subgrupo 2, en seguimiento a partir de iniciar tratamiento con corticoides con o sin azatioprina, se incluyeron uno o dos determinaciones de transaminasas y/o ARN-VHC previas al inicio del tratamiento.

En este subgrupo, durante el tratamiento, determinamos las transaminasas y la carga viral de la siguiente forma: en los 3

primeros meses, entre los 3-9 meses, entre los 9-12 meses, entre los 12-24 meses y a partir de los 24 meses.

TABLA 12. Protocolo de monitorización de los datos analíticos

	SUBGRUPO 1 (Transaminasas y viremia desconocidas previas a corticoides)	SUBGRUPO 2 (Transaminasas y/o viremia conocidas previas a corticoides)
Pacientes (%)	7 (25%)	21 (75%)
Determinación de transaminasas y carga viral durante el tratamiento	3 determinaciones separadas al menos por 3 meses	0 – 3 meses 3 – 9 meses 9 – 12 meses 12 – 24 meses > 24 meses
Determinación de transaminasas y carga viral tras retirada de corticoides		0 – 6 meses > 6 meses

El valor de las transaminasas se expresó en UI/ml.

El nivel del ARN-VHC se expresó en UI/ml. En caso de que el resultado se expresara en copias/ml por la técnica Cobas Amplicor VHC Monitor v.2.0 (Roche Molecular System, Branchburg, NJ), se transformó a UI/ml según la tabla 1.

En 3 pacientes, cuyo nivel de viremia no podía ser cuantificado de forma exacta por la técnica original, al sobrepasar el límite superior de detección de ésta, se disponía del suero congelado (en uno de los tres pacientes en dos muestras). Esto permitió aplicar la técnica de Taq48 (Roche Molecular System, Branchburg, NJ) sobre las 4 muestras y la cuantificación del ARN-VHC con precisión para poder compararlo con otras muestras posteriores que se habían analizado con esta técnica.

Las tablas 13a y 13b expresan los datos analíticos de los que disponemos en nuestro estudio para cada determinación analítica y/o periodo en cada grupo de pacientes, siguiendo el protocolo descrito.

TABLA 13. Datos analíticos disponibles según el algoritmo de monitorización

TABLA 13a. Subgrupo 1: Pacientes con corticoides con/sin azatioprina previamente al inicio del seguimiento

DETERMINACIÓN ANALÍTICA	Número y período de la determinación analítica	Número de pacientes que disponen de dato analítico / total de pacientes dentro de este grupo (%)
Transaminasas durante el tratamiento	3 determinaciones separadas al menos por 3 meses	7/7 (100%)
Cargas virales durante el tratamiento	3 determinaciones separadas al menos por 3 meses	7/7 (100%)

TABLA 13b. Subgrupo 2: Pacientes que inician su seguimiento al comenzar con corticoides con/sin azatioprina

DETERMINACIÓN ANALÍTICA	Número o período de la determinación analítica	Número de pacientes que disponen de dato analítico / total de pacientes dentro de este grupo (%)*
Transaminasas previas al tratamiento	Una determinación	21/21 (100%)
	Dos determinaciones	20/21 (95,2%)
Cargas virales previas al tratamiento	Una determinación	18/21 (85,7%)
	Dos determinaciones	8/21 (38,1%)
Transaminasas durante el tratamiento	0-3 meses	20/21 (95,2%)
	3-9 meses	20/21 (95,2%)
	9-12 meses	17/18 (94,4%)
	12-24 meses	17/17 (100%)
	> 24 meses	11/11 (100%)
Carga viral durante el tratamiento	0-3 meses	12/21 (57,1%)
	3-9 meses	10/21 (47,6%)
	9-12 meses	9/18 (50%)
	12-24 meses	11/17 (64,7%)
	> 24 meses	9/11 (81,8%)

* El número total de pacientes disminuye gradualmente a lo largo del tiempo debido a 1) la suspensión del tratamiento, ó 2) menor periodo de seguimiento en el momento de cerrar la base de datos

b. Biopsia hepática y elastografía de transición (FibroScan®):

En todos los pacientes del grupo de casos en los que fue técnicamente posible, se realizaron biopsia hepática y/o FibroScan® durante el tratamiento con corticoides con o sin azatioprina (tras al menos un año de tratamiento) o tras la finalización del mismo. Esto nos permitió analizar la influencia de los corticoides con o sin azatioprina en la evolución de la actividad necroinflamatoria y/o de la fibrosis hepática, de las siguientes formas:

- comparando estos resultados con los datos obtenidos en biopsias hepáticas y/o FibroScan® previos en aquellos pacientes que disponían de estas pruebas, en tres sentidos:
 - o describiendo la evolución del IAH de Knodell con el tratamiento con corticoides con o sin azatioprina;
 - o analizando el porcentaje de pacientes en los que el estadio de fibrosis mejoraba o permanecía estable, versus aquéllos en los que el estadio progresaba;
 - o calculando la velocidad de progresión de la fibrosis por el método directo descrito en 1997 por el grupo de Poynard (fibrosis final – fibrosis inicial / tiempo entre exploraciones en años) (152).
- examinando la progresión del IAH de Knodell y de la fibrosis en aquellos pacientes que habían recibido corticoides con/sin azatioprina durante más de 100 meses.

Para comparar la evolución de la fibrosis hepática en los pacientes tratados con corticoides con o sin azatioprina respecto a la progresión de la

misma según la historia natural de la hepatitis C se empleó un grupo control. Asimismo, para reforzar este concepto comparamos los resultados obtenidos con lo descrito en la literatura.

Los datos de los que disponemos en nuestros pacientes son los siguientes (tabla 14):

- Se disponía de biopsia hepática previa al inicio de los corticoides en 18 casos (64,29%) y de FibroScan® en 4 pacientes (14,29%).
- Se realizó biopsia hepática tras al menos 1 año de tratamiento con corticoides a 5 pacientes (17,86%) y FibroScan® a 18 pacientes (64,29%).
- Disponemos de biopsia hepática y/o FibroScan® tras al menos 100 meses de tratamiento con corticoides en 4 pacientes (14,29%).

TABLA 14. Número de exploraciones disponibles para la comparación de IAH y/o fibrosis de los casos.

	Biopsia hepática	FibroScan®
Previo corticoides con/sin azatioprina	18	4
	↓	↓
	4 pacientes	4 pacientes
	↓	↓
Posterior/durante corticoides con/sin azatioprina	5	18

El número de pacientes que aparecen en los recuadros entre las flechas, indican el número de pacientes que disponen de dos exploraciones para comparar el IAH de Knodell y/o la fibrosis hepática.

Datos perdidos: Un paciente no dispone de biopsia hepática/FibroScan® previos ni posteriores (exitus). Cuatro pacientes disponen de biopsia hepática previa sin biopsia hepática/FibroScan® posteriores (dos perdidos en el seguimiento, uno trasplantado hepático, otro recibió posteriormente a los corticoides tratamiento antiviral con RVS sin disponer de biopsia hepática/FibroScan® en el periodo de corticoides). Cuatro pacientes con FibroScan® posterior, no disponen de biopsia hepática/FibroScan® previos.

La biopsia hepática se interpretó por anatomopatólogos con experiencia, evaluando tanto la actividad de la enfermedad por el IAH de Knodell (tabla 5), como la fibrosis hepática por el sistema METAVIR (tabla 6).

El FibroScan® se realizó por personal experimentado y entrenado, y se cumplieron los criterios estándar de validez: un mínimo de diez mediciones válidas, lo que representaba al menos el 60% del total de las mediciones realizadas y un rango intercuartil (IQR) menor del 30%. El resultado se expresó en kPa, y la correlación a fibrosis hepática se estableció según la escala de Castèra (139, 143, 286).

4.2.2.2 Monitorización de los pacientes tras suspender los corticoides

En los pacientes que finalizaron el tratamiento con corticoides en el periodo del estudio, determinamos las transaminasas y el ARN-VHC en dos momentos:

- En los 6 primeros meses tras finalizar tratamiento (rango entre 1–6 meses),
- > 6 meses tras finalizar tratamiento (rango entre 7 meses y 3 años).

De los 18 pacientes (64,29%) que suspendieron los corticoides en el periodo de seguimiento, disponemos de datos posteriores en 9 pacientes (50%) de la siguiente forma (tabla 15):

- en 5 pacientes datos de transaminasas y carga viral en ambos periodos,

- 1 pacientes datos de transaminasas y carga viral en segundo periodo,
- 2 datos de transaminasas en ambos periodos, pero carga viral sólo en el segundo,
- 1 sólo transaminasas en ambos periodos.

TABLA 15. Número de pacientes que disponen de datos para valorar efecto de la suspensión de los corticoides con/sin azatioprina

Determinaciones analíticas		< 6 meses	> 6 meses
PREVIO – POSTERIOR	Transaminasas	6/9 (66,6%)	7/9 (77,8%)
	Carga viral	3/9 (33,3%)	6/9 (66,6%)
DURANTE – POSTERIOR	Transaminasas	8/9 (88,9%)	9/9 (100%)
	Carga viral	4/9 (44,4%)	5/9 (55,5%)

4.2.3 Grupo control

Por cada caso se incluyeron dos controles, considerando como tales a dos tipos de pacientes: aquéllos con hepatopatía crónica VHC, que nunca hubiesen recibido tratamiento antiviral en el momento de ser incluidos como controles (46,4%), ya fuese porque no había sido indicado por su médico o porque hubiesen rechazado el tratamiento recomendado; y pacientes tratados que hubiesen finalizado el tratamiento antiviral al menos 12 meses antes (53,6%), sin respuesta al mismo o con respuesta final de tratamiento y recidiva.

Los criterios de exclusión fueron los mismos que para el grupo de casos.

Se determinó su nivel de transaminasas y ARN-VHC dos veces separados al menos por un año y se les realizaron dos FibroScan® separados al menos por un año.

El grupo control está compuesto por 56 pacientes, de los cuales 34 eran varones (60,7%), con edad media de $48,7 \pm 9,1$ años. 49 pacientes eran genotipo 1 (87,5%), 3 pacientes genotipo 3 (5,4%) y 4 pacientes genotipo 4 (7,1%). La carga viral era <800.000 UI/ml en el 44,6%. Respecto a la vía de contagio, en el 58,9% era desconocida, el 14,3% por adicción a drogas vía parenteral (ADVP), el 21,4% postransfusional y el 5,4% tras pinchazo accidental con material contaminado. El tiempo desde que se conocía la infección por VHC hasta la recogida de los datos del estudio (considerando como tal la fecha del primer FibroScan® incluido), era de menos de 5 años en el 28,6%, de 5 a 10 años en el 41,1% y de más de 10 años en el 30,3%.

La tabla 16 refleja las características de los pacientes del estudio (casos) y de los pacientes control.

TABLA 16. Características basales de los pacientes del estudio (casos) y los pacientes control

		Pacientes con HC VHC tratados con corticoides (casos)	Pacientes con HC VHC no tratados con corticoides (controles)	p
Número de pacientes		28	56	
Edad media±DE (años)		47,2±10,4	46,8±9,2	NS
Varones pacientes (%)		12/28 (42,9%)	34/56 (60,7%)	NS
Genotipo pacientes (%)	1	24/28 (85,7%)	49/56 (87,5%)	NS
	3	2/28 (7,15%)	3/56 (5,4%)	
	4	2/28 (7,15%)	4/56 (7,1%)	
Fibrosis pacientes (%)	0-1	12/22 (54,5%)	32/56 (57,1%)	NS
	2	2/22 (9,1%)	11/56 (19,6%)	
	3	3/22 (13,6%)	7/56 (12,5%)	
	4	5/22 (22,7%)	6/56 (10,7%)	
Vía de contagio pacientes (%)	Desconocida	15/28 (53,6%)	33/56 (58,9%)	NS
	Transfusión	11/28 (39,3%)	12/56 (21,4%)	
	ADVP	2/28 (7,1%)	8/56 (14,3%)	
	Otras	0	3/56 (5,4%)	
AST mediana (RIQ) (UI/ml)		60 (35-98)	39 (31-59)	0,035
ALT mediana (RIQ) (UI/ml)		74 (45,5-141)	59,5 (41,2-85,2)	NS
Carga viral baja pacientes (%)		11/18 (61,1%)	25/56 (44,6%)	NS

HC VHC: hepatopatía crónica virus hepatitis C. ADVP: adicción a drogas vía parenteral. Carga viral baja: menor de 800.000 UI/ml. DE: desviación estándar. RIQ: rango intercuartil.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica. La metodología empleada para el desarrollo de este trabajo, cumple los criterios de la declaración de Helsinki de 1975, revisada en 2000.

4.2.4 Análisis estadístico

La base de datos englobaba los siguientes parámetros: edad, sexo, genotipo del virus C, año de diagnóstico de la infección (considerando como tal la fecha en la que se describe por primera vez la alteración de la bioquímica hepática con diagnóstico de confirmación de la infección por VHC o exclusión de otras enfermedades en el periodo de HNANB y posterior confirmación de la infección por VHC), vía de contagio, existencia de cirrosis hepática en el momento de inclusión, niveles de transaminasas (AST y ALT) y de ARN-VHC, hallazgos de la biopsia hepática y/o del FibroScan®, patología tratada con corticoides, dosis media de corticoides, administración concomitante o no de azatioprina, dosis media de azatioprina, tiempo de tratamiento, tiempo de seguimiento, terapia previa antiviral, y en caso de haber sido tratado fármacos empleados, fecha de tratamiento y respuesta al tratamiento.

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 15.0 para Windows.

Las características basales de los pacientes se presentan utilizando para las variables cualitativas porcentajes con intervalos de confianza del 95% (IC del 95%); y para las variables cuantitativas los estadísticos de tendencia central y de dispersión como medias con desviación estándar (DE) si la distribución es simétrica, y medianas con RIQ si la distribución es asimétrica, así como el rango en ambos casos.

Para el análisis de correlación entre los valores de transaminasas y carga viral previos, empleamos el coeficiente de correlación Rho de Spearman. Para comparar variables categóricas hemos utilizado el test de Chi-cuadrado o el test de Fisher cuando era preciso, y para variables cuantitativas la prueba de

la U de Mann-Whitney. Para las comparaciones en los valores de transaminasas y carga viral en los distintos momentos analizados (previo al tratamiento con corticoides, durante el tratamiento, tras retirar el tratamiento), empleamos el test de Wilcoxon. Las pruebas estadísticas son de dos colas y el nivel de significación estadística se establece con una probabilidad (p) inferior a 0,05.

5. RESULTADOS

5.1 **OBJETIVO 1: ESTUDIO BIOLÓGICO EN UN MODELO CELULAR DE REPLICÓN DEL VIRUS C**

Evaluamos el efecto directo de la prednisona y la azatioprina sobre la replicación del VHC.

Los resultados descritos a continuación, se obtuvieron empleando el modelo de replicón del virus C Huh 7.b Ava.5 que se trató a distintas concentraciones de ambos fármacos, tras lo cual se determinó el ARN-VHC por RT-PCR. Se añadieron IFN y RBV para comprobar el efecto inhibitorio esperable de estos fármacos sobre la replicación del VHC, y compararlo con el efecto detectado con prednisona y con azatioprina.

Para excluir que el efecto sobre el VHC de los fármacos inmunosupresores empleados fuese consecuencia de la reducción de la proliferación celular, se empleó como control interno del crecimiento celular la determinación de ARN de la β -actina.

Las equivalencias de las dosis *in vitro* empleadas en los cultivos celulares a la dosis farmacológica *in vivo* son las siguientes (considerando que se administrara a una persona con un peso de 65Kg):

- Prednisona: se administraron dosis *in vitro* de 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml y 1000ng/ml, lo que se corresponde con dosis *in vivo* de 0,06mg, 0,65mg, 6,5mg y 65mg, respectivamente.
- Azatioprina: se administraron dosis *in vitro* de 1ng/ml, 10 ng/ml, 100ng/ml, lo que se corresponde con dosis *in vivo* de 0,06mg, 0,65mg, 6,5mg, respectivamente. No se administraron dosis superiores, ya que como describimos a continuación con 100ng/ml *in vitro* se produjo muerte celular.

- Ribavirina: se administraron *in vitro* dosis de 40 μ M, 50 μ M y 100 μ M, lo que se corresponde con dosis *in vivo* de 635mg, 794mg y 1587mg, respectivamente.
- Interferón: se administraron dosis *in vitro* de 1U, 10U y 100U, lo que se corresponde con dosis *in vivo* de 0,55 μ g, 5,5 μ g y 55 μ g.

Mostramos el resultado de dos experimentos con corticoides, para reflejar la reproducibilidad del efecto detectado. En el segundo se añade una cuarta dosis de prednisona superior (de 1000ng/ml), respecto el primer experimento.

5.1.1 Efecto de la prednisona sobre la replicación del virus C *in vitro*

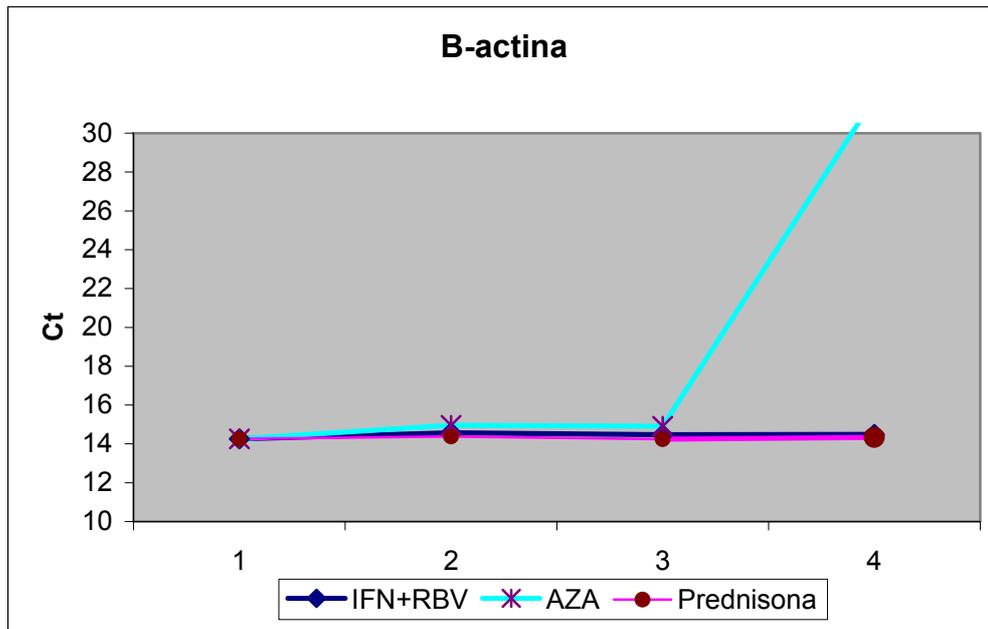
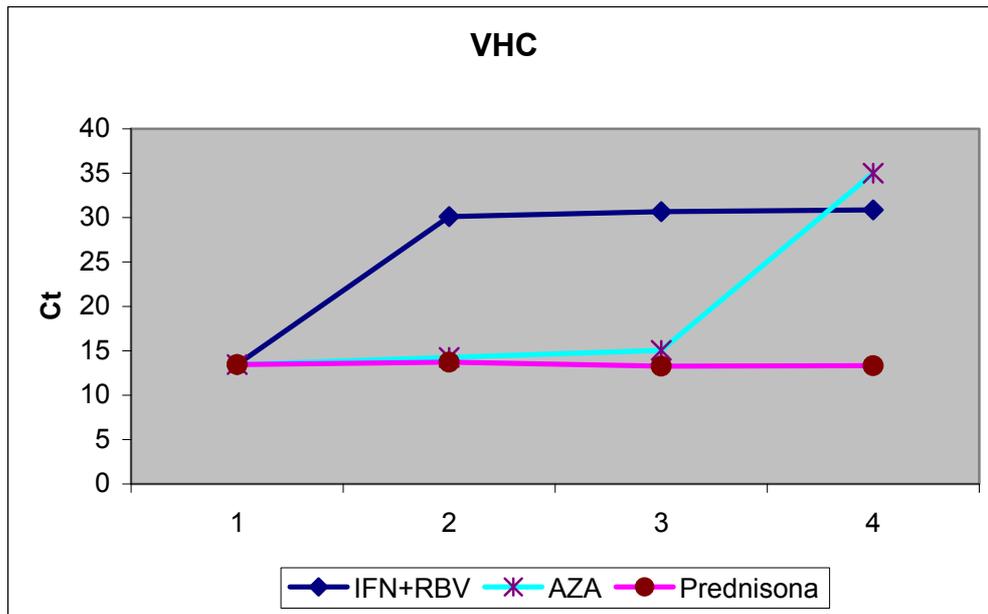
En las figuras 7 y 8 podemos observar, como de forma comparativa con la inhibición de la replicación que produce el IFN+RBV, la prednisona no afecta a la replicación del virus C, pues el número de Ct que se precisan para detectar ARN a cada concentración del fármaco varía levemente respecto al Ct inicial, es decir, sin fármaco (tablas 17 y 18). En los gráficos de β -actina comprobamos que el crecimiento celular no interfirió en los resultados obtenidos.

Además calculamos estadísticamente el coeficiente de correlación Rho de Spearman entre el efecto de la prednisona en el modelo de replicación y el efecto de la prednisona en la β -actina, siendo de 0,8 ($p=0,2$) en el experimento 1, y de 0,9 ($p=0,04$) en el experimento 2. Es decir en ambas la correlación fue positiva, alcanzando la significación estadística en el experimento 2 realizado con cuatro concentraciones diferentes de prednisona.

Por lo tanto no detectamos que la prednisona indujese ningún efecto sobre la replicación del VHC, a ninguna de las concentraciones empleadas, en los experimentos realizados.

5.1.2 Efecto de la azatioprina sobre la replicación del virus C *in vitro*

La azatioprina no produjo cambios substanciales en el número de Ct a dosis de 1 ng/ml y 10 ng/ml en el cultivo celular con replicón, respecto al número de Ct sin fármaco. A dosis de 100ng/ml se produjo muerte celular, como muestra el efecto de azatioprina sobre la β -actina, por lo tanto no se pudo estudiar su efecto a partir de dosis de 100ng/ml sobre la replicación del VHC (figura 7, tabla 17).

FIGURA 7. Experimento 1: efecto *in vitro* de IFN+RBV, prednisona y azatioprina

IFN+RBV: 1U+40 μ M
 10U+40 μ M
 100U+40 μ M

AZA: 1 ng/ml
 10 ng/ml
 100 ng/ml

Prednisona: 1 ng/ml
 10 ng/ml
 100 ng/ml

TABLA 17. Experimento 1: Número de ciclos (Ct) que se precisan para detectar ARN a cada concentración

TABLA 17a. Modelo celular de replicación: ARN-VHC

Ct	Dosis cultivo	IFN+RBV	Dosis cultivo	AZA	Prednisona
	0 (inicial)		13,45	0 (inicial)	13,45
1U+40µM		30,12	1 ng/ml	14,25	13,72
10U+40µM		30,67	10 ng/ml	15,05	13,27
100U+40µM		30,86	100 ng/ml	35	13,32

Ct: ciclo umbral (*cycle threshold*); IFN: interferón; RBV: ribavirina; AZA: azatioprina.

TABLA 17b. Control interno del crecimiento celular: ARN β -actina

Ct	Dosis cultivo	IFN+RBV	Dosis cultivo	AZA	Prednisona
	0 (inicial)		14,26	0 (inicial)	14,26
1U+40µM		14,57	1 ng/ml	14,96	14,38
10U+40µM		14,47	10 ng/ml	14,91	14,24
100U+40µM		14,49	100 ng/ml	32,4	14,33

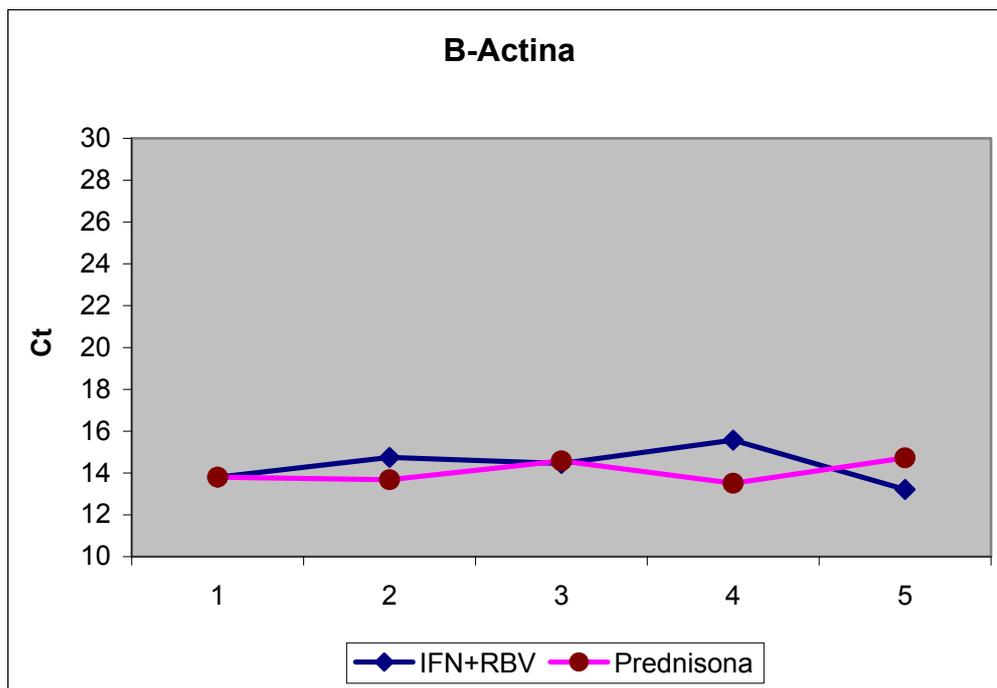
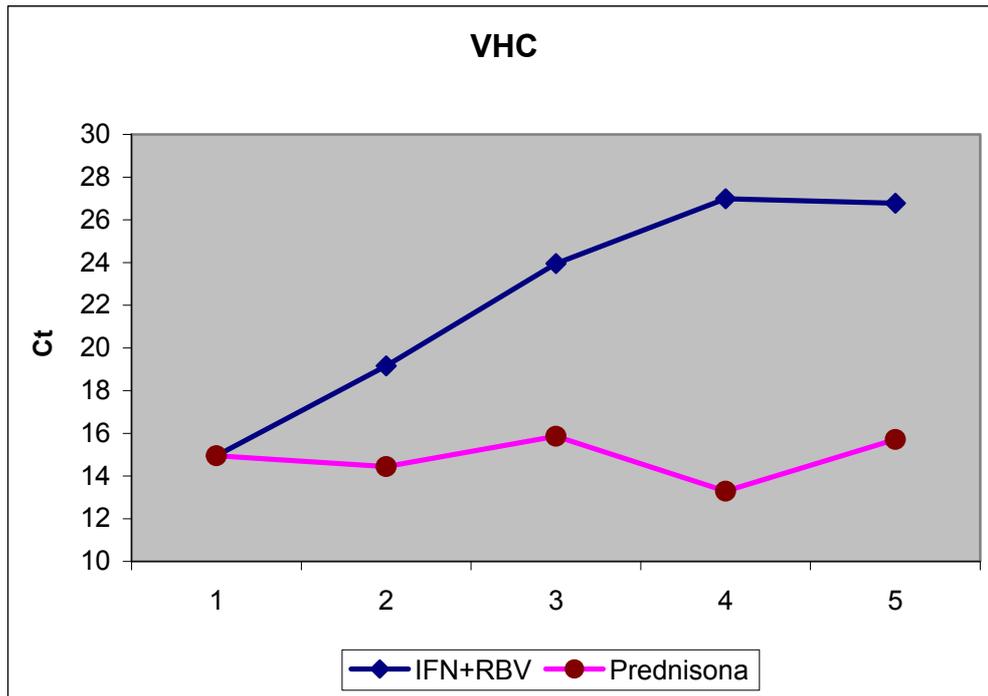
Ct: ciclo umbral (*cycle threshold*); IFN: interferon; RBV: ribavirina; AZA: azatioprina.

Cociente Ct replicación/Ct β -actina:

- Prednisona: 0 (inicial) 0,94; 1ng/ml 0,95; 10ng/ml 0,93; 100ng/ml 0,93
- IFN+RBV: 0 (inicial) 0,94; 1U+40µM 2,07; 10U+40µM 2,12; 100U+40µM 2,13

Coeficiente de correlación Rho de Spearman:

- Prednisona: 0,8 (p=0,2)
- IFN+RBV: 0,4 (p=0,6)

FIGURA 8. Experimento 2: efecto *in vitro* de IFN+RBV, prednisona y azatioprina

IFN+RBV: 10U+50 μ M
 100U+50 μ M
 10U+100 μ M
 100U+100 μ M

Prednisona: 1 ng/ml
 10 ng/ml
 100 ng/ml
 1000 ng/ml

TABLA 18. Experimento 2: Número de ciclos (Ct) que se precisan para detectar ARN a cada concentración

TABLA 18a. Modelo celular de replicación: ARN-VHC

	Dosis cultivo	IFN+RBV	Dosis cultivo	Prednisona
Ct	0 (inicial)	14,95	0 (inicial)	14,95
	10U+50 μ M	19,16	1 ng/ml	14,44
	100U+50 μ M	23,95	10 ng/ml	15,86
	10U+100 μ M	26,99	100 ng/ml	13,29
	100U+100 μ M	26,78	1000ng/ml	15,71

Ct: ciclo umbral (*cycle threshold*); IFN: interferón; RBV: ribavirina.

TABLA 18b. Control interno del crecimiento celular: ARN β -actina

	Dosis cultivo	IFN+RBV	Dosis cultivo	Prednisona
Ct	0 (inicial)	13,8	0 (inicial)	13,8
	10U+50 μ M	14,75	1 ng/ml	13,68
	100U+50 μ M	14,46	10 ng/ml	14,58
	10U+100 μ M	15,57	100 ng/ml	13,51
	100U+100 μ M	13,21	1000ng/ml	14,72

Ct: ciclo umbral (*cycle threshold*); IFN: interferón; RBV: ribavirina.

Cociente Ct replicación/Ct β -actina:

- Prednisona: 0 (inicial) 1,08; 1ng/ml 1,06; 10ng/ml 1,09; 100ng/ml 0,98; 1000ng/ml 1,07
- IFN+RBV: 0 (inicial) 1,08; 10U+50 μ M 1,3; 100U+50 μ M 1,66; 10U+100 μ M 1,73; 100U+100 μ M 2,03

Coefficiente de correlación Rho de Spearman:

- Prednisona: 0,9 ($p=0,04$)
- IFN+RBV: 0,3 ($p=0,62$)

5.2 OBJETIVO 2: ESTUDIO CLÍNICO

5.1.1 Datos de los pacientes

Incluimos 28 pacientes, 7 con esteroides con o sin azatioprina previos al inicio del seguimiento (subgrupo 1 de casos) y 21 en seguimiento desde que comenzaron a tomar esteroides con o sin azatioprina (subgrupo 2 de casos).

El tiempo medio de seguimiento fue de $87,5 \pm 61,9$ meses (rango 13,5 – 237,9 meses).

12 de los pacientes eran varones (42,9%) y 16 mujeres (57,1%). La edad media era de $47,2 \pm 10,4$ años. La dosis media que recibían de esteroides (realizando las equivalencias de los diferentes tipos de esteroides pautados a prednisona) fue de $9,1 \pm 4,9$ mg/día, con un rango entre 2,5 y 30 mg/día. El tiempo medio de tratamiento con esteroides fue de $76,3 \pm 79,6$ meses (rango 7,4 – 349,4 meses). 10 pacientes (35,7%) recibieron tratamiento concomitante con azatioprina, a una dosis media de $82,5 \pm 31,3$ mg/día (rango 50 – 150 mg/día), durante un periodo de tiempo variable pero superior en todos los casos a 6 meses.

22 pacientes (78,6%) disponían de datos sobre el estadio de fibrosis hepática previo al tratamiento con corticoides, 18 de ellos por los hallazgos de la biopsia hepática y 4 a través del FibroScan®, con un estadio de fibrosis medio de $2,04 \pm 1,29$ (rango 0 – 4). En los pacientes con biopsia hepática se determinó igualmente el IAH de Knodell basal, con un valor medio de $6,1 \pm 2,4$ (rango 3 – 12). En los pacientes con FibroScan®, el valor medio en kPa fue de $20,7 \pm 19,1$ (rango 5,3 – 46kPa), pero como sólo 4 pacientes disponen de la cuantificación de la fibrosis en kPa, este dato no expresa realmente la fibrosis hepática del grupo de pacientes a estudio.

6 pacientes (21,4%) presentaban datos de cirrosis hepática previa a los esteroides, dos por datos del FibroScan®, tres por hallazgos en la biopsia hepática y uno por datos ecográficos y analíticos determinantes.

La tabla 16 muestra las características basales del grupo de casos y del grupo control, y la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, salvo en el valor de la AST.

5.2.2 Efecto del tratamiento con corticoides con o sin azatioprina

La tabla 19 muestra las variables que se han analizado y que se presentan a continuación, y la participación de los diferentes grupos de pacientes que componen este estudio (subgrupo 1 y subgrupo 2 de casos y grupo control) en cada parte del análisis efectuado.

TABLA 19. Participación de los distintos grupos de pacientes del estudio en el análisis del efecto de los corticoides con/sin azatioprina

DATOS ANALIZADOS	GRUPOS DE PACIENTES EMPLEADOS EN EL ANÁLISIS
1. INFLUENCIA SOBRE LA BIOQUÍMICA HEPÁTICA	
a. Comparación transaminasas previas - durante el tratamiento	Subgrupo 2 de casos
b. Comparación transaminasas a lo largo del tratamiento	Subgrupos 1 y 2 de casos
c. Comparación con grupo control	Subgrupo 2 de casos y grupo control
2. INFLUENCIA SOBRE LA CARGA VIRAL	
a. Comparación viremia previa - durante el tratamiento	Subgrupo 2 de casos
b. Comparación viremia a lo largo del tratamiento	Subgrupos 1 y 2 de casos
c. Comparación con grupo control	Subgrupo 2 de casos y grupo control
3. INFLUENCIA SOBRE LA FIBROSIS HEPÁTICA	
a. IAH de Knodell previo-durante/tras el tratamiento	Subgrupo 2 de casos
b. Fibrosis hepática	
b.1. Grado de fibrosis previo - durante/tras el tratamiento	Subgrupo 2 de casos
b.2. kPa previos - durante/tras el tratamiento	Subgrupo 2 de casos
b.3. Comparación con grupo control: - Estadio de fibrosis previo - durante/tras el tratamiento - Progresión del estadio de fibrosis por año	Subgrupo 2 de casos y grupo control
c. Estadio de fibrosis tras más de 100 meses de tratamiento	Subgrupos 1 y 2 de casos

Para la comparación con el periodo previo a los corticoides, hemos empleado la primera determinación de transaminasas y de carga viral. Realizamos un análisis de correlación entre los dos valores de transaminasas y de ARN-VHC de los que disponíamos antes del inicio del tratamiento, obteniendo una correlación positiva (AST 0,915, ALT 0,792 y ARN-VHC 0,790) y estadísticamente significativa para todas ellas ($p < 0,05$). Así la segunda determinación previa a esteroides nos permitió comprobar que los valores de transaminasas y ARN-VHC con los que comparamos los valores obtenidos durante el tratamiento y tras finalizar éste son representativos del paciente.

5.2.2.1 Efecto sobre la bioquímica hepática

a. Comparación transaminasas previas – durante tratamiento con corticoides con/sin azatioprina:

Las tablas 20 y 21 muestran la evolución de AST y ALT en los diferentes periodos analizados a lo largo del tratamiento, respecto al valor basal previo al inicio de corticoides con/sin azatioprina.

- A corto-medio plazo: en los 3 primeros meses del tratamiento, entre 3-9 meses, entre 9-12 meses.
- A largo plazo: entre los 12-24 meses y a partir de los 24 meses del tratamiento.

TABLA 20. Comparación entre AST previa y durante el tratamiento con corticoides con/sin azatioprina

PERIODO DE TIEMPO DURANTE ESTEROIDES	AST		p	
	pre-esteroides (UI/ml) media±DE	AST durante esteroides (UI/ml) media±DE		
Corto/medio plazo	< 3 meses	93,7±99,6	55,2±42,9	0,006
	3-9 meses	93,7±99,6	72,6±72,2	NS
	9-12 meses	101,1±106,8	69,1±76,4	NS
Largo plazo	12-24 meses	98,8±107,4	62,3±67,3	NS
	> 24 meses	67,9±60,6	35,6±13,5	NS

TABLA 21. Comparación entre ALT previa y durante el tratamiento con corticoides con/sin azatioprina

PERIODO DE TIEMPO DURANTE ESTEROIDES	ALT		p	
	pre-esteroides (UI/ml) media±DE	ALT durante esteroides (UI/ml) media±DE		
Corto/medio plazo	< 3 meses	135,1±149,1	82,8±77	0,002
	3-9 meses	135,1±149,1	96,2±112,4	NS
	9-12 meses	142,3±158,4	92,4±109,3	NS
Largo plazo	12-24 meses	136,6±160,2	87,5±96,7	NS
	> 24 meses	100,3±120,1	41,7±21,4	NS

De esta forma vemos que en los pacientes que recibieron corticoides con/sin azatioprina, las transaminasas (tanto AST como ALT) descendieron significativamente en los 3 primeros meses de tratamiento respecto a su valor basal (AST $93,7 \pm 99,6$ versus $55,2 \pm 42,9$ UI/ml, $p=0,006$; ALT $135,1 \pm 149,1$ versus $82,8 \pm 77$ UI/ml, $p=0,002$). Posteriormente las transaminasas conservaron la tendencia a disminuir respecto al valor basal, pero sin diferencias estadísticamente significativas.

b. Comparación transaminasas durante tratamiento con corticoides con/sin azatioprina:

Las tablas 22 y 23 muestran la evolución de AST y ALT de los subgrupos 1 y 2 del estudio a lo largo del tratamiento con corticoides con/sin azatioprina.

TABLA 22. Comparación entre el primer valor de AST obtenido durante el tratamiento y los valores posteriores obtenidos durante el tratamiento

Primer valor AST durante tratamiento (UI/ml) media±DE	Valores posteriores de AST durante tratamiento (UI/ml) media±DE	p
54,3±38,2	70,4±65,9	NS
56,3±40,5	65,7±68,9	NS
58±46,9	64,4±68,9	NS
36,3±11,9	37±13,4	NS

TABLA 23. Comparación entre el primer valor de ALT obtenido durante el tratamiento y los valores posteriores obtenidos durante el tratamiento

Primer valor ALT durante tratamiento (UI/ml) media±DE	Valores posteriores de ALT durante tratamiento (UI/ml) media±DE	p
78,4±67,9	95,7±108,8	NS
80±69,8	90,7±101,6	NS
84,9±81,6	90,5±99	NS
44,8±19,3	43,5±21,7	NS

Observamos que no hay cambios significativos en las cifras de AST y ALT a lo largo del tratamiento con corticoides con/sin azatioprina.

c. Comparación con grupo control

En el grupo control vemos que no hay diferencias significativas entre las dos determinaciones de transaminasas realizadas (tabla 24).

TABLA 24. Comparación entre dos determinaciones de transaminasas del grupo control

	Primera determinación (UI/ml) media±DE	Segunda determinación (UI/ml) media±DE	p
AST	55,2±47	55,3±43,6	NS
ALT	77,8±61,7	73,1±51,9	NS

Por lo tanto, en los pacientes tratados con corticoides sí se ha observado una diferencia significativa entre el valor basal de AST y de ALT y el obtenido en los 3 primeros meses de tratamiento, sin que se haya evidenciado esta diferencia en las dos determinaciones de transaminasas del grupo control no tratado.

5.2.2.2 Efecto sobre el ARN-VHC

a. Comparación ARN-VHC previo – durante tratamiento con corticoides con/sin azatioprina:

La tabla 25 muestra la evolución del ARN-VHC a lo largo del tratamiento, respecto al valor basal previo, en los mismos periodos que las transaminasas:

- A corto-medio plazo: en los 3 primeros meses del tratamiento, entre 3-9 meses, entre 9-12 meses.
- A largo plazo: entre los 12-24 meses y a partir de los 24 meses del tratamiento.

TABLA 25. Comparación entre ARN-VHC previo y durante el tratamiento con corticoides con/sin azatioprina

PERIODO DE TIEMPO DURANTE ESTEROIDES		ARN-VHC pre-esteroides (10 ⁶ UI/ml) media±DE	ARN-VHC durante esteroides (10 ⁶ UI/ml) media±DE	p
Corto/medio plazo	< 3 meses	1,5±2,45	3,46±6,33	NS
	3-9 meses	1,3±2,57	3,58±4,4	NS
	9-12 meses	1,7±2,66	2,43±2,47	NS
Largo plazo	12-24 meses	1,74±2,49	1,96±3,16	NS
	> 24 meses	0,9±0,74	1,54±1,43	NS

Respecto a la carga viral, los corticoides produjeron un ascenso en los valores de ARN-VHC sin diferencias significativas ni durante el primer año de tratamiento (corto-medio plazo) ni posteriormente (largo plazo). De forma descriptiva analizamos en cada paciente la magnitud de la diferencia entre el valor de la carga viral basal y durante el tratamiento con corticoides. Observamos que tan solo en dos pacientes la carga viral aumentó más de 1 log₁₀ IU/ml en momentos puntuales del tratamiento: un paciente tratado 19,7 meses, cuyas dos primeras determinaciones de ARN-VHC durante tratamiento aumentaron más de 1 log₁₀ IU/ml respecto a la basal, pero durante el resto del

tratamiento volvieron a disminuir; y otro paciente tratado 121,3 meses, cuyas determinaciones entre 3-9 meses y 9-12 meses aumentaron más de 1 log₁₀ IU/ml respecto al valor basal, pero tanto la determinación previa como las posteriores aumentaron menos de 1 log₁₀ IU/ml. En contraposición, uno de los pacientes tratados 16,7 meses, presentó una disminución mayor de un 1 log₁₀ IU/ml en los tres primeros meses y entre 3-9 meses de tratamiento con corticoides.

b. Comparación ARN-VHC durante tratamiento con corticoides con/sin azatioprina:

La tabla 26 muestra la evolución del valor de viremia a lo largo del tratamiento con corticoides con o sin azatioprina.

TABLA 26. Comparación entre el primer valor de ARN-VHC obtenido durante el tratamiento y los valores posteriores obtenidos durante el tratamiento

PERIODO DE TIEMPO DURANTE ESTEROIDES	Primer valor ARN-VHC durante tratamiento (10 ⁶ UI/ml) media±DE	Valores posteriores de ARN-VHC durante tratamiento (10 ⁶ UI/ml) media±DE	p
Comparación 1 ^a – 2 ^a viremia	2,67±5,75	2,2±3,89	NS
Comparación 1 ^a – 3 ^a viremia	3,08±6,15	1,73±2,37	NS
Comparación 1 ^a – 4 ^a viremia	4,51±7,24	0,97±1,08	NS
Comparación 1 ^a – 5 ^a viremia	0,99±0,69	0,55±0,77	NS

Observamos una evolución sin diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de las determinaciones realizadas durante el tratamiento.

c. Comparación con grupo control

En el grupo control no hubo diferencias entre las dos determinaciones de ARN-VHC obtenidas (tabla 27), ni las variaciones del grupo de tratado con corticoides con/sin azatioprina fueron estadísticamente diferentes de las variaciones del grupo control.

TABLA 27. Comparación entre dos determinaciones de ARN-VHC del grupo control

	Primera determinación (10 ⁶ UI/ml) media±DE	Segunda determinación (10 ⁶ UI/ml) media±DE	p
ARN-VHC	2,74±3,79	3,1±5,28	NS

5.2.2.3 Efecto sobre el IAH de Knodell y la fibrosis hepática

a. Índice de Actividad Histológica de Knodell

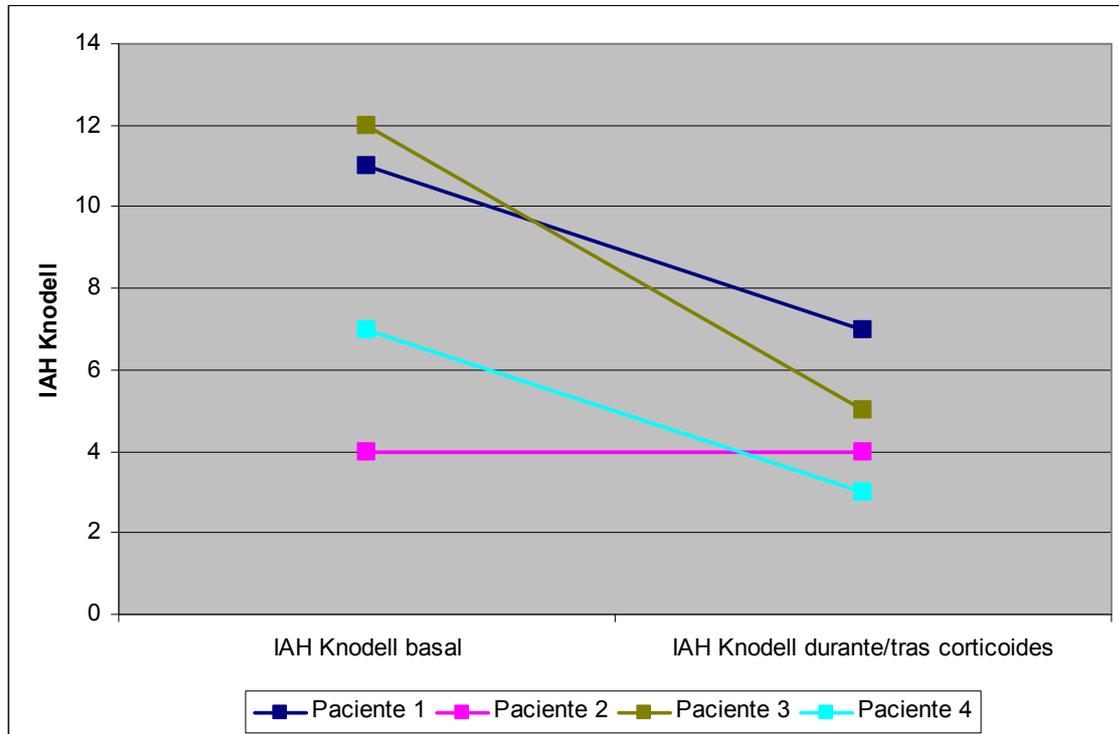
Disponemos de datos para comparar en IAH de Knodell antes y después o durante el tratamiento con corticoides con o sin azatioprina en 4 pacientes (tabla 28).

TABLA 28. Comparación entre IAH de Knodell antes y durante/después del tratamiento con corticoides con/sin azatioprina

	Biopsia hepática pre-esteroides media±DE	Biopsia hepática durante/tras tratamiento media±DE	p
IAH	8,5±3,7	4,7±1,7	NS

En estos cuatro pacientes el IAH de Knodell previo al inicio del tratamiento con corticoides con/sin azatioprina era de 8,5±3,7 que tras recibir corticoides disminuyó a 4,7±1,7. Analizándolo de forma más detallada, vemos que en tres de los cuatro pacientes el IAH disminuyó con un tiempo entre exploraciones entre 139 meses y 195,3 meses; y en uno de los pacientes se mantuvo estable con un tiempo entre exploraciones de 52,5 meses (figura 9).

FIGURA 9. Comparación del IAH de Knodell antes y durante/después del tratamiento con corticoides con/sin azatioprina



IAH: índice de actividad histológica.

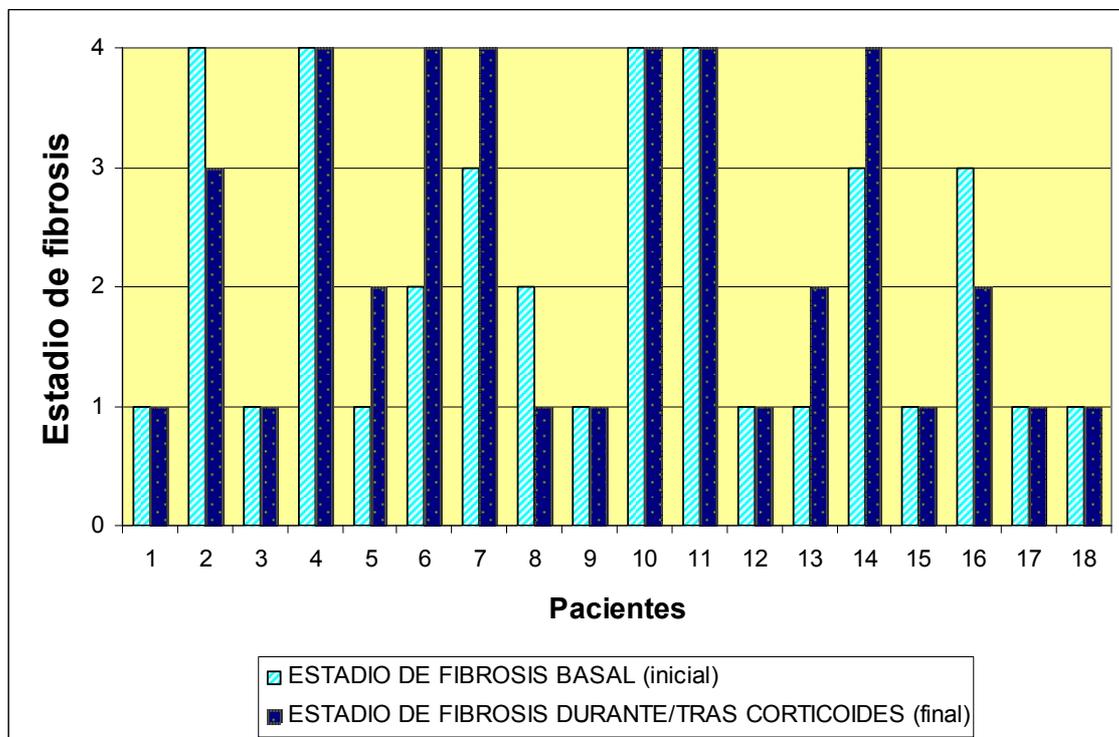
b. Fibrosis hepática

b.1. Comparación del estadio de fibrosis entre biopsia hepática/FibroScan® previo – biopsia hepática/FibroScan® durante/tras corticoides

La fibrosis hepática se cuantificó en estadios, para la biopsia hepática según el sistema METAVIR y para el FibroScan® según la escala de Castèra.

18 pacientes disponían de biopsia hepática/FibroScan® previos y durante/posterior al tratamiento con corticoides con/sin azatioprina. La figura 10 representa la evolución del estadio de fibrosis con el tratamiento, de forma individualizada en cada paciente. Observamos que en 10 casos la fibrosis se mantiene estable con el tratamiento, en 3 casos disminuye y en 5 casos progresa a lo largo del tiempo de tratamiento.

FIGURA 10. Comparación del estadio de fibrosis antes y durante/después del tratamiento con corticoides con/sin azatioprina en cada paciente



Respecto a la evolución del estadio de fibrosis, estos pacientes presentaban un estadio de fibrosis previo al inicio del tratamiento de $2,11 \pm 1,28$ que tras el mismo progresó a $2,25 \pm 1,4$ según los datos de las biopsias hepáticas o FibroScan® realizados, sin diferencia estadísticamente significativa ($p=0,42$). El tiempo medio entre ambas exploraciones fue de $123,6 \pm 88$ meses (rango: 22,3 – 329,1 meses).

b.2. Comparación Kpa previos – durante/tras corticoides

En los pacientes con dos FibroScan®, el valor medio inicial fue de $20,7 \pm 19,1$ kPa (rango 5,3 - 46kPa). Tras $27,5 \pm 4,3$ meses (rango 22,3 – 31,3 meses) se realizó un segundo FibroScan® obteniendo un valor medio de $25,7 \pm 29,1$ kPa (rango 4,9 – 67,8 kPa) ($p=0,46$) (tabla 29).

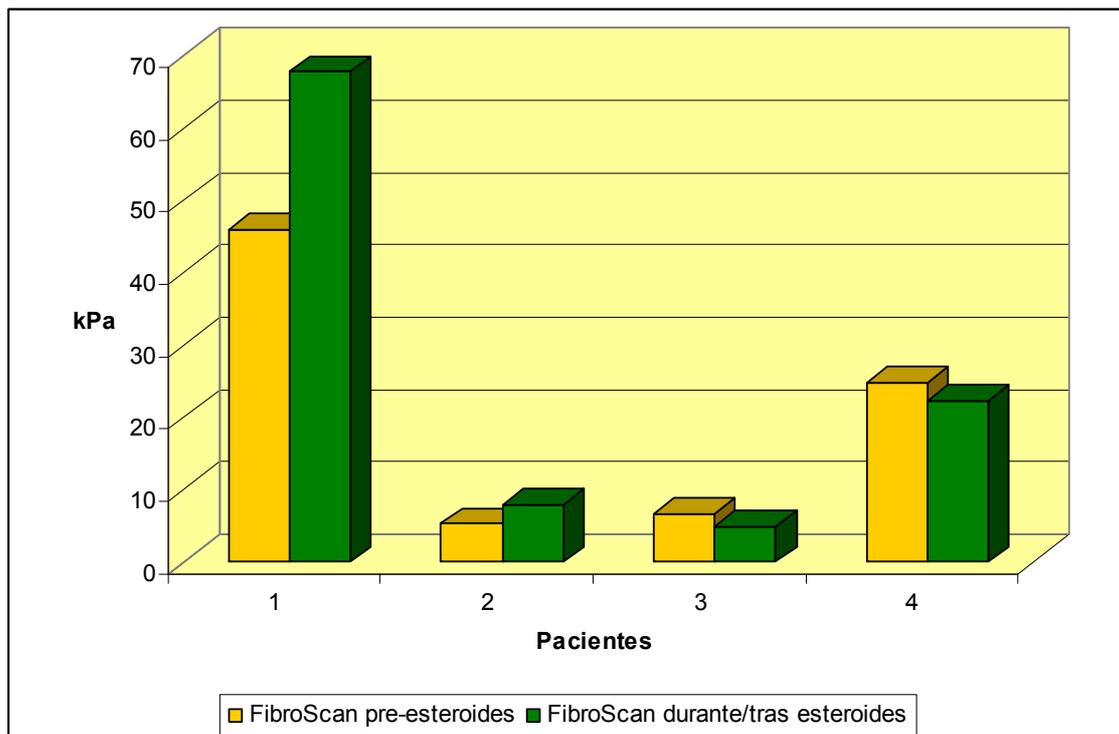
TABLA 29. Comparación entre kPa previos y durante/tras corticoides

	Cifra de kPa pre-esteroides media±DE	Cifra de kPa durante/tras tratamiento media±DE	p
kPa	20,7±19,1	25,7±29,1	NS

Pero como tan sólo 4 pacientes tienen cuantificado el estadio de fibrosis con FibroScan® tanto antes como después, este análisis tiene escaso valor representativo de la fibrosis en toda la muestra de pacientes, respecto al análisis previo.

En la figura 11 podemos observar la evolución en la fibrosis en kPa en cada uno de estos 4 pacientes. En dos de ellos la fibrosis progresó y en dos disminuyó.

FIGURA 11. Comparación de la fibrosis en kPa antes y durante/después del tratamiento con corticoides con/sin azatioprina



b.3. Comparación con grupo control.

i. Fibrosis previa – fibrosis durante/posterior

En el grupo de casos progresa el estadio de fibrosis en el 27,8%, y en el grupo control en el 30,4%, sin diferencias estadísticamente significativas ($p=0,83$).

En el grupo de casos hemos visto que el grado de fibrosis pre-esteroides es de $2,11\pm 1,28$ y con el tratamiento progresa a $2,25\pm 1,4$ según los datos de las biopsias hepáticas o FibroScan® realizados, sin diferencia estadísticamente significativa ($p=0,47$).

En el grupo control el grado de fibrosis inicial es de $1,77\pm 1,04$ con una progresión a $2,02\pm 1,1$ según los datos de los FibroScan® realizados, con una diferencia estadísticamente significativa entre ambos valores ($p=0,007$).

Para comparar la evolución del grado de fibrosis entre el grupo de pacientes tratados y el grupo control, es esencial tener en cuenta el tiempo transcurrido entre la realización de ambas exploraciones. Por este motivo, comparamos la progresión de la fibrosis como se expone en el siguiente apartado.

ii. Comparación de la progresión de la fibrosis por año

El tiempo medio transcurrido entre un/a BH/FibroScan® y otro/a en el grupo de casos es de $123,6\pm 88$ meses (rango: 22,3 - 329,1 meses); y el tiempo medio transcurrido entre un FibroScan® y otro en el grupo control es de $21,6\pm 7,9$ meses (rango: 12,2 – 41,6 meses). Por lo tanto, además de ser la progresión de la fibrosis mayor en el grupo control, hay que tener en cuenta

que esta progresión se produce en un periodo de tiempo inferior en el grupo control que en el de casos.

Para analizar este efecto, empleamos uno de los métodos que utilizó en su estudio de 1997 el grupo de Poynard, para calcular la progresión de la fibrosis por año (152). Este autor calcula la velocidad de progresión a partir del tiempo transcurrido entre la realización de dos BH y el resultado obtenido en éstas. Así en nuestro estudio calculamos la progresión de la fibrosis por año de la siguiente forma (expresado el resultado en unidades):

$$\frac{\text{fibrosis final} - \text{fibrosis inicial}}{\text{tiempo transcurrido entre exploraciones (años)}}$$

De esta forma obtenemos que la progresión de la fibrosis por año en los casos es de $0,054 \pm 0,25$ unidades, mientras que en los controles es de $0,196 \pm 0,6$ unidades ($p=0,26$) (tabla 30).

TABLA 30. Unidades de fibrosis por año en casos y controles

	Grupo de casos media±DE	Grupo de controles media±DE	p
Unidades fibrosis/año	0,054±0,25	0,196±0,6	NS

b.4. Fibrosis hepática tras al menos 100 meses de tratamiento con corticoides con/sin azatioprina (4 casos)

Describimos a continuación el efecto de los corticoides con o sin azatioprina sobre la fibrosis hepática en aquellos pacientes que recibieron un tratamiento más prolongado con corticoides con/sin azatioprina, considerando como tal un tiempo de tratamiento superior a 100 meses (8,3 años).

Analizamos los resultados de forma descriptiva:

- Un paciente tratado con corticoides a dosis media de 2,5mg/día con azatioprina por una HAI tipo 2 durante 17,3 años, progresó de fibrosis 3 a fibrosis 4. Ambos datos fueron obtenidos por biopsia hepática con una diferencia entre exploraciones de 16,3 años.
- Un paciente tratado con corticoides a dosis media de 7,5mg/día sin azatioprina por una artritis reumatoide durante 14,7 años, mejoró de fibrosis 4 a fibrosis 3. La diferencia entre la biopsia hepática inicial y el FibroScan® posterior fue de 22,5 años.
- Un paciente tratado con corticoides a dosis media de 10mg/día con azatioprina por una HAI tipo 2 durante 10,7 años, mantuvo una fibrosis 1 con una mejoría del IAH de 7 a 3 puntos. La diferencia entre ambas biopsias hepáticas fue de 12,8 años.
- Un paciente tratado con corticoides a dosis media de 7,5mg/día con azatioprina por una HAI tipo 2 durante 8,5 años, mejoró de fibrosis 3 a fibrosis 2. La diferencia entre la biopsia hepática inicial y el FibroScan® posterior fue de 8,8 años.

Por lo tanto, en estos cuatro casos vemos que el tratamiento con corticoides con o sin azatioprina a dosis bajas durante más de 100 meses, no supuso un empeoramiento de la fibrosis hepática. De forma global, en dos pacientes mejoró la fibrosis, en un paciente se mantuvo estable y en otro caso progresó, pero al cabo de 16,3 años, evolucionando a una cirrosis inactiva, por lo que respecto a la historia natural de la infección sin corticoides no aceleró la evolución de la fibrosis hepática.

5.2.2.4 Análisis del efecto de los corticoides con/sin azatioprina en pacientes con hepatopatía crónica virus C y HAI

Las causas por las que los pacientes virus C recibieron tratamiento con corticoides con/sin azatioprina son muy diversas y se detallan en material y método. Dado que una de estas causas es la HAI, realizamos el mismo análisis diferenciando entre pacientes tratados con corticoides con/sin azatioprina con HAI y pacientes sin HAI. De esta forma estudiamos si los resultados obtenidos dependen del efecto de los corticoides con/sin azatioprina sobre este subgrupo de pacientes, o todo el conjunto de pacientes tratados se comporta de forma similar.

Distinguimos por tanto para este análisis dos subgrupos dentro de los pacientes tratados con corticoides con/sin azatioprina: pacientes con HAI (8 pacientes) y pacientes sin HAI (20 pacientes). En el subgrupo de HAI, en 7 pacientes la causa del tratamiento con corticoides con o sin azatioprina es la propia HAI (1 pacientes HAI tipo 1 y 6 pacientes HAI tipo 2) y en un paciente la causa del tratamiento inicial fue un lupus eritematoso sistémico, pero que también estaba diagnosticado de HAI tipo 1.

No se detectaron diferencias entre el valor de las transaminasas, ni en el estadio de fibrosis previos a los corticoides entre ambos subgrupos, pero sí en la carga viral (tablas 31-33).

TABLA 31. Comparación HAI – no HAI en las transaminasas previas a corticoides con/sin azatioprina

Transaminasas previas	Coexistencia VHC-HAI	Transaminasas UI/ml (media±DE)	p
AST	No	74,1±58,6	NS
	Sí	129,7±163,2	
ALT	No	110±113,1	NS
	Sí	178,8±217,2	

TABLA 32. Comparación HAI – no HAI en el ARN-VHC previo a corticoides con/sin azatioprina

Coexistencia VHC-HAI	ARN VHC previo 10 ⁶ UI/ml (media±DE)	p
No	1,86±2,25	0,024
Sí	0,34±0,37	

TABLA 33. Comparación HAI – no HAI en el estadio de fibrosis previo a corticoides con/sin azatioprina

Coexistencia VHC-HAI	Estadio de fibrosis inicial (media±DE)	p
No	2,07±1,33	NS
Sí	2±1,29	

Analizaremos los siguientes aspectos separando el subgrupo de pacientes tratados con corticoides con/sin azatioprina que tienen una HAI de aquéllos sin HAI:

- Comparación de las transaminasas a lo largo del tratamiento respecto al valor basal (tabla 34 y 35).
- Evolución de las transaminasas durante el tratamiento (tabla 36 y 37).

- Comparación de la carga viral a lo largo del tratamiento respecto al valor basal (tabla 38).
- Evolución de la carga viral durante el tratamiento (tabla 39)
- Evolución del estadio de fibrosis con el tratamiento (tabla 40).

TABLA 34. Evolución de AST con corticoides respecto al valor basal en pacientes con/sin HAI

AST	Coexistencia VHC-HAI	Transaminasas UI/ml (media±DE)	p
Previa VS durante <3 meses	No	78,4±58,4 VS 51,2±4	0,02
	Sí	129,7±163,2 VS 64,5±45,2	NS
Previa VS durante 3-9 meses	No	78,4±58,4 VS 72,4±79,9	NS
	Sí	129,7±163,2 VS 73±56,6	NS
Previa VS durante 9-12 meses	No	83,4±61,9 VS 75,2±89,6	NS
	Sí	143,6±178,5 VS 54,4±29,2	0,043
Previa VS durante 12-24 meses	No	80,1±62,6 VS 66,6±78,1	NS
	Sí	143,6±178,5 VS 52±34,2	0,043
Previa VS durante >24 meses	No	75±70,2 VS 36,4±14,4	0,035
	Sí	49±19,5 VS 33,7±13,6	NS

TABLA 35. Evolución de ALT con corticoides respecto al valor basal en pacientes con/sin HAI

ALT	Coexistencia VHC-HAI	Transaminasas UI/ml (media±DE)	p
Previa VS durante <3 meses	No	116,4±114,5 VS 74,6±61	0,045
	Sí	178,8±217,2 VS 101,8±110,4	0,028
Previa VS durante 3-9 meses	No	116,4±114,6 VS 89,9±115,7	NS
	Sí	178,8±217,2 VS 111±113,3	NS
Previa VS durante 9-12 meses	No	128,5±119,9 VS 103,2±127,9	NS
	Sí	175,4±242,7 VS 66,4±40,2	0,043
Previa VS durante 12-24 meses	No	120,4±122,2 VS 94,2±113,3	NS
	Sí	175,4±242,7 VS 71,4±40,4	NS
Previa VS durante >24 meses	No	113±140,9 VS 41,2±23,3	NS
	Sí	66,3±15,5 VS 43±19,7	NS

TABLA 36. Evolución de AST durante el tratamiento con corticoides en pacientes con/sin HAI

AST durante el tratamiento	Coexistencia VHC-HAI	Transaminasas UI/ml (media±DE)	p
1ª determinación VS 2ª determinación	No	51,2±38,5 VS 73,7±72	0,048
	Sí	61,9±38,8 VS 62,4±51,7	NS
1ª determinación VS 3ª determinación	No	54,5±41,2 VS 73,1±80,8	NS
	Sí	60,6±41,7 VS 49±25,6	NS
1ª determinación VS 4ª determinación	No	55,6±47,6 VS 70,1±80,9	NS
	Sí	63,2±50,5 VS 52±34,2	NS
1ª determinación VS 5ª determinación	No	35,9±12,3 VS 38,4±14,2	NS
	Sí	37,3±13,6 VS 33,7±13,6	NS

TABLA 37. Evolución de ALT durante el tratamiento con corticoides en pacientes con/sin HAI

ALT durante el tratamiento	Coexistencia VHC-HAI	Transaminasas UI/ml (media±DE)	p
1ª determinación VS 2ª determinación	No	72,2±54,6 VS 97±114,3	NS
	Sí	92,9±95,5 VS 92,4±101,8	NS
1ª determinación VS 3ª determinación	No	78,8±57,2 VS 104,5±118,2	NS
	Sí	82,6±98,3 VS 59,3±35,1	NS
1ª determinación VS 4ª determinación	No	83±66,1 VS 99,2±117,4	NS
	Sí	89,2±118,5 VS 71,4±40,4	NS
1ª determinación VS 5ª determinación	No	49,9±19,3 VS 43,7±24	NS
	Sí	33±15,9 VS 43±19,7	NS

TABLA 38. Evolución del ARN-VHC con corticoides respecto al valor basal en pacientes con/sin HAI

ARN-VHC	Coexistencia VHC-HAI	ARN-VHC 10 ⁶ UI/ml (media±DE)	p
Previa VS durante <3 meses	No	2±2,7 VS 4,7±7,1	NS
	Sí	0,02±0,02 VS 0,1±0,2	NS
Previa VS durante 3-9 meses	No	2,1±3,1 VS 5,3±4,9	NS
	Sí	0,1±0,2 VS 1±1,5	NS
Previa VS durante 9-12 meses	No	2,5±3 VS 3,2±2,6	NS
	Sí	0,1±0,2 VS 0,9±1,4	NS
Previa VS durante 12-24 meses	No	2,1±2,7 VS 2,3±3,5	NS
	Sí	0,2±0,3 VS 0,7±0,9	NS
Previa VS durante >24 meses	No	1,2±0,8 VS 1,2±1,2	NS
	Sí	0,5±0,4 VS 2±1,9	NS

TABLA 39. Evolución del ARN-VHC durante el tratamiento con corticoides en pacientes con/sin HAI

ARN-VHC	Coexistencia VHC-HAI	ARN-VHC 10 ⁶ UI/ml (media±DE)	p
1 ^a determinación VS 2 ^a determinación	No	4,1±6,9 VS 3,3±4,6	NS
	Sí	0,2±0,2 VS 0,3±0,2	0,043
1 ^a determinación VS 3 ^a determinación	No	4,6±7,2 VS 2,5±2,6	NS
	Sí	0,1±0,1 VS 0,2±0,1	NS
1 ^a determinación VS 4 ^a determinación	No	5,1±7,6 VS 1,1±1,1	NS
	Sí	No datos	
1 ^a determinación VS 5 ^a determinación	No	1,3±2,5 VS 7,4±8,2	NS
	Sí	No datos	

TABLA 40. Evolución del estadio de fibrosis con corticoides en pacientes con/sin HAI

Coexistencia VHC-HAI	Fibrosis	Estadio de fibrosis	p
No	Fibrosis pre-esteroides	2,23±1,36	NS
	Fibrosis durante/tras esteroides	2,42±1,44	
Sí	Fibrosis pre-esteroides	1,8±1,09	NS
	Fibrosis durante/tras esteroides	1,8±1,3	

Los resultados del análisis diferenciando coexistencia de virus C y HAI o no (tablas 34-40) muestran mínimas discrepancias respecto al análisis global previo. Estas diferencias probablemente se deben al escaso número de pacientes al dividir los casos en los dos subgrupos HAI/no HAI.

Estos resultados muestran que los datos obtenidos en el análisis global no se ven influenciados por ser la HAI una de las patologías coexistentes con el virus C tratada con corticoides.

5.2.3 Efecto de la suspensión de corticoides

Tras finalizar el periodo de observación, 10 pacientes (35,7%) continuaban en tratamiento con corticoides. De los 18 pacientes (64,3%) restantes, 11 (39,2%) suspendieron el tratamiento por indicación médica, ya fuese por éxito o fracaso terapéutico, 1 (3,6%) lo abandonó por voluntad propia, en 1 paciente (3,6%) se realizó un trasplante hepático, 1 paciente (3,6%) concluyó su periodo de seguimiento al iniciar terapia antiviral con PEG-IFN+RBV, 3 pacientes (10,7%) abandonaron el seguimiento médico en las consultas y 1 paciente (3,6%) falleció como consecuencia de una sepsis de origen respiratorio, sin relación con el tratamiento con corticoides. De estos pacientes que finalizaron el tratamiento esteroideo durante el periodo observacional, disponemos de datos analíticos (transaminasas y/o viremia) de su evolución posterior al tratamiento en 9 casos (50%), distribuidos según refleja la tabla 41. Analizamos la influencia de la suspensión de los corticoides respecto al valor basal previo al tratamiento, y respecto a las determinaciones realizadas durante el mismo, tanto en los 6 primeros meses desde su finalización, como en los meses posteriores. Reflejamos en las tablas correspondientes los datos estadísticos. A pesar de la escasez de datos para este análisis, los resultados que se reflejan a continuación son muy homogéneos, si analizamos cada caso de forma descriptiva.

TABLA 41. Número de pacientes que disponen de datos para valorar el efecto de la suspensión de los corticoides

Determinaciones analíticas		< 6 meses	> 6 meses
PREVIO – POSTERIOR	Transaminasas	6/9 (66,6%)	7/9 (77,8%)
	Carga viral	3/9 (33,3%)	6/9 (66,6%)
DURANTE – POSTERIOR	Transaminasas	8/9 (88,9%)	9/9 (100%)
	Carga viral	5/9 (55,6%)	8/9 (88,9%)

5.2.3.1 Efecto sobre la bioquímica hepática

a. Comparación transaminasas previas – tras suspender el tratamiento con corticoides:

i. En los 6 primeros meses (6 pacientes)

En los primeros 6 meses tras haber retirado los corticoides, se produjo un mínimo descenso de AST y ALT en este periodo respecto a los valores previos a iniciar el tratamiento, sin diferencias significativas (tabla 42).

ii. Tras 6 meses sin corticoides (7 pacientes)

Tras haber transcurrido más de 6 meses de la retirada de los corticoides, se mantenían leves diferencias respecto a valor basal, sin diferencias significativas (tabla 42).

TABLA 42. Evolución de las transaminasas con la suspensión de los corticoides respecto al valor previo al inicio del tratamiento

	AST UI/ml (media±DE)	p	ALT UI/ml (media±DE)	p
• Previa	49,2±28	NS	59,2±45,7	NS
• < 6 meses tras corticoides	47,3±36,5		57,2±37,9	
• Previa	54,7±29,5	NS	70±50,6	NS
• > 6 meses tras corticoides	48,6±35,4		73,6±70,3	

b. Comparación de transaminasas durante – tras suspender los corticoides

i. En los 6 primeros meses (8 pacientes)

Tras retirar los corticoides, en los primeros 6 meses desde la suspensión del tratamiento, se produjo un leve aumento de las cifras de AST y de ALT respecto a las cifras durante el tratamiento, sin diferencias significativas, salvo

de forma aislada en la comparación con la tercera determinación de AST y de ALT (tabla 43).

TABLA 43. Evolución de las transaminasas tras menos de 6 meses de la suspensión de corticoides respecto a los valores durante tratamiento

Tabla 43a. Comparación de AST durante y tras menos de 6 meses de la suspensión de corticoides

	AST UI/ml media±DE	p
• 1ª determinación durante tratamiento	34,6±10,5	NS
• < 6 meses tras retirar corticoides	63,6±55,9	
• 2ª determinación durante tratamiento	60,8±45,8	NS
• < 6 meses tras retirar corticoides	63,6±55,9	
• 3ª determinación durante tratamiento	45,8±27,6	0,03
• < 6 meses tras retirar corticoides	77,3±58,8	
• 4ª determinación durante tratamiento	28,3±10	NS
• < 6 meses tras retirar corticoides	37,3±23,2	
• 5ª determinación durante tratamiento	42±9,9	NS
• < 6 meses tras retirar corticoides	48±19,8	

Tabla 43b. Comparación de ALT durante y tras menos de 6 meses de la suspensión de corticoides

	ALT UI/ml media±DE	p
• 1ª determinación durante tratamiento	45,1±16,9	NS
• < 6 meses tras retirar corticoides	93,1±106,3	
• 2ª determinación durante tratamiento	83,6±101	NS
• < 6 meses tras retirar corticoides	93,1±106,3	
• 3ª determinación durante tratamiento	67±63,6	0,03
• < 6 meses tras retirar corticoides	111±119,1	
• 4ª determinación durante tratamiento	38,3±6,3	NS
• < 6 meses tras retirar corticoides	46,7±34,3	
• 5ª determinación durante tratamiento	52±18,3	NS
• < 6 meses tras retirar corticoides	58,5±38,9	

ii. Tras más de 6 meses sin corticoides (9 pacientes)

A partir de los 6 meses de haber retirado los corticoides, los valores de las transaminasas no siguieron una línea homogénea, y en algunos casos hubo aumento y en otros disminución, según con qué determinación de transaminasas se realizase la comparación (tabla 44), sin diferencias estadísticamente significativas, excepto en el tercer valor de ALT durante el tratamiento.

TABLA 44. Evolución de las transaminasas tras más de 6 meses de la suspensión de corticoides respecto a valores durante tratamiento

Tabla 44a. Comparación de AST durante y tras más de 6 meses de la retirada de corticoides

	AST UI/ml media±DE	p
• 1ª determinación durante tratamiento	39,9±18,6	NS
• > 6 meses tras retirar corticoides	53,3±35,4	
• 2ª determinación durante tratamiento	65,2±44,8	NS
• > 6 meses tras retirar corticoides	53,3±35,4	
• 3ª determinación durante tratamiento	59,6±44,2	NS
• > 6 meses tras retirar corticoides	62±35,8	
• 4ª determinación durante tratamiento	59,6±44,2	NS
• > 6 meses tras retirar corticoides	62±35,8	
• 5ª determinación durante tratamiento	41±9,9	NS
• > 6 meses tras retirar corticoides	39,5±6,4	

Tabla 44b. Comparación de ALT durante y tras más de 6 meses de la retirada de corticoides

	ALT UI/ml media±DE	p
• 1ª determinación durante tratamiento	58,2±42,3	NS
• > 6 meses tras retirar corticoides	84,9±73,3	
• 2ª determinación durante tratamiento	95,6±101	NS
• > 6 meses tras retirar corticoides	84,9±73,3	
• 3ª determinación durante tratamiento	86,9±78,3	0,046
• > 6 meses tras retirar corticoides	95,4±81	
• 4ª determinación durante tratamiento	83,2±90	NS
• > 6 meses tras retirar corticoides	89,7±93	
• 5ª determinación durante tratamiento	52±18,4	NS
• > 6 meses tras retirar corticoides	46±8,5	

5.2.3.2 Efecto sobre el ARN-VHC

c. Comparación ARN-VHC previo – tras suspender los corticoides:

- i. En los 6 primeros meses (3 pacientes) y tras más de 6 meses sin corticoides (6 pacientes)

No hubo cambios entre la cifra de ARN-VHC previa al inicio de los corticoides y tras la retirada de éstos en los primeros 6 meses, pero sí un aumento significativo en los 6 meses posteriores (tabla 45). Sin embargo, a pesar de esta diferencia estadísticamente significativa, la cuantificación del aumento de la carga viral fue inferior a $1 \log_{10}$ IU/ml en todos los pacientes.

TABLA 45. Evolución del ARN-VHC con la suspensión de los corticoides respecto a valores previos al inicio del tratamiento

	ARN-VHC 10^6 UI/ml (media \pm DE)	p
• Previa	0,51 \pm 0,3	NS
• < 6 meses tras retirar corticoides	0,8 \pm 1,02	
• Previa	1,11 \pm 0,95	0,028*
• > 6 meses tras retirar corticoides	2,57 \pm 2,31	

* El aumento de carga viral en todos los pacientes fue inferior a $1 \log_{10}$ IU/ml.

d. Comparación ARN-VHC durante – tras suspender los corticoides:

- i. En los 6 primeros meses (5 pacientes)

Se produjo un descenso no significativo de las cifras de ARN-VHC en los primeros 6 meses tras retirar los corticoides, respecto a los valores durante el tratamiento (tabla 46).

TABLA 46. Evolución del ARN-VHC tras menos de 6 meses de la suspensión de corticoides respecto a valor previo al inicio del tratamiento

	ARN-VHC 10 ⁶ UI/ml (media±DE)	p
• 1 ^a determinación durante tratamiento • < 6 meses tras retirar corticoides	2,09±2,34 0,41±0,35	NS
• 2 ^a determinación durante tratamiento • < 6 meses tras retirar corticoides	1,21±1,68 0,6±0,44	NS
• 3 ^a determinación durante tratamiento • < 6 meses tras retirar corticoides	No hay datos	
• 4 ^a determinación durante tratamiento • < 6 meses tras retirar corticoides	No hay datos	
• 5 ^a determinación durante tratamiento • < 6 meses tras retirar corticoides	1,11±1,49 1,05±1,31	NS

ii. Tras más de 6 meses sin corticoides (8 pacientes)

Tras más de 6 meses de la retirada de los corticoides, no hubo diferencias significativas en la cifra de ARN-VHC, respecto a los valores durante el tratamiento (tabla 47).

TABLA 47. Evolución del ARN-VHC tras más de 6 meses de la suspensión de corticoides respecto a valores durante tratamiento

	ARN-VHC 10 ⁶ UI/ml (media±DE)	p
• 1 ^a determinación durante tratamiento • > 6 meses tras retirar corticoides	1,75±2,17 1,23±0,73	NS
• 2 ^a determinación durante tratamiento • > 6 meses tras retirar corticoides	2,78±2,97 1,98±1,82	NS
• 3 ^a determinación durante tratamiento • > 6 meses tras retirar corticoides	1,31±0,46 2,83±1,11	NS
• 4 ^a determinación durante tratamiento • > 6 meses tras retirar corticoides	0,28±0,31 0,6±0,41	NS
• 5 ^a determinación durante tratamiento • > 6 meses tras retirar corticoides	1,11±1,49 3,72±3,78	NS

Para estudiar el efecto de la retirada de los corticoides sobre la carga viral, dado el escaso número de pacientes para el análisis estadístico en este apartado, también hemos realizado un análisis descriptivo de la magnitud de los cambios observados en la carga viral. Así hemos comprobado que tan sólo en un paciente la carga viral disminuye más de $1 \log_{10}$ IU/ml ($1,2 \log_{10}$ IU/ml) en los 6 primeros meses sin esteroides, respecto al valor de ARN-VHC de los tres primeros meses de tratamiento; pero en los siguientes 6 meses sin corticoides esta disminución es inferior a $1 \log_{10}$ IU/ml.

Por lo tanto de forma global podemos concluir que la retirada de los corticoides, no supuso ningún cambio sostenido en las cifras de transaminasas ni de ARN-VHC respecto al valor basal, ni respecto a las determinaciones realizadas en el periodo de tratamiento. Esto fue así durante los 6 primeros meses desde la suspensión del tratamiento, y durante los meses posteriores.

6. DISCUSIÓN

En el pasado, cuando no se disponía de diagnóstico serológico, las llamadas hepatitis crónicas activas se trataban con corticoides con o sin azatioprina. Con el descubrimiento del AgHBs los pacientes con hepatitis crónicas se clasificaron por la presencia o no del AgHBs (195, 196). Sólo las AgHBs negativas continuaron tratándose con corticoides, pues en el VHB quedó demostrada la existencia de un receptor para los glucocorticoides, que empeoraba la evolución de la enfermedad con la administración de este fármaco (201, 206-209, 212, 213, 287). Sin embargo, en el VHC no existe este receptor y el efecto de los corticoides está por demostrar.

La elevada prevalencia del VHC en la población general, y la asociación del virus C a manifestaciones extrahepáticas, muchas de ellas de patogenia autoinmune, hace que haya numerosos casos de enfermedades autoinmunes que acontecen en portadores del virus C. Estos pacientes pueden precisar tratamiento con corticoides, habitualmente a dosis bajas y prolongadas, con o sin azatioprina, por lo que aclarar su efecto perjudicial o no sobre el virus y sobre la progresión de la enfermedad hepática resulta fundamental.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral analizamos el efecto *in vitro* de los corticoides y la azatioprina sobre la replicación del virus C. Para ello empleamos un modelo de replicón subgenómico del virus C Ava.5, cuya replicación se llevó a cabo en líneas celulares de hepatoma humano Huh7. Se añadieron a los cultivos diferentes dosis de corticoides y azatioprina y se cuantificó la replicación mediante RT-PCR.

Observamos que los corticoides no produjeron ningún efecto directo en la replicación del virus C con las distintas concentraciones de prednisona empleadas (figuras 7 y 8, tablas 17 y 18).

Un estudio *in vitro* realizado en cultivos en CMSP mostró que dosis altas de corticoides (20 µg/ml) aumentaban el ARN-VHC, pero este efecto no se detectaba al emplear dosis bajas (4 µg/ml) (288). El grupo de Henry (170) publicó que al aplicar corticoides a dosis clínicamente relevantes (1-10nM) sobre un modelo de replicón, no sólo no se incrementaba la replicación del VHC, sino que disminuía ligeramente (reducción del 41% en los niveles de ARN-VHC). Recientemente, un trabajo *in vitro* expuso que la administración en cultivos celulares de dosis altas de corticoides (50, 100 y 200 µg/ml) disminuía levemente la replicación del virus C, pero incrementaba su diseminación, debido a un aumento en la eficiencia de la entrada del VHC. Pero hay que tener en cuenta que la menor dosis que emplearon *in vitro* era de 50 µg/ml, lo que correspondía a 250mg/día *in vivo*, por lo que lo que este trabajo muestra es el posible mecanismo por el que la administración de corticoides a dosis elevadas en bolo resulta perjudicial para pacientes trasplantados hepáticos infectados por el VHC (173).

Así, los estudios previos realizados *in vitro* cuando emplean dosis más bajas de corticoides, no han demostrado un incremento en la replicación viral, lo que se corresponde con los resultados *in vitro* de la presenta Tesis Doctoral.

Con azatioprina se produjo muerte celular a dosis bajas, por lo que no se pudo mostrar el efecto inhibitorio reflejado en un estudio previo (184) (figura 7, tabla 17).

El efecto de los corticoides con o sin azatioprina a dosis bajas y prolongadas sobre la hepatopatía crónica virus C, lo evaluamos en el presente estudio en un grupo de 28 pacientes con hepatopatía crónica por VHC en tratamiento con corticoides a dosis $\leq 30\text{mg/día}$ durante más de 6 meses con o sin azatioprina, comparado con un grupo control de 56 pacientes sin tratamiento con características similares respecto edad, sexo, genotipo, carga viral, y estadio de fibrosis (tabla 16). Se evaluó el efecto sobre las transaminasas, la carga viral, el IAH de Knodell y la fibrosis hepática.

Los resultados del presente estudio muestran que en los 3 primeros meses de tratamiento con corticoides con o sin azatioprina, se produjo un descenso significativo de las transaminasas (AST $93,7 \pm 99,6$ versus $55,2 \pm 42,9$ UI/ml, $p=0,006$; ALT $135,1 \pm 149,1$ versus $82,8 \pm 77$ UI/ml, $p=0,002$). Posteriormente, en los periodos analizados a lo largo del tratamiento (3-9 meses, 9-12 meses, 12-24 meses, > 24 meses), el valor medio de las transaminasas se mantuvo por debajo del valor basal, pero sin cambios estadísticamente significativos (tablas 20 y 21).

Durante el tratamiento con corticoides con/sin azatioprina se produjo un aumento del ARN-VHC respecto al valor basal, pero sin diferencias significativas ni a corto/medio plazo (≤ 12 meses), ni a largo plazo (> 12 meses) (tabla 25). E igualmente es importante señalar que no hubo cambios en la cuantificación de la viremia mayores de $1 \log_{10}$ IU/ml respecto al valor basal, mantenidos a lo largo del tratamiento, en ninguno de los pacientes.

A lo largo del tiempo de tratamiento con corticoides con/sin azatioprina no se produjeron oscilaciones significativas en las cifras de AST, ALT ni ARN-VHC (tablas 22, 23 y 26).

Estudios previos en pacientes clasificados dentro del heterogéneo grupo de las hepatitis crónicas activas AgHBs negativas, mostraron que los corticoides a dosis bajas (10-30mg/día de prednisona), con o sin azatioprina, producían una mejoría tanto de marcadores bioquímicos como histológicos. Asimismo su interrupción podía empeorar la progresión de la enfermedad hepática (289), y lo más importante, su administración no causaba un efecto perjudicial en la supervivencia (290). Otros autores (291) emplearon marcadores serológicos de autoinmunidad, como ANA, SMA, marcadores de lupus eritematoso y/o enfermedades autoinmunes asociadas, para diferenciar entre dos subgrupos de pacientes AgHBs negativos: aquéllos con HAI y aquéllos sin HAI. En ambos se evaluó la respuesta a dosis bajas de esteroides (10-20mg/día de prednisona), con o sin azatioprina. No se encontraron diferencias en la tasa de remisión, fracaso del tratamiento, progresión de la cirrosis o exitus, lo que sugería la ausencia de diferencias significativas en la respuesta a esteroides entre paciente con HAI y aquéllos con probable hepatopatía virus C.

Así estos trabajos, previos al descubrimiento del virus C, muestran un efecto beneficioso, o al menos no perjudicial de los corticoides a dosis bajas sobre las hepatopatías crónicas activas, dentro de las cuales la gran mayoría eran por virus C (2-4). Sin embargo, a partir del descubrimiento del virus C (1), se realizaron varios trabajos, de metodología heterogénea, con el fin de estudiar el efecto de los corticoides en pacientes con hepatopatía crónica virus

C, en los que se mostró mayoritariamente que se producía una reducción de las transaminasas, pero a expensas de un aumento significativo de la viremia (222, 292-295).

Dos de estos estudios se centraron en analizar la influencia sobre las transaminasas: el grupo de Thiele (222) muestra el efecto de los corticoides sobre las transaminasas a dosis de ≥ 20 mg/día de prednisona o prednisolona tras al menos 6 meses de tratamiento en 32 pacientes con HNANB diferenciando el efecto entre aquéllos con anti-VHC positivo y negativo. Clasifica la respuesta al tratamiento como completa (aminotransferasas normales durante ≥ 1 mes), parcial (disminución de más de un 50%), o no respuesta. En este trabajo se observa que los corticoides produjeron una disminución de las transaminasas tanto en pacientes anti-VHC positivo como negativo, si bien todos los sujetos anti-VHC negativo tuvieron una respuesta completa al año de tratamiento, mientras que el 80% de los sujetos anti-VHC positivos tuvieron una favorable respuesta inicial aunque parcial, pero al disminuir el régimen de tratamiento a 5-10mg/día de prednisona con o sin azatioprina, sólo seis de los 15 pacientes anti-VHC positivo, mantuvieron las transaminasas en $< 2 \log_{10}$ IU/ml el límite superior de la normalidad. Es decir, el efecto que tuvieron los corticoides sobre las transaminasas fue favorable tanto en pacientes anti-VHC positivo como negativo, pero aquéllos anti-VHC positivo tuvieron una menor respuesta y en la mayor parte de los pacientes sólo inicial. En el estudio de Schiano y colaboradores (295), se administró prednisona (20-40mg/día) a siete pacientes diagnosticados de síndrome de *overlap* HAI-VHC, uno de ellos junto con azatioprina y otro con ciclosporina, con una mediana de seguimiento de 44,5 meses. Se observó un descenso significativo en las cifras

de ALT y gammaglobulina, así como una mejoría significativa en el IAH de Knodell (desde un valor basal medio de $11,4 \pm 2,5$ a una puntuación de $6,6 \pm 2,6$ tras al menos 1 año de tratamiento; $p=0,04$), sin erradicación viral. Por lo tanto los corticoides no empeoraron el componente de hepatopatía crónica por virus C.

Tres estudios muestran una disminución de las transaminasas, pero analizan también el efecto sobre la viremia, detectando un concomitante aumento significativo del ARN-VHC, con lo que se consideraba que de forma global este tratamiento podía ser perjudicial. En los 3 trabajos se administraban dosis altas de esteroides en pauta descendente en ciclos cortos de tratamiento e incluían un escaso número de pacientes:

En uno de ellos analizaron retrospectivamente la relación entre viremia y respuesta a IFN, y entre viremia y tratamiento con corticoides en pacientes con autoanticuerpos (ANA o LKM) y anti-VHC positivo. Respecto a este último punto, 14 pacientes fueron tratados con prednisona (3 meses de tratamiento, a dosis de $37,5\text{mg/día}$ durante 30 días y posteriormente $25-12,5\text{mg/día}$), observando que el nivel de la viremia determinado mediante bADN se incrementó de forma estadísticamente significativa tras tres meses de tratamiento, con un descenso de ALT (293). Previo a este estudio el mismo grupo había publicado otro trabajo en el que, tras tratar con la misma pauta de corticoides a 7 pacientes ARN-VHC positivos con presencia de anticuerpos séricos (ANA, SMA, LKM) durante 6 meses, habían observado un descenso no significativo de las transaminasas (296).

El trabajo de Fong y colaboradores (292) coincide en la detección de un descenso de las transaminasas (ALT basal media 184 U/L antes del

tratamiento versus 84U/L tras 7 semanas de corticoides; $p=0,002$), junto con un aumento significativo de la viremia según su cuantificación por bADN (ARN-VHC basal medio $40,9 \times 10^5$ Eq/ml con un pico medio de $414,3 \times 10^5$ Eq/ml durante el tratamiento; $p=0,043$), con un aumento superior a $1 \log_{10}$ IU/ml en el 80% de los pacientes cuantificado por RT-PCR. El número de pacientes incluido es muy reducido (10 para el análisis sobre las transaminasas y 9 pacientes para la determinación de ARN-VHC, todos ellos sin presencia de anticuerpos ANA, SMA ni LKM), y la pauta de prednisona administrada es de 60mg/día de prednisona inicialmente con una pauta descendente hasta su suspensión en 7 semanas.

Posteriormente se elaboró un estudio randomizado, doble ciego, controlado con placebo en pacientes con hepatopatía crónica virus C a los que se les administraba prednisona a dosis inicial de 60mg/día en pauta descendente durante 6 semanas (16 pacientes) o placebo (17 pacientes), y posteriormente a todos ellos tratamiento con IFN α 2b para analizar la existencia de diferencias en la RVS. Además de registrar que no hubo diferencias en la RVS, se examinó la evolución de ALT y ARN-VHC con los corticoides: ALT disminuyó y ARN-VHC aumentó durante el tratamiento, ambos cambios de forma significativa. Además otorgaron a los corticoides una morbilidad importante, pues relacionaron dos complicaciones severas con el uso de este fármaco: una infección de tejidos blandos que requirió desbridar quirúrgicamente y una descompensación hepática en forma de ascitis (294). Sin embargo, en el presente trabajo los corticoides a dosis bajas administrados durante periodos superiores a 6 meses, con o sin azatioprina ha demostrado ser un fármaco seguro, ya que no hemos detectado ninguna complicación

severa que pueda relacionarse con la administración de corticoides a las dosis pautadas por otras comorbilidades en pacientes con hepatopatía crónica virus C .

Otras publicaciones también investigan la influencia en la RVS de la administración de corticoides previamente a IFN (297-299), basándose en la idea de que la manipulación del sistema inmune de pacientes con infección crónica por el virus C mediante la administración de un curso corto de esteroides pudiese mejorar la eficacia del tratamiento con interferón, al incrementar la actividad del sistema inmune frente al virus C con la retirada de los corticoides. En este sentido se observó que la administración de esteroides indujo una disminución de ALT y un aumento de ARN-VHC, y su posterior interrupción, causó un rebrote en la ALT y un descenso en la concentración de ARN-VHC sérica, pero estos cambios no afectaron la posterior efectividad del tratamiento con IFN alfa, si evaluaban la RVS correctamente mediante la viremia.

Tan solo un estudio detecta un aumento significativo de las transaminasas en 8 pacientes ARN-VHC positivos con presencia de anticuerpos ANA o LKM sin ningún otro dato de HAI, que fueron tratados con prednisona a dosis de 0,5mg/kg/día durante un mes, disminuyendo dosis a 0,2mg/kg/día hasta completar una media de 4 meses (rango 3-6 meses). Pero en aquellos pacientes en los que se habían incrementado las transaminasas, se realizó una biopsia hepática al finalizar los corticoides, sin cambios significativos en el IAH de Knodell (300).

Por lo tanto, de forma global y en comparación con los estudios publicados, la presente Tesis Doctoral corrobora el efecto de los corticoides respecto a la disminución de las transaminasas, especificando en el presente estudio que sólo se produce de forma significativa en los 3 primeros meses de tratamiento. En cuanto al efecto sobre la carga viral, no hemos detectado diferencias significativas en el aumento del ARN-VHC que se produce con la administración de corticoides a dosis bajas y tiempo prolongado, a diferencias de los trabajos que analizan este aspecto, si bien como ya hemos mencionado la pauta de administración es distinta: las dosis que emplean son altas (60mg/día de prednisona de forma inicial) y durante cortos periodos de tiempo (6-7 semanas); el número de pacientes incluido en todos los trabajos es inferior; y sólo uno es prospectivo y comparado con un grupo control tratado con placebo.

Evaluamos el efecto que causó la suspensión de los corticoides en las transaminasas y el ARN-VHC en dos periodos: en los primeros 6 meses sin corticoides, y tras más de 6 meses sin corticoides (tablas 42-47). Nuestros resultados muestran que la retirada de los corticoides no supuso ningún cambio significativo de forma sostenida en las cifras de transaminasas ni de carga viral respecto al valor basal ni respecto a las determinaciones realizadas en el tiempo de tratamiento en ninguno de los dos periodos examinados. Sólo dos trabajos previos analizan este efecto sobre las transaminasas y uno sobre la viremia, sin la influencia de ninguna medicación administrada inmediatamente después (294). En uno de ellos las transaminasas rebrotaron en los 8 pacientes (de los 10 incluidos) en los que habían disminuido durante el tratamiento tras

una media de 7,7 semanas sin corticoides (rango 4-12 semanas); y los niveles de ARN-VHC disminuyeron a los valores previos al tratamiento tras una media de 2,8 semanas sin corticoides (rango 1-5 semanas) (292). Sin embargo, en otro trabajo, con un mayor número de pacientes y en concordancia con los resultados del presente estudio no se produjo rebrote de las transaminasas después de tres meses sin corticoides, tras el descenso inicial (293).

La fibrosis hepática es el factor predictor de severidad más importante en la evolución de la hepatopatía crónica virus C (147, 149-151, 155). Por lo tanto, consideramos fundamental para estudiar la influencia de los corticoides sobre la enfermedad hepática, analizar el efecto sobre el IAH de Knodell y la fibrosis hepática.

El IAH de Knodell previo al inicio del tratamiento con corticoides con/sin azatioprina se comparó con el obtenido durante o tras el tratamiento, adquiriendo una disminución en la puntuación, pero sin una diferencia estadísticamente significativa (IAH de Knodell medio previo de $8,5 \pm 3,7$ versus $4,7 \pm 1,7$ durante/tras el tratamiento). De los cuatro pacientes que incluimos en el análisis, vemos que en tres el IAH de Knodell disminuyó con un tiempo medio entre exploraciones entre 139 meses y 195,3 meses; y en uno de los pacientes se mantuvo estable con un tiempo medio entre exploraciones de 52,5 meses (figura 9).

La fibrosis hepática se cuantificó en estadios, para la biopsia hepática según el sistema METAVIR (137) y para el FibroScan® según la escala de Castèra (139, 143, 286). 18 pacientes disponían de 2 biopsias hepáticas/FibroScan® previos y durante/tras el tratamiento. De forma

individualizada en 10 casos la fibrosis se mantuvo estable con el tratamiento, en 3 casos disminuyó y en 5 casos progresó a lo largo del tiempo de tratamiento (figura 10).

Los pacientes que recibieron corticoides con/sin azatioprina, tenían un estadio medio de fibrosis basal de $2,11 \pm 1,28$ que tras el tratamiento con corticoides con/sin azatioprina progresó a $2,25 \pm 1,4$, sin una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,42$). El tiempo medio entre ambas exploraciones fue de $123,6 \pm 88$ meses (rango: 22,3 – 329,1 meses). En el grupo control el estadio medio de fibrosis inicial fue de $1,77 \pm 1,04$ con una progresión a $2,02 \pm 1,1$, con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,007$). El tiempo medio transcurrido entre los FibroScan® fue de $21,6 \pm 7,9$ meses (rango: 12,2 – 41,6 meses). Es decir, en el grupo control la progresión de la fibrosis fue superior en un menor periodo de tiempo.

Para el análisis del efecto de los corticoides con/sin azatioprina sobre la progresión de la fibrosis hepática, en comparación con el grupo control, consideramos esencial tener en cuenta el tiempo entre las exploraciones (biopsia hepática y/o FibroScan®). Por ello empleamos uno de los métodos directos para calcular la velocidad de progresión de la fibrosis hepática que utilizó el grupo de Poynard en 1997 (152). Calculó la velocidad de progresión a partir del tiempo transcurrido entre la realización de dos biopsias hepáticas y el resultado obtenido en éstas (fibrosis final – fibrosis inicial / tiempo entre exploraciones en años; expresado el resultado en unidades/año). De esta forma obtenemos que la progresión media de la fibrosis por año en los casos es de $0,054 \pm 0,25$ unidades/año, mientras que en los controles es de $0,196 \pm 0,6$ unidades/año ($p=0,26$) (tabla 30).

Estudios previos que emplean este mismo sistema de biopsias pareadas marcan una velocidad de progresión de la fibrosis media de $0,212 \pm 0,66$ unidades/año para pacientes con una fibrosis estadio 0, y de $0,266 \pm 0,91$ unidades/año para pacientes con estadio 1 (301), o una mediana global de $0,183$ unidades/año (152). Asimismo un metaanálisis que incluye 111 estudios de pacientes con infección crónica por el virus C ($n=33.121$) estima una media anual de progresión de la fibrosis hepática de $0,117$ para $F0 \rightarrow F1$, de $0,085$ para $F1 \rightarrow F2$, de $0,120$ para $F2 \rightarrow F3$, y de $0,116$ para $F3 \rightarrow F4$ (302), empleando el método de Markov (303). Es decir, estos valores de progresión de la fibrosis se aproximan al obtenido en el grupo control; y tanto por la comparación con el grupo control, como por los datos de la literatura, la progresión media de fibrosis por año en los pacientes tratados con corticoides con o sin azatioprina es inferior.

Cuatro pacientes de los 18 que disponen de dos biopsias hepáticas/FibroScan® fueron tratados más de 100 meses (8,3 años) con corticoides con/sin azatioprina. En dos la fibrosis mejoró, en un paciente se mantuvo estable y en otro caso progresó, pero al cabo de 16,3 años, evolucionando a una cirrosis inactiva, por lo que respecto a la historia natural de la infección los corticoides no aceleraron la evolución de la fibrosis hepática. Únicamente un estudio analiza si existen cambios histológicos con la administración de corticoides en 6 pacientes en los que prolonga el tratamiento hasta 12 meses, tras lo que realiza una segunda biopsia hepática. En un caso detecta mejoría (de hepatitis crónica activa severa a moderada), en tres pacientes cirróticos disminución de la actividad necroinflamatoria, y en dos casos no hubo cambios (292).

Por lo tanto, en el presente trabajo de Tesis Doctoral hemos comprobado que los corticoides a dosis bajas pautados más de 6 meses carecen de un efecto perjudicial sobre un factor de gran impacto en la evolución de la hepatopatía crónica virus C, como es la fibrosis hepática. Así hemos obtenido una tendencia hacia una disminución del IAH de Knodell y una menor progresión de la fibrosis, pero sin diferencias estadísticamente significativas. Datos en concordancia con lo descrito en la escasa literatura previa en este sentido.

En el análisis distinguiendo pacientes con/sin HAI coexistente (tablas 34-40), se muestran mínimas discrepancias respecto al análisis global previo, probablemente debidas al escaso número de pacientes al dividir los casos en los dos subgrupos HAI/no HAI. Por lo tanto, en los resultados obtenidos no influye que la HAI sea una de las patologías coexistentes con el virus C tratada con corticoides con/sin azatioprina.

Existen ciertas limitaciones en el presente estudio. En primer lugar, el grupo control no está compuesto por pacientes aleatorizados con hepatopatía crónica virus C a los que les corresponde no tomar corticoides, ya que la indicación de corticoides con o sin azatioprina del grupo de casos se debía a otra patología concomitante, que el grupo control no padecía. No obstante, el hecho de no padecer otra enfermedad concomitante posiblemente no haya afectado de forma beneficiosa a la evolución de la hepatopatía, sino en tal caso ésta podría suponer un mayor deterioro de la misma. En segundo lugar, se trata de un estudio clínico observacional retrospectivo-prospectivo, con las

limitaciones en cuanto a la obtención de datos que esto ha supuesto, como el hecho de no disponer en todos los pacientes de biopsia hepática previa y posterior al tratamiento, o que el tiempo de seguimiento en casos y controles sea diferente. Pero fue posible completar la obtención de datos en un número no desdeñable de pacientes con un tiempo de seguimiento prolongado, y se contrarrestó el efecto de un tiempo de seguimiento distinto al grupo control al emplear el cálculo de la velocidad de progresión de la fibrosis. Por último, el tamaño muestral ha reducido la potencia estadística de los resultados. Por estos motivos, se proponen como posibles futuras líneas de investigación, realizar estudios prospectivos aleatorizados con un mayor número de pacientes, para corroborar el efecto neutro de los corticoides sobre la hepatopatía crónica virus C, e incluso para estudiar la hipótesis de un efecto beneficioso sobre la misma. Sin embargo, incluso aunque este beneficio se demostrase, existen en la actualidad tratamientos muy eficaces frente a la hepatopatía crónica virus C (6, 7, 22-31), que harían que la aplicación de los corticoides como tratamiento fuese muy limitada.

Respecto al trabajo *in vitro*, futuros estudios más completos y complejos podrían analizar el efecto de los corticoides a dosis bajas en el ciclo completo de la replicación del virus C, como sería estudiar si el incremento de la entrada del VHC en los hepatocitos, con el consiguiente efecto favorable en la diseminación del virus descrito en un trabajo previo (173), también se produce utilizando dosis más bajas de corticoides.

En resumen, en la práctica clínica hay pacientes con hepatopatía crónica virus C que requieren tratamiento con corticoides con o sin azatioprina por

otras patologías concomitantes. Muchas de estas patologías requieren dosis bajas durante periodos de tiempo prolongados. El presente estudio demuestra que los corticoides *in vitro* no influyen sobre la replicación viral y que *in vivo* producen un descenso significativo inicial en las transaminasas, sin cambios en la carga viral y sin una mayor progresión de la fibrosis hepática. Por lo que dosis bajas de corticoides con o sin azatioprina durante periodos superiores a 6 meses no empeoran la historia natural de la enfermedad hepática.

7. CONCLUSIONES

1. Los corticoides *in vitro* no afectan a la replicación del VHC.
2. En pacientes con hepatopatía crónica virus C, los corticoides a dosis bajas ($\leq 30\text{mg/día}$ de prednisona o esteroide equivalente) con o sin azatioprina producen un descenso inicial significativo de las transaminasas.
3. En pacientes con hepatopatía crónica virus C, los corticoides a dosis bajas ($\leq 30\text{mg/día}$ de prednisona o esteroide equivalente) con o sin azatioprina no causan cambios significativos en la carga viral a corto plazo ni a largo plazo.
4. En pacientes con hepatopatía crónica virus C, tratados con corticoides a dosis bajas ($\leq 30\text{mg/día}$ de prednisona o esteroide equivalente) con o sin azatioprina durante periodos prolongados (> 6 meses), el IAH de Knodell disminuye respecto al valor basal, sin diferencias significativas; y la progresión de la fibrosis muestra una tendencia al enlentecimiento respecto al grupo control, sin diferencias significativas.
5. Los corticoides a dosis bajas ($\leq 30\text{mg/día}$ de prednisona o esteroide equivalente) administrados durante periodos prolongados de tiempo (> 6 meses) con o sin azatioprina en pacientes con hepatopatía crónica por virus C, no producen una variación significativa en la progresión de la enfermedad hepática.

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(4902):359-362.
2. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*. 1989;244(4902):362-364.
3. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PY, 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(17):2231-2235.
4. Bortolotti F, Tagger A, Cadrobbi P, Crivellaro C, Pregliasco F, Ribero ML, et al. Antibodies to hepatitis C virus in community-acquired acute non-A, non-B hepatitis. *J Hepatol*. 1991;12(2):176-180.
5. Japanese Red Cross Non-A Bhrq. Effect of screening for hepatitis C virus antibody and hepatitis B virus core antibody of incidence of postransfusion hepatitis. *Lancet*. 1991;338(8774):1040-1041.
6. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Jr., et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002;347(13):975-982.
7. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*. 2001;358(9286):958-965.
8. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2011;55(2):245-264.
9. Berg T, von WM, Nasser S, Sarrazin C, Heintges T, Gerlach T, et al. Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1: comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon-alfa-2a plus ribavirin. *Gastroenterology*. 2006;130(4):1086-1097.
10. Dalgard O, Bjoro K, Hellum KB, Myrvang B, Ritland S, Skaug K, et al. Treatment with pegylated interferon and ribavirin in HCV infection with genotype 2 or 3 for 14 weeks: a pilot study. *Hepatology*. 2004;40(6):1260-1265.
11. Dalgard O, Bjoro K, Ring-Larsen H, Bjornsson E, Holberg-Petersen M, Skovlund E, et al. Pegylated interferon alfa and ribavirin for 14 versus 24 weeks in patients with hepatitis C virus genotype 2 or 3 and rapid virological response. *Hepatology*. 2008;47(1):35-42.
12. Diago M, Shiffman ML, Bronowicki JP, Zeuzem S, Rodríguez-Torres M, Pappas SC, et al. Identifying hepatitis C virus genotype 2/3 patients who can receive a 16-week abbreviated course of peginterferon alfa-2a (40KD) plus ribavirin. *Hepatology*. 2010;51(6):1897-1903.

13. Ferenci P, Laferl H, Scherzer TM, Gschwantler M, Maieron A, Brunner H, et al. Peginterferon alfa-2a and ribavirin for 24 weeks in hepatitis C type 1 and 4 patients with rapid virological response. *Gastroenterology*. 2008;135(2):451-458.
14. Ferenci P, Laferl H, Scherzer TM, Maieron A, Hofer H, Stauber R, et al. Peginterferon alfa-2a/ribavirin for 48 or 72 weeks in hepatitis C genotypes 1 and 4 patients with slow virologic response. *Gastroenterology*. 2010;138(2):503-512.
15. Mangia A, Santoro R, Minerva N, Ricci GL, Carretta V, Persico M, et al. Peginterferon alfa-2b and ribavirin for 12 vs. 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med*. 2005;352(25):2609-2617.
16. Sánchez-Tapias JM, Diago M, Escartín P, Enríquez J, Romero-Gómez M, Bárcena R, et al. Peginterferon-alfa2a plus ribavirin for 48 versus 72 weeks in patients with detectable hepatitis C virus RNA at week 4 of treatment. *Gastroenterology*. 2006;131(2):451-460.
17. Shiffman ML, Suter F, Bacon BR, Nelson D, Harley H, Solá R, et al. Peginterferon alfa-2a and ribavirin for 16 or 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med*. 2007;357(2):124-134.
18. von WM, Huber M, Berg T, Hinrichsen H, Rasenack J, Heintges T, et al. Peginterferon-alpha-2a (40KD) and ribavirin for 16 or 24 weeks in patients with genotype 2 or 3 chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2005;129(2):522-527.
19. Zeuzem S, Buti M, Ferenci P, Sperl J, Horsmans Y, Cianciara J, et al. Efficacy of 24 weeks treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C infected with genotype 1 and low pretreatment viremia. *J Hepatol*. 2006;44(1):97-103.
20. Moreno C, Deltenre P, Pawlotsky JM, Henrion J, Adler M, Mathurin P. Shortened treatment duration in treatment-naive genotype 1 HCV patients with rapid virological response: a meta-analysis. *J Hepatol*. 2010;52(1):25-31.
21. Farnik H, Lange CM, Sarrazin C, Kronenberger B, Zeuzem S, Herrmann E. Meta-analysis shows extended therapy improves response of patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010;8(10):884-890.
22. Muir AJ, Poordad FF, McHutchison JG, Shiffman ML, Berg T, Ferenci P, et al. Retreatment with telaprevir combination therapy in hepatitis C patients with well-characterized prior treatment response. *Hepatology*. 2011;54(5):1538-1546.
23. Kumada H, Toyota J, Okanoué T, Chayama K, Tsubouchi H, Hayashi N. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for treatment-naive patients chronically infected with HCV of genotype 1 in Japan. *J Hepatol*. 2012;56(1):78-84.

24. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2011;364(25):2405-2416.
25. Asselah T, Marcellin P. New direct-acting antivirals' combination for the treatment of chronic hepatitis C. *Liver Int*. 2011;31 Suppl 1:68-77.
26. Fontaine H, Pol S. Antiviral activity of telaprevir and boceprevir for the treatment of hepatitis C virus infection in treatment-experienced patients. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2011;35 Suppl 2:S59-S63.
27. Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Marcellin P, Vierling JM, Zeuzem S, et al. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med*. 2011;364(13):1207-1217.
28. Poordad F, McCone J, Jr., Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med*. 2011;364(13):1195-1206.
29. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*. 2009;49(4):1335-1374.
30. Hezode C, Forestier N, Dusheiko G, Ferenci P, Pol S, Goeser T, et al. Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med*. 2009;360(18):1839-1850.
31. McHutchison JG, Everson GT, Gordon SC, Jacobson IM, Sulkowski M, Kauffman R, et al. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med*. 2009;360(18):1827-1838.
32. Clark PJ, Thompson AJ, McHutchison JG. IL28B genomic-based treatment paradigms for patients with chronic hepatitis C infection: the future of personalized HCV therapies. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(1):38-45.
33. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 2009;461(7262):399-401.
34. Ghany MG, Nelson DR, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2011;54(4):1433-1444.
35. Mangia A, Thompson AJ, Santoro R, Piazzolla V, Tillmann HL, Patel K, et al. An IL28B polymorphism determines treatment response of hepatitis C virus genotype 2 or 3 patients who do not achieve a rapid virologic response. *Gastroenterology*. 2010;139(3):821-827.
36. McCarthy JJ, Li JH, Thompson A, Suchindran S, Lao XQ, Patel K, et al. Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained

- response to pegylated interferon and ribavirin. *Gastroenterology*. 2010;138(7):2307-2314.
37. McHutchison JG. The role of genetic markers in hepatitis C virus therapy: a major step for individualized care. *Liver Int*. 2011;31 Suppl 1:29-35.
 38. Stattermayer AF, Stauber R, Hofer H, Rutter K, Beinhardt S, Scherzer TM, et al. Impact of IL28B genotype on the early and sustained virologic response in treatment-naive patients with chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011;9(4):344-350.
 39. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*. 2009;41(10):1105-1109.
 40. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet*. 2009;41(10):1100-1104.
 41. Francki RI, Fauquet C, Knudson D, Brown F. Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol*. 1991;Suppl 2:223-233.
 42. Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, et al. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Arch Virol*. 1998;143(12):2493-2503.
 43. Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo QL. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology*. 1991;14(2):381-388.
 44. Rosenberg S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J Mol Biol*. 2001;313(3):451-464.
 45. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2001;345(1):41-52.
 46. Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 2000;81(Pt 7):1631-1648.
 47. Kolykhalov AA, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol*. 2000;74(4):2046-2051.
 48. McLauchlan J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat*. 2000;7(1):2-14.

49. Brass V, Moradpour D, Blum HE. Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 update. *Int J Med Sci.* 2006;3(2):29-34.
50. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(6):2451-2455.
51. De FR. Molecular virology of the hepatitis C virus. *J Hepatol.* 1999;31 Suppl 1:47-53.
52. Zignego AL, De CM, Monti M, Careccia G, La VG, Giannini C, et al. Hepatitis C virus infection of mononuclear cells from peripheral blood and liver infiltrates in chronically infected patients. *J Med Virol.* 1995;47(1):58-64.
53. Cribier B, Schmitt C, Bingen A, Kirn A, Keller F. In vitro infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. *J Gen Virol.* 1995;76(Pt 10):2485-2491.
54. Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, et al. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol.* 2006;80(14):6964-6972.
55. Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, et al. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(12):7271-7276.
56. Tscherne DM, Jones CT, Evans MJ, Lindenbach BD, McKeating JA, Rice CM. Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol.* 2006;80(4):1734-1741.
57. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science.* 1998;282(5390):938-941.
58. Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science.* 2000;290(5498):1972-1974.
59. Saito S, Heller T, Yoneda M, Takahashi H, Nakajima A, Liang JT. Lifestyle-related diseases of the digestive system: a new in vitro model of hepatitis C virion production: application of basic research on hepatitis C virus to clinical medicine. *J Pharmacol Sci.* 2007;105(2):138-144.
60. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science.* 1999;285(5424):110-113.
61. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med.* 2005;11(7):791-796.

62. Ikeda M, Yi M, Li K, Lemon SM. Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *J Virol.* 2002;76(6):2997-3006.
63. Horscroft N, Lai VC, Cheney W, Yao N, Wu JZ, Hong Z, et al. Replicon cell culture system as a valuable tool in antiviral drug discovery against hepatitis C virus. *Antivir Chem Chemother.* 2005;16(1):1-12.
64. Blight KJ, McKeating JA, Marcotrigiano J, Rice CM. Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J Virol.* 2003;77(5):3181-3190.
65. Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M, et al. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology.* 2003;125(6):1808-1817.
66. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis.* 2005;5(9):558-567.
67. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep.* 1998;47(RR-19):1-39.
68. Tsukuma H, Hiyama T, Tanaka S, Nakao M, Yabuuchi T, Kitamura T, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med.* 1993;328(25):1797-1801.
69. Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology.* 1997;26(3 Suppl 1):S15-S20.
70. Kim WR. The burden of hepatitis C in the United States. *Hepatology.* 2002;36(5 Suppl 1):S30-S34.
71. Wong JB, McQuillan GM, McHutchison JG, Poynard T. Estimating future hepatitis C morbidity, mortality, and costs in the United States. *Am J Public Health.* 2000;90(10):1562-1569.
72. Davis GL, Albright JE, Cook SF, Rosenberg DM. Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. *Liver Transpl.* 2003;9(4):331-338.
73. Deuffic S, Buffat L, Poynard T, Valleron AJ. Modeling the hepatitis C virus epidemic in France. *Hepatology.* 1999;29(5):1596-1601.
74. Esteban JI, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol.* 2008;48(1):148-162.
75. Domínguez A, Bruguera M, Vidal J, Plans P, Salleras L. Community-based seroepidemiological survey of HCV infection in Catalonia, Spain. *J Med Virol.* 2001;65(4):688-693.

76. Prieto Domingo JJ, Carrión Bolanos JA, Bandrés MF. Prevalencia del virus de la hepatitis C y consumo excesivo de alcohol en una población laboral no hospitalaria. *Gastroenterol Hepatol.* 1997;20(10):479-483.
77. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med.* 1999;341(8):556-562.
78. Simmonds P, Mellor J, Sakuldamrongpanich T, Nuchaprayoon C, Tanprasert S, Holmes EC, et al. Evolutionary analysis of variants of hepatitis C virus found in South-East Asia: comparison with classifications based upon sequence similarity. *J Gen Virol.* 1996;77(Pt 12):3013-3024.
79. Fang JW, Chow V, Lau JY. Virology of hepatitis C virus. *Clin Liver Dis.* 1997;1(3):493-514.
80. Pawlotsky JM, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, Pellet C, Stuyver L, Duval J, et al. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis.* 1995;171(6):1607-1610.
81. Simmonds P. Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. *J Hepatol.* 1999;31 Suppl 1:54-60.
82. Forns X, Martínez-Bauer E, Feliu A, García-Retortillo M, Martín M, Gay E, et al. Nosocomial transmission of HCV in the liver unit of a tertiary care center. *Hepatology.* 2005;41(1):115-122.
83. Bronowicki JP, Venard V, Botte C, Monhoven N, Gastin I, Chone L, et al. Patient-to-patient transmission of hepatitis C virus during colonoscopy. *N Engl J Med.* 1997;337(4):237-240.
84. Katsoulidou A, Paraskevis D, Kalapothaki V, Arvanitis D, Karayiannis P, Hadjiconstantiou V, et al. Molecular epidemiology of a hepatitis C virus outbreak in a haemodialysis unit. Multicentre Haemodialysis Cohort Study on Viral Hepatitis. *Nephrol Dial Transplant.* 1999;14(5):1188-1194.
85. Ross RS, Viazov S, Khudyakov YE, Xia GL, Lin Y, Holzmann H, et al. Transmission of hepatitis C virus in an orthopedic hospital ward. *J Med Virol.* 2009;81(2):249-257.
86. Esteban JI, Gómez J, Martell M, Cabot B, Quer J, Camps J, et al. Transmission of hepatitis C virus by a cardiac surgeon. *N Engl J Med.* 1996;334(9):555-560.
87. Alter MJ. The epidemiology of acute and chronic hepatitis C. *Clin Liver Dis.* 1997;1(3):559-568.
88. Soto B, Rodrigo L, Garcia-Bengoechea M, Sanchez-Quijano A, Riestra S, Arenas JI, et al. Heterosexual transmission of hepatitis C virus and the

- possible role of coexistent human immunodeficiency virus infection in the index case. A multicentre study of 423 pairings. *J Intern Med.* 1994;236(5):515-519.
89. Roudot-Thoraval F, Bastie A, Pawlotsky JM, Dhumeaux D. Epidemiological factors affecting the severity of hepatitis C virus-related liver disease: a French survey of 6,664 patients. The Study Group for the Prevalence and the Epidemiology of Hepatitis C Virus. *Hepatology.* 1997;26(2):485-490.
 90. Choo QL, Weiner AJ, Overby LR, Kuo G, Houghton M, Bradley DW. Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *Br Med Bull.* 1990;46(2):423-441.
 91. Miyamura T, Saito I, Katayama T, Kikuchi S, Tateda A, Houghton M, et al. Detection of antibody against antigen expressed by molecularly cloned hepatitis C virus cDNA: application to diagnosis and blood screening for posttransfusion hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(3):983-987.
 92. Pawlotsky JM. Diagnostic tests for hepatitis C. *J Hepatol.* 1999;31 Suppl 1:71-79.
 93. National Institutes of Health Consensus Development Conference Panel statement: management of hepatitis C. *Hepatology.* 1997;26(3 Suppl 1):S2-S10.
 94. Takaki A, Wiese M, Maertens G, Depla E, Seifert U, Liebetrau A, et al. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med.* 2000;6(5):578-582.
 95. Pawlotsky JM. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology.* 2002;36(5 Suppl 1):S65-S73.
 96. Gretch DR. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology.* 1997;26(3 Suppl 1):43S-47S.
 97. 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(26):1685-1690.
 98. Beld M, Habibuw MR, Rebers SP, Boom R, Reesink HW. Evaluation of automated RNA-extraction technology and a qualitative HCV assay for sensitivity and detection of HCV RNA in pool-screening systems. *Transfusion.* 2000;40(5):575-579.
 99. Fried MW, Draguesku JO, Shindo M, Simpson LH, Banks SM, Hoofnagle JH, et al. Clinical and serological differentiation of autoimmune and hepatitis C virus-related chronic hepatitis. *Dig Dis Sci.* 1993;38(4):631-636.

100. Colin C, Lanoir D, Touzet S, Meyaud-Kraemer L, Bailly F, Trepo C. Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *J Viral Hepat.* 2001;8(2):87-95.
101. Alter HJ, Tegtmeier GE, Jett BW, Quan S, Shih JW, Bayer WL, et al. The use of a recombinant immunoblot assay in the interpretation of anti-hepatitis C virus reactivity among prospectively followed patients, implicated donors, and random donors. *Transfusion.* 1991;31(8):771-776.
102. Alter MJ, Kuhnert WL, Finelli L. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep.* 2003;52(RR-3):1-16.
103. Pawlotsky JM, Lonjon I, Hezode C, Raynard B, Darthuy F, Remire J, et al. What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories? *Hepatology.* 1998;27(6):1700-1702.
104. Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology.* 2002;122(6):1554-1568.
105. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Use of virologic assays in the diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis.* 2005;9(3):371-382.
106. Saldanha J, Lelie N, Heath A. Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. WHO Collaborative Study Group. *Vox Sang.* 1999;76(3):149-158.
107. Saldanha J, Heath A, Aberham C, Albrecht J, Gentili G, Gessner M, et al. World Health Organization collaborative study to establish a replacement WHO international standard for hepatitis C virus RNA nucleic acid amplification technology assays. *Vox Sang.* 2005;88(3):202-204.
108. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Vacunas, sangre y productos biológicos. Disponible en [7 de marzo de 2012]: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/BloodDonorScreening/InfectiousDisease/ucm126581.htm>.
109. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Vacunas, sangre y productos biológicos. Disponible en [7 de marzo de 2012]: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm217318.htm>.
110. Ferreira-González A, Shiffman ML. Use of diagnostic testing for managing hepatitis C virus infection. *Semin Liver Dis.* 2004;24 Suppl 2:9-18.
111. Ross RS, Viazov SO, Hoffmann S, Roggendorf M. Performance characteristics of a transcription-mediated nucleic acid amplification

- assay for qualitative detection of hepatitis C virus RNA. *J Clin Lab Anal.* 2001;15(6):308-313.
112. Gretch DR, dela RC, Carithers RL, Jr., Willson RA, Williams B, Corey L. Assessment of hepatitis C viremia using molecular amplification technologies: correlations and clinical implications. *Ann Intern Med.* 1995;123(5):321-329.
113. Lee SC, Antony A, Lee N, Leibow J, Yang JQ, Soviero S, et al. Improved version 2.0 qualitative and quantitative AMPLICOR reverse transcription-PCR tests for hepatitis C virus RNA: calibration to international units, enhanced genotype reactivity, and performance characteristics. *J Clin Microbiol.* 2000;38(11):4171-4179.
114. Costa J. PCR a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22(5):299-304.
115. Real Decreto 1088/2005, de 16 de septiembre, por el que se establecen los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y de los centros y servicios de transfusión. *Boletín Oficial del Estado (BOE)* 2005 Sep 20;225:31288-31304.
116. Sherman KE, Flamm SL, Afdhal NH, Nelson DR, Sulkowski MS, Everson GT, et al. Response-guided telaprevir combination treatment for hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2011;365(11):1014-1024.
117. Vermehren J, Kau A, Gartner BC, Gobel R, Zeuzem S, Sarrazin C. Differences between two real-time PCR-based hepatitis C virus (HCV) assays (RealTime HCV and Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan) and one signal amplification assay (Versant HCV RNA 3.0) for RNA detection and quantification. *J Clin Microbiol.* 2008;46(12):3880-3891.
118. Michelin BD, Muller Z, Stelzl E, Marth E, Kessler HH. Evaluation of the Abbott RealTime HCV assay for quantitative detection of hepatitis C virus RNA. *J Clin Virol.* 2007;38(2):96-100.
119. Sarrazin C, Gartner BC, Sizmann D, Babel R, Mihm U, Hofmann WP, et al. Comparison of conventional PCR with real-time PCR and branched DNA-based assays for hepatitis C virus RNA quantification and clinical significance for genotypes 1 to 5. *J Clin Microbiol.* 2006;44(3):729-737.
120. Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Brillet R, Pawlotsky JM. Overestimation and underestimation of hepatitis C virus RNA levels in a widely used real-time polymerase chain reaction-based method. *Hepatology.* 2007;46(1):22-31.
121. Bouvier-Alias M, Patel K, Dahari H, Beaucourt S, Larderie P, Blatt L, et al. Clinical utility of total HCV core antigen quantification: a new indirect marker of HCV replication. *Hepatology.* 2002;36(1):211-218.

122. Seme K, Poljak M, Babic DZ, Mociłnik T, Vince A. The role of core antigen detection in management of hepatitis C: a critical review. *J Clin Virol*. 2005;32(2):92-101.
123. Morota K, Fujinami R, Kinukawa H, Machida T, Ohno K, Saegusa H, et al. A new sensitive and automated chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of hepatitis C virus core antigen. *J Virol Methods*. 2009;157(1):8-14.
124. Esteban JI, Sauleda S. Diagnóstico de laboratorio de la infección por el virus de la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol*. 2006;29 Supl 2:107-112.
125. Fried MW, Hadziyannis SJ. Treatment of chronic hepatitis C infection with peginterferons plus ribavirin. *Semin Liver Dis*. 2004;24 Suppl 2:47-54.
126. Halfon P, Trimoulet P, Bourliere M, Khiri H, De L, V, Couzigou P, et al. Hepatitis C virus genotyping based on 5' noncoding sequence analysis (Trugene). *J Clin Microbiol*. 2001;39(5):1771-1773.
127. Simmonds P, Smith DB, McOmish F, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS, et al. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol*. 1994;75(Pt 5):1053-1061.
128. Solís Herruzo JA. Current indications of liver biopsy. *Rev Esp Enferm Dig*. 2006;98(2):122-139.
129. Castèra L, Negre I, Samii K, Buffet C. Pain experienced during percutaneous liver biopsy. *Hepatology*. 1999;30(6):1529-1530.
130. Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med*. 2001;344(7):495-500.
131. Poynard T, Ratziu V, McHutchison J, Manns M, Goodman Z, Zeuzem S, et al. Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38(1):75-85.
132. Olynyk JK, Reddy KR, Di Bisceglie AM, Jeffers LJ, Parker TI, Radick JL, et al. Hepatic iron concentration as a predictor of response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 1995;108(4):1104-1109.
133. Powell EE, Jonsson JR, Clouston AD. Steatosis: co-factor in other liver diseases. *Hepatology*. 2005;42(1):5-13.
134. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*. 1981;1(5):431-435.

135. Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol.* 1991;13(3):372-374.
136. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De GJ, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol.* 1995;22(6):696-699.
137. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology.* 1996;24(2):289-293.
138. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology.* 1994;20(1 Pt 1):15-20.
139. Castèra L, Forns X, Alberti A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol.* 2008;48(5):835-847.
140. Degos F, Perez P, Roche B, Mahmoudi A, Asselineau J, Voitot H, et al. Diagnostic accuracy of FibroScan and comparison to liver fibrosis biomarkers in chronic viral hepatitis: a multicenter prospective study (the FIBROSTIC study). *J Hepatol.* 2010;53(6):1013-1021.
141. Munteanu M, Ratziu V, Poynard T. FibroStic: a large confirmatory study for non-invasive biomarkers accuracy, if correctly interpreted. *J Hepatol.* 2011;55(1):233-235.
142. Fraquelli M, Rigamonti C, Casazza G, Donato MF, Ronchi G, Conte D, et al. Etiology-related determinants of liver stiffness values in chronic viral hepatitis B or C. *J Hepatol.* 2011;54(4):621-628.
143. Castèra L, Vergniol J, Foucher J, Le BB, Chanteloup E, Haaser M, et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2005;128(2):343-350.
144. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, et al. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol.* 2003;29(12):1705-1713.
145. Rockey DC, Bissell DM. Noninvasive measures of liver fibrosis. *Hepatology.* 2006;43(2 Suppl 1):S113-S120.
146. González Guilabert MI, Hinojosa Mena-Bernal C, del Pozo GJ, del Pozo Pérez MA. Estudio retrospectivo de la capacidad de evaluación de fibrosis hepática del FibroScan, APRI, FIB-4 y FORNS con referencia a la biopsia hepática de pacientes con hepatitis crónica C, mono y coinfectados con VIH. *Gastroenterol Hepatol.* 2010;33(6):425-432.
147. Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. Viral hepatitis C. *Lancet.* 2003;362(9401):2095-2100.

148. Poynard T, Ratziu V, Benmanov Y, Di M, V, Bedossa P, Opolon P. Fibrosis in patients with chronic hepatitis C: detection and significance. *Semin Liver Dis.* 2000;20(1):47-55.
149. Poynard T, Ratziu V, Benhamou Y, Opolon P, Cacoub P, Bedossa P. Natural history of HCV infection. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2000;14(2):211-228.
150. McHutchison J, Poynard T, Afdhal N. Fibrosis as an end point for clinical trials in liver disease: a report of the international fibrosis group. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006;4(10):1214-1220.
151. Poynard T, Afdhal NH. Perspectives on fibrosis progression in hepatitis C: an a la carte approach to risk factors and staging of fibrosis. *Antivir Ther.* 2010;15(3):281-291.
152. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet.* 1997;349(9055):825-832.
153. de Torres M, Poynard T. Risk factors for liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Ann Hepatol.* 2003;2(1):5-11.
154. Deuffic-Burban S, Poynard T, Valleron AJ. Quantification of fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C using a Markov model. *J Viral Hepat.* 2002;9(2):114-122.
155. Ryder SD, Irving WL, Jones DA, Neal KR, Underwood JC. Progression of hepatic fibrosis in patients with hepatitis C: a prospective repeat liver biopsy study. *Gut.* 2004;53(3):451-455.
156. Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2001;34(5):730-739.
157. Poynard T, Mathurin P, Lai CL, Guyader D, Poupon R, Tainturier MH, et al. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *J Hepatol.* 2003;38(3):257-265.
158. Benhamou Y, Bochet M, Di Martino V, Charlotte F, Azria F, Coutellier A, et al. Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multivirc Group. *Hepatology.* 1999;30(4):1054-1058.
159. Adinolfi LE, Gambardella M, Andreana A, Tripodi MF, Utili R, Ruggiero G. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology.* 2001;33(6):1358-1364.

160. Hourigan LF, Macdonald GA, Purdie D, Whitehall VH, Shorthouse C, Clouston A, et al. Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis. *Hepatology*. 1999;29(4):1215-1219.
161. Hwang SJ, Luo JC, Chu CW, Lai CR, Lu CL, Tsay SH, et al. Hepatic steatosis in chronic hepatitis C virus infection: prevalence and clinical correlation. *J Gastroenterol Hepatol*. 2001;16(2):190-195.
162. Monto A, Alonzo J, Watson JJ, Grunfeld C, Wright TL. Steatosis in chronic hepatitis C: relative contributions of obesity, diabetes mellitus, and alcohol. *Hepatology*. 2002;36(3):729-736.
163. Ortiz V, Berenguer M, Rayón JM, Carrasco D, Berenguer J. Contribution of obesity to hepatitis C-related fibrosis progression. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(9):2408-2414.
164. Ratziu V, Munteanu M, Charlotte F, Bonyhay L, Poynard T. Fibrogenic impact of high serum glucose in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2003;39(6):1049-1055.
165. Westin J, Nordlinder H, Lagging M, Norkrans G, Wejstal R. Steatosis accelerates fibrosis development over time in hepatitis C virus genotype 3 infected patients. *J Hepatol*. 2002;37(6):837-842.
166. Massard J, Ratziu V, Thabut D, Moussalli J, Lebray P, Benhamou Y, et al. Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2006;44 Suppl 1:S19-S24.
167. Magy N, Cribier B, Schmitt C, Ellero B, Jaeck D, Boudjema K, et al. Effects of corticosteroids on HCV infection. *Int J Immunopharmacol*. 1999;21(4):253-261.
168. Frey BM, Frey FJ. Clinical pharmacokinetics of prednisone and prednisolone. *Clin Pharmacokinet*. 1990;19(2):126-146.
169. Rohatagi S, Barth J, Mollmann H, Hochhaus G, Soldner A, Mollmann C, et al. Pharmacokinetics of methylprednisolone and prednisolone after single and multiple oral administration. *J Clin Pharmacol*. 1997;37(10):916-925.
170. Henry SD, Metselaar HJ, Van DJ, Tilanus HW, Van Der Laan LJ. Impact of steroids on hepatitis C virus replication in vivo and in vitro. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1110:439-447.
171. Henry SD, Metselaar HJ, Lonsdale RC, Kok A, Haagmans BL, Tilanus HW, et al. Mycophenolic acid inhibits hepatitis C virus replication and acts in synergy with cyclosporin A and interferon-alpha. *Gastroenterology*. 2006;131(5):1452-1462.
172. Henry SD, van der Wegen P, Metselaar HJ, Tilanus HW, Scholte BJ, van der Laan LJ. Simultaneous targeting of HCV replication and viral binding

- with a single lentiviral vector containing multiple RNA interference expression cassettes. *Mol Ther.* 2006;14(4):485-493.
173. Ciesek S, Steinmann E, Iken M, Ott M, Helfritz FA, Wappler I, et al. Glucocorticosteroids increase cell entry by hepatitis C virus. *Gastroenterology.* 2010;138(5):1875-1884.
174. Blight KJ, McKeating JA, Rice CM. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol.* 2002;76(24):13001-13014.
175. Rostaing L, Izopet J, Cisterne JM, Arnaud C, Duffaut M, Rumeau JL, et al. Is long-term chronic immunosuppression therapy detrimental in hepatitis C virus-positive renal transplant patients? *Transplant Proc.* 1998;30(4):1312-1313.
176. Aroldi A, Lampertico P, Montagnino G, Passerini P, Villa M, Campise MR, et al. Natural history of hepatitis B and C in renal allograft recipients. *Transplantation.* 2005;79(9):1132-1136.
177. Aroldi A, Lampertico P, Montagnino G, Lunghi G, Passerini P, Villa M, et al. Natural history of hepatitis C virus infection in adult renal graft recipients. *Transplant Proc.* 2005;37(2):940-941.
178. David-Neto E, Americo da FJ, Jota de PF, Nahas WC, Sabbaga E, Ianhez LE. The impact of azathioprine on chronic viral hepatitis in renal transplantation: a long-term, single-center, prospective study on azathioprine withdrawal. *Transplantation.* 1999;68(7):976-980.
179. David-Neto E, da Fonseca JA, de Paula FJ, Nahas WC, Sabbaga E, Ianhez LE. Is azathioprine harmful to chronic viral hepatitis in renal transplantation? A long-term study on azathioprine withdrawal. *Transplant Proc.* 1999;31(1-2):1149-1150.
180. Pol S, Cavalcanti R, Carnot F, Legendre C, Driss F, Chaix ML, et al. Azathioprine hepatitis in kidney transplant recipients. A predisposing role of chronic viral hepatitis. *Transplantation.* 1996;61(12):1774-1776.
181. Ichikawa Y, Kishikawa H, Nishimura K, Tokugawa S, Yoshioka I, Arichi N, et al. Retrospective study of the effects of cyclosporine in comparison with azathioprine on renal transplant recipients infected with hepatitis C virus. *Transplant Proc.* 2006;38(10):3451-3453.
182. Berenguer M, Prieto M, Córdoba J, Rayón JM, Carrasco D, Olaso V, et al. Early development of chronic active hepatitis in recurrent hepatitis C virus infection after liver transplantation: association with treatment of rejection. *J Hepatol.* 1998;28(5):756-763.
183. Feray C. Steroid and azathoprine maintenance as the best regimen during recurrent hepatitis C? *Liver Transpl.* 2005;11(4):384-385.

184. Stangl JR, Carroll KL, Illichmann M, Striker R. Effect of antimetabolite immunosuppressants on Flaviviridae, including hepatitis C virus. *Transplantation*. 2004;77(4):562-567.
185. Blum AL, Stutz R, Haemmerli UP, Schmid P, Grady GF. A fortuitously controlled study of steroid therapy in acute viral hepatitis. I. Acute disease. *Am J Med*. 1969;47(1):82-92.
186. Ducci H, Motilis J. Recuperación de hepatitis fulminante. *Rev Med Chil*. 1951;79(9):590-594.
187. Ducci H, Katz R. Cortisone, ACTH and antibiotics in fulminant hepatitis. *Gastroenterology*. 1952;21(3):357-374.
188. Evans AS, Sprinz H, Nelson R. Adrenal hormone therapy in viral hepatitis. III. The effect of ACTH and cortisone in severe and fulminant cases. *Ann Intern Med*. 1953;38(6):1148-1159.
189. Stutz R, Blum AL, Haemmerli UP, Schmid P, Schmid M. A fortuitously controlled study of steroid therapy in acute viral hepatitis. II. Follow-up examination of 202 patients. *Am J Med*. 1969;47(1):93-100.
190. Vakil BJ, Iyer SN, Shah SC, Gadgil RK, Waghlikar UN. A controlled trial of prednisolone in the treatment of infective hepatitis. *J Indian Med Assoc*. 1965;45(7):357-362.
191. Katz R, Velasco M, Klinger J, Alessandri H. Corticosteroids in the treatment of acute hepatitis in coma. *Gastroenterology*. 1962;42:258-265.
192. Sborov VM, Giges B, Plough IC, Mandel W. ACTH therapy in acute viral hepatitis. *J Lab Clin Med*. 1954;43(1):48-54.
193. Sborov VM, Bluemle LW, Jr., Neefe JR, Gyorgi P. The clinical usefulness of ACTH and cortisone in liver disease. *Gastroenterology*. 1955;28(5):745-758.
194. Naglo O, Rydenstam B, Siverstolpe L. ACTH-treatment of acute viral hepatitis. *Acta Med Scand*. 1959;165:167-171.
195. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A "New" antigen in leukemia sera. *JAMA*. 1965;191:541-546.
196. Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med*. 1967;66(5):924-931.
197. Krugman S, Giles JP, Hammond J. Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *JAMA*. 1967;200(5):365-373.

198. Cook GC, Mulligan R, Sherlock S. Controlled prospective trial of corticosteroid therapy in active chronic hepatitis. *Q J Med.* 1971;40(158):159-185.
199. Kirk AP, Jain S, Pocock S, Thomas HC, Sherlock S. Late results of the Royal Free Hospital prospective controlled trial of prednisolone therapy in hepatitis B surface antigen negative chronic active hepatitis. *Gut.* 1980;21(1):78-83.
200. Murray-Lyon IM, Stern RB, Williams R. Controlled trial of prednisone and azathioprine in active chronic hepatitis. *Lancet.* 1973;1(7806):735-737.
201. Schalm SW, Summerskill WH, Gitnick GL, Elveback LR. Contrasting features and responses to treatment of severe chronic active liver disease with and without HBs antigen. *Gut.* 1976;17(10):781-786.
202. Seeff LB, Koff RS. Therapy for chronic active hepatitis. *Adv Intern Med.* 1984;29:109-145.
203. Soloway RD, Summerskill WH, Baggenstoss AH, Geall MG, Gitnick GL, Elveback IR, et al. Clinical, biochemical, and histological remission of severe chronic active liver disease: a controlled study of treatments and early prognosis. *Gastroenterology.* 1972;63(5):820-833.
204. Summerskill WH, Korman MG, Ammon HV, Baggenstoss AH. Prednisone for chronic active liver disease: dose titration, standard dose, and combination with azathioprine compared. *Gut.* 1975;16(11):876-883.
205. Wright EC, Seeff LB, Berk PD, Jones A, Plotz PH. Treatment of chronic active hepatitis. An analysis of three controlled trials. *Gastroenterology.* 1977;73(6):1422-1430.
206. Scullard GH, Smith CI, Merigan TC, Robinson WS, Gregory PB. Effects of immunosuppressive therapy on viral markers in chronic active hepatitis B. *Gastroenterology.* 1981;81(6):987-991.
207. Rakela J, Redeker AG, Weliky B. Effect of short-term prednisone therapy on aminotransferase levels and hepatitis B virus markers in chronic type B hepatitis. *Gastroenterology.* 1983;84(5 Pt 1):956-960.
208. Sagnelli E, Manzillo G, Maio G, Pasquale G, Felaco FM, Filippini P, et al. Serum levels of hepatitis B surface and core antigens during immunosuppressive treatment of HBsAg-positive chronic active hepatitis. *Lancet.* 1980;2(8191):395-397.
209. Tygstrup N, Andersen PK, Juhl E. Steroids in chronic B-hepatitis. A randomized, double-blind, multinational trial on the effect of low-dose, long-term treatment on survival. A trial group of the European Association for the Study of the Liver. *Liver.* 1986;6(4):227-232.

210. Gregory PB, Knauer CM, Kempson RL, Miller R. Steroid therapy in severe viral hepatitis. A double-blind, randomized trial of methylprednisolone versus placebo. *N Engl J Med.* 1976;294(13):681-687.
211. Lee SD, Tong MJ, Wu JC, Lin HC, Tsai YT, Lo KJ. A randomised double-blind placebo-controlled trial of prednisolone therapy in HBeAg and HBV DNA positive Chinese patients with chronic active hepatitis B. *J Hepatol.* 1991;12(2):246-250.
212. Lam KC, Lai CL, Trepo C, Wu PC. Deleterious effect of prednisolone in HBsAg-positive chronic active hepatitis. *N Engl J Med.* 1981;304(7):380-386.
213. Nair PV, Tong MJ, Stevenson D, Roskamp D, Boone C. Effects of short-term, high-dose prednisone treatment of patients with HBsAg-positive chronic active hepatitis. *Liver.* 1985;5(1):8-12.
214. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science.* 1973;182(4116):1026-1028.
215. Alter HJ, Holland PV, Morrow AG, Purcell RH, Feinstone SM, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet.* 1975;2(7940):838-841.
216. Dienstag JL. Non-A, non-B hepatitis. I. Recognition, epidemiology, and clinical features. *Gastroenterology.* 1983;85(2):439-462.
217. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. 1975. *Rev Med Virol.* 2001;11(1):3-8.
218. Prince AM, Brotman B, Grady GF, Kuhns WJ, Hazzi C, Levine RW, et al. Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet.* 1974;2(7875):241-246.
219. Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB, Rustgi V, Di BA, Peters M, et al. Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med.* 1986;315(25):1575-1578.
220. Hoofnagle JH, Jones EA. Therapy of chronic viral hepatitis: past, present, and future. *Semin Liver Dis.* 1989;9(4):231-234.
221. Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Treatment of chronic type C hepatitis with alpha interferon. *Semin Liver Dis.* 1989;9(4):259-263.
222. Thiele DL, DuCharme L, Cunningham MR, Mimms LT, Cuthbert JA, Lee WM, et al. Steroid therapy of chronic hepatitis: characteristics associated with response in anti-hepatitis C virus-positive and -negative patients. *Am J Gastroenterol.* 1996;91(2):300-308.

223. Yoshikawa M, Toyohara M, Yamane Y, Mimura M, Miyamoto Y, Ueda S, et al. Disappearance of serum HCV-RNA after short-term prednisolone therapy in a patient with chronic hepatitis C associated with autoimmune hepatitis-like serological manifestations. *J Gastroenterol*. 1999;34(2):269-274.
224. Bellary S, Schiano T, Hartman G, Black M. Chronic hepatitis with combined features of autoimmune chronic hepatitis and chronic hepatitis C: favorable response to prednisone and azathioprine. *Ann Intern Med*. 1995;123(1):32-34.
225. Mazzaro C, Panarello G, Carniello S, Faelli A, Mazzi G, Crovatto M, et al. Interferon versus steroids in patients with hepatitis C virus-associated cryoglobulinaemic glomerulonephritis. *Dig Liver Dis*. 2000;32(8):708-715.
226. Brok J, Møllerup MT, Krogsgaard K, Gluud C. Glucocorticosteroids for viral hepatitis C. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;(2):CD002904.
227. Brok J, Møllerup MT, Krogsgaard K, Gluud C. Glucocorticosteroids for viral hepatitis C (review). *Cochrane Database Syst Rev* 2009;(1).
228. Cacoub P, Renou C, Rosenthal E, Cohen P, Louri I, Loustaud-Ratti V, et al. Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection. A prospective multicenter study of 321 patients. The GERMIVIC. Groupe d'Etude et de Recherche en Médecine Interne et Maladies Infectieuses sur le Virus de l'Hépatite C. *Medicine (Baltimore)*. 2000;79(1):47-56.
229. Ramos-Casals M, Muñoz S, Medina F, Jara LJ, Rosas J, Calvo-Alen J, et al. Systemic autoimmune diseases in patients with hepatitis C virus infection: characterization of 1020 cases (The HISPAMEC Registry). *J Rheumatol*. 2009;36(7):1442-1448.
230. Manns MP, Rambusch EG. Autoimmunity and extrahepatic manifestations in hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 1999;31 Suppl 1:39-42.
231. McMurray RW, Elbourne K. Hepatitis C virus infection and autoimmunity. *Semin Arthritis Rheum*. 1997;26(4):689-701.
232. McMurray RW. Hepatitis C-associated autoimmune disorders. *Rheum Dis Clin North Am*. 1998;24(2):353-374.
233. Ramos-Casals M, Font J, Ingelmo M. Prevalencia y significado clínico de la infección crónica por el virus de la hepatitis C en las enfermedades autoinmunes sistémicas. *Med Clin (Barc)*. 2001;116(18):701-709.
234. García-Buey L, González-Mateos F, Moreno-Otero R. Manifestaciones extrahepáticas de la infección por VHC. *Gastroenterol Hepatol*. 2006;29 Supl 2:168-174.
235. Dammacco F, Sansonno D, Han JH, Shyamala V, Cornacchiulo V, Iacobelli AR, et al. Natural interferon-alpha versus its combination with 6-

- methyl-prednisolone in the therapy of type II mixed cryoglobulinemia: a long-term, randomized, controlled study. *Blood*. 1994;84(10):3336-3343.
236. Lunel F, Cacoub P. Treatment of autoimmune and extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 1999;31 Suppl 1:210-216.
237. Agmon-Levin N, Ram M, Barzilai O, Porat-Katz BS, Parikman R, Selmi C, et al. Prevalence of hepatitis C serum antibody in autoimmune diseases. *J Autoimmun*. 2009;32(3-4):261-266.
238. Aceti A, Taliani G, Sorice M, Amendolea MA. HCV and Sjogren's syndrome. *Lancet*. 1992;339(8806):1425-1426.
239. Aksu K, Kabasakal Y, Sayiner A, Keser G, Oksel F, Bilgic A, et al. Prevalences of hepatitis A, B, C and E viruses in Behcet's disease. *Rheumatology (Oxford)*. 1999;38(12):1279-1281.
240. Cacoub P, Lunel-Fabiani F, Du LT. Polyarteritis nodosa and hepatitis C virus infection. *Ann Intern Med*. 1992;116(7):605-606.
241. Pawlotsky JM, Roudot-Thoraval F, Simmonds P, Mellor J, Ben Yahia MB, Andre C, et al. Extrahepatic immunologic manifestations in chronic hepatitis C and hepatitis C virus serotypes. *Ann Intern Med*. 1995;122(3):169-173.
242. Cantini F, Emmi L, Niccoli L, Padula A, Salvarani C, Olivieri I. Lack of association between chronic hepatitis C virus infection and Behcet's disease. *Clin Exp Rheumatol*. 1997;15(3):338-339.
243. 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(2):304-309.
244. Coll J, Gambus G, Corominas J, Tomás S, Esteban JI, Guardia J. Immunohistochemistry of minor salivary gland biopsy specimens from patients with Sjogren's syndrome with and without hepatitis C virus infection. *Ann Rheum Dis*. 1997;56(6):390-392.
245. García-Carrasco M, Ramos M, Cervera R, Font J, Vidal J, Muñoz FJ, et al. Hepatitis C virus infection in 'primary' Sjogren's syndrome: prevalence and clinical significance in a series of 90 patients. *Ann Rheum Dis*. 1997;56(3):173-175.
246. Hamuryudan V, Sonsuz A, Yurdakul S. More on hepatitis C virus and Behcet's syndrome. *N Engl J Med*. 1995;333(5):322-323.
247. Horn TL, Reynolds J, de VW, Pena LR. Hepatitis C virus and inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 2009;54(6):1171-1177.

248. Hortelano ME, Calvo CJ, González-Cruz MI, Ortega GE, Riera AM, Valero PI, et al. Panarteritis nodosa asociada al virus de la hepatitis C. *An Med Interna*. 1997;14(5):241-243.
249. Jorgensen C, Legouffe MC, Perney P, Coste J, Tissot B, Segarra C, et al. Sicca syndrome associated with hepatitis C virus infection. *Arthritis Rheum*. 1996;39(7):1166-1171.
250. Karakoc Y, Dilek K, Gullulu M, Yavuz M, Ersoy A, Akalyn H, et al. Prevalence of hepatitis C virus antibody in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 1997;56(9):570-571.
251. Kowdley KV, Subler DE, Scheffel J, Moore B, Smith H. Hepatitis C virus antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Clin Gastroenterol*. 1997;25(2):437-439.
252. Loras C, Saro C, González-Huix F, Mínguez M, Merino O, Gisbert JP, et al. Prevalence and factors related to hepatitis B and C in inflammatory bowel disease patients in Spain: a nationwide, multicenter study. *Am J Gastroenterol*. 2009;104(1):57-63.
253. Mariette X, Zerbib M, Jaccard A, Schenmetzler C, Danon F, Clauvel JP. Hepatitis C virus and Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 1993;36(2):280-281.
254. Monger RM, West SG. Inflammatory myopathy and hepatitis C virus infection. *Arthritis Rheum*. 1998;41(7):1323-1324.
255. Nishikai M, Miyairi M, Kosaka S. Dermatomyositis following infection with hepatitis C virus. *J Rheumatol*. 1994;21(8):1584-1585.
256. Oguz A, Sametoglu F, Erdogan S. More on hepatitis C and Behcet's syndrome. *N Engl J Med*. 1995;333(5):322-323.
257. Ramos-Casals M, Font J, García-Carrasco M, Cervera R, Jiménez S, Trejo O, et al. Hepatitis C virus infection mimicking systemic lupus erythematosus: study of hepatitis C virus infection in a series of 134 Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2000;43(12):2801-2806.
258. Rivera J, García-Monforte A, Pineda A, Millán Núñez-Cortés J. Arthritis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Rheumatol*. 1999;26(2):420-424.
259. Sawada T, Hirohata S, Inoue T, Ito K. Development of rheumatoid arthritis after hepatitis C virus infection. *Arthritis Rheum*. 1991;34(12):1620-1621.
260. 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(4):482.

261. Verbaan H, Carlson J, Eriksson S, Larsson A, Liedholm R, Manthorpe R, et al. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C infection and the interrelationship between primary Sjogren's syndrome and hepatitis C in Swedish patients. *J Intern Med.* 1999;245(2):127-132.
262. Vidal E, Ranger S, Loustaud V, Verdier M, Liozon F, Denis F. Suspected multiviral involvement in primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol.* 1994;12(2):227.
263. Vitali C, Sciuto M, Neri R, Greco F, Mavridis AK, Tsioufas AG, et al. Anti-hepatitis C virus antibodies in primary Sjogren's syndrome: false positive results are related to hyper-gamma-globulinaemia. *Clin Exp Rheumatol.* 1992;10(1):103-104.
264. Weidensaul D, Imam T, Holyst MM, King PD, McMurray RW. Polymyositis, pulmonary fibrosis, and hepatitis C. *Arthritis Rheum.* 1995;38(3):437-439.
265. Ramos-Casals M, Mañá J, Nardi N, Brito-Zerón P, Xaubet A, Sánchez-Tapias JM, et al. Sarcoidosis in patients with chronic hepatitis C virus infection: analysis of 68 cases. *Medicine (Baltimore).* 2005;84(2):69-80.
266. Bonnet F, Morlat P, Dubuc J, De WS, Bonarek M, Bernard N, et al. Sarcoidosis-associated hepatitis C virus infection. *Dig Dis Sci.* 2002;47(4):794-796.
267. Longueira SR, Ammari I, Lamas Ferreiro JL, Sopena Pérez-Argüelles B, Martínez-Vázquez C. Manejo de la hepatitis crónica por virus C asociada a sarcoidosis: evolución y tratamiento. *Rev Clin Esp.* 2009;209(7):358-359.
268. Castanet J, Lacour JP, Fuzibet JG, Perrin C, Rodot S, Ortonne JP. Adult Still's disease associated with hepatitis C virus infection. *J Am Acad Dermatol.* 1994;31(5 Pt 1):807-808.
269. Pawlotsky JM, Bouvier M, Fromont P, Deforges L, Duval J, Dhumeaux D, et al. Hepatitis C virus infection and autoimmune thrombocytopenic purpura. *J Hepatol.* 1995;23(6):635-639.
270. Clifford BD, Donahue D, Smith L, Cable E, Luttig B, Manns M, et al. High prevalence of serological markers of autoimmunity in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 1995;21(3):613-619.
271. Lenzi M, Bellentani S, Saccoccio G, Muratori P, Masutti F, Muratori L, et al. Prevalence of non-organ-specific autoantibodies and chronic liver disease in the general population: a nested case-control study of the Dionysos cohort. *Gut.* 1999;45(3):435-441.
272. Williams MJ, Lawson A, Neal KR, Ryder SD, Irving WL. Autoantibodies in chronic hepatitis C virus infection and their association with disease profile. *J Viral Hepat.* 2009;16(5):325-331.

273. Lenzi M, Johnson PJ, McFarlane IG, Ballardini G, Smith HM, McFarlane BM, et al. Antibodies to hepatitis C virus in autoimmune liver disease: evidence for geographical heterogeneity. *Lancet*. 1991;338(8762):277-280.
274. Abuaf N, Lunel F, Giral P, Borotto E, Laperche S, Poupon R, et al. Non-organ specific autoantibodies associated with chronic C virus hepatitis. *J Hepatol*. 1993;18(3):359-364.
275. Papo T, Marcellin P, Bernuau J, Durand F, Poynard T, Benhamou JP. Autoimmune chronic hepatitis exacerbated by alpha-interferon. *Ann Intern Med*. 1992;116(1):51-53.
276. Vento S, Di PG, Garofano T, Cosco L, Concia E, Ferraro T, et al. Hazards of interferon therapy for HBV-seronegative chronic hepatitis. *Lancet*. 1989;2(8668):926.
277. Shindo M, Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH. Acute exacerbation of liver disease during interferon alfa therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 1992;102(4 Pt 1):1406-1408.
278. García-Buey L, García-Monzón C, Rodríguez S, Borque MJ, García-Sánchez A, Iglesias R, et al. Latent autoimmune hepatitis triggered during interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 1995;108(6):1770-1777.
279. Bell TM, Bansal AS, Shorthouse C, Sandford N, Powell EE. Low-titre auto-antibodies predict autoimmune disease during interferon-alpha treatment of chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol*. 1999;14(5):419-422.
280. Touzot M, Touzot F, Galicier L, Ripault MP, Peraldi MN, Glotz D, et al. Polyarthritis and anemia in a hemodialysis patient: systemic lupus erythematosus following treatment with interferon alpha. *Clin Nephrol*. 2010;73(4):318-320.
281. Wilson LE, Widman D, Dikman SH, Gorevic PD. Autoimmune disease complicating antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Semin Arthritis Rheum*. 2002;32(3):163-173.
282. Black M, Peters M. Alpha-interferon treatment of chronic hepatitis C: need for accurate diagnosis in selecting patients. *Ann Intern Med*. 1992;116(1):86-88.
283. Kawai S, Yokosuka O, Kanda T, Imazeki F, Maru Y, Saisho H. Quantification of hepatitis C virus by TaqMan PCR: comparison with HCV Amplicor Monitor assay. *J Med Virol*. 1999;58(2):121-126.
284. Rodríguez-Antona C, Donato MT, Pareja E, Gómez-Lechón MJ, Castell JV. Cytochrome P-450 mRNA expression in human liver and its relationship with enzyme activity. *Arch Biochem Biophys*. 2001;393(2):308-315.

285. Castèra L, Sebastiani G, Le BB, De L, V, Couzigou P, Alberti A. Prospective comparison of two algorithms combining non-invasive methods for staging liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2010;52(2):191-198.
286. Castèra L, Foucher J, Bernard PH, Carvalho F, Allaix D, Merrouche W, et al. Pitfalls of liver stiffness measurement: a 5-year prospective study of 13,369 examinations. *Hepatology.* 2010;51(3):828-835.
287. Weller IV, Bassendine MF, Murray AK, Craxi A, Thomas HC, Sherlock S. Effects of prednisolone/azathioprine in chronic hepatitis B viral infection. *Gut.* 1982;23(8):650-655.
288. Magy N, Cribier B, Schmitt C, Ellero B, Jaeck D, Boudjema K, et al. Effects of corticosteroids on HCV infection. *Int J Immunopharmacol.* 1999;21(4):253-261.
289. Giusti G, Piccinino F, Galanti B, Sagnelli E, Ruggiero G, Gallo C. Immunosuppressive therapy in chronic active hepatitis (CAH). A multicentric retrospective study on 867 patients. A report from a study group for CAH of the Italian Association for the study of the liver. *Hepatogastroenterology.* 1984;31(1):24-29.
290. Tage-Jensen U, Schlichting P, Aldershvile J, Andersen P, Dietrichson O, Hardt F, et al. Azathioprine versus prednisone in non-alcoholic chronic liver disease (CLD). Relation to a serological classification. *Liver.* 1982;2(2):95-103.
291. Czaja AJ, Davis GL, Ludwig J, Baggenstoss AH, Taswell HF. Autoimmune features as determinants of prognosis in steroid-treated chronic active hepatitis of uncertain etiology. *Gastroenterology.* 1983;85(3):713-717.
292. Fong TL, Valinluck B, Govindarajan S, Charboneau F, Adkins RH, Redeker AG. Short-term prednisone therapy affects aminotransferase activity and hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 1994;107(1):196-199.
293. Magrin S, Craxi A, Fabiano C, Simonetti RG, Fiorentino G, Marino L, et al. Hepatitis C viremia in chronic liver disease: relationship to interferon-alpha or corticosteroid treatment. *Hepatology.* 1994;19(2):273-279.
294. McHutchison JG, Ponnudurai R, Bylund DL, Anguiano A, Pockros PJ, Mondala T, et al. Prednisone withdrawal followed by interferon alpha for treatment of chronic hepatitis C infection: results of a randomized controlled trial. *J Clin Gastroenterol.* 2001;32(2):133-137.
295. Schiano TD, Te HS, Thomas RM, Hussain H, Bond K, Black M. Results of steroid-based therapy for the hepatitis C-autoimmune hepatitis overlap syndrome. *Am J Gastroenterol.* 2001;96(10):2984-2991.

-
296. Magrin S, Craxi A, Fabiano C, Fiorentino G, Almasio P, Palazzo U, et al. Hepatitis C virus replication in 'autoimmune' chronic hepatitis. *J Hepatol.* 1991;13(3):364-367.
 297. Chayama K, Tsubota A, Kobayashi M, Hashimoto M, Miyano Y, Koike H, et al. A pilot study of corticosteroid priming for lymphoblastoid interferon alfa in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 1996;23(5):953-957.
 298. Guilera M, Forns X, Torras X, Enríquez J, Coll S, Solá R, et al. Pre-treatment with prednisolone does not improve the efficacy of subsequent alpha interferon therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2000;33(1):135-141.
 299. Liaw YF, Sheen IS, Lin SM, Chen TJ, Chu CM. Effects of prednisolone pretreatment in interferon alfa therapy for patients with chronic non-A, non-B (C) hepatitis. *Liver.* 1993;13(1):46-50.
 300. Calleja JL, Albillos A, Cacho G, Iborra J, Abreu L, Escartín P. Interferon and prednisone therapy in chronic hepatitis C with non-organ-specific antibodies. *J Hepatol.* 1996;24(3):308-312.
 301. Boccato S, Pistis R, Noventa F, Guido M, Benvegna L, Alberti A. Fibrosis progression in initially mild chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2006;13(5):297-302.
 302. Thein HH, Yi Q, Dore GJ, Krahn MD. Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression. *Hepatology.* 2008;48(2):418-431.
 303. Yi Q, Wang PP, Krahn M. Improving the accuracy of long-term prognostic estimates in hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat.* 2004;11(2):166-174.

