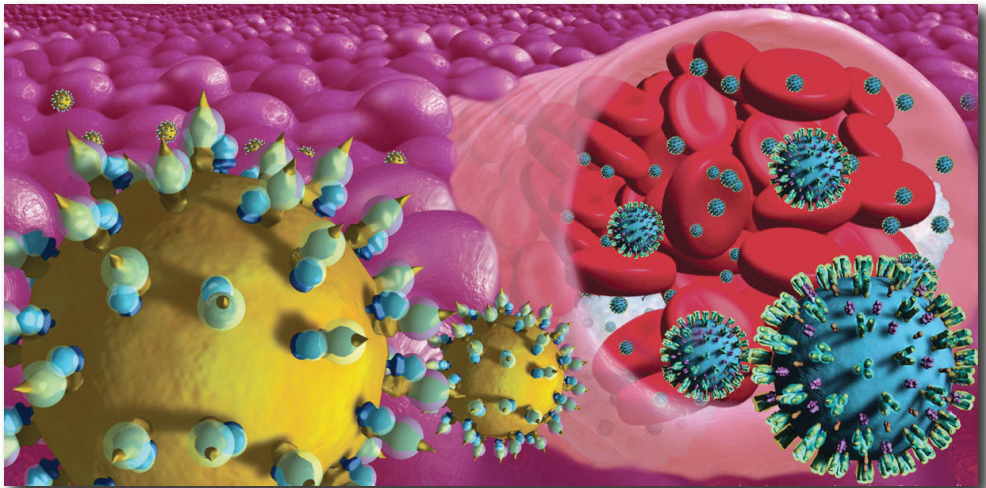


**DETECCIÓN DE ARN-VHC EN SALIVA DE PACIENTES  
INFECTADOS CON VIH Y HEPATITIS C CRÓNICA.  
PATRONES DE ACLARAMIENTO VIRAL TRAS LA  
ADMINISTRACIÓN DE INTERFERÓN PEGILADO Y RIBAVIRINA**



***Miriam Eirea Arcos***

*Santiago de Compostela, 2012*









FACULTADE DE MEDICINA  
E ODONTOLOXÍA

Departamento de Estomatoloxía

- El **Dr. Pedro Diz Dios**, profesor del Departamento de Estomatología de la Universidad de Santiago de Compostela
- El **Dr. Javier Fernández Feijoo**, profesor del Departamento de Estomatología de la Universidad de Santiago de Compostela
- El **Dr. Jacobo Limeres Posse**, profesor del Departamento de Estomatología de la Universidad de Santiago de Compostela

#### **HACEN CONSTAR:**

Como Directores de la Tesis Doctoral que lleva por título **"DETECCIÓN DE ARN-VHC EN SALIVA DE PACIENTES INFECTADOS CON VIH Y HEPATITIS C CRÓNICA. PATRONES DE ACLARAMIENTO VIRAL TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE INTERFERÓN PEGILADO Y RIBAVIRINA"**, realizada por la Licenciada en Odontología Dña. Miriam Eirea Arcos, que cumple todos los requisitos para ser presentada y defendida ante el oportuno Tribunal para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela.

*Dr. P. Diz Dios*

*Dr. J. Fdez. Feijoo*

*Dr. J. Limeres Posse*

*Dña. Miriam Eirea Arcos*

Santiago de Compostela, diciembre de 2012



## AGRADECIMIENTOS

- Mi mayor agradecimiento y eterna gratitud para los directores de esta tesis, Drs. Pedro Diz Dios, Javier Fernández Feijoo y Jacobo Limeres Posse, por su inagotable energía y entusiasmo, capacidad de trabajo, infinita paciencia y extenso saber. Ha sido realmente un placer y un orgullo el que me hayan brindado la oportunidad de desarrollar este proyecto.

- A la Dra. Ángeles Castro Iglesias, del Servicio de Medicina Interna del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña y a todos sus colaboradores, por poner a nuestra disposición su Departamento y participar activamente en la recolección de muestras.

- A los Drs. Antonio Ocampo Hermida y Celia Millares Álvarez, del Departamento de Medicina Interna del Complejo Hospitalario Universitario de Vigo y a todos sus colaboradores, por compartir conmigo su tiempo, buen humor y conocimientos, durante todo el proceso de recogida de datos.

- Al Dr. Manuel Hermida Prieto, del Instituto Universitario de Ciencias de la Salud del Hospital Marítimo de Oza en A Coruña, por su inestimable ayuda en el procesamiento de las muestras recogidas.

- A los componentes de la Unidad de Bioestadística - GRID [ECMB] del Departamento de Estadística e Investigación Operativa de la Universidad de Santiago de Compostela, especialmente a Isabel Martínez, por su minucioso e imprescindible análisis estadístico de los resultados.

- Todo mi cariño para la Dra. Emma Vázquez García y para la pequeña Marina por compartir horas de su vida familiar para la realización de este trabajo, por su ánimo y comprensión.

- A mi familia, por haberme dado la posibilidad de llegar hasta aquí.

- A Maica, Chus, Geni, Alfredo, Eladía, Mariela, Montse, Águeda y todos los amigos que siempre confiaron en mí y no me permitieron tirar la toalla en los difíciles momentos personales vividos durante esta interminable travesía.

- A Manel por compartir conmigo todos estos años.



# Resumen

**Fundamento.** El diagnóstico de hepatitis crónica por VHC en pacientes sin factores identificables de riesgo parenteral, permite especular sobre la existencia de otras vías de transmisión. Aplicando técnicas de biología molecular se ha demostrado la presencia de ARN-VHC en muestras de saliva de estos pacientes, por lo que se ha sugerido que este fluido podría constituir un vehículo potencial de infección. En los pacientes mono infectados por el VHC se ha descrito un único factor predictor de la presencia del VHC en saliva, que es la carga viral en sangre. La replicación del VHC se incrementa en presencia del VIH, lo que se traduce en mayores niveles de ARN-VHC en el hígado y el suero de los pacientes coinfectados. Hasta la fecha, muy pocos autores han investigado la presencia del VHC en la saliva de los pacientes coinfectados y en este colectivo se desconoce el patrón de aclaramiento salival del virus en respuesta al tratamiento con interferón-ribavirina.

**Objetivos.** Analizar la prevalencia de partículas ARN-VHC en saliva de pacientes coinfectados VIH-VHC, determinar los factores que condicionan su presencia, y estudiar los patrones de aclaramiento viral en sangre y en saliva tras la administración de interferón pegilado y ribavirina.

**Pacientes y métodos.** Se diseñaron dos estudios, uno transversal de prevalencia y otro longitudinal de aclaramiento. En el de prevalencia, participaron 150 pacientes con hepatitis C crónica, 75 coinfectados con VIH y 75 VIH negativos; después de registrar sus variables demográficas, clínicas y analíticas, a todos se les tomó una única muestra de saliva estimulada. En el de aclaramiento, se incluyeron 60 pacientes VIH+ con hepatitis crónica por VHC, seleccionados para recibir terapia combinada con interferón pegilado y ribavirina; después de registrar sus variables demográficas, clínicas y analíticas, a todos se les tomaron muestras de sangre y saliva al iniciar el tratamiento (basal), al finalizarlo, a los 6 meses post-tratamiento y en un seguimiento ulterior a los 12 meses post-tratamiento; en los pacientes que completaron el seguimiento, a los 5 años de la finalización del tratamiento se hizo un nuevo control serológico para comprobar la presencia del VHC. Para detectar ARN-VHC en las muestras de saliva se utilizó una técnica de RT-PCR anidada previamente validada.

**Resultados.** Se detectaron partículas ARN-VHC en la saliva del 65% de los pacientes coinfectados frente al 52% de los controles mono infectados; la presencia del VHC en saliva se relacionó con la carga viral en sangre ( $p < 0,001$ ) y con determinados genotipos virales como el 3 ( $p < 0,001$ ) en los pacientes mono infectados, pero no en los coinfectados. El estudio de aclaramiento viral se completó en 34 pacientes; la tasa de respuesta en sangre al finalizar el tratamiento fue del 79,4%, la de respuesta sostenida a los 6 meses descendió al 55,8%, a los 12 meses de finalizar el tratamiento se detectaron 2 recaídas (50% de los pacientes mantuvieron criterios de respuesta favorable) y a los 5 años se estimó que el 56,6% de los pacientes mantenían una respuesta viral favorable a largo plazo. Al finalizar la terapia el virus estaba presente en las muestras salivales de 13 pacientes (38,2%), mientras que a los 6 y 12 meses de seguimiento se detectó ARN viral en el 52,9% de las muestras salivales recogidas (18 pacientes). La detección del VHC en saliva basal no permitió predecir la respuesta al tratamiento con interferón-ribavirina en términos de aclaramiento viral en sangre. Al analizar la concordancia en los patrones de aclaramiento del VHC en sangre y en saliva en términos de presencia/ausencia de ARN-VHC detectable, observamos que ésta aumentaba progresivamente a los largo del tiempo, alcanzando su máximo valor en el control analítico efectuado 12 meses después de finalizar el tratamiento (OR= 112,51).

**Conclusiones.** La prevalencia de ARN-VHC en muestras salivales de pacientes coinfectados VIH-VHC fue similar a la detectada en los mono infectados VHC. No se identificó ningún factor demográfico, clínico ni analítico, que condicionara la presencia del VHC en la saliva de los pacientes coinfectados, ni en la determinación basal ni en las efectuadas después de recibir tratamiento con interferón-ribavirina. La concordancia entre sangre y saliva en términos de presencia/ausencia de VHC detectable aumenta progresivamente en los meses posteriores a la finalización del tratamiento, confirmando que el aclaramiento viral puede ser más lento en saliva que en sangre.





# Índice

## 1. INTRODUCCIÓN

<b>1.1. Coinfección VIH-VHC .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Epidemiología .....</b>	<b>1</b>
Población general	
Personal sanitario	
<b>1.1.2. Transmisión.....</b>	<b>3</b>
Parenteral	
Sexual	
Vertical y perinatal	
<b>1.1.3. Historia natural.....</b>	<b>5</b>
Efectos del VIH en la progresión de la infección por VHC	
Impacto de la TARGA en la progresión de la fibrosis	
Efectos del VHC en la progresión de la infección por VIH	
Adicción a drogas inyectables y coinfección VIH-VHC	
<b>1.1.4. Diagnóstico.....</b>	<b>14</b>
Tests serológicos y moleculares	
Genotipado	
Niveles de transaminasas	
Técnicas de imagen	
Biopsia hepática	
Pruebas no invasivas	
Manifestaciones extrahepáticas	
Enfermedades autoinmunes	
Enfermedad tiroidea	
<b>1.1.5. Tratamiento.....</b>	<b>26</b>
Candidatos para el tratamiento anti-VHC	
Inicio del tratamiento	
Biopsia hepática	
Factores pronóstico basales de respuesta a la terapia	
Monitorización de la respuesta virológica	
Duración del tratamiento	
Interacciones y efectos adversos	
Estrategia para mejorar la adherencia al tratamiento	
Eficacia terapéutica y seguimiento	
Tratamiento de las recaídas y de los no respondedores	
Nuevos fármacos	
<b>1.2. Detección del VHC en saliva.....</b>	<b>43</b>

<b>2. JUSTIFICACIÓN y OBJETIVOS .....</b>	<b>51</b>
<b>3. PACIENTES Y MÉTODOS</b>	
<b>3.1. Selección de pacientes .....</b>	<b>55</b>
<b>3.1.1. Estudio de prevalencia .....</b>	<b>55</b>
Grupo de estudio (VIH-VHC)	
Grupo control (VHC)	
<b>3.1.2. Estudio de aclaramiento .....</b>	<b>56</b>
..... Grupo de estudio (VIH-VHC)	
<b>3.2. Secuencia metodológica.....</b>	<b>57</b>
<b>3.2.1. Recolección de muestras.....</b>	<b>57</b>
<b>3.2.2. Detección del ARN-VHC en saliva.....</b>	<b>57</b>
<b>3.2.3. Diseño del estudio de prevalencia.....</b>	<b>62</b>
<b>3.2.4. Diseño del estudio de aclaramiento.....</b>	<b>62</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	
<b>4.1. Estudio de prevalencia .....</b>	<b>67</b>
<b>4.1.1. Grupo de estudio (VIH-VHC) .....</b>	<b>67</b>
Características de la infección por VIH	
Características de la infección por VHC	
Prevalencia de VHC en saliva y factores condicionantes	
<b>4.1.2. Grupo control (VHC) .....</b>	<b>69</b>
Características de la infección por VHC	
Prevalencia de VHC en saliva y factores condicionantes	
<b>4.2. Estudio de aclaramiento .....</b>	<b>73</b>
<b>4.2.1. Grupo de estudio (VIH-VHC) 72</b>	
Características de la infección por VIH	
Características de la infección por VHC	
Aclaramiento del VHC en sangre	
Aclaramiento del VHC en saliva	
Relación entre el aclaramiento del VHC en sangre y su presencia en saliva	
Factores condicionantes de la presencia del VHC en saliva	
Valor predictivo de la presencia de VHC en saliva	
Concordancia entre la presencia/ausencia del VHC en sangre y en saliva	

---

<b>5. DISCUSIÓN</b>	
<b>5.1. Técnica de detección de ARN-VHC mediante PCR .....</b>	<b>87</b>
Técnicas de PCR para la detección del VHC en sangre	
Adaptación de la técnica de PCR para la detección del VHC en saliva	
<b>5.2. Prevalencia del ARN-VHC en saliva .....</b>	<b>91</b>
<b>5.3. Aclaramiento del ARN-VHC en sangre .....</b>	<b>94</b>
<b>5.4. Aclaramiento del ARN-VHC en saliva .....</b>	<b>102</b>
<b>5.5. Implicaciones clínicas.....</b>	<b>104</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>109</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>113</b>







# 1

## Introducción



## 1.1. Coinfección VIH-VHC

### 1.1.1. Epidemiología

#### Población general

En todo el mundo se calcula que hay 180 millones de infectados por el virus de la hepatitis C (VHC) y que la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) afecta a 33,3 millones de personas (WHO/UNAIDS, 2011). Las cifras totales de coinfección por ambos virus (VIH-VHC) son difíciles de determinar, fundamentalmente debido a que en algunos países con un nivel menor de recursos no se dispone de registros, pero se estima que el número de infectados oscila entre 4 y 5 millones (Thomas, 2008; Hadigan y Kottlil, 2011; Operskalski y Kovacs, 2011).

El solapamiento de ambas infecciones se hace especialmente patente en las áreas geográficas y poblaciones más afectadas. Esto justifica la elevada prevalencia observada en ciertos grupos poblacionales que comparten determinados patrones de conductas de riesgo, ya que existen muchas similitudes en las vías de transmisión de ambos virus (Alter, 2006). En un análisis retrospectivo sobre la frecuencia de la coinfección VIH-VHC realizado en el marco del estudio CAESAR (Canadá, Australia, Europa y Suráfrica), se encontró una prevalencia total del 15,6%, con un rango que iba desde el 1,9% en Sudáfrica al 48,6% en Italia (Amin et al, 2004). Estos resultados parecen confirmar que las diferencias en las cifras de prevalencia están condicionadas principalmente por la conducta de riesgo para la adquisición de la infección.

En el estado indio de Manipur, el 92% de los adictos a drogas por vía parenteral VIH positivos (VIH+) están coinfectados con el VHC (Saha et al, 2000), mientras que entre las mujeres de la República de Malawi -en donde el modo predominante de transmisión del VIH es el contacto heterosexual-, la prevalencia de VHC (aproximadamente un 16,5%) es similar en las coinfectadas que en las VIH negativas (Ahmed et al, 1998).

Paradójicamente, en Australia, entre el colectivo de adictos a drogas por vía parenteral, la prevalencia del VHC es de un 50-60% mientras que la del VIH es de un 1%. Sorprendentemente la

prevalencia de la coinfección VIH-VHC también es del 1%, dato que contrasta con las cifras mucho más elevadas observadas en dicho colectivo en otros países como EE.UU. o España. Este resultado pone de manifiesto el éxito de los programas australianos para reducir la diseminación del VIH entre los consumidores de drogas por vía intravenosa (National Centre in HIV Epidemiology and Clinical Research, 2001).

En EE.UU., según los Centros para el Control de las Enfermedades (CDC), el número de infectados por el VIH es de 800.000-900.000, de los cuales entre el 16 y el 25% también lo están por el VHC (más de 200.000 personas) (Sherman et al, 2002; Thomas, 2002; Tedaldi et al, 2003; Pellicano et al, 2007). Entre los individuos infectados por el VHC, alrededor de un 10% también lo está por el VIH (Highleyman 2003).

En Europa, al igual que en EE.UU., la prevalencia de coinfección varía ostensiblemente en función de la zona geográfica evaluada. En la tabla 1 se detallan los porcentajes de coinfección de los estudios más relevantes llevados a cabo en países europeos; cabe destacar la elevada prevalencia detectada en España, Rusia y Ucrania, fundamentalmente a expensas del colectivo de adictos a drogas por vía parenteral.

► **Tabla 1.** Prevalencia de la coinfección VIH-VHC en diversos estudios europeos

ESTUDIO	COHORTE	VIH+	VIH-VHC	% VIH-VHC
<b>Mendel et al, 1995</b>	Normandía, Francia	161	55	34,2
<b>Soriano et al, 2000</b>	EuroSIDA	4.034	1.350	33,5
<b>Greub et al, 2000</b>	Swiss VIH	3.111	1.157	37,2
<b>Martín et al, 2001</b>	Madrid, España	902	649	72,0
<b>Pialoux et al, 2002</b>	Francia	1.764	465	27,0
<b>Rockstroh et al, 2005</b>	Europa Central (Bélgica, Austria y Alemania)			10-15
<b>Soriano et al, 2008</b>	Rusia y Ucrania			70,0

## Personal sanitario

Se ha sugerido que el riesgo de transmisión del VHC tras un pinchazo accidental es aproximadamente de un 3% y del VIH del 0,3% (Lauer et al, 2001). En un extenso estudio llevado a cabo por la Organización Mundial de la Salud (OMS), concluyeron que el porcentaje atribuible de infección por VHC contraída por heridas cortantes entre el personal sanitario era del 40-65% en las regiones en vías de desarrollo en contraposición al 8-27% en los países más avanzados. En el caso del VIH el rango oscilaba entre el 0,5 y el 10%, dependiendo de la zona geográfica. Llama la atención el escaso número de infecciones adquiridas por heridas cortantes accidentales registradas entre el personal sanitario de la región geográfica que incluye EE.UU., Canadá y Cuba (Rapiti et al, 2005).

### 1.1.2. Transmisión

Uno de los principales argumentos para justificar la elevada frecuencia de la coinfección VIH-VHC es que ambos virus comparten básicamente las mismas vías de transmisión (parenteral, sexual y vertical).

#### Parenteral

Dentro del grupo de adquisición de estos virus por vía parenteral, los adictos a drogas por vía intravenosa y los receptores de hemoderivados son particularmente susceptibles a la coinfección. Se estima que entre el 85 y el 90% de las personas que se contagian con el VIH debido al uso compartido de jeringuillas están coinfectadas con el VHC (Sulkowski et al, 2000a; Sulkowski y Thomas, 2003). Así mismo, alrededor de un 70% de los hemofílicos VIH+ están coinfectados con el VHC, ya que los procedimientos para la inactivación del virus en sangre y hemoderivados no se instauraron de forma sistemática hasta el año 1985 (Rockstroh y Spengler, 2004).

#### Sexual

La transmisión sexual del VHC se produce con menor frecuencia que la del virus de la hepatitis B (VHB) o la del VIH. En consecuencia, tanto la infección por VHC como la coinfección VIH-VHC son infrecuentes entre los varones homosexuales en relación a otros colectivos de riesgo. Sin embargo, se han descrito casos de hepatitis C aguda entre varones homosexuales VIH+ (Jaeckel et al, 2001), y el análisis

filogenético refrenda la posibilidad de que el VHC se puede transmitir por vía sexual (Urbanus et al, 2009). El riesgo de dicha transmisión se estima entre el 10 y el 14%, y depende probablemente del número de parejas sexuales y del tipo de prácticas sexuales (especialmente si facilitan la aparición de heridas que comprometan la integridad de la mucosa) (Danta et al, 2007).

Se ha sugerido que aunque la transmisión del VHC por vía sexual es más infrecuente que la del VIH, la coinfección VIH-VHC podría incrementar el riesgo de contagio del VHC por esta vía (Eyster et al, 1991; Lissen et al, 1993; Thomas et al, 1995; Hisada et al, 2000), como ocurre con otras enfermedades de transmisión sexual. Una posible explicación sería el aumento de la viremia del VHC tras la infección con el VIH, que habitualmente se mantiene en valores en torno a 10 veces mayores que en la mono infección (Collier y Heathcote, 1998; Bonacini y Puoti, 2000). Sin embargo, no se ha demostrado que exista una relación directa entre la viremia y la presencia de VHC en semen, ni tampoco con la duración de la infección, el tipo de tratamiento antirretroviral para combatir el VIH, el recuento de linfocitos T CD4+ (CD4), la carga viral del VIH, ni la presencia del VIH en el semen (Pasquier et al, 2003). Asimismo, se ha calculado que cada incremento de un logaritmo en la carga viral del VIH multiplica el riesgo de infección por 1,37, mientras que las viremias elevadas del VHC no parecen condicionar significativamente el riesgo de transmisión de dicho virus (Hisada et al, 2000).

## **Vertical y perinatal**

La transmisión perinatal de la hepatitis C es poco frecuente en individuos inmunocompetentes (<1%). En madres VIH+, el porcentaje de transmisión vertical del VHC se eleva con el aumento de la inmunosupresión (Pappalardo, 2003), y se estima que puede llegar al 20% (Yeung et al, 2001). La transmisión perinatal del VIH aumenta en mujeres coinfectadas VIH-VHC (Tovo et al, 1997); estas mujeres suelen tener viremias de VHC muy elevadas, por lo que paralelamente también se incrementa el riesgo de transmisión del VHC de la madre al feto (Okamoto et al, 2000; Tajiri et al, 2001; Yeung et al, 2001; Roberts y Yeung, 2002, Ngo-Giang-Huong et al, 2010). En este sentido, se han detectado partículas de VHC en las secreciones genitales de las mujeres coinfectadas (Nowicki et al, 2002; Rakela et al, 2003), y la presencia de ARN-VHC en el líquido cervicovaginal se ha asociado de forma significativa a la coexistencia de ARN-VIH (Rakela et al, 2003). La tasa de transmisión vertical del VHC se reduce

notablemente entre los bebés nacidos por cesárea con respecto a los nacidos por vía vaginal. En la actualidad no se dispone de datos definitivos sobre el riesgo de transmisión del VHC a través de la lactancia materna, aunque se asume que éste es muy pequeño. De todas formas, las madres coinfectadas VIH-VHC deben evitar la lactancia natural, porque se ha confirmado que puede constituir otra vía de contagio del VIH al recién nacido. El riesgo de transmisión vertical del VHC por parte de las gestantes VIH+ tratadas eficazmente con Terapia Antirretroviral de Gran Actividad (TARGA) y de las coinfectadas VIH-VHC con viremia VHC indetectable, no se ha demostrado que sea mayor que el de las mujeres mono infectadas por el VHC (Thomas et al, 1998).

Los niños nacidos de madres coinfectadas deben ser testados para el VHC. La positividad de los anticuerpos hasta los 18 meses de edad no indica, en la mayoría de los casos, infección activa, ya que puede deberse a la transmisión pasiva de anticuerpos maternos a través de la placenta; en consecuencia, en los niños con sospecha de infección perinatal por el VHC es imperativo repetir la serología aproximadamente a los 2 años de edad. Si se requiere un diagnóstico precoz de la infección, se determinará el ARN-VHC mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (en inglés *polymerase chain reaction* PCR) a las 4-6 semanas del nacimiento.

### 1.1.3. Historia natural

Aunque el VHC es un flavivirus y el VIH un retrovirus, ambos son monocatenarios (ARN) y provocan una infección crónica. En la tabla 2 se resumen sus principales analogías y diferencias. Ambos virus consiguen eludir la acción del sistema inmune del huésped gracias a un elevado porcentaje de mutaciones, derivadas de una rápida replicación sin corrección de errores. La tasa estimada de producción diaria de viriones es de  $10^{10}$  en el caso del VIH y de  $10^{12}$  para el VHC (Ho et al, 1995; Neumann et al, 1998). Estos virus coexisten en el organismo del paciente como un conjunto de clones estrechamente emparentados (quasiespecies), que evolucionarán de distinto modo en el hígado, el plasma y las células mononucleares de la sangre periférica (Maggi et al, 1997; Venturi et al, 2000).

► **Tabla 2.** Características principales del VIH y del VHC

	<b>VIH</b>	<b>VHC</b>
<b>Descubrimiento del virus (año)</b>	1983	1989
<b>Nº de personas infectadas</b>	40 millones	180 millones
<b>Material genético</b>	ARN	ARN
<b>Vida media del virión</b>	<1 hora	2,7 horas
<b>Principal célula diana</b>	Linfocitos T CD4+	Hepatocitos
<b>Vida media de la célula infectada</b>	Alrededor de 1 día	Varios días o semanas
<b>Principal ruta de transmisión</b>	Sexual	Parenteral
<b>Tasa de cronicidad</b>	100%	76%
<b>Tasa de curación con terapia</b>	0%	40%
<b>Período asintomático</b>	10 años	30 años
<b>Principales valores predictivos</b>	Recuento de CD4, carga viral	Fibrosis, estadio, cofactores
<b>Principal mecanismo patogénico</b>	Muerte celular directa	Mediación inmunológica
<b>Tratamiento</b>	Antirretrovirales	Inmunomoduladores
<b>Predictores del éxito del tratamiento</b>	Carga viral, recuento de CD4, adherencia, resistencias	Genotipo, carga viral, adherencia, cirrosis

Se ha demostrado que la infección por VIH acelera la progresión de la hepatitis C, pero esta repercusión de la coinfección no es recíproca, y la influencia del VHC en la progresión de la enfermedad por VIH no se ha constatado de forma concluyente. La historia natural de ambas infecciones ha variado considerablemente con la introducción de la TARGA.

En la mayoría de los estudios de la era pre-TARGA no se observaron diferencias en la progresión de la infección por VIH ni en términos de supervivencia, en base al estado serológico al VHC (Wright et al, 1994; Dorrucci et al, 1995; Macías et al, 1998); en dichos estudios, el riesgo de muerte por infección por VIH era mayor que el riesgo de muerte por coinfección VIH-VHC (Fultz et al, 2003).

En la época de la TARGA, sin embargo, se ha generado información controvertida acerca de la eficacia de esta modalidad terapéutica en los individuos coinfectados. Algunos estudios apuntan a que la respuesta inmune a la TARGA está comprometida en los individuos coinfectados, pero no está claro el efecto del VHC en dicha respuesta, ya que este hallazgo no ha sido posteriormente confirmado por algunos autores (Greub et al, 2000; Torriani et al, 2001; Sulkowski et al, 2002; Rockstroh et al, 2004). Desde el año 1996 las hospitalizaciones por infecciones oportunistas disminuyeron significativamente, mientras que las relacionadas con complicaciones hepáticas aumentaron (Gebo et al, 2003). A pesar de que la TARGA incrementa significativamente la supervivencia de los pacientes VIH-positivos, la coinfección con el VHC aumenta el riesgo de muerte por causa hepática (Fultz et al, 2003; Rimland y Guest, 2004; Rockstroh et al, 2004; Backus et al, 2005).

## Efectos del VIH en la progresión de la infección por VHC

Tras una infección aguda por VHC, la probabilidad de que el virus no se elimine espontáneamente y se cronifique la hepatitis es de un 80-90% en los pacientes coinfectados VIH-VHC frente a un 60-70% en los VIH negativos (Thomas et al, 2000; Mehta et al, 2002; Augenbraun et al, 2003; Mathews y Bhagani, 2003; Danta et al, 2007; Matthews y Dore, 2008). La probabilidad de cronificación del VHC entre los coinfectados es menor en las mujeres que en los varones, y también se reduce en los pacientes con niveles elevados de CD4 (Joshi et al, 2011).

La replicación del VHC se incrementa en presencia del VIH, lo que se traduce en mayores niveles de ARN-VHC en el hígado y el suero de los pacientes coinfectados (Sherman et al, 1993; Cribier et al, 1995; Thomas et al, 1996). Algunos autores han sugerido que los niveles de ARN-VHC aumentan a medida que avanza la inmunosupresión (Soto et al, 1997), mientras que otros no han podido confirmar que exista una correlación entre el recuento de CD4 y la carga viral del VHC (Sherman et al, 1993; Cribier et al, 1995; Beld et al, 1998; Bonacini et al, 1999; Collazos et al, 2010). También se ha generado cierta controversia sobre el comportamiento de la carga viral del VHC tras el tratamiento exitoso con TARGA y la consiguiente recuperación inmunológica; mientras que algunos autores constataron un descenso de los niveles de ARN-VHC (Pérez-Olmeda et al, 2000), otros no apreciaron cambios (García-Samaniego et al, 1998; Rockstroh et al, 1998; Zylberberg et al, 1998), e incluso se ha descrito una elevación transitoria de

la viremia VHC (Rutschmann et al, 1998; Vento et al, 1998). Los niveles elevados de viremia VHC pueden potenciar el riesgo de transmisión de la infección y comprometer el éxito de la TARGA (Soto et al, 1997). Sin embargo, tanto en los coinfectados VIH-VHC como en los mono infectados VHC, no se ha demostrado que las viremias VHC elevadas favorezcan la progresión de la fibrosis hepática (Fanning et al, 1999; Thomas et al, 2000).

La coinfección con el VIH también puede afectar a la heterogeneidad viral del VHC. En un estudio realizado en pacientes con un recuento de linfocitos T CD4+ <50 cels/ $\mu$ l, se observó que tenían un marcado descenso en la diversidad nucleótida del VHC, a pesar de que conservaban un número normal de clones de quasiespecies virales (Toyoda et al, 1997). Este hallazgo sugiere que, dentro de cada quasiespecie, los clones que se replican más eficazmente pueden llegar a convertirse en los predominantes cuando la selección inmunológica está dañada, produciéndose, en algunos casos, una progresión más rápida de la hepatitis C.

El curso clínico de la hepatitis C en la coinfección VIH-VHC, viene determinado por la inmunosupresión asociada al VIH. En varios estudios -algunos incluyendo análisis histopatológicos- (Eyster et al, 1993; Telfer et al, 1994; Sánchez-Quijano et al, 1995; Rockstroh et al, 1996), se confirmó el curso acelerado de la hepatitis C en los casos de coinfección. El avance de la infección por VIH precipita la progresión de la hepatitis C, como reflejó la información proporcionada por el *American Multicenter Hemophilia Cohort Study* (Eyster et al, 1993), en el que el 10% de los adultos hemofílicos coinfectados VIH-VHC desarrollaron un fallo hepático tras un período latente de 10 a 20 años, incluso antes de la aparición de alguna infección oportunista asociada al SIDA o de una neoplasia; los enfermos con un recuento de CD4 <100 cels/ $\mu$ l fueron los que progresaron con mayor celeridad hacia la fibrosis hepática; entre los pacientes mono infectados por VHC no se produjo ningún caso de fallo hepático en el mismo intervalo de tiempo, y el período estimado para desarrollar un fallo hepático o un carcinoma hepatocelular fue de 30-40 años.

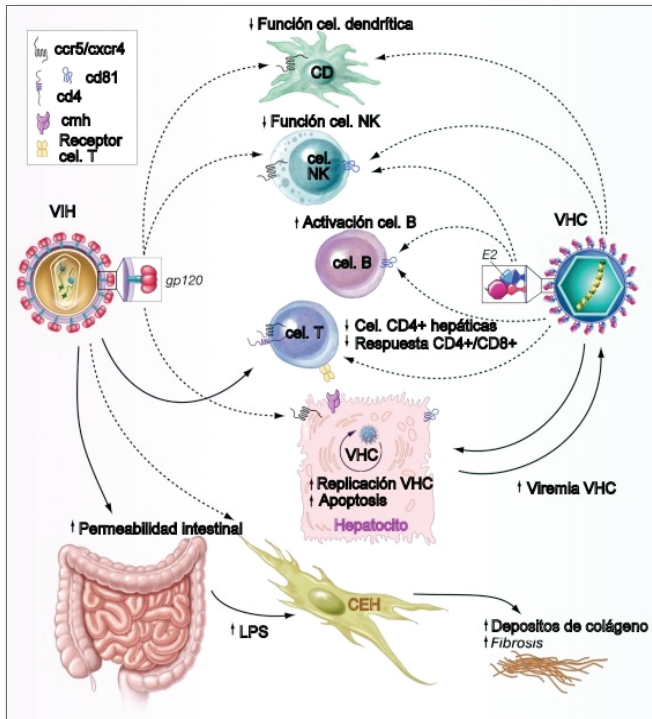
Numerosos autores sostienen que la progresión a fibrosis hepática en los individuos coinfectados VIH-VHC es más rápida que en los mono infectados VHC (Kim y Chung, 2009; Rotman y Liang, 2009; Hernández y Sherman, 2011), pero aún no se ha esclarecido si la presencia del VIH por sí sola puede acelerar la evolución de la enfermedad por VHC o si la progresión a fibrosis se asocia fundamentalmente a

la inmunodeficiencia. Puoti et al (Puoti et al, 2001), en un estudio de carácter retrospectivo, encontraron una asociación significativa entre un recuento de CD4  $<500$  cels/ $\mu$ l y un grado de fibrosis importante, mientras que la infección por VIH por sí misma no se asociaba a fibrosis severa; en este sentido, otros autores confirmaron que los pacientes con  $<200$  CD4/ $\mu$ l tenían mayor riesgo de desarrollar cirrosis que los que mantenían un mayor nivel de inmunocompetencia (Lesens et al, 1999; Allory et al, 2000; Ragni y Belle, 2001; Goedert et al, 2002). Por el contrario, en un estudio de casos y controles en el que se evaluaron 116 pacientes con hepatitis C, 56 de los cuales estaban coinfectados, Allory et al (Allory et al, 2000) describieron una actividad necroinflamatoria mayor en los individuos coinfectados, especialmente en aquéllos con un recuento elevado de linfocitos CD4 ( $>500$  cels/ $\mu$ l), lo que sustenta la teoría sobre el influjo del propio VIH en la progresión de la fibrosis hepática, incluso antes de que exista un deterioro inmunológico significativo. La influencia potencial de la TARGA en estos hallazgos no se ha aclarado definitivamente, ya que los participantes que recibían más de dos antirretrovirales fueron excluidos por Puoti et al (Puoti et al, 2001), mientras que Allory et al (Allory et al, 2000) no hicieron referencia a la administración de TARGA. Recientemente, se ha sugerido que el VIH acelera la evolución de la enfermedad hepática en los pacientes con hepatitis C, si bien la progresión es más significativa en los pacientes inmunodeprimidos (Joshi et al, 2011).

En varios estudios se ha subrayado que entre los factores de mal pronóstico para la progresión a fibrosis se encuentran: la edad, un consumo de alcohol diario superior a 50-80 gramos, un bajo recuento de linfocitos CD4 ( $<200$  cels/ $\mu$ l) y el tiempo de evolución de la infección por VHC ( $>15$  años) (Benhamou et al, 1999; Martín-Carbonero et al, 2003; Martín-Carbonero et al, 2004).

Para explicar la etiopatogenia de este hallazgo se ha sugerido que la apoptosis de los hepatocitos aumenta ante la presencia simultánea de ambos virus, en comparación con la existencia de sólo uno de ellos (Babu et al, 2009; Jan et al, 2011) (Figura 1). Además, tanto el VHC como el VIH participan de forma independiente en la progresión de la fibrosis, al aumentar el estrés oxidativo (Tuyama et al, 2010; Katsounas et al, 2011).

► **Figura 1.** Mecanismo de apoptosis de los hepatocitos en pacientes coinfectados VIH-VHC



Tomado de Rotman y Liang, 2009

Anecdóticamente, otros autores (García-Álvarez et al, 2010) han investigado un grupo de pequeños virus con un ADN genéticamente variable, muy abundantes en los seres humanos de todo el mundo, los torque teno virus (TTV) y los torque teno minivirus (TTVM). En sus estudios encontraron una elevada prevalencia de infecciones por ambos virus en los individuos coinfectados VIH-VHC, así como una relación directa entre la carga viral de estos virus y los grados de actividad inflamatoria y fibrosis en las biopsias hepáticas.

## Impacto de la TARGA en la progresión de la fibrosis hepática

Todavía no se ha demostrado de forma concluyente si la introducción de la TARGA ha tenido un impacto significativo en el curso de la hepatitis C, aunque en varios estudios de cohortes se ha demostrado que al mejorar la función inmunológica se retrasa la aparición del fallo hepático -especialmente en los

pacientes que toman inhibidores de la proteasa- (Qurishi et al, 2003). Paradójicamente, la actividad inflamatoria que genera esa misma recuperación del estado inmunológico podría acelerar la progresión de la hepatitis C; este efecto se ha observado en algunos pacientes coinfectados en los que, tras la iniciación de la TARGA, además de un aumento importante de los linfocitos T CD4+ se detectó una elevación transitoria de las transaminasas, en el contexto de la reconstitución inmunológica (Rutschmann et al, 1998).

Delimitar la contribución de un determinado agente antirretroviral a la progresión de la fibrosis es complejo. En la mayoría de los estudios publicados hasta la fecha, las tasas de progresión se han estimado en base a un modelo que asume la linealidad, pero esta presunción no siempre es cierta. Sin biopsias secuenciales, la progresión individual de la fibrosis no se puede establecer. La duración de la infección por VHC, la severidad de la infección por VIH, la edad, el consumo de alcohol, el uso de drogas recreacionales y otros factores de susceptibilidad individual, pueden dificultar la valoración del efecto de la TARGA en la progresión de la fibrosis (Macías et al, 2000; Benhamou et al, 2001).

## Efectos del VHC en la progresión de la infección por VIH

En la mayoría de los estudios realizados en el período pre-TARGA, no se encontraron diferencias en la progresión ni en la supervivencia a la infección por VIH entre los pacientes VIH+ mono infectados y los coinfectados VIH-VHC. Estos estudios tenían ciertas limitaciones, como el tiempo de seguimiento, generalmente limitado a unos pocos años, lo que impedía elaborar información fidedigna sobre la evolución de los recuentos de linfocitos T CD4+ y de las cargas virales. Teniendo en cuenta estas limitaciones, los resultados de dichos estudios sugerían que la infección por VHC no alteraba sustancialmente el curso de la infección por VIH, al menos en períodos cortos de tiempo (Wright et al, 1994; Dorrucci et al, 1995; Macías et al, 1998; Piroth et al, 1998).

A pesar de que el VHC por sí mismo no empeora significativamente el curso de la infección por VIH, las alteraciones hepáticas que ocasiona pueden condicionar la progresión de la enfermedad (Lesens et al, 1999). En este sentido, en el *Swiss Cohort Study*, se identificó la hepatitis C como un factor de riesgo independiente para una progresión más rápida de la infección por VIH a SIDA y muerte (Greub et al, 2000). Este hecho parece que no responde a un uso más irregular o a una peor tolerancia a la TARGA,

sino que obedecería a una respuesta inmunológica más pobre -cuantificable en términos de un menor incremento de linfocitos T CD4+ en los pacientes coinfectados- (Potter et al, 2010), probablemente como consecuencia de la exacerbación de la apoptosis linfocitaria observada en este colectivo (Körner et al, 2010). En otros estudios, por el contrario, la hepatitis C no condicionó la progresión de la infección por VIH, inclusive tras ajustar en función del uso y respuesta a la TARGA (Chen et al, 2009). Los resultados del *Australian HIV Observational Database* (AHOD) no confirmaron que existiera mayor riesgo de progresión de la infección por VIH en la población coinfectada, pero, al igual que el *Swiss Cohort Study*, demostraron un menor incremento del número de linfocitos T CD4+ en respuesta a la TARGA que en los pacientes mono infectados (National Centre in HIV Epidemiology and Clinical Research, 2001).

Se ha corroborado, que al mejorar las opciones terapéuticas del VIH y prolongarse significativamente la esperanza de vida de estos pacientes, ha aumentado la probabilidad de los coinfectados de experimentar un fallo hepático. Para algunos autores, el fallo hepático representa la causa más frecuente de muerte entre los pacientes VIH+ (Bica et al, 2001). En un estudio llevado a cabo en pacientes norteamericanos y europeos sobre los efectos adversos de los antirretrovirales, se encontró que la enfermedad hepática era la segunda causa de muerte en los pacientes VIH+, por delante de la enfermedad cardiovascular y sólo superada por el SIDA (Weber et al, 2006). En España, sin embargo, la hepatitis crónica está relegada al quinto lugar entre las causas de muerte en los pacientes VIH+ (Soriano et al, 1999). Este hecho, unido al curso más rápido de la hepatitis C en la coinfección, ha llevado a muchos expertos a considerar la hepatitis C como una enfermedad oportunista (Sulkowski et al, 2000b).

En definitiva, parece que la respuesta a la TARGA en términos de reducción de los niveles de ARN-VIH se conserva en los pacientes coinfectados (Chung et al, 2002), pero se han publicado resultados contradictorios acerca de la influencia de la hepatitis C en la respuesta inmunológica a la terapia antirretroviral, en términos de incremento de los linfocitos T CD4+ (Greub et al, 2000; Sulkowski et al, 2002). Se han descrito otros factores que condicionan negativamente esta reconstitución inmunológica y que incluyen: un recuento basal elevado de CD4 al comenzar la administración de la TARGA, el sexo masculino, la edad avanzada, el historial de previo de adicción a drogas inyectables, y la utilización de regímenes terapéuticos exclusivamente a base de nucleósidos/nucleótidos inhibidores de la transcriptasa reversa (Yacisin et al, 2008).

Por otra parte, la condición de coinfectado constituye un factor de riesgo para desarrollar hepatotoxicidad por antirretrovirales, y en este sentido se ha determinado que más de un 10% de los pacientes tienen que interrumpir el tratamiento debido a hepatotoxicidad severa (Fuping et al, 2010).

## Adicción a drogas inyectables y coinfección VIH-VHC

Los estudios de cohortes en pacientes adictos a drogas inyectables que adquirieron la infección por VHC, han proporcionado información muy relevante sobre la coinfección VIH-VHC, aunque determinados factores como la reinfección por VHC, el uso cotidiano de drogas adulteradas o las inyecciones no estériles, también podrían favorecer la progresión de la hepatitis C.

Las investigaciones realizadas en este colectivo corroboran la progresión más rápida a cirrosis entre los coinfectados VIH-VHC. Soto et al (Soto et al, 1997) estimaron que el tiempo medio para desarrollar cirrosis era de 23,2 años en los monoinfectados y 6,9 en los coinfectados. Al igual que en las cohortes de hemofílicos, el riesgo de cirrosis se incrementaba en los individuos coinfectados con un recuento de linfocitos T CD4+ <200 cels/ $\mu$ l (Di Martino et al, 2001).

Las discrepancias entre diferentes estudios sobre coinfección VIH-VHC y progresión de la fibrosis hepática podrían deberse a la elevada mortalidad por SIDA antes de la introducción de la TARGA (Goedert et al, 2002). En la era TARGA, el uso de drogas inyectables conlleva aparejado un aumento del riesgo de mortalidad en los pacientes coinfectados. En un estudio publicado por Voirin et al (Voirin et al, 2003), al comparar el período 1996-2002 con la etapa pre-TARGA, las tasas de mortalidad a los 3 y 5 años descendieron en los monoinfectados por VIH, los coinfectados VIH-VHC y los coinfectados que utilizaban drogas inyectables; tras ajustar los resultados en función de la edad y el recuento de linfocitos T CD4+ , el riesgo de muerte entre los monoinfectados por VIH no era sustancialmente diferente al de los coinfectados VIH-VHC, pero este riesgo aumentaba significativamente entre los coinfectados que consumían drogas inyectables.

## 1.1.4. Diagnóstico

### Tests serológicos y moleculares

Todos los pacientes infectados por VIH deberían someterse a tests específicos para descartar la presencia de una infección crónica concomitante por VHC (Straeder et al, 2004; Soriano et al, 2007). Las pruebas de diagnóstico que se emplean en los pacientes coinfectados, no difieren de las utilizadas en los pacientes monoinfectados por el VHC. Los tests diagnósticos se denominan serológicos cuando analizan anticuerpos específicos, y moleculares si detectan partículas virales.

Los **tests serológicos** se utilizan en primera instancia por su simplicidad técnica y su bajo coste, aunque carecen de la sensibilidad y especificidad de los exámenes de detección del genoma viral. Los tests más aplicados para detectar anticuerpos contra el VHC (anti-VHC) son los enzoinmunoanálisis (EIA). Se han desarrollado tres generaciones de EIA desde su incorporación como prueba de detección en 1990. La sensibilidad del EIA de 3ª generación (EIA-3) alcanza el 99%, pero tiene una especificidad limitada que obliga a efectuar un análisis de confirmación (Vrielink et al, 1997). El análisis mediante ensayo recombinante por inmunoblot (en inglés RIBA) de 3ª generación (RIBA-3) es una técnica sencilla, estandarizada y reproducible, pero más compleja en su realización que el EIA, consume más tiempo y es relativamente cara, por lo que su utilidad suele limitarse a la exclusión de falsos positivos del EIA en los bancos de sangre. La viremia de la hepatitis C es detectable mediante técnicas de PCR en el 60-90% de los pacientes coinfectados, con anti-VHC positivos (McNair et al, 1992; Dieterich et al, 1999). En todo caso, un EIA negativo no es suficiente para excluir la presencia del VHC en los pacientes VIH+. De hecho, los EIA de 1ª generación (con una sensibilidad del 70-80%) arrojaban porcentajes significativos de falsos negativos entre los pacientes VIH+, infravalorando la prevalencia de la infección por VHC en un 10-30% (Hayashi et al, 1991; Thomas et al, 1996). Este elevado porcentaje de falsos negativos se ha atribuido a diferentes factores: una escasa producción de anti-VHC por la inmunosupresión avanzada (recuento de CD4 <100 cels/ $\mu$ l), una disminución más rápida de los títulos de anti-VHC, una posible interacción entre los dos virus y una negativización de los anti-VHC. También podrían darse casos de falsos negativos durante el período ventana de una infección aguda por VHC (primeras 12 semanas tras el contagio). Así mismo, la hipergammaglobulinemia asociada a la infección por VIH podría inducir falsos positivos en los

EIA (McHutchison et al, 1991). También se han observado algunas inconsistencias en los análisis confirmativos de la infección por VHC mediante RIBA, ya que el 10-23% de los resultados se consideran indeterminados en presencia de coinfección (Nübling et al, 1994; Dieterich et al, 1999). En consecuencia, aunque el EIA se considera una prueba diagnóstica obligada, en los pacientes con anti-VHC indetectables y otras evidencias de enfermedad hepática crónica (niveles altos de enzimas hepáticas) y/o determinadas conductas de riesgo (adicción a drogas por vía parenteral o prácticas sexuales de alto riesgo), se debe cuantificar la presencia de ARN-VHC en suero mediante PCR (Public Health Service and Infectious Diseases Society of America, 1999). En conclusión, la detección de anti-VHC confirma la exposición al virus, pero no distingue entre una hepatitis C resuelta o crónica.

Los **tests moleculares** se emplean fundamentalmente para diagnosticar la hepatitis C crónica en base a la detección del ARN-VHC circulante. Desde que se identificó el VHC a principios de los años noventa, empezaron a desarrollarse numerosos métodos de detección del ARN viral, que diferían significativamente en términos de sensibilidad, especificidad y en las unidades de cuantificación, lo que imposibilitaba la comparación de los resultados obtenidos con las diferentes técnicas. Para evitar esta discrepancia, la OMS propuso la creación de un estándar internacional que permitiera la cuantificación homogénea del ARN viral, las denominadas Unidades Internacionales (UI). El número de UI es aproximadamente 0,8 log veces menor que el número de copias/ml (Saldanha et al, 1999).

La tasa de replicación del VHC es relativamente baja, por lo que las técnicas clásicas de hibridación son ineficaces para detectar el virus en los fluidos corporales y resulta imprescindible aplicar técnicas de amplificación del ARN.

Los métodos utilizados para analizar la presencia de ARN-VHC (detección cualitativa) deben tener la capacidad de detectar  $\leq 50$  UI/ml de ARN viral, manteniendo su sensibilidad entre los diferentes genotipos. Existen al menos dos técnicas comerciales disponibles: la RT-PCR (Amplicor<sup>®</sup> VHC y Cobas<sup>®</sup> Amplicor) y la TMA (Versant<sup>®</sup> VHC ARN). Estas pruebas presentan una sensibilidad del 96-98%, con una especificidad del 99%; los límites de detección de cada técnica son 50 y 5 UI/ml respectivamente.

El ARN-VHC se puede cuantificar (detección cuantitativa) mediante la aplicación de dos técnicas: RT-PCR competitiva/PCR en tiempo real y bADN. Los tests comerciales más utilizados son: Quantiplex<sup>®</sup>

VHC ARN (bADN), Amplicor® VHC Monitor (RT-PCR cuantitativa) y Cobas Taqman® y Taqman Real Time PCR® de Abbot (PCR en tiempo real). Los rangos dinámicos de detección suelen situarse entre 600 y 8.000.000 UI/ml, de forma que si el nivel de ARN supera el límite superior del rango dinámico, éste debe retestarse diluyendo la muestra al 1:10 o 1:100 para cuantificarlo de forma más precisa.

A continuación se comentan las características más sobresalientes de estas técnicas moleculares de detección del ARN-VHC circulante:

- *Reacción en cadena de la polimerasa con sistema de transcriptasa inversa (en inglés Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; RT-PCR)*

La PCR consiste en amplificar un fragmento de ADN, que queda delimitado entre los dos *primers* o cebadores que constituyen secuencias complementarias del ácido nucleico diana previamente seleccionado. El VHC es un virus ARN, lo que hace necesario realizar una retrotranscripción previa, es decir, convertir el ARN en ADN complementario (ADNc), para después amplificarlo. Esta técnica recibe la denominación abreviada de RT-PCR. Para ello, se selecciona una región viral bien conservada, como la 5' (UTR), que permita la amplificación de todos los genotipos.

- *Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real*

En la PCR clásica, el producto amplificado se detecta al final de la reacción tras un número de ciclos fijos, mientras que en la PCR en tiempo real se va detectando a medida que se va produciendo en cada ciclo. Al igual que en la RT-PCR, se requiere una retrotranscripción previa y la utilización de cebadores que delimiten la región que se desea amplificar, y se intercala una sonda de ADN complementaria a la secuencia problema, que se marca con un fluorocromo. A medida que se completan los ciclos, se incrementa la cantidad de fluorescencia detectada. Es una técnica más sensible y rápida que la PCR clásica, y puesto que la amplificación y la detección se producen en el mismo tubo de reacción, no precisa de manipulaciones posteriores, minimizando así el riesgo de contaminación. Su gran sensibilidad permite establecer límites inferiores de detección por debajo de 10 UI, con límites dinámicos de detección más amplios (entre 10 y 10.000.000 UI/ml), sin necesidad de diluir las muestras (Esteban y Saucedo, 2006).

- *Métodos de amplificación isotérmica basados en la transcripción (en inglés Transcription Mediated Amplification; TMA)*

Con esta técnica se obtiene el ADNc del ARN problema utilizando cebadores específicos que delimitan la región que se debe amplificar y distintas enzimas. Es un proceso secuencial, de modo que las nuevas hebras de ARN se transcriben de nuevo a ADNc, para obtener más ARN. Para detectar el producto de la amplificación, la TMA utiliza sondas de oligonucleótidos marcadas que emiten una señal quimioluminiscente con un límite de detección de 5 UI/ml (Ross et al, 2001).

- *Amplificación de señal mediante sondas de ADN ramificado (en inglés branched DNA; bDNA)*

Consiste en un sistema de hibridación tipo sándwich en fase sólida, que incorpora distintas sondas de oligonucleótidos para amplificar la señal de detección. Entre las ventajas que presenta esta técnica con respecto a las de amplificación genómica destacan: un menor riesgo de contaminación cruzada -y por lo tanto de falsos positivos-, y el hecho de no necesitar transcripción inversa, lo que permite detectar directamente el ARN (Nolte y Caliendo, 2007).

En la tabla 3 se detallan las técnicas moleculares comercializadas más utilizadas y sus rangos de detección (Esteban y Saulea, 2006).

► **Tabla 3.** Técnicas moleculares para la detección/cuantificación del ARN-VHC en suero

<b>TEST COMERCIALES CUALITATIVOS</b>	<b>TÉCNICA DE LABORATORIO</b>	<b>LÍMITE DE DETECCIÓN (UI/ml)</b>
Amplicor® HCV, versión 2.0	RT-PCR manual	50
Cobas® Amplicor	RT-PCR semiautomatizada	50
Versant® HCV ARN, versión 3.0	TMA	10
<b>TESTS COMERCIALES CUANTITATIVOS</b>	<b>TÉCNICA DE LABORATORIO</b>	<b>RANGO DINÁMICO (UI/ml)</b>
Cobas® Amplicor VHC monitor, versión 2.0	RT-PCR semiautomatizada	600-850.000
Versant® VHC ARN, versión 3.0	bADN	615-8.000.000
Cobas Taqman VHC®	RT-PCR en tiempo real semiautomatizada	30-200.000.000
LCX® VHC ARN	RT-PCR semiautomatizada	25-2.630.000

No existe ninguna fórmula de conversión estándar para transformar a UI la cantidad de ARN-VHC expresada en copias/ml, aunque el factor de conversión oscila habitualmente entre 1 y 5 copias por cada UI. Generalmente, cada laboratorio especifica el factor de conversión de la técnica que comercializa (Ferreira-González y Shiffman, 2004) (Tabla 4).

► **Tabla 4.** Equivalencia numérica entre diferentes tests para la cuantificación del ARN del VHC en copias/ml y Unidades Internacionales (UI)

TEST	EQUIVALENCIA DE 1 UI/ml
Amplicor® HCV Monitor, versión 2.0 (procedimiento manual)	0,9 copias/ml
Cobas® Amplicor HCV Monitor, versión 2.0 (procedimiento semiautomático)	2,7 copias/ml
Prueba cuantitativa del ARN del VHC Versant®, versión 3.0	5,2 copias/ml
Prueba cuantitativa del ARN del VHC LCx®	3,8 copias/ml
SuperQuant®	3,4 copias/ml

Un resultado positivo de ARN-VHC es suficiente para confirmar una infección activa por VHC, pero no se puede descartar dicha infección en base a un único resultado negativo, ya que los niveles de partículas virales pueden disminuir transitoriamente por debajo del límite de detección. Por ello, es imperativo repetir las PCR negativas. Los análisis cuantitativos seriados de ARN-VHC se deben realizar únicamente a los pacientes que están recibiendo tratamiento anti-VHC.

## Genotipado

En el contexto de la estrategia terapéutica de la hepatitis C es necesario determinar previamente el genotipo viral, ya que éste representa uno de los factores predictores de la respuesta al tratamiento -los genotipos 2 y 3 son los que mejor responden a la administración de interferón-, y puede condicionar la decisión de iniciar la terapia y/o de realizar una biopsia hepática. Existe cierta controversia sobre el número de genotipos que exhibe el VHC, ya que algunos investigadores defienden que existen 11 genotipos que tienen una distribución geográfica heterogénea, mientras que otros mantienen que sólo hay 6 genotipos con numerosos subtipos correspondiendo los genotipos 7 al 11 a variaciones del genotipo 6, siendo esta última la opinión más consensuada en la actualidad (Simmonds et al, 2005). Además, es factible la coinfección simultánea con varios genotipos (infección mixta).

Los subtipos 1a y 1b son los más comunes en EE.UU. y Europa. En Japón, el subtipo 1b es el responsable del 73% de las infecciones por VHC. Los subtipos 2a y 2b son relativamente comunes en Norteamérica, Europa y Japón, mientras que el subtipo 2c es especialmente frecuente en el norte de Italia. El subtipo 3a es particularmente prevalente en europeos y estadounidenses adictos a drogas por vía intravenosa. El genotipo 4 es el que predomina en el norte de África y en Oriente Medio, y los genotipos 5 y 6 parecen confinados a Sudáfrica y Hong Kong, respectivamente. Los genotipos 7, 8 y 9 sólo se han identificado en pacientes vietnamitas, mientras que el 10 y el 11 se han detectado exclusivamente en Indonesia.

La distribución geográfica del VHC (Figura 2) y la diversidad de genotipos existente, proporcionan información acerca de la evolución histórica de la infección. La presencia de numerosos subtipos de cada genotipo en determinadas regiones del planeta como el África subsahariana y el sudeste asiático, parece sugerir una endemia del VHC prolongada en el tiempo, mientras que la limitada diversidad de subtipos detectada en EE.UU y Europa aboga por una reciente introducción del virus desde las áreas de infección endémica.

► **Figura 2.** Distribución geográfica de los distintos genotipos del VHC



Se ha sugerido que existe una asociación entre el genotipo del VHC y el modo de adquisición de la infección (Pawlotsky et al, 1995; Watson et al, 1996; Berg et al, 1997). En este sentido, los genotipos 1a y 3a estarían directamente relacionados con el consumo de drogas por vía intravenosa, mientras que el

genotipo 1b se observaría con mayor frecuencia entre los pacientes que contrajeron la enfermedad como consecuencia de una transfusión de sangre contaminada. Sin embargo, otros autores no pudieron confirmar este tipo de asociaciones (Zein, 2000).

El genotipo del VHC puede determinarse por técnicas moleculares o bien serológicas. Entre las moleculares la referencia estándar es la amplificación mediante PCR y posterior secuenciación y análisis de las regiones virales NS5, core, E1 y 5'UTRs. Otros métodos se basan en la amplificación del ARN-VHC de especímenes clínicos, seguida bien de una reamplificación con cebadores específicos, de una hibridación o de un proceso de digestión de los productos de la PCR mediante endonucleasas restrictivas que reconocen la posición concreta de enclavamiento para cada genotipo. En Europa, para la determinación del genotipo, se comercializa un kit (Inno-Lipa HCV II, Innogenetics, Bélgica) basado en la hibridación inversa de los productos amplificados de la región 5'UTR (Carithers et al, 2000). Aunque cualquiera de estos métodos permite identificar correctamente la mayoría de los genotipos, sólo mediante la secuenciación directa de los nucleótidos se podría discriminar el subtipo.

Se han comercializado varios tests para la determinación serológica del genotipo del VHC. Uno de los más utilizados es el RIBA SIA (Chiron Corp. Emeryville, CA, USA), que contiene 5 secuencias de péptidos específicos para cada genotipo serológico diferentes, extraídas de la región del core del genoma del VHC para los genotipos 1, 2 y 3 (Dixit et al, 1995), que posteriormente dio lugar a las versiones 2.0 y 3.0. El otro test es el Murex VHC (Murex Diagnostics Ltd., Kyalami, República de Sudáfrica), que se basa en la detección de anticuerpos específicos para cada genotipo serológico, dirigidos a epitopos codificados por la región NS4 de los genomas de los genotipos 1 a 6 (Gish et al, 1997), cuya última versión es la 4.0.

La selección del método de tipificación para el VHC se basará en la experiencia del laboratorio de referencia y en el objetivo que se persigue con la tipificación. Para identificar todos los subtipos e incluso secuencias nuevas si las hubiera, la amplificación por PCR y posterior secuenciación, constituye el método de elección. Sin embargo, muchas veces se pretende exclusivamente identificar a los pacientes infectados por el genotipo 1 para determinar la estrategia terapéutica, en cuyo caso resultarían de utilidad cualquiera de los métodos serológicos descritos previamente.

## Niveles de transaminasas

Tras el genotipado también se deben determinar los niveles de transaminasas, los parámetros de colestasis y los marcadores de la capacidad sintetizadora del hígado (colinesterasa, albúmina, proteínas totales y factores de coagulación), ya que la información que proporcionan en los pacientes coinfectados es tan útil como en los VIH negativos.

## Técnicas de imagen

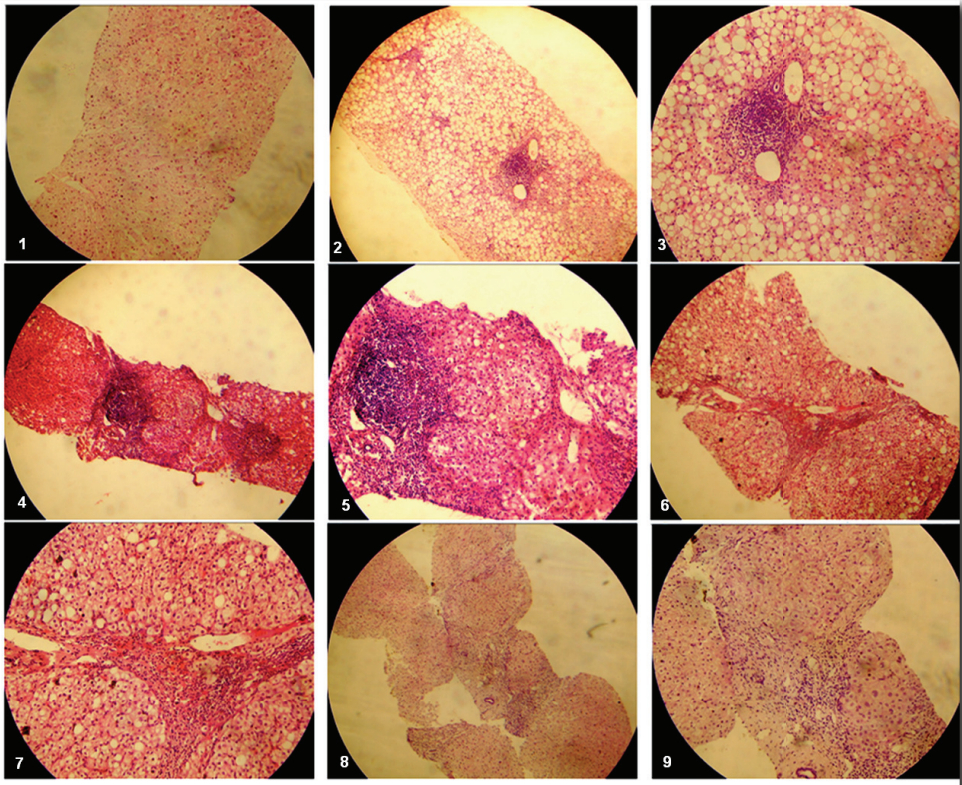
Se dispone de numerosas técnicas de imagen para evaluar las alteraciones del parénquima hepático, como la ecografía, la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM). Sin embargo, estas pruebas presentan una utilidad limitada en el estadiaje de la enfermedad hepática, ya que a menudo detectan anomalías únicamente en estadios avanzados de la enfermedad. La ecografía puede emplearse como prueba inicial para la evaluación de la cirrosis (especialmente si existe sospecha clínica en base a un examen físico o a parámetros analíticos) o para la detección preliminar de lesiones sospechosas de carcinoma hepatocelular. En términos de coste/beneficio, el uso de la TC con contraste o de la RM, en general debería limitarse a la evaluación de posibles masas hepáticas en los pacientes con cirrosis.

## Biopsia hepática

Existe cierta controversia acerca de la importancia de realizar una biopsia hepática previa al comienzo de la terapia, ya que no hay recomendaciones específicas basadas en resultados de estudios clínicos. Por una parte, se considera que el tratamiento para el VHC sólo debería administrarse si se dispone de una confirmación "absoluta" como la que proporciona el estudio histológico, ya que habitualmente coexisten numerosos factores de confusión como efectos secundarios, interacciones con la TARGA y una eficacia limitada. Por otro lado, debería asumirse que la terapia para el VHC estaría justificada prácticamente en todos los pacientes coinfectados, debido al curso particularmente acelerado de la hepatitis C en este colectivo, que progresa a fibrosis o a cirrosis en aproximadamente la mitad de los casos. Además, la biopsia hepática debería repetirse cada 2-3 años para poder evaluar la progresión de la enfermedad y no todos los pacientes aceptan este planteamiento. En consecuencia, la biopsia hepática sería deseable especialmente en los pacientes con una alta probabilidad de respuesta favorable a la

terapia, mientras que resultaría ineludible si los hallazgos clínicos no fueran concluyentes y se necesitase determinar la actividad hepática y el nivel de daño del parénquima hepático. Las clasificaciones histológicas más utilizadas son las que incluyen los grados de fibrosis (F0-F4) y el índice de Knodell de actividad histológica (Figura 3). Si no se confirma la existencia de fibrosis o de una actividad inflamatoria significativa, no estaría indicado iniciar el tratamiento de forma inmediata.

► **Figura 3.** Diferentes grados de actividad histológica en biopsias hepáticas de pacientes con hepatitis crónica por VHC



**1.** Actividad ligera y sin fibrosis (x 10 H&E) **2.** Infiltración grasa (esteatosis), actividad moderada y fibrosis portal (x 10 H&E). **3.** Actividad moderada y fibrosis portal (x 10 H&E). **4.** Actividad moderada y fibrosis portal (x 10 H&E). **5.** Actividad moderada y fibrosis portal (x 20 H&E). **6.** Actividad moderada y fibrosis severa (x 10 H&E). **7.** Actividad moderada y fibrosis severa (x 20 H&E). **8.** Actividad moderada-severa e inicio de cirrosis (x 10 H&E) **9.** Actividad moderada-severa e inicio de cirrosis (x 20 H&E)

En cualquier caso, antes de efectuar una biopsia hepática deberían considerarse minuciosamente sus contraindicaciones. Esta puntualización resulta particularmente relevante para los hemofílicos, en los

que habitualmente hay que desistir de plantearse la biopsia por el riesgo inherente de hemorragia severa. También hay que tener presente que el estadiaje de la enfermedad mediante biopsias es costoso y está sujeto a errores de muestreo por la heterogeneidad de la propia fibrosis. Además, si bien con la técnica guiada mediante ultrasonidos se reduce el riesgo, las complicaciones de la biopsia hepática percutánea (hemorragia, peritonitis biliar y neumotórax) se detectan en el 0,31% de los casos. Se sostiene que la biopsia hepática es el método diagnóstico de referencia de la fibrosis hepática, pero es una herramienta imperfecta, que debe reservarse para aquellos pacientes en los que los métodos incruentos no permitan definir la gravedad de la enfermedad y en los que sus resultados condicionen la decisión terapéutica; también puede proporcionar información relevante cuando exista la posibilidad de una enfermedad concomitante que pueda condicionar el diagnóstico y/o el tratamiento del paciente.

## Pruebas no invasivas

Un área de investigación especialmente activa en los últimos años, ha sido intentar aumentar la sensibilidad y el poder discriminatorio de las pruebas no invasivas para evaluar la fibrosis hepática. Los índices o biomarcadores séricos son meros indicadores indirectos de la fibrosis; en la actualidad, disponemos de tests fiables para discriminar entre los pacientes con un grado mínimo de fibrosis y los que tienen cirrosis, pero que no distinguen con claridad fases intermedias en la progresión de la enfermedad (Myers et al, 2003; Kellegher et al, 2005; Nunes et al, 2005; Sterling et al, 2006; Wilson et al, 2006). Algunas pruebas se han popularizado en el marco de ensayos comerciales -por ejemplo, el HCV FibroSURE™ (Laboratory Corporation of America Holdings, Burlington, NC, USA)-, mientras que otras se basan en parámetros analíticos que se obtienen rutinariamente en las personas infectadas por el VIH (FIB-4: edad, GPT, GOT y recuento de plaquetas; APRI: GOT-plaquetas Ratio Index; HEPAScore: bilirrubina, GGT, hialourónico,  $\alpha$ -2, macroglobulina, edad, sexo; FIBROMETER: plaquetas, protrombina, hialourónico,  $\alpha$ -2, macroglobulina, edad, GOT, urea). Una técnica no invasiva particularmente destacable es la elastografía transitoria (FibroScan®, Echosens, París, Francia), que proporciona mediciones de la rigidez hepática como expresión del grado de fibrosis (de Ledinghen et al, 2006). Con la elastografía se explora un volumen hepático 500 veces superior al analizado en la biopsia hepática y es un técnica sencilla, con

elevada reproducibilidad; en diversos estudios realizados en pacientes coinfectados VIH-VHC, se ha corroborado el notable rendimiento de esta técnica para el diagnóstico de cirrosis (de Ledinghen et al, 2006; Vergara et al, 2007); valores superiores a 11,8 kPa ó 14,6 kPa se han asociado a la presencia de cirrosis en más del 80% de los pacientes. La capacidad de la elastografía para discriminar entre pacientes con y sin fibrosis significativa parece más limitada (de Ledinghen et al, 2006; Vergara et al, 2007), aunque se ha señalado que una elasticidad inferior a 6 kPa permite descartar la presencia de fibrosis significativa con un valor predictivo del 90% (Macías et al, 2008). La utilidad de diferentes combinaciones de biomarcadores séricos entre sí y con el FibroScan® para establecer el diagnóstico y la progresión de la fibrosis, aún no se ha determinado definitivamente (Manning y Afdhal, 2008, Sánchez-Conde et al, 2010).

## Manifestaciones extrahepáticas

Cuando existe una sospecha clínica que requiere la detección o la exclusión de manifestaciones extrahepáticas como vasculitis, glomerulonefritis y/o crioglobulinemia sistémica, es necesario efectuar pruebas específicas como biopsia de piel, análisis de orina, biopsia renal y/o detección de crioglobulinas séricas.

## Enfermedades autoinmunes

Las recomendaciones para realizar análisis de autoanticuerpos con el fin de descartar enfermedades autoinmunes no se han establecido de forma concluyente, ya que sus resultados son difíciles de interpretar, y más del 60% de los pacientes con hepatitis C tienen autoanticuerpos como ANA, RF, anticardiolipina, SMA o LKM1, como expresión de un fenómeno autoinmune sin relevancia clínica. Si los títulos de dichos autoanticuerpos se elevan o aparecen por primera vez durante el tratamiento con interferón, la terapia no debería interrumpirse, así que la necesidad de realizar tests rutinarios para detectar autoanticuerpos es discutible. La excepción la constituyen los anticuerpos LKM1, cuya determinación es imperativa antes de comenzar el tratamiento con interferón, con objeto de excluir una

hepatitis autoinmune. Los pacientes con resultados positivos deberían monitorizarse estrechamente, para detectar precozmente cualquier deterioro de la función hepática durante la terapia con interferón, como hallazgo sugestivo de hepatitis autoinmune activa; si empeora la función hepática el tratamiento debería interrumpirse; la necesidad de fármacos inmunosupresores debe valorarse de forma individualizada.

## Enfermedad tiroidea

Antes de comenzar el tratamiento farmacológico de la hepatitis C se deben controlar los niveles de TSH para descartar una disfunción de la glándula tiroides. Si la función tiroidea es normal, sería suficiente con investigar los niveles de la hormona a intervalos de 12 semanas. En los casos de hipotiroidismo se recomienda emplear levotiroxina, y para el hipertiroidismo es importante aplicar tratamiento específico antes de comenzar la terapia. Una vez controlada la disfunción tiroidea, puede iniciarse la administración de interferón, siempre bajo un estricto control mensual de la TSH. Cerca de un 5% de los pacientes desarrollan una disfunción tiroidea durante el tratamiento con interferón, que generalmente se manifiesta en los tres primeros meses de terapia; en caso de inducción de hipotiroidismo habitualmente es posible mantener el interferón en combinación con la levotiroxina; por el contrario, si se provoca un hipertiroidismo, muchos autores sugieren interrumpir de inmediato el tratamiento con interferón, aunque en algunos casos concretos se pudiese continuar; en la mayoría de los pacientes dicha disfunción tiroidea se resuelve al suspender el interferón, pero cada caso debe evaluarse de forma individualizada.

Más del 12% de los pacientes con hepatitis C tienen autoanticuerpos tiroideos antes de iniciar el tratamiento con interferón (anticuerpos anti-tiroperoxidasa, anti-tiroglobulina y anti-receptores de TSH). En estos pacientes, el riesgo de deterioro de la función tiroidea al administrarles interferón es sensiblemente mayor. El despistaje previo a la terapia con interferón de dichos anticuerpos sería deseable en todos los infectados, pero es imperativo en aquéllos que presenten niveles anormales de TSH, para disponer de valores basales que permitan interpretar adecuadamente los controles posteriores.

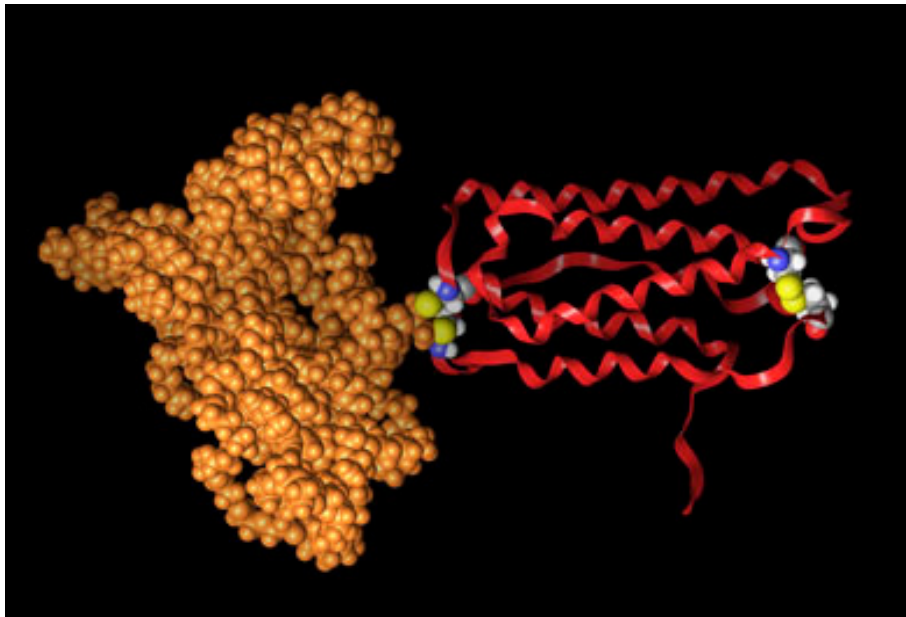
## 1.1.5. Tratamiento

El objetivo de la terapia anti-VHC en los individuos coinfectados es el mismo que en los mono infectados, eliminar el virus; su éxito se define como Respuesta Viroológica Sostenida (RVS) y se confirma cuando no se detecta ARN viral en plasma a los 6 meses de finalizado el tratamiento. Las tasas de RVS son inferiores en los pacientes coinfectados (Perronne et al, 2002; Chung et al, 2004; Perronne et al, 2004; Torriani et al, 2004); en estos pacientes, la RVS se traduce en reducción de la fibrosis y mejoría histológica, lo que reduce la posibilidad de desarrollar una enfermedad hepática terminal y/o un hepatocarcinoma (Barreiro et al, 2006).

El tratamiento de elección en los pacientes coinfectados consiste, al igual que en los mono infectados, en la combinación de interferón pegilado (PEG-IFN) (Figura 4) y ribavirina (Panel de expertos de Gesida, SPNS y AEEH, 2010), con porcentajes de RVS que oscilan entre el 27 y el 44% (Carrat et al, 2004; Chung et al, 2004; Laguno et al, 2004a; Torriani et al, 2004). Hasta la fecha se han comercializado dos tipos de PEG-IFN, el  $\alpha$ -2a y el  $\alpha$ -2b, definidos por el tipo de pegilación de la molécula, que les confiere características farmacocinéticas distintas.

Las dosis de PEG-IFN son similares a las que se administran en los pacientes mono infectados (PEG-IFN  $\alpha$ -2a = 180  $\mu$ g/semanales; PEG-IFN  $\alpha$ -2b = 1-1,5  $\mu$ g/kg/semanales). En los primeros ensayos clínicos publicados, la ribavirina se administraba a una dosis fija de 800 mg al día, fundamentalmente para evitar la aparición de anemia; sin embargo, los escasos resultados en términos de RVS (18%) obtenidos en pacientes con VHC genotipo 1 y las elevadas viremias observadas en el estudio APRICOT, constituyeron el principal argumento para señalar que esta dosis podía ser insuficiente (Torriani et al, 2004). En estudios posteriores se demostró que se pueden prescribir dosis mayores, mejorando significativamente las tasas de RVS (Álvarez et al, 2006). En la actualidad se recomienda establecer la dosis de ribavirina en función del peso del paciente, independientemente del genotipo viral; 1000 mg/día para los de menos de 75 kg y 1200 mg/día para los que pesan más de 75 kg, repartidos en dos dosis (Hadziyannis et al, 2004; Soriano et al, 2007, European AIDS Clinical Society, 2011).

- **Figura 4.** Molécula de interferón pegilado, que se obtiene mediante la unión fisicoquímica de polietilenglicol a una proteína, el interferón alfa recombinante



## Candidatos para el tratamiento anti-VHC

La coinfección VIH-VHC ha suscitado cambios de estrategia en el manejo de la hepatitis crónica por VHC, promoviendo actitudes más intervencionistas condicionadas por la mayor velocidad de progresión del daño hepático en los coinfectados (Benhamou et al, 1999; Martínez-Sierra et al, 2003; Martín-Carbonero et al, 2004). En consecuencia, todos los pacientes coinfectados deben considerarse potenciales candidatos para recibir tratamiento anti-VHC de forma precoz, ya que la mayoría son jóvenes y la tasa de respuesta empeora a medida que avanza la fibrosis hepática (Soriano et al, 2003). El principal factor predictivo de estadios avanzados de fibrosis es el tiempo estimado de evolución de la infección por VHC (Martín-Carbonero et al, 2004). Se calcula que la mitad de los pacientes desarrollarán fibrosis a los 25 años de la primera exposición al VHC. Si consideramos que la edad media de los coinfectados es de unos 40 años, que la mayoría tienen antecedentes de adicción a drogas por vía parenteral y que iniciaron esta práctica a los 18-20 años, es de esperar que muchos de ellos presenten grados avanzados de fibrosis

hepática (Martín-Carbonero et al, 2004); en este sentido, en nuestro entorno se confirmó que casi la mitad de los pacientes coinfectados ya tienen precirrosis o cirrosis en el momento de efectuar la biopsia hepática. En consecuencia, si no se aplica un tratamiento anti-VHC temprano y eficaz, probablemente en los próximos años se registrará un aumento de las complicaciones hepáticas en los pacientes coinfectados.

- *Criterios de tratamiento dependientes de las características de la infección por el VHC*

El genotipo y la carga viral, son los principales factores predictores de éxito del tratamiento anti-VHC. La tasa de respuesta viral sostenida en los pacientes con genotipo 3 es del 44-73%, mientras que en el genotipo 1 es del 17-39%. El 34-61% de los pacientes con carga viral baja responden al tratamiento, frente al 25-33% de los que tienen una carga del VHC elevada. Combinando ambos factores, en aquellos pacientes con genotipo 1 y carga viral elevada, la tasa de respuesta no supera el 18% (Carrat et al, 2004; Chung et al, 2004; Torriani et al, 2004; Núñez et al, 2007).

- *Criterios de tratamiento dependientes de la infección por el VIH*

La respuesta al tratamiento se correlaciona con el recuento de linfocitos T CD4+, posiblemente como reflejo de una mejor preservación del sistema inmune. Por lo tanto, en pacientes que no han recibido tratamiento antirretroviral, es aconsejable tratar la hepatitis C cuando los recuentos linfocitarios son altos y no esperar a estadios de inmunosupresión más avanzados (Soriano et al, 2004a). De forma arbitraria, se ha establecido la cifra de 350 cels/ $\mu$ l como el umbral mínimo aconsejable para iniciar el tratamiento anti-VHC. Sin embargo, en pacientes con recuentos de linfocitos T CD4+ entre 200 y 350 cels/ $\mu$ l que ya han recibido TARGA durante un tiempo prolongado y muestran una adecuada supresión de la replicación del VIH, también debe valorarse el tratamiento de la hepatitis C. En esta situación, la decisión sobre iniciar o no la terapia debe individualizarse, teniendo en cuenta factores como la tasa de respuesta viral sostenida estimada, el tiempo de tratamiento, la severidad de la enfermedad hepática y el riesgo de progresión, entre otros (Soriano et al, 2004a). Por todo ello, en general debe evitarse el tratamiento de los pacientes con recuentos de linfocitos T CD4+ <200 cels/ $\mu$ l.

No se ha demostrado una relación directa entre la carga viral del VIH y la probabilidad de respuesta favorable al tratamiento de la hepatitis C. En consecuencia, la concentración plasmática del VIH no se considera un factor primordial al valorar la indicación de tratamiento de la infección crónica por VHC,

siempre y cuando el paciente reciba regularmente tratamiento antirretroviral, en los casos en los que esté indicado.

- *Contraindicaciones para el tratamiento de la infección crónica por el VHC en pacientes coinfectados VIH-VHC*

Las principales contraindicaciones para recibir tratamiento de la infección crónica por el VHC son:

- Síndrome depresivo no controlado. La depresión leve-moderada puede ser una limitación eludible, siempre que el paciente sea evaluado de forma adecuada y si es preciso reciba tratamiento antidepresivo.
- Dependencia de alcohol o de otras sustancias de abuso.
- Trasplante renal, cardíaco o pulmonar.
- Enfermedades de etiología autoinmune que puedan exacerbarse con la administración de interferón (como la hepatitis autoinmune).
- Hipertiroidismo no tratado.
- Embarazo, lactancia e incapacidad para cumplir con una contracepción adecuada.
- Cirrosis hepática descompensada.
- Comorbilidades graves o mal controladas como hipertensión, insuficiencia cardíaca, cardiopatía isquémica o enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
- Hipersensibilidad conocida al interferón o la ribavirina.
- Presencia o antecedente de trastorno psiquiátrico grave, ya que el interferón puede exacerbar el proceso.

## Inicio del tratamiento

En pacientes *naive* para antirretrovirales y sin criterios para recibir tratamiento anti-VIH (CD4 >350 cels/ $\mu$ l y carga viral del VIH <50.000 copias/ml), está indicado tratar primero la hepatitis C crónica, con la ventaja de que la respuesta será mejor con un sistema inmune relativamente preservado, evitando además las interacciones potenciales entre la ribavirina y los antirretrovirales (Soriano et al, 2004a). Se puede plantear cierta controversia sobre la conveniencia de iniciar el tratamiento anti-VIH antes que el

anti-VHC en los coinfectados con linfocitos T CD4+ >350 cels/ $\mu$ l y carga viral del VIH >50.000 copias/ml; en este sentido, se ha señalado que la tolerancia a los antirretrovirales mejora si se trata la hepatitis C antes de iniciar la TARGA (Uberti-Foppa et al, 2003).

## Biopsia hepática

Como ya se ha comentado previamente, la biopsia hepática proporciona una información valiosa, ya que permite determinar el grado de fibrosis y descartar otras causas concurrentes de hepatopatía. Conociendo el estadio de la enfermedad hepática y el tiempo aproximado de infección, se puede hacer una estimación del tiempo que ha de transcurrir hasta el desarrollo de una disfunción hepática terminal. En consecuencia, la biopsia puede ayudar a decidir de forma individualizada la idoneidad de prescribir tratamiento anti-VHC, en función de la edad del paciente y del grado de daño hepático. Los clínicos que defienden realizar una biopsia hepática antes de iniciar el tratamiento para la hepatitis crónica C en pacientes coinfectados, argumentan que los efectos secundarios del interferón y la ribavirina, junto con las interacciones potenciales con los antirretrovirales y la eficacia limitada de los actuales tratamientos en este colectivo, obligan a seleccionar muy bien a los candidatos.

Sin embargo, la agresividad de la biopsia y la cuestionabilidad del resultado cuando no se dispone de fragmentos de tejido mayores de 25 mm, han puesto en entredicho su utilidad. Al disponer de nuevos marcadores serológicos, de alternativas no invasivas como el FibroScan® y de nuevas formulaciones de IFN más eficaces, la tendencia actual -especialmente en los casos de coinfección- es prescindir de la información histológica que proporciona la biopsia para tomar decisiones sobre la idoneidad de iniciar el tratamiento anti-VHC (Soriano et al, 2003; Lacombe y Rockstroh, 2012). En los pacientes coinfectados, la evidencia de progresión de la fibrosis hepática de estadios iniciales a avanzados en un período de tres años, así como la escasa utilidad de la biopsia para tomar decisiones en relación al inicio del tratamiento anti-VHC, no justifican fundamentar la estrategia terapéutica en los hallazgos de una única biopsia (Quereda et al, 2004; Sulkowski et al, 2005b); en este sentido, incluso suponiendo que con grados mínimos de fibrosis puede resultar innecesario el tratamiento anti-VHC, a estos pacientes se les debería realizar una nueva biopsia cada 3 años, con el consiguiente aumento de costes y de riesgos inherentes a esta prueba invasiva. La relevancia de la biopsia resulta todavía más discutible en los

pacientes con altas probabilidades de respuesta viral sostenida, como ocurre con los que tienen genotipo 2, 3 o 1 con carga viral baja. Por último, la presencia de cirrosis en la biopsia hepática no contraindica el tratamiento de la infección por el VHC, registrándose porcentajes de curación del 28-29% (Torriani et al, 2004), si bien la cirrosis con grados B o C de Child-Pugh constituye una contraindicación absoluta para el tratamiento del VHC, ya que conlleva un notable incremento de la mortalidad (Maus et al, 2004).

## Factores pronóstico basales de la respuesta a la terapia

Al igual que en el colectivo de pacientes mono infectados por el VHC, los factores principales que se asocian a una respuesta viral sostenida en los coinfectados están relacionados con la viremia VHC (se considera alta  $>400.000$  UI/ml) y con el genotipo viral (2 y 3 mejor que el 1). Se han descrito otros agentes que, en menor medida, también pueden condicionar el éxito de la terapia, y que se agrupan en tres categorías:

- **Huésped:** la edad (mejor en jóvenes), la raza (peor la raza negra), el índice de masa corporal (mejor si es bajo), los antecedentes de abuso de polisustancias (peores resultados) y las enfermedades psiquiátricas (pueden agravarse en el curso del tratamiento de la hepatitis). Algunos autores han sugerido que el sexo también podría representar un factor condicionante de la adherencia al tratamiento, ya que observaron que las mujeres presentaban en mayor medida y de forma más temprana, efectos adversos que obligaban a suspender o a modificar las dosis de terapia combinada, comprometiendo su eficacia (Bhattacharya et al, 2010). Recientemente se ha prestado una especial atención al impacto negativo de la resistencia a la insulina en el éxito de la terapia combinada (Romero-Gómez et al, 2005; Nasta et al, 2010); esta resistencia es bastante prevalente en los pacientes coinfectados, en parte como un efecto indeseable de determinados antirretrovirales (Dubé, 2000; Garcia-Benayas et al, 2006), por lo que su prevención y/o un manejo adecuado podrían contribuir a mejorar los resultados de la terapia anti-VHC (Ratzu et al, 2006).
- **Estadio de la infección por VHC:** se evalúa en base a los niveles de transaminasas, al grado de fibrosis hepática, la presencia de esteatosis y la coexistencia de hepatopatías de otro origen.

- Tratamiento: ajustando la dosis óptima de interferón pegilado y de ribavirina, la duración adecuada, y especialmente manteniendo una buena adherencia. La regla de “80/80/80” es válida, al igual que en los mono infectados, ya que se ha observado que los pacientes con genotipo 1 del VHC, que en el curso del tratamiento reciben un 80% de la dosis total prescrita de interferón y de RBV, durante al menos el 80% del tiempo indicado, presentan una tasa de respuesta superior a la observada en los enfermos que reciben una dosis total inferior o durante menos tiempo (McHutchison et al, 2002).

Así mismo, los resultados serán mejores en función de algunas variables relativas al VIH, como el recuento elevado de linfocitos CD4 o una viremia VIH baja (Opravil et al, 2008), aunque ésto podría únicamente reflejar una mejor tolerancia a la medicación anti-VHC en esta categoría de pacientes (Bani-Sadr et al, 2005). El tipo de antirretroviral también puede condicionar el éxito de la terapia, y en este sentido se ha señalado que los pacientes tratados con nevirapina responden mejor al tratamiento combinado anti-VHC que los que reciben lopinavir/ritonavir; para explicar este hallazgo, se ha sugerido que la nevirapina suprime la expresión del receptor TNF-alfa mejor que otros antirretrovirales, lo que podría reducir la secreción de TGF-beta -un estimulador de la replicación del VHC- y en consecuencia reducir la carga viral VHC (Mira et al, 2010), si bien no existe una opinión consensuada en torno a estos hallazgos.

## **Monitorización de la respuesta virológica**

La monitorización de los niveles de ARN-VHC durante el tratamiento, favorece la toma de decisiones en cuanto a su interrupción ante la falta de eficacia y para establecer su duración. El ARN-VHC debe determinarse en el momento basal, en las semanas 4, 12 y 24, al final del tratamiento y 6 meses más tarde. En aquellos pacientes con viremia indetectable en la semana 4, podría diferirse el siguiente control hasta el final del tratamiento, excepto si se confirma un aumento de los niveles de transaminasas en el período intermedio. La determinación debe ser cuantitativa en el momento basal y en la semana 12, pero puede ser de carácter cualitativo en las semanas 4 y 24, al final del tratamiento y en el control de los 6 meses post-tratamiento.

La cinética de la carga viral del VHC en respuesta a la terapia combinada, es un indicador fiable de la eficacia del tratamiento; una respuesta rápida permite seleccionar a los pacientes sensibles y

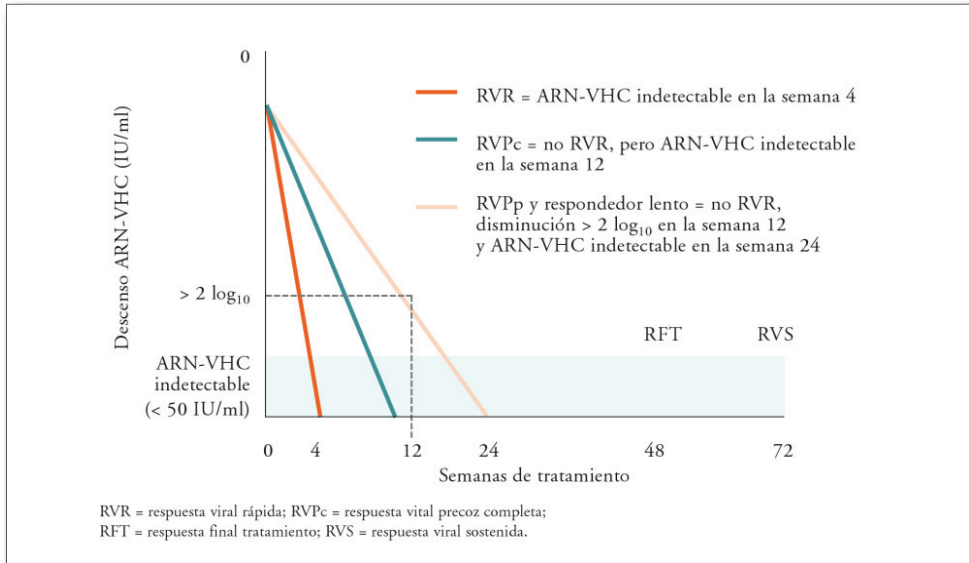
refractarios a la terapia. Cerca del 20% de los mono infectados no muestran una reducción significativa de la viremia (definida por un descenso  $>2$  log IU/ml) durante el primer mes de tratamiento con PEG-IFN y ribavirina (Fried et al, 2002), mientras que en los coinfectados ésta alcanza el 30% (Ramos et al, 2007).

La respuesta virológica rápida (RVR) se define como un test cualitativo de carga viral negativo ( $<50$  UI/ml) a las 4 semanas de tratamiento (Figura 5). La importancia de la RVR radica en su alto valor predictivo positivo (82-94%), de tal manera que los pacientes con RVR tienen una elevada probabilidad de curación (Davis, 2002; Núñez et al, 2007). La consecución de una RVR podría ser de especial utilidad en algunos grupos de coinfectados; en este sentido, en un estudio realizado en pacientes coinfectados con genotipo VHC 3 tratados durante 24 semanas, se comprobó que el principal predictor de una RVS era conseguir una RVR, lo que además permitiría acortar la duración del tratamiento (Crespo et al, 2007a).

Se considera respuesta virológica precoz (RVP) a un test cualitativo de carga viral del VHC negativo en la semana 12 de tratamiento o a una disminución  $>2$  log IU/ml de la carga viral entre la determinación basal y la de la semana 12 (Figura 5). La no obtención de una RVP, tiene un alto valor predictivo negativo (98-100%) y los pacientes que no la alcanzan deben abandonar el tratamiento, dadas las posibilidades prácticamente nulas de curación, considerándose respondedores nulos o no-respondedores verdaderos (Davis, 2002; Ballesteros et al, 2004; Carrat et al, 2004; Chung et al, 2004; Laguno et al, 2004a; Moreno et al, 2004; Soriano et al, 2004b; Torriani et al, 2004; Núñez et al, 2007; Payan et al, 2007). Aunque aún existen algunas discrepancias terminológicas, muchos autores consideran la RVP como completa (RVPc) cuando la carga en la semana 12 es indetectable, o parcial (RVPp) cuando a pesar de haber alcanzado una disminución de al menos 2 log IU/ml, no se logra la negativización hasta la semana 24. En algunas publicaciones, los pacientes con RVPp se denominan también respondedores lentos.

Una respuesta viral al final del tratamiento (RVF) implica que el paciente presenta un test cualitativo de ARN-VHC negativo ( $<50$  UI/ml) en el momento de terminar la administración de la medicación anti-VHC, mientras que la respuesta virológica sostenida (RVS) exige un test cualitativo negativo a las 24 semanas de finalizar el tratamiento (Figura 5).

► **Figura 5.** Patrones de respuesta viral al tratamiento anti-VHC



Tomado de Guarnier y Enríquez, 2008

## Duración del tratamiento

No existe un criterio unánime sobre la duración óptima del tratamiento anti-VHC. En base a la información derivada de ensayos aleatorios, la propuesta sería tratar a todos los pacientes durante 48 semanas, independientemente de su genotipo (Carrat et al, 2004; Chung et al, 2004; Soriano et al, 2004a; Torriani et al, 2004; Núñez et al, 2007). Sin embargo, las investigaciones fundamentadas en estudios no aleatorios, sugieren acortar el tratamiento a 24 semanas en los pacientes con genotipos 2 y 3, con carga viral baja y que consigan una RVR (Crespo et al, 2007a). Esta reducción del tiempo de tratamiento minimizaría la aparición de toxicidades y abarataría costes. Así mismo, también se ha propuesto alargar las pautas de tratamiento a 60-72 semanas en pacientes que no consigan una RVR pero sí una RVP, especialmente con genotipos 1 y 4, y viremias basales elevadas (Berg et al, 2006; Sánchez-Tapias et al, 2006; Soriano et al, 2006a; Soriano et al, 2007; Barreiro et al, 2010). Por el momento, no existen argumentos para recomendar la prolongación del tratamiento en los pacientes sin RVP o en los que sí la

presentan pero mantienen la carga viral detectable en la semana 24 (ausencia de RVR), dado que en estos casos es prácticamente nula la posibilidad de obtener una respuesta tardía favorable.

## Interacciones y efectos adversos

### Interacciones

Los pacientes coinfectados requieren una monitorización exhaustiva durante el tratamiento. Las cifras de abandono y toxicidades relacionadas con la terapia en los primeros estudios fueron muy elevadas (ej: 35% en el ensayo RIBAVIC) (Carrat et al, 2004), posiblemente debido a la falta de experiencia previa en el manejo de los efectos secundarios en el contexto de la coinfección VIH-VHC.

- *Ribavirina y didanosina*

En estudios efectuados in vitro, se ha demostrado que la ribavirina incrementa los niveles del metabolito activo de la didanosina -dideoxyadenosina 5'-trifosfato (ddATP)-, lo que podría exacerbar la toxicidad relacionada con la didanosina, provocando pancreatitis, acidosis láctica, fallo hepático y neuropatía periférica. Se han descrito casos de toxicidad mitocondrial hasta en un 5% de los pacientes tratados simultáneamente con ribavirina y didanosina (Lafeuillade y Chapadaud, 2001; Fleisher et al, 2004).

- *Ribavirina y estavudina*

A pesar de que no existe información concisa sobre interacciones entre estos dos medicamentos, algunos efectos adversos detectados en ensayos clínicos, apuntan a que los efectos secundarios y toxicidad propios de la estavudina (d4T), como acidosis láctica, neuropatía periférica severa y pérdida de peso significativa, podrían exacerbarse con la administración concomitante de ribavirina (Perronne, 2002; Pérez-Olmeda et al, 2003; Moreno et al, 2004).

- *Ribavirina, interferón y zidovudina*

El interferón induce anemia por un mecanismo de supresión medular, al igual que la zidovudina (Dieterich y Spivak, 2003), mientras que la ribavirina la ocasiona por vía hemolítica (Dusheiko et al, 1996; Bodenheimer et al, 1997; Dieterich, 2002). La combinación de estos medicamentos aumenta el riesgo de

anemia, ya que la mielosupresión dificulta la compensación de la pérdida de eritrocitos (Braü et al, 2004; Moreno et al, 2004; Alvarez et al, 2006).

- *Interferón y análogos de nucleósidos*

Aunque la investigación sobre las interacciones entre los agentes antirretrovirales y la terapia para la hepatitis C se concentró inicialmente en la ribavirina, el interferón también podría estar implicado, ya que éste puede alterar la regulación de la fosforilación de los análogos de nucleósidos y nucleótidos vía activación celular (Anderson et al, 2004).

## Efectos adversos

Los efectos secundarios del interferón y la ribavirina aparecen con mayor frecuencia y severidad en las personas coinfectadas que en las mono infectadas, y en ocasiones los medicamentos empleados para solventar estas complicaciones pueden provocar nuevas toxicidades.

- *Depresión*

La depresión es común entre los pacientes VIH+, con una prevalencia que oscila entre el 20 y el 80% (Tate et al, 2003; Valente, 2003). También constituye un efecto secundario atribuible al interferón, habiéndose descrito incluso intentos de suicidio (Koskinas et al, 2002; Kraus et al, 2002; Kraus et al, 2003). Algunos autores han sugerido la administración preventiva de fármacos antidepressivos, para evitar que la aparición de esta complicación pueda obligar a interrumpir la terapia anti-VHC (Laguno et al, 2004b; Myers et al, 2004).

- *Anemia*

Se detecta en el 30% de los pacientes VIH+ asintomáticos y en el 75-80% de los incluidos en el estadio SIDA (Levine et al, 2001). Si la anemia no se trata o no responde al tratamiento, se acelera la progresión de la enfermedad (Semba et al, 2002; Sullivan, 2002; Diallo et al, 2003; Lundgren y Mocroft, 2003). Es más prevalente entre las mujeres VIH+ y el riesgo de desarrollarla aumenta entre los afro-americanos, con la edad, la administración de zidovudina y un recuento de CD4 <200 cels/ $\mu$ l (Sullivan et al, 1998; Levine et al, 2001; Semba et al, 2002; Volberding et al, 2004). La eritropoyetina humana

recombinante se ha utilizado con éxito para el tratamiento de la anemia severa en los pacientes HIV+, mejorando su calidad y expectativa de vida (Sulkowski et al, 2005a).

El interferón puede provocar anemia por supresión medular y la anemia hemolítica es un efecto secundario habitual de la ribavirina, aunque generalmente reversible (Dieterich, 2002; Dieterich y Spivak, 2003). La ribavirina produce anemia con mayor frecuencia en los pacientes coinfectados VIH-VHC que en los monoinfectados VIH+ (Dieterich, 1999) y el riesgo aumenta con dosis elevadas (Chang et al, 2002). Aunque la reducción de la dosis puede disminuir su eficacia (Sulkowski y Thomas, 2003), se aconseja un reajuste escalonado de la dosis de ribavirina cuando los niveles de hemoglobina son  $\leq 10$  mg/dl e interrumpir la administración del fármaco cuando no alcanzan 8,5 mg/dl (Del Río et al, 2006).

Aunque existen pocas evidencias en pacientes coinfectados, el uso de factores estimulantes de la eritropoyesis (eritropoyetina y darbopoetina) permite mantener las dosis de peginterferón y ribavirina (Sulkowski et al, 2005a); por el momento, el análisis del impacto de su uso sobre la respuesta final del tratamiento ha ofrecido resultados discordantes (Younossi et al, 2008). También se recomienda considerar el grado de riesgo cardiovascular y la repercusión clínica de la anemia en el momento de plantear la necesidad de administrar dichos factores.

Finalmente, como ya se ha señalado con anterioridad, en los pacientes coinfectados VIH-VHC debe evitarse el uso conjunto de peginterferón y zidovudina para prevenir un mayor riesgo de aparición de anemia severa.

- *Neutropenia*

La neutropenia es frecuente en estadios avanzados de la infección por VIH, y algunos autores sugieren que incrementa significativamente el riesgo de infecciones bacterianas (Kuritzkes, 2000). En varios estudios se ha señalado que el factor estimulante de colonias granulopoyéticas es un tratamiento eficaz para combatir la neutropenia en estos pacientes (Mitsuyasu, 1999; Kuritzkes, 2000).

El interferón induce neutropenia, principalmente el interferón pegilado (Manns et al, 2001; Fried, 2002) y ésta es habitualmente más prevalente en las personas coinfectadas (42%) que en la monoinfección por VHC (18-20%) (Manns et al, 2001; Fried, 2002; Slim et al, 2003). Ante un recuento de neutrófilos  $< 750$  cels/ml, se aconseja reducir la dosis de peginterferón. La reducción de la dosis de

interferón ha demostrado su eficacia para revertir la neutropenia en sólo 2 semanas (Golie et al, 2003), pero podría comprometer la respuesta a la terapia anti-VHC. El interferón pegilado puede provocar además un descenso en el recuento de linfocitos T CD4+, que puede exigir la prescripción de profilaxis para prevenir infecciones oportunistas, aunque generalmente la distribución de los linfocitos se mantiene a pesar de la disminución en números absolutos.

- *Trombocitopenia*

La trombocitopenia es una complicación común en la infección por VIH, con una prevalencia estimada del 5-7%, que aumenta ostensiblemente en estadios avanzados de la enfermedad (Scaradavou, 2002). También se ha asociado a la infección por VHC, especialmente en pacientes con enfermedad hepática avanzada (Pockros et al, 2002; Ramos-Casals et al, 2003).

El interferón se ha utilizado para tratar la trombocitopenia inducida por el VHC, aunque el propio medicamento también la puede provocar, particularmente el interferón pegilado (Fried, 2002). Si el descenso de plaquetas es muy acusado -por debajo de  $90 \times 10^3$  plaquetas/ml- puede obligar a una modificación de la dosis de interferón e incluso a la interrupción del tratamiento.

- *Hemoglobinuria*

La hemoglobinuria es un efecto secundario poco común de la ribavirina (Massoud et al, 2003; Diamond, 2004), cuya aparición obliga a monitorizar los niveles de hemoglobina.

- *Pérdida de peso*

Es un problema especialmente relevante entre los pacientes VIH+ en la era TARGA (Wanke et al, 2000), ya que un descenso en el peso del 5-10% conlleva un incremento significativo del riesgo de padecer enfermedades oportunistas y de muerte (Wheeler et al, 1998; Wheeler, 1999; Williams et al, 1999).

Entre los efectos secundarios habituales del interferón se incluyen las náuseas, los vómitos, la anorexia y la pérdida peso (Zeuzem et al, 2000; Lindsay et al, 2001; Manns et al, 2001; Fried, 2002; Pérez-Olmeda et al, 2003; Pomova et al, 2003; Moreno et al, 2004). Es importante mantener un

seguimiento cuidadoso del peso y si se registra un descenso significativo proporcionar consejo dietético a los pacientes y/o prescribirles antieméticos o dronabinol.

- *Neuropatía óptica*

Es un efecto secundario poco común del interferón pegilado que puede causar ceguera selectiva para el color o la pérdida completa de la visión (Farel et al, 2004). En la mayoría de los casos el daño es reversible, pero en algunos exige la interrupción temporal o incluso definitiva del fármaco para prevenir la pérdida de visión.

- *Monitorización de efectos adversos*

Se recomienda la realización de un hemograma basal, las semanas 2 y 4 de tratamiento, y posteriormente cada 4 semanas. Las variaciones en el recuento de linfocitos T CD4+ se producen generalmente durante las primeras 12 semanas y después éste suele estabilizarse. A pesar de estos cambios analíticos, la aparición de infecciones oportunistas es infrecuente. Se propone la valoración de los niveles de CD4 cada mes y de la carga viral del VIH trimestralmente. Por el contrario, no se recomienda la determinación seriada de ácido láctico o ADN mitocondrial durante el tratamiento con peginterferón y ribavirina (Brau et al, 2004). Hasta en un 12% de los pacientes se detectan alteraciones de la función tiroidea, por lo que también se aconseja la determinación trimestral de los niveles de TSH.

## Eficacia terapéutica y seguimiento

En los pacientes con hepatitis crónica por virus C a los que se administra interferón y ribavirina, las tasas de respuesta temprana y al final del tratamiento son inferiores en presencia de infección por VIH, incluso cuando se prescribe interferón pegilado. En conjunto, la respuesta sostenida es del orden del 20-40%, lo que supone aproximadamente la mitad de la que se obtiene en pacientes mono infectados por VHC. Además, las recidivas también son más frecuentes (Soriano, 2004).

La planificación del seguimiento de los pacientes que han recibido tratamiento farmacológico anti-VHC está condicionada por el tipo de respuesta obtenida. En los no respondedores hay que efectuar un control periódico con el fin de evaluar el grado de progresión de la enfermedad hepática, valorando la necesidad y las probabilidades de éxito de un retratamiento, así como el grado de fibrosis mediante

técnicas no invasivas y, en caso de fibrosis avanzada, someterse a técnicas específicas para la detección precoz del carcinoma hepatocelular. En los respondedores sostenidos se ha demostrado la persistencia de la respuesta viral persistente a lo largo de los años y la mejoría de la fibrosis hepática. Sin embargo, no se puede descartar la aparición de carcinoma hepatocelular en los pacientes cirróticos que han respondido al tratamiento, por lo que en este grupo se considera necesario el control periódico con ultrasonografía y analíticas semestrales (George et al, 2008).

## **Tratamiento de las recaídas y de los no respondedores**

Existe un número creciente de pacientes coinfectados que ya han sido tratados con interferón sin obtener una respuesta viral sostenida. Por tratarse de un colectivo tan heterogéneo, los tratamientos deben planificarse de manera individualizada.

Los pacientes que recibieron un tratamiento inadecuado (duración y/o dosis de ribavirina insuficientes, monoterapia con interferón estándar, etc.), los que abandonaron prematuramente la medicación debido a sus efectos secundarios y los que no siguieron correctamente las pautas de tratamiento, no se consideran fracasos de la terapia. Estos pacientes pueden recibir retratamiento con las pautas recomendadas en la actualidad. Las tasas de respuesta viral sostenida suelen ser aceptables, pero inferiores a las alcanzadas por los pacientes que no han recibido tratamiento previamente (Myers et al, 2004). Las posibilidades de conseguir una respuesta viral sostenida serán mayores cuanto menor eficacia haya tenido el tratamiento previo (Shiffman et al, 2004). La respuesta al retratamiento con terapia combinada es más favorable en los pacientes con recaídas que en los no respondedores.

Se consideran no respondedores los pacientes con una buena adherencia al tratamiento y una pauta adecuada de peginterferón-ribavirina que no consiguen una carga viral VHC indetectable en la semana 24 o una respuesta viral sostenida. Las recaídas se producen en pacientes que vuelven a tener cargas virales detectables una vez que finalizan un ciclo completo de tratamiento adecuado. El incremento de la duración de la terapia o el empleo de dosis mayores podrían aumentar ligeramente las tasas de respuesta (Moucari et al, 2006), aunque el porcentaje no suele superar el 20%.

Cuando no se consigue el aclaramiento completo del VHC, el objetivo que se persigue es detener o ralentizar la progresión de la hepatopatía. La fibrosis hepática mejora en el 35-43% de los pacientes

independientemente de que no consigan una respuesta viral sostenida (Chung et al, 2004; Lissen et al, 2006). Se ha sugerido que los pacientes coinfectados podrían beneficiarse de los supuestos efectos antifibróticos del interferón (Soriano et al, 2006b), lo que justificaría la prolongación de la terapia con peginterferón para aminorar el deterioro hepático en casos en los que no se consiguió la curación. En contra de esta propuesta, se desconoce si la administración de interferón durante un largo período aumenta la aparición de efectos secundarios, reduce el recuento de linfocitos T CD4+ y/o compromete la calidad de vida de los pacientes.

La administración de nuevos fármacos como interferones modificados, análogos de nucleósidos, análogos no-nucleósidos o inhibidores de la proteasa, podrían representar una alternativa terapéutica para los pacientes con recidivas y para los no respondedores.

## Nuevos fármacos

En los últimos años se han puesto en marcha diversos ensayos clínicos en los que se plantearon nuevos abordajes terapéuticos de la hepatitis C crónica, lo que ha permitido la incorporación progresiva de algunas modificaciones como aumentar la duración y la dosis de la terapia combinada -administrando más ribavirina-, que han proporcionado mayores porcentajes de respuesta viral sostenida a expensas de aumentar el perfil de toxicidad (Lindahl et al, 2005). También se han testado nuevas formulaciones de interferón y una generación de pequeñas moléculas diana inhibitoras de determinadas enzimas virales, codificadas como proteasas y polimerasas (Pawlotsky, 2007); algunas de estas moléculas ofrecen resultados prometedores en la supresión de la carga viral del VHC, pero los pacientes desarrollan rápidamente resistencias que obligan a su combinación con interferón.

Entre los nuevos agentes antivirales directos para tratar el VHC, se han propuesto dos inhibidores de la proteasa, telaprevir y boceprevir. En la reunión de otoño de 2010 de la Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas (AASLD), se presentaron los resultados de los estudios ADVANCE e ILLUMINATE (Jacobson et al, 2011), en los que se demostró que la adición de telaprevir -un inhibidor de la proteasa NS34A del VHC- a la terapia combinada de interferón pegilado-ribavirina, aumentaba la tasa de respuesta sostenida para pacientes con genotipo 1 que no habían recibido tratamiento previo, permitiendo a muchos de ellos reducir la duración del tratamiento a 24 semanas. Los

hallazgos de los estudios RESPOND-2 y SPRINT-2 (Poordad et al, 2011), presentados en la misma reunión, indicaban que incorporando boceprevir -un inhibidor experimental de la proteasa NS3 VHC- a la terapia estándar (interferón pegilado-ribavirina), aumentaba la probabilidad de conseguir una respuesta viral sostenida en los pacientes con genotipo viral 1, tanto en los tratados previamente como en los no tratados.

A pesar de que estas medicaciones diana se plantearon inicialmente como complementarias al interferón pegilado, se han comenzado a probar nuevas combinaciones de fármacos con una acción directa en las diferentes etapas del ciclo vital del VHC. Una de estas combinaciones es un inhibidor de la proteasa añadido a una polimerasa o a un inhibidor NS5A. Asimismo, se ha sugerido que la ribavirina puede aumentar la probabilidad de respuesta viral sostenida de los agentes de acción directa, incluso sin interferón (Soriano et al, 2011).

La influencia del genotipo del VHC como factor pronóstico de la respuesta al tratamiento se considera un hecho contrastado, pero recientemente se ha señalado que los patrones genéticos individuales también pueden tener una especial relevancia. En 2009, se informó por primera vez que los polimorfismos genéticos o las variaciones naturales en el gen de la interleuquina 28B (IL28B), que codifica el interferón lambda, estaban asociados al aclaramiento espontáneo del VHC y a una respuesta favorable al interferón. El patrón genético que favorece este hallazgo es fundamentalmente el rs 12979860 C/C (de Araujo et al, 2011), y existe cierta controversia sobre su mayor prevalencia entre las personas de ascendencia europea, lo que podría explicar la peor respuesta al tratamiento de los pacientes de raza negra. En la Conferencia sobre Retrovirus e Infecciones Oportunistas (CROI) de 2010, varios investigadores informaron de que algunas variaciones en la IL28B también predicen un aclaramiento espontáneo y una buena respuesta al tratamiento en los pacientes coinfectados VIH-VHC. En la reunión de la AASLD de 2011, se puso de manifiesto que los polimorfismos de la IL28B también desempeñaban un papel destacado en la progresión de la enfermedad hepática (de Araujo et al, 2011). Se ha sugerido que el rs 12979860 T/T representa un patrón genético desfavorable asociado a un empeoramiento de la fibrosis, aunque no existe una opinión consensuada con respecto a este hallazgo. En otros estudios recientes (Charlton et al, 2010; Coto-Llerena et al, 2010) se observó que las variaciones de la IL28B permiten predecir resultados favorables tras un trasplante.

Recientemente se ha desarrollado el índice PROMETHEUS (<http://ideasydesarrollo.com/fundacion/prometheusindex.php>), que se basa en la combinación de 4 variables (ARN-VHC en sangre, genotipo VHC, grado de fibrosis hepática mediante elastometría y presencia de genotipo IL28B), y puede utilizarse opcionalmente para calcular el riesgo y predecir la posibilidad de RVS en pacientes coinfectados VIH-VHC cuando reciben tratamiento con PEG-INF y ribavirina (Medrano et al, 2010). Asimismo, se ha propuesto el tratamiento de los pacientes coinfectados con genotipo 1, basándose en el estadio de fibrosis hepática; en los que tienen un índice de fibrosis bajo (F0-F1) se difiere el tratamiento a la espera de nuevas opciones terapéuticas con mejor tolerancia y de fácil administración, mientras que en los pacientes con mayor grado de fibrosis (F2-F4) se recomienda la terapia triple (añadiendo un inhibidor de la proteasa del VHC) (Lacombe y Rockstroh, 2012).

En definitiva, el futuro en el tratamiento de los pacientes con hepatitis C crónica residiría en la combinación de interferón pegilado y ribavirina junto con los nuevos agentes antivirales en las últimas fases de desarrollo clínico, así como en la incorporación de marcadores genéticos como la IL28B

## 1.2. Detección del VHC EN SALIVA

Desde el año 1990 -sólo un año después de su descubrimiento- se reconoce la presencia de ARN-VHC en la saliva de los pacientes con hepatitis C crónica (Takamatsu et al, 1990). Se han publicado varias series en las que se investigó la presencia del genoma del VHC en saliva utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), con porcentajes de prevalencia que varían entre el 0 (Fried et al, 1992) y el 100% (Takamatsu et al, 1990) (Tabla 5). La heterogeneidad de estos resultados probablemente expresa diferencias en las poblaciones de estudio y en las técnicas de detección aplicadas. En un estudio realizado en nuestro país en pacientes con ARN-VHC detectable en sangre aplicando una técnica de PCR de sensibilidad contrastada, el porcentaje de pacientes con ARN-VHC en saliva fue superior al 50% (Hermida et al, 2002).

La detección de partículas virales en la saliva no puede deberse exclusivamente a la contaminación hemática procedente de papilas interdentes inflamadas, bolsas periodontales o heridas de

la mucosa, ya que la existencia de sangre oculta en las muestras no condiciona la detección del ARN-VHC (Liou et al, 1992; Fabris et al, 1999; Hermida et al, 2002). Sin embargo, se ha señalado que existe una relación directa entre la presencia del virus en saliva y la carga viral en sangre (Wang et al, 1992; Mariette et al, 1995; Fabris et al, 1999; Hermida et al, 2002), lo que podría indicar un transvase desde el torrente circulatorio a la saliva por un mecanismo de gradiente de concentración. El VHC también tendría acceso a la saliva a través del surco gingival (Maticic et al, 2001), pero en cualquier caso ésta no sería la única ruta de entrada, ya que se ha aislado ARN-VHC en la saliva de pacientes edéntulos (Roy et al, 1998). Se ha sugerido que algunas partículas también podrían expresarse en la saliva como resultado de la replicación activa del virus en las glándulas salivales (Arrieta et al, 2001).

La centrifugación de las muestras de saliva permite realizar su análisis fraccionado, y en este sentido en algunas series las partículas virales sólo se detectaron en la fracción celular (Chen et al, 1995; Fabris et al, 1999; Belec et al, 2003). Por el contrario, otros autores aislaron el ARN viral a partir del sedimento, del sobrenadante o de ambos (Roy et al, 1996; Hermida et al, 2002), lo que sugiere que el ARN-VHC no se deriva exclusivamente de los componentes celulares. La controversia generada por estos resultados discordantes se debe probablemente a diferencias metodológicas, como el manejo de las muestras y su almacenamiento, la presencia de inhibidores de la PCR, el diseño correcto de los cebadores, la variabilidad de las reacciones bioquímicas, la contaminación y la eficiencia de los sistemas de postamplificación (Pawlotsky, 1999).

► **Tabla 5.** Estudios sobre la prevalencia del VHC en la saliva

AUTOR, AÑO	TIPO DE PACIENTES	Nº DE PACIENTES	TÉCNICA DE DETECCIÓN DEL VHC	Nº DE PACIENTES CON VHC EN SALIVA (%)
<b>Takamatsu et al, 1990</b>	Anti VHC +	5	PCR anidada	5 (100)
<b>Fried et al, 1992</b>	Anti VHC + Enf. hepática terminal	14	PCR anidada	0 (0)
<b>Wang et al, 1992</b>	Anti-VHC + Hepatitis post-transfusión	14	PCR anidada	7 (50)
<b>Liou et al, 1992</b>	Anti VHC + ARN-VHC en suero Enf. hepática terminal	37	PCR anidada	15 (48)
<b>Numata et al, 1993</b>	Anti-VHC +	23	PCR anidada	8 (34)
<b>Couzigou et al, 1993</b>	Anti-VHC + Enf. hepática terminal	37	PCR anidada	23 (62)
<b>Mariette et al, 1995</b>	Suero VHC + (13 VIH +)	28	Amplicor® VHC	17 (61)
<b>Chen et al, 1995</b>	Suero VHC + (11 VIH +)	23	PCR anidada	4 (17)
<b>Sugimura et al, 1995</b>	Anti-VHC +	76	PCR anidada	27 (36)
<b>Roy et al, 1995</b>	Suero VHC +	14	PCR anidada	9 (64)
<b>Tang et al, 1996</b>	Suero VHC +	16	PCR simple	5 (31)
<b>Jorgensen et al, 1996</b>	Suero VHC + Síndrome seco	16	PCR simple	13 (83)
<b>Caldwell et al, 1996</b>	Suero VHC + (21 trasplante hepático)	33	PCR simple	5 (15)
<b>Roy et al, 1996</b>	Suero VHC + Hemofílicos (6 VIH +)	21	PCR anidada	10 (48)
<b>Kage et al, 1997</b>	Suero VHC + Mujeres postparto	11	PCR anidada	4 (36)
<b>Ustundag et al, 1997</b>	Suero VHC + Hemodializados	10	PCR anidada	3 (30)
<b>Taliani et al, 1997</b>	Suero VHC + Cirrosis	20	PCR anidada	3 (15)
<b>Roy et al, 1998</b>	Suero VHC + Drogadicción parenteral (19 VIH +)	33	PCR anidada	19 (58)
<b>Fabris et al, 1999</b>	Suero VHC +	39	PCR anidada	22 (56)
<b>Maticic et al, 2001</b>	Suero VHC +	48	Amplicor® VHC	17 (35)
<b>Rey et al, 2001</b>	Anti-VHC + VIH +	59	PCR anidada	22 (37)
<b>Hermida et al, 2002</b>	Suero VHC +	61	PCR anidada	32 (52)
<b>Lins et al, 2005</b>	Anti-VHC +	50	PCR anidada	50 (100)
<b>Tavares et al, 2005</b>	Suero VHC-ARN	32	PCR anidada	8 (25)

Las partículas del VHC también se encuentran en las células epiteliales (Arrieta et al, 2000; Carrozzo et al, 2002), lo que en parte explicaría su presencia en la fracción celular salival. Las células mononucleares de sangre periférica constituyen otro vehículo potencial para transportar el VHC hasta la saliva (Maticic et al, 2001). La gingivitis y las lesiones erosivas de la mucosa oral, pueden favorecer la exudación de suero a la saliva y aumentar la diseminación de células mononucleares potencialmente infectadas al conjunto de la saliva, aunque ninguno de estos factores clínicos se ha correlacionado con la presencia de ARN-VHC en saliva (Roy et al, 1998). Paradójicamente, otros autores han señalado que la presencia de ARN-VHC en células mononucleares de sangre periférica y en saliva no está estrechamente correlacionada, por lo que resulta poco probable que dichas células representen un vehículo importante para la transferencia viral a la saliva (Young et al, 1993).

Se ha demostrado la existencia de una distribución heterogénea de quasiespecies en la sangre y otros tejidos de pacientes con infección crónica por VHC, lo que proporciona una evidencia de replicación viral independiente, extrahepática y compartimentada (Laskus et al, 2000). Esto explicaría el hallazgo de partículas virales con secuencias genómicas diferentes en los tejidos orales y en el suero de algunos pacientes (Nagao et al, 2000), la detección de diferentes genotipos en el suero y la saliva de un mismo paciente (Roy et al, 1998), y la identificación de pacientes que son seronegativos pero saliva-positivos para el VHC (Harle et al, 1993; Mastromatteo et al, 2001).

Los niveles de ARN-VHC en la saliva son bajos, si se comparan con los que se encuentran en el suero (Wang et al, 1992; Numata et al, 1993; Taliani et al, 1997). Sin embargo, la mayoría de los estudios publicados requieren una interpretación cautelosa, ya que en ellos no se emplearon técnicas de cuantificación específicas para saliva (Rey et al, 2001).

La detección de cadenas de ARN-VHC en muestras de mucosa bucal de pacientes con hepatitis C crónica, permite especular que ésta puede ser una zona de entrada para la infección por el VHC, que infecta a las células epiteliales y se duplica dentro de ellas (Arrieta et al, 2000; Nagao et al 2000; Carrozzo et al, 2002). El porcentaje de células epiteliales en las que se identificó ARN-VHC fue menor que el alcanzado en los hepatocitos (Arrieta et al, 2000; Carrozzo et al, 2002). La replicación viral en la mucosa oral probablemente constituya un factor relevante en la etiopatogenia de algunas manifestaciones

extrahepáticas asociadas con la hepatitis C crónica, como el líquen plano (Arrieta et al, 2000; Nagao et al, 2000; Carrozzo et al, 2002; Pilli et al, 2002; Carrozzo y Gandolfo, 2003).

El mecanismo por el cual el virus accede al interior de la célula hospedadora todavía no está totalmente aclarado, aunque se ha sugerido que la infectividad depende de la co-expresión de las glicoproteínas E1 y E2 en la superficie viral y es pH-dependiente (Hsu et al, 2003). La presencia del receptor tetraspanin CD81 en la superficie de la célula hospedadora no es suficiente por sí sola para permitir la entrada del VHC (Pileri et al, 1998), que exige la expresión de otros receptores (Agnello et al, 1999; Scarselli et al, 2002; Bartosch et al, 2003a,b; Hsu et al, 2003). Los modelos de infección in vitro que emplean pseudopartículas que transportan glicoproteínas del VHC sin modificar, muestran que los principales objetivos de la infección son hepatocitos primarios y células de hepatocarcinoma (Bartosch et al, 2003a,b; Hsu et al, 2003). Sin embargo, diversas líneas celulares de origen no hepático que expresan todas las moléculas de superficie de entrada celular, no son o son poco permisibles a las pseudopartículas infecciosas de VHC, lo que implica que son necesarios cofactores adicionales específicos del hígado para la entrada del VHC (Bartosch et al, 2003b). Hasta la fecha, no se ha podido demostrar si estos receptores y cofactores también están presentes en las células epiteliales orales.





2

# Justificación y Objetivos



El virus de la hepatitis C se transmite fundamentalmente por contacto percutáneo directo con sangre contaminada. Sin embargo, el diagnóstico de la infección en pacientes sin factores identificables de riesgo parenteral, permite especular sobre la existencia de otras vías de transmisión. Aplicando técnicas de biología molecular -concretamente una RT-PCR de alta sensibilidad- se ha demostrado la presencia de ARN-VHC en muestras de saliva de pacientes con hepatitis crónica por virus C (Hermida et al, 2002), por lo que se ha sugerido que la saliva podría constituir un vehículo potencial de infección. Hasta la fecha no se ha demostrado la infectividad de las partículas virales detectadas en saliva, pero en base a los resultados de estudios epidemiológicos parece deducirse que su potencial de transmisión, si es que existe, es muy limitado (Castro et al, 2004).

En los pacientes mono infectados por el VHC, es habitual la presencia del virus en saliva, habiéndose identificado por el momento un único factor predictor que es la carga viral en sangre. La administración de interferón y ribavirina proporciona una reducción significativa de la viremia, y se ha sugerido que la monitorización del VHC en saliva puede resultar de utilidad para determinar el efecto antiviral sostenido de esta combinación terapéutica (Diz et al, 2005).

La replicación del VHC se incrementa en presencia del VIH, lo que se traduce en mayores niveles de ARN-VHC en el hígado y el suero de los pacientes coinfectados (Thomas et al, 1996). Los niveles elevados de viremia VHC pueden potenciar el riesgo de transmisión de la infección y comprometer el éxito de la TARGA (Soto et al, 1997). El curso clínico de la hepatitis C se acelera en la coinfección VIH-VHC y la progresión a fibrosis hepática en los pacientes coinfectados es más rápida que en los mono infectados (Kim y Chung, 2009).

En consecuencia, la coinfección VIH-VHC proporciona un nuevo escenario en el que hasta la fecha no se ha investigado la presencia del VHC en saliva, ni su patrón de aclaramiento en respuesta al tratamiento con interferón-ribavirina. Para intentar dar respuesta a estas cuestiones se han planteado los siguientes objetivos:

- Analizar comparativamente la prevalencia de partículas ARN-VHC en saliva de pacientes coinfectados VIH-VHC frente a mono infectados por VHC, y determinar los factores que condicionan su presencia.
- Estudiar los patrones de aclaramiento del VHC en sangre y saliva de pacientes coinfectados VIH-VHC, tras la administración de interferón pegilado y ribavirina.
- Investigar el valor predictivo de la presencia del VHC en saliva de pacientes coinfectados sobre el patrón de respuesta al tratamiento con interferón pegilado y ribavirina, así como la concordancia en términos de presencia/ausencia del VHC en muestras de sangre y saliva.





3

# Pacientes y Métodos



## 3.1. Selección de pacientes

### 3.1.1. Estudio de prevalencia

#### Grupo de estudio (VIH-VHC)

En el colectivo de estudio se incluyeron 75 pacientes VIH+ con hepatitis crónica por VHC elegidos aleatoriamente entre los diagnosticados en la Unidad de seguimiento de VIH del Complejo Hospitalario Universitario de Vigo (CHUVI, Vigo, España). Se aplicaron los siguientes criterios de inclusión: edad superior a 18 años, infección confirmada por VIH, presencia de ARN-VHC en sangre confirmada por PCR, ausencia de hábitos tóxicos activos (consumo de alcohol o drogas recreacionales), ausencia de enfermedades hepáticas concomitantes (excepto la hepatitis B), no haber recibido tratamiento previo con interferón y la participación voluntaria en el estudio (consentimiento informado).

Del historial clínico de los pacientes seleccionados se recogió la siguiente información: variables demográficas (edad, sexo, conducta de riesgo para la adquisición de la infección por VIH, tiempo de evolución desde su diagnóstico, estadio clínico de la infección por VIH y terapia antirretroviral recibida, factores de riesgo de adquisición del VHC y tiempo transcurrido desde su diagnóstico), datos analíticos (valores de transaminasas, concentración de ARN-VHC en sangre, genotipo viral, carga viral de VIH, recuento de linfocitos T CD4 nadir, concentración de linfocitos T CD4), y coinfección pasada por el virus de la hepatitis B (VHB).

#### Grupo Control (VHC)

Lo constituyeron 75 pacientes con infección crónica por VHC elegidos aleatoriamente entre los diagnosticados en el Servicio de Medicina Interna del Complejo Hospitalario Universitario de La Coruña (CHUAC, La Coruña, España). Se aplicaron los mismos criterios de inclusión que para el grupo de estudio, a excepción de las pruebas de detección de anticuerpos anti-VIH que en estos pacientes debían ser negativas.

Al igual que en el grupo de estudio, del historial clínico de los pacientes seleccionados se recogieron datos demográficos, analíticos y sobre coinfección pasada por el VHB (con excepción de los parámetros relativos a la infección por VIH).

### **3.1.2. Estudio de aclaramiento**

#### **Grupo de estudio (VIH-VHC)**

Se incluyeron 60 pacientes VIH+ con hepatitis crónica por VHC diagnosticados en la Unidad de Seguimiento de VIH del Complejo Hospitalario Xeral-Ciés (Vigo, España), seleccionados para recibir terapia combinada con interferón pegilado-ribavirina con la finalidad de combatir la infección por VHC.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes (Soriano et al, 2004a): pacientes con infección por VIH confirmada, presencia de ARN-VHC en sangre confirmada con PCR, edad comprendida entre 18 y 65 años, ausencia de hábitos tóxicos (consumo activo de alcohol y/o drogas recreacionales), no haber recibido terapia previa con interferón, recuento de linfocitos T CD4+ >200 células/  $\mu$ l, recuento de leucocitos  $\geq$ 3.000 células/ml, recuento de neutrófilos  $\geq$ 1.500 células/ml, recuento de plaquetas  $\geq$ 100.000 células/ml, valores de hemoglobina  $\geq$ 12 gr/dl, y valores de tiempo de protrombina, bilirrubina, albumina y creatinina en el rango de la normalidad, buena adherencia al tratamiento, perfil psicológico estable, soporte familiar y participación voluntaria en el estudio (consentimiento informado).

Los criterios de exclusión aplicados fueron: cirrosis u otras enfermedades hepáticas concomitantes (excepto hepatitis B), hemoglobinopatías, alteraciones psiquiátricas, eventos cardiovasculares, diabetes descompensada, bronquitis crónica, enfermedades autoinmunes, retinopatía severa, embarazo, lactancia, y cualquier otra condición de las que contraindican el tratamiento de la infección crónica por el VHC en pacientes coinfectados VIH-VHC.

Del historial clínico de los pacientes seleccionados se recogió la siguiente información: variables demográficas (edad, sexo, conducta de riesgo para la adquisición de la infección por VIH, tiempo de evolución desde su diagnóstico, estadio clínico de la infección por VIH y terapia antirretroviral recibida, factores de riesgo de adquisición del VHC y tiempo transcurrido desde su diagnóstico), datos analíticos (valores de transaminasas, concentración de ARN-VHC en sangre, genotipo viral, carga viral de VIH,

recuento de linfocitos T CD4 nadir, concentración de linfocitos T CD4), y antecedentes de infección por el virus de la hepatitis B (VHB).

## 3.2. Secuencia metodológica

### 3.2.1. Recolección de muestras

Las muestras de saliva se recogieron entre las 9:00 y las 14:30 horas. El paciente permaneció sentado y depositó en un contenedor estéril la saliva total, estimulada mediante la aplicación de 2-3 gotas de ácido cítrico (0,1 mol/l) en el dorso de la lengua cada minuto durante 3 minutos (Navazesh y Christensen, 1982). Antes de que transcurriese una hora se procedió a la congelación de los contenedores a -80°C para la posterior detección de ARN-VHC.

Simultáneamente, se recogieron 10 ml de sangre venosa periférica para la identificación y el genotipado del ARN-VHC. Para la detección se empleó el sistema Amplicor<sup>®</sup> HCV Monitor (Roche Molecular Systems, Barcelona, España) en el estudio de prevalencia y el Versant<sup>®</sup> HCV-RNA 3.0 (bDNA) (Bayer Diagnostics, Barcelona, España) en el estudio de aclaramiento. El genotipado se llevó a cabo empleando un ensayo de hibridación reversa en tira (Inno-Lipa<sup>®</sup> HCV II; Bayer, Barcelona, España), siguiendo los protocolos de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Delgado-Iribarren et al, 2004).

### 3.2.2. Detección del ARN-VHC en saliva

La detección del ARN-VHC en las muestras salivales se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias de la Salud adscrito al Complejo Hospitalario Universitario de La Coruña (CHUAC, La Coruña, España), aplicando una técnica específica (Hermida et al, 2002).

Para evitar que el ARN-VHC detectado en las muestras de saliva procediese de una eventual contaminación hemática, se desecharon los especímenes que exhibieron sangre en la inspección visual. A los restantes se les aplicó un test específico para detectar hemoglobina humana con una sensibilidad de 40 µg/ml (Hem Check<sup>®</sup>, Menarini Diagnostics, Barcelona, España), con el objetivo de estudiar si la existencia de sangre oculta resultaba un factor determinante de la presencia del ARN viral en la saliva.

La detección del ARN-VHC se llevó a cabo mediante una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) modificando la sistemática aplicada previamente por otros autores. El método se fundamenta en la capacidad de la enzima "polimerasa" para catalizar la adición de nucleótidos a una cadena de ADN matriz. La polimerasa precisa, para poder iniciar su actividad, de la hibridación previa de oligonucleótidos complementarios que actuarán como iniciadores (cebador o *primer*) que por su complementariedad específica delimitan la cadena que va a ser copiada. Para el procesamiento del ARN se precisa la transformación previa en ADN complementario (ADNc) mediante la técnica de retrotranscripción o transcripción reversa (RT).

La técnica de la RT-PCR consta de las siguientes fases (Figuras 6 y 7):

- Extracción del ARN
- Transcripción reversa o retrotranscripción
- Amplificación
- Análisis de los productos de PCR
- *Extracción del ARN*

La obtención de cantidades suficientes de ARN viral puro e íntegro es fundamental para garantizar la fiabilidad del análisis de productos de la PCR. Para la extracción del ARN, las muestras se someten a procedimientos de lisis. El TRIzol (Life Technologies, Barcelona, España) es una solución monofásica de isocianato de guanidina y fenol que produce la disrupción de las células y solubiliza los componentes intracelulares manteniendo la integridad del ARN. Añadiendo cloroformo y centrifugando la muestra, la solución se divide en dos fases, una acuosa y otra orgánica. El ARN se mantiene en la fase acuosa y se recupera por precipitación con isopropanol. El ADN y las proteínas permanecen en la fase orgánica y pueden aislarse mediante precipitación secuencial. Tras el aislamiento, el ARN se suspende en una solución de dietilpircarbonato (DEPC) para preservarlo de la acción de las ARNasas.

- *Transcripción reversa*

El ARN problema debe transformarse en ADNc para que pueda someterse a maniobras de amplificación. Las enzimas de transcripción reversa permiten el apareamiento de desoxinucleótidos

complementarios a la molécula de ARN, de forma que en este proceso el nucleótido complementario al uracilo es la adenina.

Para el inicio de la reacción se precisa la adición de oligonucleótidos iniciadores y la presencia de enzimas de transcripción reversa. Existen iniciadores de baja especificidad (*random primers*), que se unen a diferentes regiones y captan distintos tipos de cadenas (ARN mensajero, ARN ribosómico, etc.), e iniciadores específicos (*Gen Specific Primer –GSP*), que hibridan exclusivamente la secuencia de un ARN problema.

La transcripción reversa puede realizarse simultáneamente a la amplificación, de forma que ambos procedimientos se llevan a cabo en un mismo tubo de ensayo. En el presente estudio se ejecutó cada fase de forma independiente, comenzando por la síntesis de ADNc en un medio tamponado optimizado, del cual se extrajo una muestra para su posterior amplificación, aumentando de esta forma la especificidad del método. La síntesis de ADN complementario se obtuvo por retrotranscripción de 10  $\mu$ l de ARN extraído, dispuesto en un medio con pH optimizado (10 mM/l Tris-ClH, 50 mM/l ClK, 3mM/l Cl<sub>2</sub>Mg) a una temperatura de 38°C. Se añadieron los cebadores específicos 209 y 939 (Life Technologies, Barcelona, España), nucleótidos (10  $\mu$ M DTT y 0,5 mM dNTPs) y 200 unidades de Virus de la Leucemia Murina de Moloney (MMLV) que actúan de transcriptasa inversa. A los 5 minutos se inhibió el proceso de transcripción sometiendo la transcriptasa a altas temperaturas (95°C).

- *Amplificación*

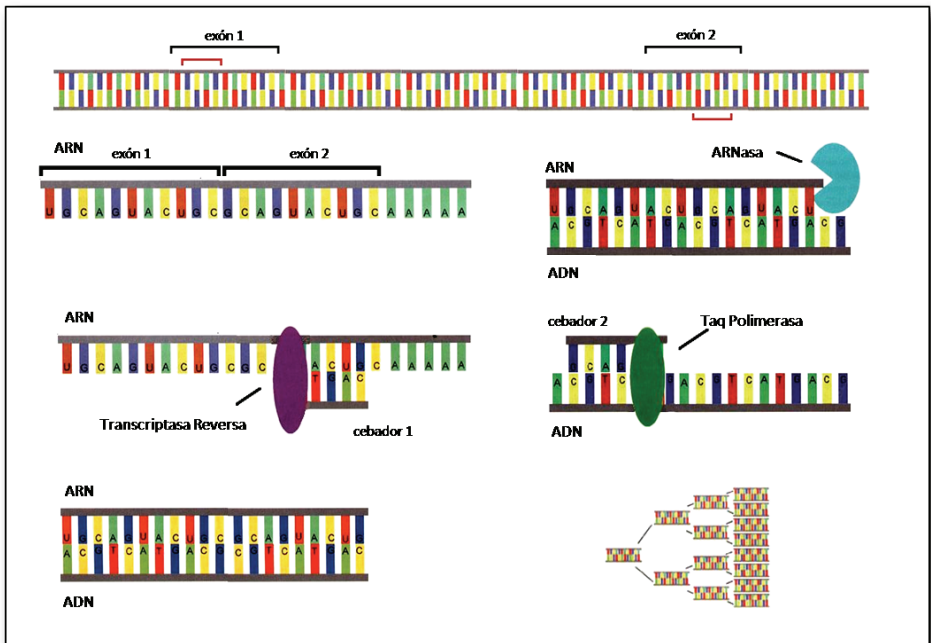
Cuando la doble cadena se somete a temperaturas superiores a los 90°C se produce el fenómeno de la “desnaturalización”, se rompen los enlaces de hidrógeno y las dos cadenas se separan permitiendo el copiado *in vitro* mediante la adición de cebadores específicos y desoxinucleótidos. En el proceso de “hibridación”, la polimerasa cataliza la adición de nucleótidos complementarios, obteniéndose un duplicado de cada cadena. La repetición del ciclo permitirá la generación de copias de la cadena original en progresión geométrica, de forma que tras varios ciclos el número de moléculas generado es suficiente para permitir su detección.

En la fase de amplificación, 20  $\mu$ l del ADNc obtenido en la retrotranscripción se incorporaron a una mezcla de reacción con un volumen final de 50  $\mu$ l, que contenía: 10mM/l Tris-ClH (pH 8,4) 50 mM/l

CIK, 1,5 mM/I Cl<sub>2</sub>Mg, 200 μM dNTPs, 1U Taq Polimerasa (Life Technologies). Se realizaron 30 ciclos de amplificación con las siguientes temperaturas: 94°C/30 seg; 53°C/45seg; 72°C/60seg.

Se utilizó la técnica de PCR anidada, en la que tras completar una primera amplificación, los productos de la reacción se reamplifican utilizando nuevos cebadores que hibridan a los iniciales. Consecuentemente, 1 μl del producto de la primera PCR se reamplificó en una mezcla de reacción de 50 μl que contenía: 10 mM/I Tris-CIH (pH 8,4), 50 mM/I KCIK, 1,5 mM/I Cl<sub>2</sub>Mg, 200 μM dNTPs, 1U Taq Polimerasa (Life Technologies) y 1 μM de los cebadores 211 y 940 (Life Technologies). El programa de amplificación fue el mismo que en la primera PCR.

► **Figura 6.** Fases de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección del ARN-VHC



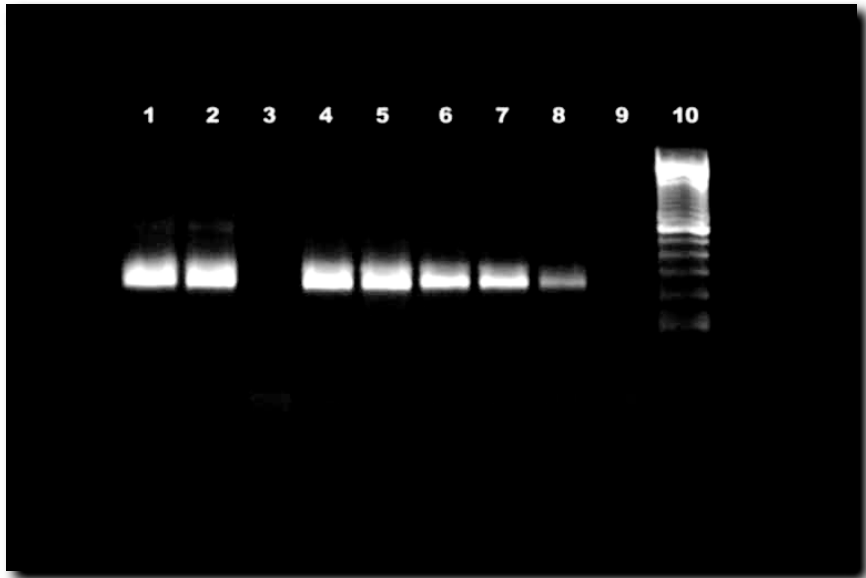
- *Análisis de los productos de la PCR*

El producto se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% y se tiñó con bromuro de etidio.

La sensibilidad de la técnica para la detección de ARN-VHC se determinó estudiando el producto de PCR de diluciones seriadas de plasma en saliva. El plasma procedía de un individuo infectado, cuya

viremia era de 1.000.000 copias de VHC por ml de plasma (determinado con el sistema Amplicor<sup>®</sup>, Roche) y la saliva procedía de un individuo control VHC negativo. El límite de detección de esta técnica fue de 10 moléculas de ARN-VHC/ml (Figura 7).

► **Figura 7.** Análisis de los productos de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa



- Línea 1: Suero control positivo
- Línea 2: Suero de un paciente infectado por VHC con carga viral de  $1 \times 10^6$  copias/ml
- Línea 3: Saliva control negativa
- Línea 4: Dilución al 10% de suero en saliva
- Línea 5: Dilución al 1% de suero en saliva
- Línea 6: Dilución al 0,1% de suero en saliva
- Línea 7: Dilución al 0,01% de suero en saliva
- Línea 8: Dilución al 0,001% de suero en saliva
- Línea 9: Saliva control negativa
- Línea 10: Control de peso molecular

### 3.2.3. Diseño del estudio de prevalencia

En este estudio de carácter transversal, se procedió a la detección cualitativa del VHC en la saliva del grupo de estudio (n= 75) y del grupo control (n= 75), siguiendo los procedimientos descritos anteriormente. Primero se compararon las características de ambos grupos (estudio y control) para comprobar que eran similares y después se intentó determinar qué variables -demográficas, clínicas y/o analíticas- condicionaban la aparición del virus en la saliva.

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el entorno de *software libre* R, versión 2.12.0 (R Development Core Team, Vienna, Austria). Las variables discretas se analizaron mediante el test de Fisher y el de Chi-cuadrado, mientras que para las continuas se aplicó un modelo de regresión logística. Se consideraron estadísticamente significativos los resultados con valores de  $p < 0,05$ .

### 3.2.4. Diseño del estudio de aclaramiento

En los pacientes candidatos a recibir terapia combinada (n= 60), los fármacos de elección fueron el interferón pegilado  $\alpha$ -2a (Pegasy, Roche, Basilea, Suiza) y la ribavirina (Copegus, Roche). La dosis se estableció en función del peso del paciente: aquéllos con un peso inferior a 75 kg recibían 180 mcg de peginterferón  $\alpha$ -2a una vez por semana y 1000 mg diarios de ribavirina repartidos en dos dosis, mientras que a los de peso igual o superior a 75 kg se les administraba la misma dosis de peginterferón pero 1200 mg de ribavirina/día. La duración del tratamiento se estableció en base al genotipo viral: 48 semanas para los genotipos 1 y 4, y sólo 24 semanas para los genotipos 2 y 3. En las 24 horas previas al inicio de la terapia se prescribía profilácticamente paracetamol o ibuprofeno para paliar los efectos adversos del interferón, y se evaluaba la necesidad de antieméticos (Soriano et al, 2004a).

Las detección del VHC tanto en sangre como en saliva de los pacientes que recibieron terapia combinada se realizó al iniciar el tratamiento (basal), al finalizarlo, a los 6 meses post-tratamiento y en un seguimiento ulterior a los 12 meses post-tratamiento. En los pacientes que completaron el seguimiento, a los 5 años de la finalización del tratamiento se hizo un nuevo control serológico para comprobar la presencia del VHC.

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el entorno de *software libre* R, versión 2.12.0 (R Development Core Team, Vienna, Austria), aplicando en cada caso el test de Fisher, el test de Chi-cuadrado o un modelo de regresión logística. Se consideraron estadísticamente significativos los resultados con valores de  $p < 0,05$ .

Para estudiar la concordancia entre la presencia/ausencia del VHC en sangre y en saliva, se ajustó un modelo de regresión logística con respuesta bivalente (basado en la odds-ratio):  $\text{vglm}(\text{cbind}(\text{sangre}, \text{saliva}) \sim \text{tiempo}, \text{binom2.or}(\text{zero} = \text{NULL}), \text{datos})$ . Para poder determinar si la concordancia ([[no,no), (si,si)] frente a [(si,no), (no,si)]) era similar al finalizar el tratamiento, a los 6 y 12 meses, se introdujo el tiempo como factor en el modelo. El análisis estadístico se realizó utilizando el software R, versión 2.12.0 (R Development Core Team, Vienna, Austria), y el modelo se ajustó utilizando el paquete VGAM (Yee y Wild, 1996; Yee, 2012). En todos los casos, se consideraron estadísticamente significativos los valores de  $p < 0,05$ .







4

**Resultados**



## 4.1. Estudio de prevalencia

### 4.1.1. Grupo de estudio (VIH-VHC)

#### Características de la infección por VIH

De los 75 pacientes coinfectados VIH-VHC incluidos en el estudio, 60 (80%) eran varones y 15 (20%) mujeres, con una edad media de 38 años (rango 21-64 años). La conducta de riesgo preponderante para la adquisición del VIH fue la adicción a drogas por vía parenteral (76%). El tiempo de evolución de la infección por VIH superaba los 5 años en el 88% de los pacientes y en el 25% era mayor de 15 años. El recuento de linfocitos T CD4 nadir se hallaba por debajo de las 200 cels/ $\mu$ l en el 39% de los pacientes, mientras que en el 47% estaba comprendido entre las 200-500 cels/ $\mu$ l. Más de la mitad de los pacientes de la serie (38 casos; 51%) tenían un recuento de linfocitos T CD4+ superior a 500 cels/ $\mu$ l en el momento en que se tomaron las muestras de saliva, mientras que sólo 4 pacientes (5%) no superaban las 200 cels/ $\mu$ l. Sólo un paciente tenía más de  $1 \times 10^6$  copias/ml de VIH, mientras que en 40 (53%) la viremia de VIH fue indetectable ( $\leq 50$  copias/ml). Casi la mitad de los pacientes (36 casos) pertenecían al estadio A de la infección, 24 pacientes (32%) al B y los 15 restantes (20%) al C. El 45% de los pacientes (34 casos) no recibía terapia antirretroviral durante la realización del estudio y los 41 restantes estaban tratados con 8 combinaciones diferentes de antirretrovirales. Todos estos resultados se detallan en la tabla 6.

#### Características de la infección por VHC

La carga viral media del VHC detectada en suero en el grupo de estudio fue  $10.024.241 \pm 13.862.304$  UI/ml (rango 0,00- $8,3 \times 10^7$  UI/ml). La viremia del VHC de 52 pacientes (81%) alcanzó valores comprendidos entre  $10^6$ - $10^8$  UI/ml. El genotipo predominante fue el 1, presente en 37 pacientes (60%). El 38% de los pacientes tenían una concentración sérica de GPT de 91-300 UI/l y sólo el 4% (3 pacientes) presentaron valores  $>300$  UI/l (Tabla 6). En un solo paciente se confirmó infección activa por VHB, mientras que 53 pacientes (72%) la habían tenido con anterioridad a la realización del estudio (Tabla 6).

► **Tabla 6.** Datos descriptivos del colectivo de estudio en relación a la infección por VIH

		<b>N</b>	<b>%</b>
<b>CONDUCTA DE RIESGO PARA LA ADQUISICIÓN DEL VIH</b>	ADPV	57	76
	Prácticas heterosexuales	9	12
	Recepción de hemoderivados	9	12
<b>TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN POR VIH (AÑOS)</b>	0-5	9	12
	6-10	20	27
	11-15	27	36
	16-20	19	25
<b>LINFOCITOS T CD4+ NADIR (CELS/<math>\mu</math>l)</b>	<200	29	39
	200-500	35	47
	>500	11	14
<b>LINFOCITOS T CD4 ACTUAL (CELS/<math>\mu</math>l)</b>	<200	4	5
	200-500	33	44
	>500	38	51
<b>VIREMIA DEL VIH (COPIAS/ml)</b>	$\leq 50$	40	53
	$10^2$ - $10^3$	7	9
	$10^3$ - $10^4$	10	13
	$10^4$ - $10^5$	15	20
	$10^5$ - $10^6$	2	3
	$10^6$ - $10^7$	1	2
<b>ESTADIO DE LA INFECCIÓN</b>	A1	16	21
	A2	12	16
	A3	8	11
	B1	1	1
	B2	18	24
	B3	5	7
	C1	0	0
	C2	3	4
	C3	12	16
<b>TERAPIA ANTIRRETROVIRAL</b>	Sin terapia	34	45
	INTI	5	6,6
	2 INTI + INTI ana.	2	2,6
	2 INTI + INNTI	15	20
	INTI + INNTI + INTI ana.	5	6,6
	2 INTI + IP	10	13,3
	IP + INNTI + INTI ana.	1	1,3
	IP + INTI + INTI ana.	2	2,6
	Otras	1	1,3

ADPV = Adictos a Drogas por Vía Parenteral; INTI = Inhibidores Nucleósidos de la Transcriptasa Inversa; INNTI = Inhibidores No Nucleósidos de la Transcriptasa Inversa; IP = Inhibidores de la proteasa; INTI ana. = Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleótidos

## Prevalencia de VHC en saliva y factores condicionantes

Se detectaron partículas ARN-VHC en 49 de las 75 muestras salivales recogidas en el colectivo de pacientes coinfectados, lo que representa una prevalencia del 65%.

La presencia del VHC en saliva no se relacionó con la edad, el sexo, factores de riesgo identificados para la infección por VIH ni el tiempo transcurrido desde su diagnóstico, el recuento de linfocitos T CD4 + nadir ni actual, el estadio clínico, la viremia del VIH, la terapia antirretroviral, la viremia del VHC, el genotipo del VHC, los valores de GPT, ni la coinfección por VHB.

### 4.1.2. Grupo control (VHC)

#### Características de la infección por VHC

El grupo control incluyó 55 varones (73%) y 20 mujeres (27%) con una edad media de 40 años (rango 20-71 años). En términos de edad y sexo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de coinfectados y el grupo control.

La carga viral media de VHC detectada en suero en el grupo control fue  $264.429 \pm 249.299$  UI/ml (rango 0-1.796.068 UI/ml). Solamente el 1,5% (1 caso) de los pacientes de este grupo alcanzaron viremias de VHC superiores a  $1 \times 10^6$  UI/ml. El genotipo predominante fue el 1 (62% de los casos). El valor medio de GPT fue  $106,4 \pm 96,8$  UI/l (rango 11-447 UI/l). En 4 pacientes (5,3%) se detectó infección por VHB activa y 1 la había tenido en el pasado.

La viremia VHC de los pacientes coinfectados resultó significativamente superior a los valores detectados en el grupo control ( $p < 0,001$ ). También se observaron diferencias significativas en la distribución del genotipo viral entre ambos grupos ( $p = 0,012$ ). Los niveles de GPT fueron similares en ambos grupos. La prevalencia de antecedentes de hepatitis por VHB fue significativamente superior entre los coinfectados que en el grupo control ( $p < 0,001$ ; OR (IC) = 36,51 (12,51-132,94)), (Tabla 7).

► **Tabla 7.** Datos descriptivos en relación a la infección por VHC\* del grupo de estudio (VIH-VHC) y del grupo control (VHC)

		<b>GRUPO DE ESTUDIO VIH-VHC</b> <b>N (%)</b>	<b>GRUPO CONTROL VHC</b> <b>N (%)</b>
<b>Viremia VHC (UI/ml)</b>	<600	3 (4,6)	2 (3,2)
	600-10 <sup>5</sup>	4 (6,3)	11 (17,5)
	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>	5 (7,8)	49 (77,8)
	10 <sup>6</sup> -10 <sup>8</sup>	52 (81,2)	1 (1,5)
<b>Genotipo VHC</b>	1	37 (60,6)	24 (61,5)
	2	2 (3,3)	6 (15,3)
	3	12 (19,6)	9 (23,1)
	4	10 (16,4)	0 (0)
<b>GPT (UI/l)</b>	>30	9 (12,1)	9 (12)
	30-90	34 (45,9)	36 (48)
	91-300	28 (37,8)	23 (30,6)
	>300	3 (4,1)	7 (9,3)
<b>Hepatitis B</b>	No	20 (27)	70 (94)
	Hepatitis B pasada	53 (72)	1 (1)
	Hepatitis B activa	1(1)	4 (5)

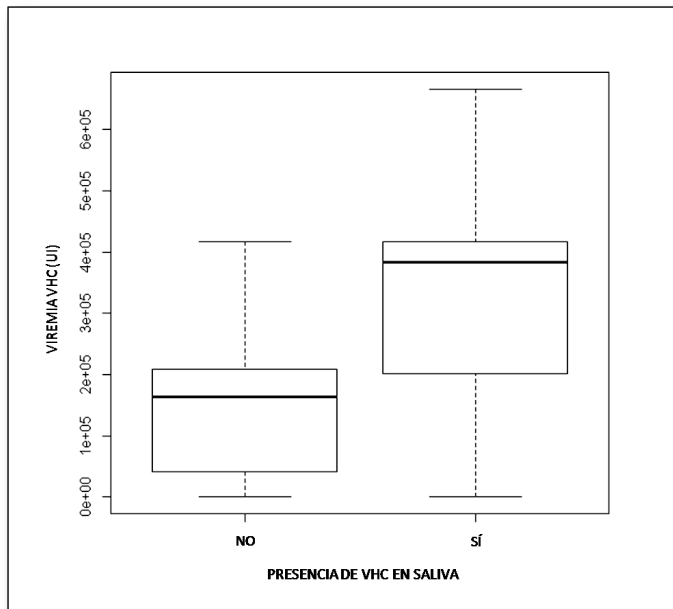
\*no existía información disponible de todos los pacientes

## Prevalencia de VHC en saliva y factores condicionantes

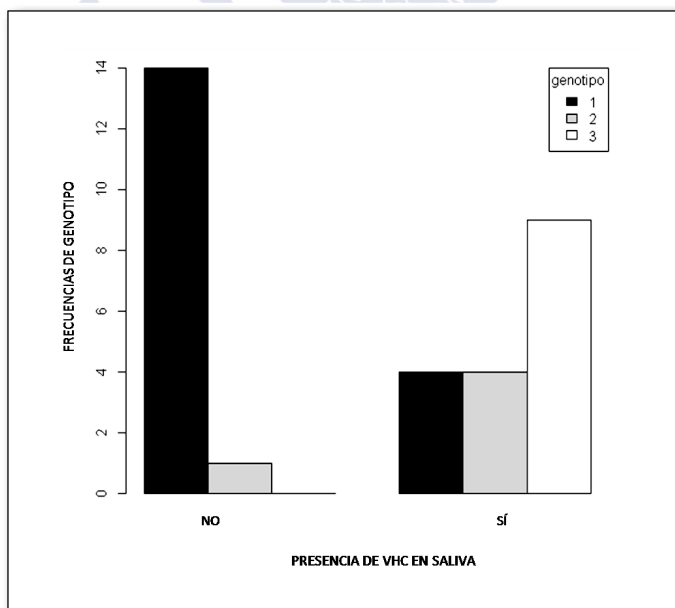
Se detectó ARN-VHC en la saliva de 39 pacientes (52%), resultando esta prevalencia similar a la observada en los pacientes coinfectados.

No se estableció ninguna correlación entre la detección del VHC en saliva y la edad del paciente, el sexo, los valores de GPT, ni la coinfección por VHB. Se demostró una relación estadísticamente significativa entre la detección de ARN-VHC en saliva y la carga viral en sangre ( $p < 0,001$ ) (Figura 8). También se constató que la presencia del VHC en saliva era más habitual en pacientes con determinados genotipos virales como el 3 ( $p < 0,001$ ) (Figura 9).

► **Figura 8.** Presencia del VHC en saliva de pacientes mono infectados en función de la carga viral



► **Figura 9.** Presencia del VHC en saliva de pacientes mono infectados en función del genotipo viral



## 4.2. Estudio de aclaramiento

### 4.2.1. Grupo de estudio (VIH-VHC)

#### Características de la infección por VIH

De los 60 pacientes seleccionados inicialmente, únicamente se pudo completar el estudio en 34, debido a la interrupción precoz del tratamiento o a la imposibilidad de finalizar el seguimiento post-tratamiento en los 26 restantes. De los 34 pacientes coinfectados VIH-VHC, 26 (76,5%) eran varones y 8 (23,5%) mujeres, con una edad media de 41 años (rango 29-65 años).

La conducta de riesgo preponderante para la adquisición del VIH fue la adicción a drogas por vía parenteral (64,8%). El recuento de linfocitos T CD4+ nadir se hallaba por debajo de las 200 cels/ $\mu$ l en el 21% de los pacientes, mientras que en el 64% estaba comprendido entre 200 y 500 cels/ $\mu$ l. Más de la mitad de los pacientes de la serie (23 casos; 68%) tenían un recuento de linfocitos T CD4+ superior a 500 cels/ $\mu$ l en el momento en que se inició la terapia anti-VHC, y el 32% tenían 200-500 cels/ $\mu$ l. Sólo un paciente tenía más de  $1 \times 10^5$  copias/ml de VIH, mientras que en 22 (64%) la viremia de VIH era indetectable ( $\leq 50$  copias/ml). El estadio de la infección por VIH fue el B en casi la mitad de los pacientes (16 casos), el A en 13 pacientes (38%) y el C en los 4 restantes (12%).

El 32% de los pacientes (11 casos) no recibieron terapia antirretroviral durante la realización del estudio y los 23 restantes estaban tratados con 6 combinaciones diferentes de antirretrovirales. La combinación más frecuente fue (Inhibidores Nucleósidos de la Transcriptasa Inversa + Inhibidores No Nucleósidos de la Transcriptasa Inversa + Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleótidos), que se administró a 8 pacientes (23%). Todos estos resultados se detallan en la tabla 8.

► **Tabla 8.** Datos descriptivos del colectivo de estudio en relación a la infección por VIH

		<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Conducta de riesgo para la adquisición del VIH</b>	ADPV	22	64
	Prácticas heterosexuales	6	18
	Recepción de hemoderivados	6	18
<b>Tiempo de evolución de la infección por VIH (años)</b>	0-5	4	12
	6-10	10	29
	11-15	12	35
	16-20	8	24
<b>Linfocitos T CD4+ nadir (cels/<math>\mu</math>l)</b>	<200	7	21
	200-500	22	64
	>500	5	15
<b>Linfocitos T CD4 actual (cels/<math>\mu</math>l)</b>	<200	0	0
	200-500	11	32
	>500	23	68
<b>Viremia del VIH (copias/ml)</b>	$\leq 50$	22	64
	$10^2-10^3$	4	12
	$10^3-10^4$	2	6
	$10^4-10^5$	5	15
	$10^5-10^6$	1	3
<b>Estadio de la infección</b>	A1	4	12
	A2	7	21
	A3	2	6
	B1	2	6
	B2	9	28
	B3	5	15
	C1	0	0
	C2	0	0
	C3	4	12
<b>Terapia Antirretroviral</b>	Sin terapia	11	32
	INTI	2	6
	2 INTI + INNTI	7	20
	INTI + INNTI + INTI ana.	8	23
	2 INTI + IP	3	9
	IP + INNTI + INTI ana.	2	6
	IP + INTI + INTI ana.	1	3

ADPV= Adictos a Drogas por Vía Parenteral; INTI= Inhibidores Nucleósidos de la Transcriptasa Inversa; INNTI= Inhibidores No Nucleósidos de la Transcriptasa Inversa; IP= Inhibidores de la proteasa; INTI ana.= Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleótidos

## Características de la infección por VHC

La carga viral media del VHC detectada en suero en el grupo de estudio en la determinación basal fue de  $1.124.996 \pm 1.103.189$  UI/ml ( $n = 27$ ). El genotipo predominante fue el 1, presente en 17 pacientes (50%). El 65% de los pacientes tenía una concentración sérica de GPT comprendida entre 91 y 300 UI/l y ningún paciente presentó valores por encima de las 300 UI/l (Tabla 9). Tan sólo el 35% de los pacientes ( $n = 12$ ) habían tenido hepatitis B con anterioridad a la realización del estudio.

► **Tabla 9.** Datos descriptivos del colectivo de estudio en relación a la infección por VHC

		<b>GRUPO DE ESTUDIO VIH-VHC</b>
		<b>N (%)</b>
<b>Viremia VHC (UI/ml)</b>	600-10 <sup>5</sup>	3 (9)
	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>	3 (9)
	10 <sup>6</sup> -10 <sup>8</sup>	28 (82)
<b>Genotipo VHC</b>	1	17 (50)
	2	0 (0)
	3	13 (17,2)
	4	4 (11,8)
<b>GPT (UI/l)</b>	>30	0 (0)
	30-90	12 (35)
	91-300	22 (65)
	>300	0 (0)
<b>Hepatitis B</b>	No	22 (65)
	Hepatitis B pasada	12 (35)

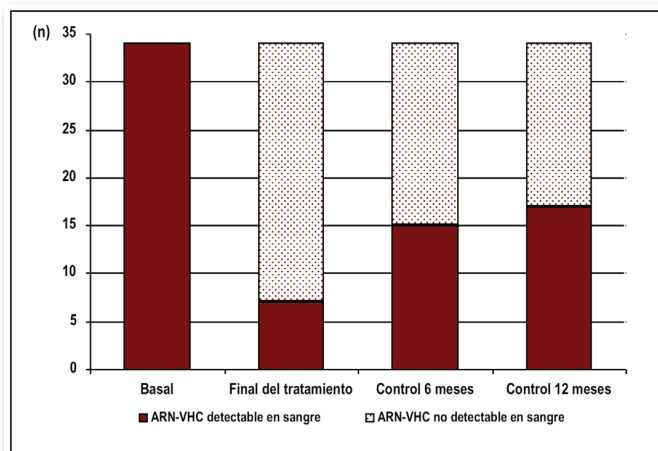
## Aclaramiento del VHC en sangre

La tasa de respuesta al finalizar el tratamiento (RVF) fue del 79,4%, ya que sólo se detectó ARN-VHC en 7 de los 34 pacientes del grupo de estudio. La tasa de respuesta sostenida (RVS) a los 6 meses de acabar el tratamiento descendió al 55,8% (19 de 34). En el control posterior efectuado a los 12 meses de finalizar el tratamiento se detectaron 2 recaídas, por lo que 17 pacientes (50%) mantuvieron criterios de respuesta favorable (Figura 10).

A los 5 años de finalizar el tratamiento se efectuó un nuevo control serológico: 4 pacientes no acudieron a la revisión, 4 había fallecido y el virus resultó indetectable en 17 de los 26 restantes (65,3%). Considerando que en los 4 fallecidos había fracasado el tratamiento, podríamos estimar que el 56,6% de

los pacientes (17 de 30, incluidos los éxitos) mantenían una respuesta viral favorable a largo plazo (Tabla 10).

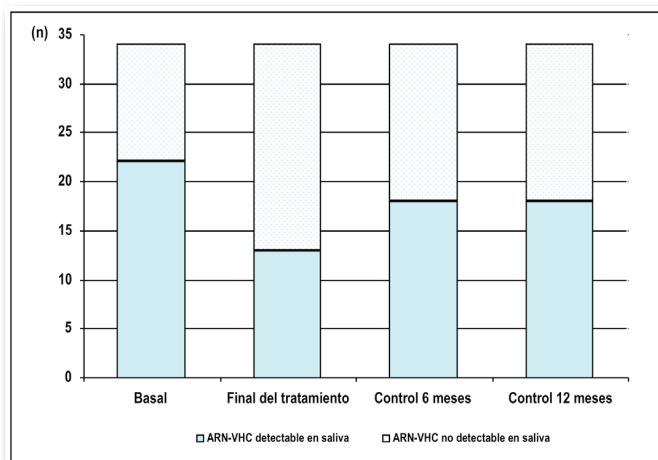
► **Figura 10.** Presencia del VHC en sangre de pacientes coinfectados (VIH-VHC)



## Aclaramiento del VHC en saliva

Al iniciar el tratamiento, 22 de los 34 pacientes (65%) tenían ARN-VHC detectable en saliva. Al finalizar la terapia el virus estaba presente en las muestras salivales de 13 pacientes (38,2%). A los 6 y 12 meses de seguimiento se detectó ARN viral en el 52,9% de las muestras salivales recogidas (18 pacientes) (Figura 11 y Tabla 10).

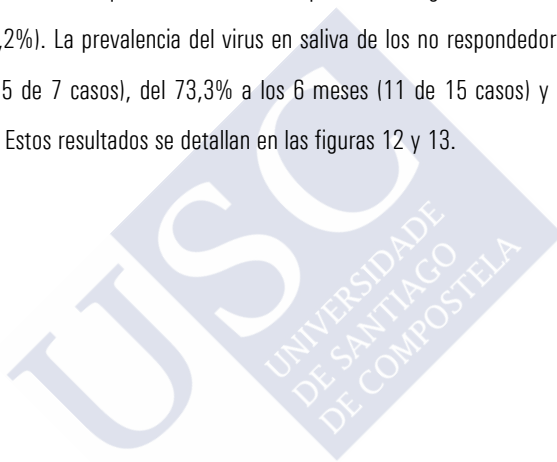
► **Figura 11.** Presencia del VHC en saliva de pacientes coinfectados (VIH-VHC)



## **Relación entre el aclaramiento del VHC en sangre y su presencia en saliva**

En la tabla 10 se detallan de forma individualizada los datos sobre la presencia de ARN-VHC en sangre y en saliva de los pacientes coinfectados participantes en el estudio.

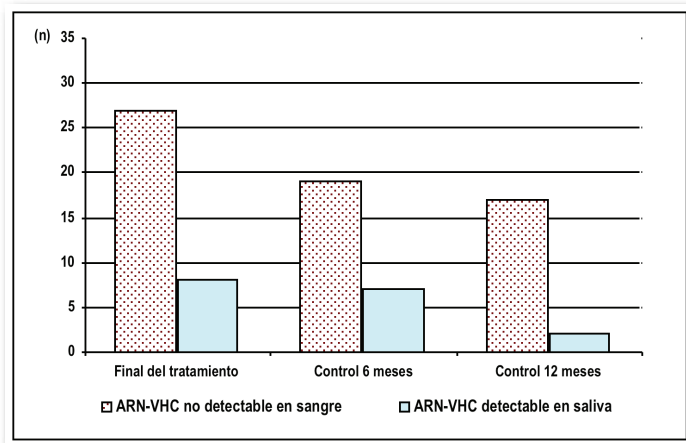
Al analizar la concordancia en los patrones de aclaramiento del VHC en sangre y en saliva observamos que: En el 70,3% de los respondedores (19 de 27 casos), no se detectó ARN-VHC en saliva al finalizar el tratamiento. En el control efectuado 6 meses más tarde, no se constató la presencia del virus en saliva en el 63,1% de los respondedores sostenidos (12 de 19 casos). A los 12 meses de finalizar el tratamiento 15 pacientes de los 17 que mantenían una respuesta serológica favorable no tenían ARN-VHC detectable en saliva (88,2%). La prevalencia del virus en saliva de los no respondedores fue del 71,4% al finalizar el tratamiento (5 de 7 casos), del 73,3% a los 6 meses (11 de 15 casos) y del 94,1% a los 12 meses (16 de 17 casos). Estos resultados se detallan en las figuras 12 y 13.



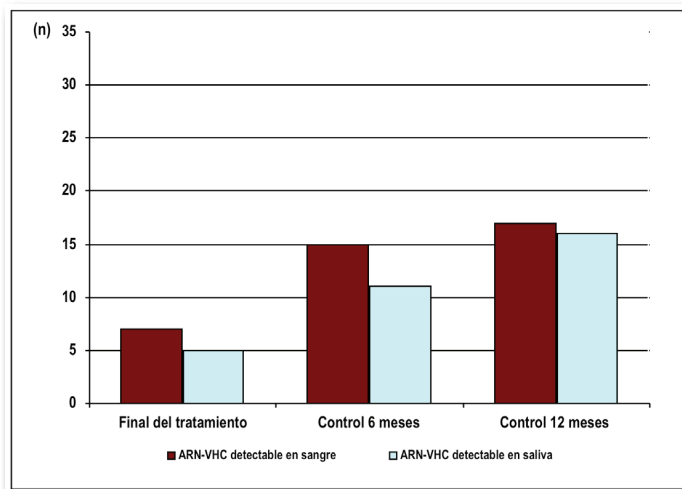
► **Tabla 10.** Datos individualizados sobre la presencia de ARN-VHC en sangre y en saliva de los pacientes coinfectados VIH-VHC participantes en el estudio (n = 34)

PACIENTE	BASAL		FINAL DEL TRATAMIENTO		CONTROL 6 MESES		CONTROL 12 MESES		CONTROL 5 AÑOS
	SANGRE	SALIVA	SANGRE	SALIVA	SANGRE	SALIVA	SANGRE	SALIVA	SANGRE
1	+	+	-	-	-	+	-	-	-
2	+	+	-	+	+	+	+	+	+
3	+	-	-	+	-	+	-	-	-
4	+	-	-	+	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	-	+	+	+
6	+	-	-	-	+	+	+	+	+
7	+	+	-	-	-	+	-	+	-
8	+	-	-	+	-	-	-	-	-
9	+	+	-	+	+	+	+	+	éxito
10	+	-	-	-	-	-	-	+	-
11	+	-	-	-	-	+	-	-	-
12	+	+	-	-	-	-	-	-	perdido
13	+	+	-	+	+	-	+	+	+
14	+	+	-	-	-	-	-	-	-
15	+	+	-	-	+	+	+	+	-
16	+	+	+	+	+	-	+	+	-
17	+	+	-	-	+	+	+	+	+
18	+	+	-	-	-	+	+	+	éxito
19	+	+	-	-	-	-	-	-	perdido
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	+	+	-	-	-	-	-	-	perdido
23	+	+	-	-	+	+	+	+	-
24	+	-	-	+	+	+	+	+	perdido
25	+	-	-	-	-	-	-	-	-
26	+	-	-	-	-	-	-	-	-
27	+	+	-	+	-	-	-	-	-
28	+	+	+	-	+	-	+	-	+
29	+	+	-	-	-	-	-	-	+
30	+	+	-	-	-	+	-	-	-
31	+	+	-	-	-	-	-	-	-
32	+	-	+	-	+	+	+	+	éxito
33	+	-	-	-	-	+	+	+	-
34	+	-	+	+	+	+	+	+	éxito

► **Figura 12.** Presencia del VHC en saliva de pacientes con ARN-VHC no detectable en sangre



► **Figura 13.** Presencia del VHC en saliva de pacientes con ARN-VHC detectable en sangre



## Factores condicionantes de la presencia del VHC en saliva

- *Final del tratamiento*

La detección del VHC en la saliva de los pacientes coinfectados no estaba condicionada por la edad, el sexo, ni ninguna de las variables analizadas en relación a la infección por VIH: conducta de riesgo

para la adquisición del VIH, tiempo transcurrido desde el diagnóstico de infección por VIH, recuento de linfocitos T CD4+ nadir y al inicio del tratamiento, estadio clínico, viremia VIH y terapia antirretroviral.

Ninguna de las siguientes variables de hepatitis se relacionó con la presencia del VHC en saliva al finalizar el tratamiento con interferón-ribavirina (Tabla 11): viremia VHC basal, genotipo viral, presencia del VHC en sangre al acabar el tratamiento, a los 6 y a los 12 meses post-tratamiento, duración del tratamiento, niveles de GPT, antecedentes de hepatitis B y presencia del VHC en saliva basal.

► **Tabla 11.** Relación entre las variables de hepatitis y la presencia del VHC en saliva al finalizar el tratamiento con interferón-ribavirina

	TEST ESTADÍSTICO	VALOR DE "p"	ODDS RATIO (INTERVALO DE CONFIANZA AL 95%)
<b>Viremia VHC basal</b>	Regresión logística	0,55	1,00 (0,99-1,00)
<b>Genotipo viral</b>	Chi-cuadrado	0,23	
<b>Detección del VHC en sangre al final del tratamiento</b>	Fisher	0,17	4,03 (0,48-52,46)
<b>Duración del tratamiento con interferón-ribavirina</b>	Chi-cuadrado	0,64	
<b>Niveles de GPT</b>	Regresión logística	0,29	1,00 (0,99-1,01)
<b>Antecedentes de hepatitis B</b>	Fisher	0,13	3,58 (0,68-21,19)
<b>Presencia del VHC en saliva basal</b>	Fisher	1,00	0,81 (0,15-4,38)

- *A los 6 meses de finalizar el tratamiento*

Al igual que ocurrió al finalizar el tratamiento anti-VHC, la presencia de ARN-VHC en saliva en el control efectuado 6 meses más tarde, no estuvo condicionada por ninguno de los factores analizados de la infección por VIH.

Con respecto a las variables de hepatitis, la presencia del virus en saliva se relacionó de forma estadísticamente significativa con la detección del VHC en sangre a los 6 meses de finalizar el tratamiento ( $p = 0,0454$ ) y con los niveles de GPT ( $p = 0,0147$ ), aunque este último hallazgo pierde validez en base a los valores del Odds Ratio (Tabla 12).

► **Tabla 12.** Relación entre las variables de hepatitis y la presencia del VHC en saliva a los 6 meses de finalizar el tratamiento con interferón-ribavirina

	<b>TEST ESTADÍSTICO</b>	<b>VALOR DE "p"</b>	<b>ODDS RATIO (INTERVALO DE CONFIANZA AL 95%)</b>
<b>Viremia VHC basal</b>	Regresión logística	0,55	1,00 (0,99-1,00)
<b>Genotipo viral</b>	Chi-cuadrado	0,60	
<b>Detección del VHC en sangre al final del tratamiento</b>	Fisher	0,87	0,87 (0,09-7,68)
<b>Detección del VHC en sangre a los 6 meses de finalizar el tratamiento</b>	Fisher	0,04	4,48 (0,88-27,49)
<b>Duración del tratamiento con interferón-ribavirina</b>	Chi-cuadrado	0,34	
<b>Niveles de GPT</b>	Regresión logística	0,01	0,98 (0,96-0,99)
<b>Antecedentes de hepatitis B</b>	Fisher	1,00	0,84 (0,16-4,28)
<b>Presencia del VHC en saliva basal</b>	Fisher	0,72	0,72 (0,13-3,64)

- *A los 12 meses de finalizar el tratamiento*

Ni la edad, ni el sexo, ni las variables de la infección por VIH, condicionaron de forma estadísticamente significativa la presencia del VHC en saliva, a los 12 meses de finalizar el tratamiento con interferón-ribavirina.

Al analizar las variables de hepatitis, comprobamos que la presencia del virus en saliva se relacionó de forma estadísticamente significativa con la detección del VHC en sangre a los 6 meses y a los 12 meses de finalizar el tratamiento ( $p < 0,001$  en ambos casos) (Tabla 13).

► **Tabla 13.** Relación entre las variables de hepatitis y la presencia del VHC en saliva a los 12 meses de finalizar el tratamiento con interferón-ribavirina

	TEST ESTADÍSTICO	VALOR DE "p"	ODDS RATIO (INTERVALO DE CONFIANZA AL 95%)
<b>Viremia VHC basal</b>	Regresión logística	0,41	1,00 (0,99-1,00)
<b>Genotipo viral</b>	Chi-cuadrado	0,99	
<b>Viremia VHC al final del tratamiento</b>	Fisher	0,18	5,51 (0,51-290,18)
<b>Detección del VHC en sangre a los 6 meses de finalizar el tratamiento</b>	Fisher	< 0,001	44,22 (4,55-2320,56)
<b>Detección del VHC en sangre a los 12 meses de finalizar el tratamiento</b>	Fisher	< 0,001	88,83 (7,95-5096,73)
<b>Duración del tratamiento con interferón-ribavirina</b>	Chi-cuadrado	0,24	
<b>Niveles de GPT</b>	Regresión logística	0,09	0,99 (0,79-17,41)
<b>Antecedentes de hepatitis B</b>	Fisher	1,00	0,83 (0,16-4,28)
<b>Presencia del VHC en saliva basal</b>	Fisher	1,00	1,19 (0,23-6,14)

## Valor predictivo de la presencia de VHC en saliva

La detección de VHC en saliva basal no permite intuir la respuesta al tratamiento con interferón-ribavirina en términos de aclaramiento viral en sangre. Existe una correlación estadísticamente significativa entre la presencia del VHC en saliva al finalizar el tratamiento y en sangre 6 meses más tarde ( $p = 0,03$ ), aunque esta correspondencia desaparece en los controles posteriores. La presencia del VHC en saliva a los 6 meses de finalizar el tratamiento está relacionada con su detección en sangre a los 12 meses ( $p = 0,01$ ). No se observó ninguna relación estadísticamente significativa entre la detección del virus en saliva en ninguna de las determinaciones efectuadas y su presencia en sangre a los 5 años. Estos resultados se detallan en la tabla 14.

► **Tabla 14.** Relación entre la presencia del VHC en saliva y la respuesta al tratamiento con interferón-ribavirina en términos de aclaramiento viral en sangre (test de Fisher)

	<b>DETECCIÓN DEL VHC EN SANGRE AL FINALIZAR EL TRATAMIENTO</b>	<b>DETECCIÓN DEL VHC EN SANGRE A LOS 6 MESES DE FINALIZAR EL TRATAMIENTO</b>	<b>DETECCIÓN DEL VHC EN SANGRE A LOS 12 MESES DE FINALIZAR EL TRATAMIENTO</b>	<b>DETECCIÓN DEL VHC EN SANGRE A LOS 5 AÑOS DE FINALIZAR EL TRATAMIENTO</b>
<b>Presencia del VHC en saliva basal</b>	p = 1,00 OR = 1,45 (0,19-17,99)	p = 0,47 OR = 1,95 (0,38-11,69)	p = 0,72 OR = 1,51 (0,29-8,29)	p = 0,10 OR = 6,85 (0,69-353,60)
<b>Presencia del VHC en saliva al finalizar el tratamiento</b>		p = 0,03 OR = 5,31 (1,00-34,02)	p = 0,07 OR = 3,98 (0,76-24,89)	p = 0,41 OR = 2,42 (0,38-16,70)
<b>Presencia del VHC en saliva a los 6 meses de finalizar el tratamiento</b>			p = 0,01 OR = 6,71 (1,25-44,90)	p = 1,00 OR = 0,93 (0,14-6,21)
<b>Presencia del VHC en saliva a los 12 meses de finalizar el tratamiento</b>				p = 0,22 OR = 3,68 (0,52-44,55)

## Concordancia entre la presencia/ausencia del VHC en sangre y en saliva

Al analizar en el conjunto del grupo de estudio la concordancia entre sangre y saliva en términos de presencia/ausencia de VHC detectable, observamos que ésta aumenta progresivamente a los largo del tiempo (Tabla 15), alcanzando su máximo valor en el control analítico efectuado 12 meses después de finalizar el tratamiento (OR = 112,51).

► **Tabla 15.** Estudio global de concordancia entre sangre y saliva, en términos de presencia/ausencia de VHC detectable

	<b>ODDS RATIO</b>	<b>VALOR DE "p"</b>
<b>Fin de tratamiento</b>	5,63	0,066
<b>6 meses post-tratamiento</b>	5,50	0,027
<b>12 meses post-tratamiento</b>	112,51	<0,001
<b>DIFERENCIAS ENTRE LOS DIFERENTES TIEMPOS DE CONTROL ANALÍTICO</b>		
	<b>FIN DE TRATAMIENTO</b>	<b>6 MESES POST-TRATAMIENTO</b>
<b>Fin de tratamiento</b>	---	---
<b>6 meses post-tratamiento</b>	p = 0,985	---
<b>12 meses post-tratamiento</b>	p = 0,059	p = 0,043







5

Discusión



## 5.1. Técnicas de detección de ARN-VHC mediante PCR

### Técnicas de PCR para la detección del VHC en sangre

La utilización de marcadores moleculares como el ARN-VHC es esencial para el manejo de los pacientes infectados por el VHC, ya que representan indicadores directos de la replicación viral y permiten su cuantificación. Las principales aplicaciones de estos marcadores en la práctica clínica son el diagnóstico de la infección activa, la indicación de la terapia antiviral y la monitorización de la respuesta al tratamiento. En consecuencia, tal y como se recoge en diferentes recomendaciones y guías terapéuticas, el manejo de la infección por el VHC se basa primordialmente en la cuantificación de la carga viral antes, durante y después del tratamiento (Davis, 2002; Berg et al, 2003; Ghany et al, 2009). La detección del ARN viral se realiza mediante pruebas de amplificación genómica, cuya positividad indica presencia de virus circulante y confirma infección en curso, aguda o crónica; su negatividad en una muestra puntual no permite descartar la infección crónica, ya que la viremia tiene en ocasiones carácter intermitente.

La respuesta al tratamiento antiviral se evalúa determinando una carga viral basal (pre-tratamiento), y al menos una carga viral al término de éste y a las 24 semanas post-tratamiento. Se considera una buena respuesta si se obtiene una carga viral indetectable al término del tratamiento, y una carga viral indetectable y/o ARN cualitativo negativo a las 24 semanas (respuesta viral sostenida). Adicionalmente, se ha establecido que una caída igual o superior a 2 log de la carga viral a las 4 ó 12 semanas de tratamiento (respuesta viral precoz), permite predecir la probabilidad de obtener una respuesta virológica sostenida al término de la terapia. En el presente estudio, la decisión de recoger muestras de sangre y saliva a los 12 meses de finalizar el tratamiento, se tomó en base a los resultados obtenidos en una investigación previa en pacientes mono infectados, en los que se observó un retraso en el aclaramiento del VHC en la saliva con respecto al suero (Diz et al, 2005).

Debido a la escasa concentración de virus circulante, la detección y cuantificación del ARN-VHC requiere del uso de técnicas moleculares para su amplificación. A este respecto, lo ideal es disponer de un ensayo que sea sensible, específico, reproducible y que tenga un amplio intervalo dinámico de cuantificación, para que cubra todas las posibles situaciones clínicas. Se han desarrollado algunos sistemas

para poder realizar una cuantificación aproximada de la viremia y existe un estándar internacional de ARN-VHC, cuantificado en Unidades Internacionales, que ha permitido unificar los criterios de expresión de resultados. Aunque se ha contrastado la fiabilidad de numerosas técnicas, es aconsejable utilizar siempre el mismo método para el seguimiento individual de cada paciente, y no utilizar factores de corrección para equiparar las unidades de medición. Por otra parte, dado que todos estos métodos se basan en la acumulación exponencial de productos amplificados/señales, los números absolutos expresados en ellos son referenciales y la evaluación de una caída significativa de la carga viral debe evaluarse siempre en función de la diferencia en logaritmos en base 10.

Los métodos de cuantificación de la carga viral del VHC disponibles comercialmente, se fundamentan en dos técnicas de biología molecular basadas en la amplificación de la señal por hibridación molecular (bDNA, del inglés *branched DNA*) y en la amplificación de la secuencia diana por PCR de transcripción reversa (PCR-TR) competitiva cuantitativa y PCR-TR a tiempo real.

El sistema Cobas AmpliC<sup>®</sup> fue el primer ensayo semiautomatizado desarrollado para determinar la carga viral del VHC por PCR-TR. Aunque es un ensayo muy reproducible, tiene una escasa sensibilidad (rango dinámico 600-850.000 UI/ml) y rendimiento, lo que ha motivado su desplazamiento por nuevos métodos de PCR a tiempo real (Pawlotsky, 2002).

El sistema Versant<sup>®</sup> HCV-RNA v3.0 Assay se caracteriza, fundamentalmente, por su reproducibilidad, que es mayor que la de los métodos de PCR a tiempo real, aunque presenta un grado de automatización y rendimiento intermedios, debido a su largo período de incubación (Schutten et al, 2008; Vermehren et al, 2008). Su principal inconveniente es un límite inferior de cuantificación de 615 UI/ml, significativamente mayor que el de otros sistemas; para paliar este defecto, el mismo fabricante promovió la comercialización de un ensayo de PCR a tiempo real (Versant<sup>®</sup> HCV RNA 1.0 Assay kPCR).

El sistema Cobas AmpliPrep<sup>®</sup>/Cobas<sup>®</sup> TaqMan HCV, integrado en la plataforma modular Docking Station<sup>®</sup>, es el primer sistema basado en PCR a tiempo real que está totalmente automatizado. Se caracteriza por un límite de detección bajo (rango 30-200.000.000 UI/ml), un elevado rendimiento y por no necesitar de personal especializado para su manejo (Schutten et al, 2008; Vermehren et al, 2008). La cuantificación viral del VHC por este método es la más utilizada en nuestro entorno, tal y como reflejan los

estudios realizados en el seno de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Caliendo et al, 2006; Orta et al, 2007; Orta et al, 2008). Sin embargo, este ensayo presenta dos aspectos críticos: una sobrestimación en los niveles de ARN-VHC, que parece acentuarse en muestras con cargas virales elevadas (Davis, 2000), y una subestimación de la carga viral para los genotipos 2 y 4 (Caliendo et al, 2006; Colson et al, 2006; Sarrazin et al, 2006; Chevaliez et al, 2007; Sizmann et al, 2007; Tuailon et al, 2007).

Por último, el sistema Abbott RealTime HCV Assay<sup>®</sup> es otro método de PCR a tiempo real disponible en la actualidad, que también se caracteriza por un límite de detección bajo (rango 12-100.000.000 UI/ml), y por un rendimiento y grado de automatización intermedios, a los que añade su elevada precisión para cuantificar los diferentes genotipos virales. No obstante, las posibilidades de contaminación aumentan al trabajar con tubos abiertos (Pyne et al, 2009) y exige personal cualificado para su manejo (Vermehren et al, 2008).

Todos estos sistemas tiene una debilidad metodológica común, la extracción de los ácidos nucleicos, aunque este problema se palia mediante sistemas de extracción automatizados, que minimizan considerablemente el riesgo de contaminación.

Con la introducción de la PCR a tiempo real en la determinación de la carga viral del VHC, el protagonismo que ejercía el intervalo dinámico ha dado paso al de la influencia del genotipo viral. Desde un principio, los genotipos del VHC han condicionado los resultados obtenidos con los ensayos comerciales de cuantificación viral (Mellors et al, 1999). Diversos estudios han demostrado la existencia de diferencias significativas en los valores obtenidos con las distintas técnicas, resultando esta cuantificación sustancialmente subestimada para los genotipos 1 y 3 en el ensayo de amplificación de la señal de hibridación (Caliendo et al, 2006; Colson et al, 2006; Sarrazin et al, 2006), y para los genotipos 2, 3 y 4 en los formatos de tiempo real con sondas TaqMan (Caliendo et al, 2006; Colson et al, 2006; Sarrazin et al, 2006; Chevaliez et al, 2007; Sizmann et al, 2007; Tuailon et al, 2007). La existencia de polimorfismos en las regiones del genoma que se utilizan como dianas para los cebadores y sondas empleados en las diferentes técnicas moleculares, puede dar lugar a alteraciones significativas en el procesamiento técnico y, en consecuencia, comprometer la cuantificación de la carga viral (Tuailon et al, 2007). También se ha sugerido que otro factor condicionante puede ser la utilización exclusiva de paneles del genotipo 1 para la

estandarización de los ensayos de carga viral del VHC en Unidades Internacionales (Sarrazin et al, 2006). En consecuencia, si la cuantificación del ARN-VHC es genotipo-dependiente, los valores umbrales establecidos pueden no ser equivalentes para todos los genotipos, lo que podría en algunos casos acarrear decisiones erróneas en la monitorización terapéutica.

## Adaptación de la técnica de PCR para la detección del VHC en saliva

La amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR ha permitido superar la escasa sensibilidad de las pruebas de hibridación *in situ* (Wolk et al, 2001). El Amplicor® HCV 2.0 (Roche Diagnostics, Barcelona, España) es un test de PCR automatizado para detección cualitativa (indica resultados positivos o negativos) de ARN-VHC en suero. Debido a que los métodos de PCR automatizados carecen de homologación para analizar saliva, en el presente estudio se optó por un test de PCR procesada en laboratorio para la detección de ARN-VHC salival.

Entre las modificaciones incorporadas a la técnica de PCR convencional, se utilizó el método de la PCR anidada (nested-PCR), en la cual se realiza una doble amplificación. Tras completar una primera amplificación, los productos de la reacción se reamplifican utilizando nuevos cebadores que hibridan a los iniciales, mejorando la sensibilidad y la especificidad de la técnica (Wolk et al, 2001).

La validez de las pruebas de detección en microbiología molecular está condicionada por el límite de sensibilidad o límite inferior de detección, es decir, la mínima concentración de microorganismos detectable -de forma reproducible- mediante la técnica analítica utilizada (Wolk et al, 2001). El método de RT-PCR aplicado alcanzó una sensibilidad de 10 moléculas de ARN-VHC/ml. Además, es imperativo que el diseño del test incluya un número suficiente de controles negativos (superior al 20% de las muestras), que son procesados junto a las muestras y a los controles positivos, para garantizar que no exista ningún tipo de contaminación en el laboratorio (Wolk et al, 2001).

Una característica importante del ARN relacionada con su manipulación en el laboratorio es su elevada inestabilidad. La molécula de ribosa que constituye el ARN posee un grupo OH<sup>-</sup> altamente reactivo, y los contaminantes externos incluyen enzimas con actividad ribonucleasa (ARNasa). Para

minimizar la acción de las ARNasas, las muestras se almacenaron a  $-80^{\circ}$  tras su recogida y hasta el momento de su procesamiento definitivo.

El protocolo de procesamiento, se realizó en las condiciones especiales de aislamiento y asepsia estipuladas:

- Preparación de la mezcla de reacción en cabinas de flujo laminar equipadas con luz ultravioleta.
- Empleo de instrumental específico para amplificación.
- Las soluciones tampón se esterizaron con autoclave y se almacenaron en áreas específicas.
- Los reactivos se descongelaron a  $4^{\circ}$  y se mantuvieron en hielo hasta su paso por el termociclador.

## 5.2. Prevalencia del ARN-VHC en saliva

Al estudiar la dinámica de la secreción del VHC en saliva, se observó que ésta no se producía de forma continua (Wang et al, 2003), lo cual debe tenerse en cuenta al evaluar los resultados de los estudios de prevalencia del VHC en muestras salivales, ya que ésta probablemente está a menudo infraestimada.

Suzuki et al (Suzuki et al, 2005), encontraron que en un importante porcentaje de pacientes mono infectados que no tenían ARN-VHC en saliva, éste era detectable en el fluido gingival crevicular, por lo que sugirieron que ésta podía representar una de las principales vías de acceso del virus para contaminar la saliva; sin embargo, estos resultados son cuestionables, ya que más de la mitad de los pacientes de la serie presentaban periodontitis u otras enfermedades orales, por lo que el ARN viral detectado podría provenir de alguna fracción celular derivada del sangrado o del infiltrado linfocitario asociado a la inflamación periodontal.

En algunos estudios, la prevalencia del virus en la saliva de los pacientes coinfectados VIH-VHC fue ligeramente superior a la de los mono infectados (Chen et al, 1995). Otros autores, por el contrario, describieron una prevalencia levemente inferior en los pacientes coinfectados (Mariette et al, 1995; Roy et

al, 1996; Roy et al, 1998). La baja frecuencia de detección de partículas de ARN-VHC salival encontrada por Rey et al (Rey et al, 2001) en una serie importante de 59 pacientes coinfectados, probablemente expresa la limitada sensibilidad de la técnica de PCR aplicada. La literatura disponible sobre la presencia de partículas virales ARN-VHC en la saliva de los pacientes coinfectados es escasa, metodológicamente heterogénea y habitualmente se limita a series muy pequeñas (Tabla 16). Los resultados del presente trabajo confirman que no existen diferencias significativas en la prevalencia de ARN-VHC en la saliva de los pacientes coinfectados VHC-VIH y de los mono infectados VHC.

Coincidiendo con otros autores (Cribier et al, 1995; Cribier et al, 1996; Cribier et al, 1997; Filippini et al, 2000; Mohsen et al, 2002; Mathews y Bhagani, 2003; Cadafalch et al, 2004; Laskus et al, 2004), la viremia del VHC en los pacientes coinfectados era más alta que en los mono infectados, presumiblemente debido a que el VIH potencia la replicación del VHC en sangre y a que la vida media del virión VHC es mayor en los pacientes coinfectados (Torriani et al, 2003). Al restaurarse la inmunocompetencia en los pacientes tratados con TARGA también se incrementa la viremia del VHC, probablemente como expresión de una mayor destrucción de hepatocitos infectados.

Al igual que otros autores (Wang et al, 1992; Numata et al, 1993; Mariette et al, 1995; Caldwell et al, 1996; Heintges y Wands, 1997; Fabris et al, 1999; Maticic et al, 2001; Hermida et al, 2002; Pastore et al, 2006), en los pacientes mono infectados de la presente serie, encontramos una relación directa entre la carga viral en sangre y la presencia del virus VHC en saliva. Este hallazgo, permite sugerir una posible transferencia de partículas virales desde el torrente circulatorio a la saliva, a través de lesiones en la mucosa, por enfermedad periodontal o por gradiente de concentración desde el surco gingival. Sin embargo, deberían contemplarse otras rutas de contaminación salival, ya que también se ha aislado ARN-VHC en la saliva de pacientes edéntulos (Roy et al, 1998). En este sentido, se ha propuesto que las partículas virales aisladas en saliva podían provenir de las glándulas salivales (Roy et al, 1998) y se ha confirmado la replicación intraglandular del virus (Arrieta et al, 2001; Carozo et al, 2002), lo que podría justificar por qué ocasionalmente en algunos pacientes el VHC es detectable en saliva pero paradójicamente no lo es en sangre (Harle et al, 1993; Nagao et al, 2000).

Rey et al (Rey et al, 2001) estudiaron simultáneamente la carga viral del VHC en sangre y saliva en un colectivo de pacientes coinfectados, sin encontrar una relación significativa entre ellas. En el presente trabajo, la presencia de ARN-VHC en la saliva de los pacientes coinfectados no se relacionó con la carga viral sérica. Al seleccionar a los pacientes mono infectados con las viremias más elevadas ( $>1 \times 10^6$  UI/ml) la prevalencia del VHC en la saliva aumentaba hasta un 83%, mientras que, entre los pacientes coinfectados, permanecía en torno al 65%, independientemente del valor de la viremia. Hipotéticamente, la afluencia de partículas ARN-VHC a las glándulas salivales desde el torrente circulatorio podría incrementarse en los pacientes coinfectados, por la capacidad del VIH para aumentar la susceptibilidad de macrófagos y monocitos al VHC (Laskus et al, 2004), pero se ha demostrado que no existe relación alguna entre la presencia de ARN-VHC en las células mononucleares de la sangre periférica y en la saliva (Young et al, 1993). La infección por VIH produce, ya desde sus fases iniciales, una alteración de las glándulas salivales (Lin et al, 2003), y en consecuencia, la replicación del VHC en el interior de las mismas, podría estar alterada en los pacientes coinfectados. Navazesh et al (Navazesh et al, 2003) relacionaron esta hipofunción glandular con la administración de TARGA y con un recuento bajo de linfocitos T CD4+. Por último, la presencia de partículas ARN-VHC en saliva también podría estar condicionada por la expresión y la actividad de proteínas asociadas a la mucosa endógena, tales como el inhibidor de la secreción salival de la proteasa leucocitaria (Lin et al, 2004; Chattopadhyay et al, 2004), aunque no se ha demostrado que tengan actividad viricida frente al VHC.

En los pacientes mono infectados de la presente serie, el genotipo viral se relacionó con la detección del virus en saliva, especialmente el genotipo 3. Pastore et al (Pastore et al, 2006) también describieron una relación significativa entre el genotipo del VHC y su presencia en saliva, pero paradójicamente afirmaron que el genotipo 3a no pasaba a la saliva, por lo que esta controversia debería ser objeto de futuras investigaciones.

► **Tabla 16.** Prevalencia de ARN-VHC en saliva de pacientes coinfectados (VIH-VHC) y en controles mono infectados VHC

AUTOR, AÑO	PACIENTES VHC	PACIENTES VIH-VHC	CONDICIÓN DE RIESGO	PREVALENCIA DE ARN-VHC EN SALIVA DE MONOINFECTADOS	PREVALENCIA DE ARN-VHC EN SALIVA DE COINFECTADOS
<b>Chen et al, 1995</b>	14	9	-	2 (14,3%)	2 (22,2%)
<b>Mariette et al, 1995</b>	15	13	-	10 (66,6%)	7 (53,8%)
<b>Roy et al, 1996</b>	15	6	Hemofilia	8 (53,3%)	2 (33,3%)
<b>Roy et al, 1998</b>	14	19	Drogadicción	9 (64,2%)	10 (52,6%)
<b>Rey et al, 2001</b>	---	59	Drogadicción Heterosexual Homosexual Hemoderivados	---	23 (37,3%)
<b>Presente serie (estudio prevalencia)</b>	75	75	Drogadicción Heterosexual Hemoderivados	39 (52%)	49 (65,3%)
<b>Presente serie (estudio aclaramiento)</b>	-	34	Drogadicción Heterosexual Hemoderivados	---	22 (64,7%)

### 5.3. Aclaramiento del ARN-VHC en sangre

Aunque los protocolos terapéuticos basados exclusivamente en el interferón ya no representan el procedimiento estándar de tratamiento del VHC, los estudios en los que se han aplicado proporcionaron información muy útil en términos de tolerabilidad, interacciones medicamentosas, complicaciones, y relación entre el recuento de linfocitos T CD4+ y la tasa de respuesta al tratamiento. Además, la monoterapia con interferón ha demostrado beneficios a nivel histológico, en pacientes coinfectados que no toleraron la terapia combinada con ribavirina por problemas de toxicidad debidos a interacciones medicamentosas. Los resultados de los estudios sobre el tratamiento de la mono infección por VHC, apuntaban a un aumento en la eficacia de la terapia con la incorporación de la ribavirina. Para diseñar el presente estudio, se siguieron las directrices para el tratamiento del VHC propuestas por la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (EASL, 1999); se implementaron las recomendaciones dirigidas a los

monoinfectados, ya que en aquel momento todavía no existían pautas específicas para los pacientes coinfectados. Se prescribió interferón en su forma pegilada combinado con ribavirina; como la dosis de esta última no estaba bien definida en los casos de coinfección, se decidió administrarla en función del peso del paciente, siguiendo las indicaciones vigentes en el momento de diseñar el estudio (Soriano et al, 2002); la duración propuesta del tratamiento fue de 6 meses para los genotipos 2 y 3, y de 12 meses para el genotipo 1.

Posteriormente, en 2004 y 2007, se publicaron extensos ensayos clínicos llevados a cabo en población coinfectada (APRICOT, ACTG 5071, RIBAVIC y PRESCO), en los que se evidenció que los resultados mejoraban al emplear el interferón en su forma pegilada frente a la estándar (Tabla 17), ya que la pegilación aceleraba la absorción del fármaco, facilitaba su metabolización y prolongaba su vida media, reduciendo la prescripción a una única dosis semanal. En estudios ulteriores, se comprobó que no sólo era importante administrar dosis adecuadas de interferón, sino que también tenía relevancia el tipo de PEG-IFN utilizado, ya que el derivado  $\alpha$ -2a (en cadenas ramificadas y con un peso medio de 40 kd) parece resultar más eficaz que el  $\alpha$ -2b (una cadena lineal única y un peso medio de 12 kd), en base a sus diferencias farmacocinéticas (Vispo et al, 2008; Awad et al, 2010; Foster, 2010).

En el estudio ACTG (AIDS Clinical Trials Group) A5071 se reclutaron 133 pacientes de diferentes centros de Estados Unidos, a los que se trató con dosis fijas de 180  $\mu$ g/semana de PEG-IFN  $\alpha$ -2a y con dosis progresivas de ribavirina, que comenzaron en 600 mg/día y se incrementaron hasta 1.000 mg/día, según la tolerancia. El 77% de los pacientes eran portadores del genotipo 1, que presumiblemente conlleva una peor tasa de respuesta al interferón. La respuesta al final del tratamiento (RFT) se alcanzó en el 41% de los pacientes, pero la respuesta virológica sostenida (RVS) sólo se obtuvo en el 27% de los casos (14% con genotipo 1 y 73% en el resto de genotipos) (Chung et al, 2004).

El RIBAVIC fue un ensayo multicéntrico francés en el que se evaluaron pacientes coinfectados tratados con dosis de PEG-IFN  $\alpha$ -2b ajustadas al peso (1,5  $\mu$ g/kg/semana) y con dosis fijas de ribavirina de 800 mg/día. La RVS fue del 27%, al igual que en el estudio americano previo, pero la proporción de genotipos 2 y 3 con RVS fue menor. Además, el grado de abandonos fue más elevado (38%), debido principalmente a los efectos secundarios de la medicación (Carrat et al, 2004).

► **Tabla 17.** Principales ensayos clínicos de tratamiento con interferón pegilado y ribavirina en pacientes coinfectados VIH-VHC

	<b>APRICOT</b> Torriani et al, 2004	<b>ACTG 5071</b> Chung et al, 2004	<b>RIBAVIC</b> Carrat et al, 2004	<b>BARCELONA</b> Ilaguno et al, 2004a	<b>PRESCO</b> Núñez et al, 2007	<b>PRESENTE</b> <b>SERIE</b>
<b>Participantes (n)</b>	868	133	412	95	389	34
<b>Área geográfica</b>	Internacional	EE.UU.	Francia	España	España	España
<b>Peginterferón dosis (µg/semana)</b>	PEG-IFN α-2a 180	PEG-IFN α-2a 180	PEG-IFN α-2b 1,5 µg/kg	PEG-IFN α-2b 100-150	PEG-IFN α-2a 180 µg	PEG-IFN α-2a 180 µg
<b>Ribavirina dosis (mg/día)</b>	800	600-800-1000 progresiva	800	600-1200	1000 <75kg 1200 >75kg	1000 <75kg 1200 >75kg
<b>Edad (años)</b>	39,7	45	39,5	40	40	41
<b>Género masculino (%)</b>	80	79	77	63	69,7	76
<b>Duración (semanas)</b>	48	48	48	48	48 ó 72	24 ó 48 según genotipo
<b>Raza blanca (%)</b>	79	33	93	100	100	100
<b>Viremia VIH indetectable (%)</b>	60	60	67	70	71,5	64
<b>Recuento medio de CD4 (cels/µl)</b>	530	474	482	570	510 todos >300	690 todos >200
<b>Con TARGA (%)</b>	84	86	83	88	80,3	68
<b>Viremia elevada en UI/ml (% de pacientes)</b>	>8 x10 <sup>5</sup> (72)	>10 <sup>6</sup> (83)	>5 x10 <sup>5</sup> (65)	>8 x10 <sup>5</sup> (47)	>8 x10 <sup>5</sup> (66,6)	>10 <sup>6</sup> (44,4)
<b>Genotipo 1 (%)</b>	61	77	59	55	49	50
<b>Fibrosis severa/cirrosis (%)</b>	12	11	39	30	27	-
<b>Respuesta viral sostenida (%)</b>	<b>Total</b>	40	27	27	44	56
	<b>Genotipo 1</b>	29	14	-	-	35,6
	<b>Genotipo 1 y 4</b>	-	-	17	38	35
	<b>Genotipo 4</b>	-	-	-	-	32,6
	<b>Genotipo 2 y 3</b>	62	73	44	53	72,4

El APRICOT es el mayor ensayo terapéutico publicado hasta la fecha en individuos coinfectados. Los pacientes recibieron al menos una dosis de PEG-IFN α-2a de 180 µg/semana y 800 mg/día de ribavirina. Una diferencia sustancial con los dos trabajos anteriores es que en éste se incluyeron pacientes de diferentes países y continentes, y hasta el 60% tenían un genotipo que no era el 1. El porcentaje de RVS fue del 40%, aunque no superó el 29% en los genotipos 1. La tasa de abandonos del tratamiento fue del 25%, presumiblemente por que se aplicaron unos criterios de inclusión más estrictos y se realizó una

monitorización exhaustiva. La dosis de ribavirina administrada pudo influir en la tasa de respuesta, más favorable que en el estudio ACTG A5071. Los mejores resultados obtenidos en los genotipos 2 y 3 (RFT = 64% y RVS = 62%) en comparación con el genotipo 1, corroboraron los hallazgos de estudios previos. La escasa proporción de recaídas, justificó el tratamiento durante 48 semanas de los pacientes coinfectados con genotipos 2 y 3 (Soriano et al, 2004c).

La información derivada del estudio PRESCO (Núñez et al, 2007), realizado en España, permitió ajustar las pautas de tratamiento en el colectivo de coinfectados. En este ensayo se incluyeron 389 pacientes que recibieron tratamiento con 180  $\mu$ g/semana de PEG-IFN  $\alpha$ -2a y 1.000-1.200 mg/día de ribavirina. La tasa de RVS fue del 50% (72% para los genotipos 2 y 3, frente al 35% para los genotipos 1 y 4), con un porcentaje de abandonos del 8,2%. Se investigó el beneficio de prolongar el tratamiento hasta 48 semanas para los genotipos 2 y 3, y hasta 72 semanas para los genotipos 1 y 4 (en lugar de 24 y 48 semanas respectivamente). Los resultados confirmaron la mayor eficacia de las dosis más altas de ribavirina en todos los grupos de tratamiento, mientras que la extensión del mismo sólo resultó beneficiosa en algunos subgrupos de pacientes, en virtud de factores como la cinética viral temprana, la viremia inicial y el genotipo viral.

En un estudio reciente llevado a cabo en pacientes coinfectados, se observó que existía una relación estadísticamente significativa entre un descenso de la carga viral de al menos 0,9 log a las 24 horas de comenzar la terapia y una RVS. El valor predictivo negativo para conseguir una RVS fue del 100% y el valor predictivo positivo alcanzó el 71% (Laufer et al, 2011). Este hallazgo podría permitir la optimización del tratamiento en entornos con recursos limitados, y en pacientes con factores pre-tratamiento predictivos de no respuesta o con antecedentes de toxicidad grave.

En la mayoría de los primeros trabajos publicados sobre pacientes coinfectados a los que se administró terapia combinada con PEG-IFN y ribavirina, la tasa definida de RVS osciló entre el 27 y el 44% (Carrat et al, 2004; Chung et al, 2004; Laguno et al, 2004a; Torriani et al, 2004), sensiblemente menor al 50-60% observado en los pacientes mono infectados (Manns et al, 2001; Fried et al, 2002). La información proporcionada por estos estudios permitió conocer mejor los factores que comprometen el éxito de la terapia y que se detallan a continuación:

- Relacionados con el huésped: edad avanzada, sexo femenino, raza negra, índice de masa corporal elevado, resistencia a la insulina, presencia del haplotipo IL28B TT, abuso de polisustancias/alcohol y enfermedad psiquiátrica.
- Relacionados con la infección por VHC: grados de fibrosis más altos, esteatosis favorecida por el alcohol y los antirretrovirales, gradiente de presión hepato-venosa, coexistencia de hepatopatías por otra etiología, niveles elevados de ARN-VHC y genotipo viral 1.

Sin embargo, un factor predictivo favorable de RVS es un valor basal de proteína 10 interferón gamma inducible (IP-10) <400 pg/ml. Los niveles de IP-10 están asociados con la carga viral del VHC, los niveles de GPT, la actividad inflamatoria hepática y el estadio de fibrosis (Reiberger et al, 2008).

- Relacionados con la infección por VIH: recuento bajo de linfocitos T CD4+, viremia VIH elevada y tipo de antirretroviral administrado.

La función renal es un factor importante en la farmacocinética de la ribavirina, especialmente cuando el aclaramiento de creatinina está por debajo de 43 mL/min (Wade et al, 2006). En pacientes infectados por el VIH, en los que el riesgo de afectación renal es mayor debido a la nefropatía asociada al propio virus y al daño causado por algunos antirretrovirales (como indinavir o tenofovir), esta consideración podría ser especialmente relevante (Fabian et al, 2007).

- Relacionados con el tratamiento: dosis subóptima de interferón pegilado y/o ribavirina, duración inadecuada, incumplimiento del tratamiento por problemas de tolerancia y adherencia, cinética de eliminación viral más lenta y recidivas más frecuentes tras finalizar el tratamiento.

Tanto el PEG-IFN como la ribavirina actúan como inmunomoduladores, de modo que la deficiencia inmunológica que provoca la infección por el VIH tiene un impacto negativo sobre su eficacia, incluso en pacientes con una cifra elevada de linfocitos T CD4+ y/o con ARN-VIH indetectable. Por el contrario, los linfocitos T CD8+ efectores intrahepáticos, se asocian al éxito del tratamiento con interferón (Vrolijk et al, 2003). Los ensayos clínicos de fase III SPRINT-2 en pacientes *naive* (*Retreatment with HCV Serine Protease Inhibitor Boceprevir and PegIntron/Rebetol 2*) y RESPOND-2 en pacientes en los que fracasó la

terapia con interferón PEG-IFN y ribavirina (*Serine Protease Inhibitor Therapy-2*), han aportado resultados prometedores; en ambos estudios se administró boceprir, un inhibidor de la proteasa NS3/4A que actúa directamente sobre la replicación del VHC, a diferencia del tratamiento estándar, que intenta potenciar la respuesta inmunitaria natural; estos ensayos han contado con la participación de 1.500 personas con genotipo 1, y al añadir este fármaco a la terapia estándar prácticamente se duplicaba el porcentaje de participantes que alcanzaban una RVS (Chang et al, 2012). Sin embargo, teniendo en cuenta que estos medicamentos se metabolizan por la vía del citocromo P-450, es posible que existan interacciones farmacocinéticas con los antirretrovirales. El boceprir, fue el primero de una serie de moléculas -todavía en fase de investigación- que también tienen una acción directa sobre el VHC, entre las que destaca el TMC435 (Tanwar et al, 2012).

La información proporcionada por los ensayos clínicos, permitió establecer protocolos de tratamiento específicos para los pacientes coinfectados (períodos de tratamiento más largos y dosis de ribavirina en función del peso), y comprender mejor las interacciones medicamentosas y los efectos secundarios de la terapia, reduciendo significativamente la tasa de abandonos (que en algunos estudios suponía hasta un tercio de los pacientes).

Al completar el curso del tratamiento del VHC, los pacientes coinfectados VIH-VHC presentan una tasa de respuesta inicial menor y una tasa de recidiva mayor que los monoinfectados (Torriani et al, 2004). Como el tratamiento es fundamentalmente inmunomodulador, es posible que la disfunción inmune derivada de la infección por VIH represente el principal factor implicado, incluso en estadios tempranos con recuentos de linfocitos T CD4+ relativamente altos. El aclaramiento del VHC parece que se realiza en dos fases: en una etapa temprana se produciría el aclaramiento de los viriones, mientras que la segunda fase, más tardía, correspondería a la destrucción continuada de los hepatocitos infectados. Un enlentecimiento de este proceso en el contexto de la infección por VIH, podría explicar la mayor incidencia de recurrencias tras la supresión inicial de la viremia del VHC observada en algún estudio (Soriano, 2004).

La tasa de respondedores primarios en nuestra serie fue del 79,4%, un porcentaje elevado si se compara con otros estudios realizados en los últimos años, en los que los resultados oscilaron entre el 60 y el 67% (Crespo et al, 2007b; Núñez et al, 2007; Rallon et al, 2011). Este hallazgo, podría explicarse en base a la coexistencia de varios factores favorecedores, como: la administración de dosis de ribavirina

ajustadas al peso del paciente y de PEG-IFN  $\alpha$ -2a (frente a 2b), un grupo de estudio integrado por pacientes con niveles elevados de linfocitos T CD4+, todos de raza blanca, sólo la mitad con genotipo 1, 68% recibiendo TARGA y sólo el 44% con viremias VHC basales elevadas. Además, en el presente estudio, los pacientes en los que no se pudo completar el tratamiento o el seguimiento, no se incorporaron en el análisis de resultados.

En la literatura, los porcentajes de RVS se han ido aproximando progresivamente hasta confluir en torno al 50-55% tanto en coinfectados (Crespo et al, 2007b; Núñez et al, 2007; Rallón et al, 2011) como en mono infectados (Dore et al, 2010; Milan et al, 2011). Esas tasas de RVS coinciden con el 55,8% obtenido en la presente serie. En el colectivo de mono infectados, desglosando los resultados en función del genotipo, encontramos cifras que oscilan entre el 48 y el 84% para el genotipo 1 (Mach et al, 2011; Chen et al, 2010), frente al 75-90% para los genotipos 2 y 3 (Kim et al, 2008; Mecenate et al, 2010). Entre los coinfectados también existen diferencias sustanciales, con valores del 31-45% en genotipos 1 y 4 (Van den Eynde et al, 2010), y alrededor del 70% en los genotipos 2 y 3 (Crespo et al, 2007b; Núñez et al, 2007). En los pacientes con genotipo 1 también registramos un descenso importante en la tasa de aclaramiento viral (82% de RFT frente a 59% de RVS), pero este resultado se justifica en base al pobre pronóstico de este genotipo *per se*. En este sentido, se ha propuesto un modelo para estimar la probabilidad de obtener una respuesta favorable al tratamiento en base a 4 parámetros no invasivos, dos dependientes del huésped como son el IL28B SNP rs12979860 y la fibrosis hepática, y dos relacionados con el VHC, el genotipo y la carga viral basal (Medrano et al, 2010).

Otro factor que podría explicar la menor eficacia del tratamiento y la mayor incidencia de recaídas en el colectivo coinfectado, es el patrón dinámico de la población viral del VHC, que favorece el desarrollo de infecciones mixtas -en las que coexisten diferentes genotipos virales-. En un estudio reciente en el que se analizó la dinámica temporal de las cepas del VHC en 11 enfermos no respondedores, 5 que estaban infectados por el genotipo 1 ó 4 expresaron el genotipo 3 a las 12 semanas de tratamiento, aunque en todos ellos a lo largo de las 48 semanas de terapia reemergió el genotipo dominante inicial (Porrino et al, 2011).

Medrano et al (Medrano et al, 2009), diseñaron un estudio para evaluar la frecuencia de recaídas en los pacientes coinfectados, planteando como hipótesis de trabajo que este colectivo podría ser

especialmente proclive a los rebotes de la infección por VHC tras la supresión viral al final del tratamiento, aunque de forma más tardía que las personas VIH negativas. Los investigadores estudiaron a 275 pacientes con hepatitis C crónica, 145 VIH+ y 132 VIH negativos, sin experiencia previa con interferón, que completaron 48 semanas de tratamiento con PEG-IFN y ribavirina, y que lograron niveles de ARN-VHC indetectables (<10 UI/ml) al final de la terapia. El 32% de los pacientes coinfectados experimentaron recidivas, frente al 22% de los mono infectados con el VHC. Los pacientes con genotipos 1 ó 4 tuvieron más recidivas que los portadores de los genotipos 2 ó 3, especialmente entre los coinfectados.

En la presente serie, obtuvimos una tasa de recidiva temprana (en las 24 primeras semanas post-tratamiento) del 26%, en el rango de otros trabajos publicados recientemente en nuestro país como el de Rivero-Juárez et al (Rivero-Juárez et al, 2011) con un 22%. Estas recidivas en pacientes con RFT favorable podrían explicarse por la duración inadecuada del tratamiento, ya que en la fecha en la que se inició el estudio se desconocía la importancia de la cinética viral temprana para definir la duración de la terapia. La duración se estableció exclusivamente en base al genotipo (24 semanas para genotipos 2 y 3, frente a 48 semanas para genotipos 1 y 4) y es posible que en algunos pacientes este período haya resultado insuficiente (Rockstroh et al, 2008). En un estudio reciente, en el que se describió una tasa de recidiva del 29% en un colectivo de coinfectados con genotipo 1 tratados durante 48 semanas, se sugirió que los factores predisponentes de recidiva tras obtener una RFT eran la presencia de cirrosis, la reducción de las dosis de ribavirina y el aclaramiento lento del virus (Van den Eynde et al, 2010)

En el trabajo publicado por Medrano et al (Medrano et al, 2009), sólo 3 pacientes -2 coinfectados y 1 mono infectado- experimentaron recidivas tardías, después de haber alcanzado una RVS, aunque en todo caso antes de transcurrido 1 año post-tratamiento: Si bien algunos autores insisten en que estas recidivas tardías representan habitualmente reinfecciones (Jones et al, 2010), en nuestro estudio también detectamos 2 casos de recidiva tardía (24-48 semanas después de acabar el tratamiento), lo que supone el 10,5% de los pacientes con RVS. En este sentido, cobra interés la propuesta de la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (EASL, 2011), de monitorizar el ARN-VHC y los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) séricos a las 48 y 96 semanas post-tratamiento en los pacientes no cirróticos con RVS, para descartar una recidiva tardía o una reinfección.

El efecto antiviral de la ribavirina combinada con PEG-IFN o con los nuevos inhibidores de la proteasa sobre el aclaramiento del VHC, especialmente en relación a la caída temprana de la viremia y a la tasa de recidiva del VHC, ha sido refrendado por numerosas investigaciones (McHutchison et al, 1998; Poynard et al, 1998; Manns et al, 2001; Fried et al, 2002; Hezode et al, 2009). Se ha sugerido que las recidivas aparecen preferentemente en los pacientes que no alcanzan una RVR, pero los resultados de los ensayos clínicos con los nuevos inhibidores de la proteasa, indican que la ribavirina puede disminuir el riesgo de recidiva independientemente del efecto del tratamiento en la semana 4. El interés de esta observación radica en que la monitorización de las concentraciones plasmáticas de ribavirina a las 4 semanas de tratamiento, podría resultar de utilidad para maximizar la probabilidad de curación con la terapia estándar del VHC, especialmente en los pacientes con una caída lenta de la carga viral (RVR negativa) (Nicot et al, 2008; Morello et al, 2010). En todo caso, las investigaciones apuntan a que la RFT conlleva una tasa inferior de descompensación y muerte que la observada en aquellos pacientes que no responden al tratamiento (Berenguer et al, 2010).

## **5.4. Aclaramiento del ARN-VHC en saliva**

En un estudio en el que participaron 44 pacientes con hepatitis C crónica mono infectados, Diz et al (Diz et al, 2005) definieron tres patrones diferentes de aclaramiento del VHC en saliva con respecto a la respuesta sérica al tratamiento con PEG-IFN y ribavirina:

- Patrón 1: Concordancia en el aclaramiento del VHC en sangre y saliva. En la variante 1a el virus se vuelve indetectable en ambos fluidos y en la 1b sigue presente en ambos.
- Patrón 2: Aclaramiento retardado. En la variante 2a el virus se hace indetectable primero en la saliva y posteriormente en la sangre, mientras que en la variante 2b es a la inversa.
- Patrón 3: Discordancia en el aclaramiento. En la variante 3a el virus se aclara en sangre pero no en saliva y en la 3b se aclara en saliva pero no en sangre.

Aplicando estos criterios pero sólo en términos de concordancia (patrón 1) y discordancia (patrón 3), en el presente trabajo -en el que sólo se incluyeron pacientes coinfectados-, cuando analizamos los resultados a los 6 meses post-tratamiento, encontramos un claro predominio del patrón 1, observado en 22 pacientes, 11 con la variante 1a y otros 11 con la 1b. Los 12 pacientes restantes presentaron el patrón 3 de discordancia, 8 con la variante 3a y 4 con la variante 3b. En el trabajo publicado en un colectivo de monoinfectados, el seguimiento concluyó a los 6 meses post-tratamiento (Diz et al, 2005), mientras que en el presente estudio se efectuó un nuevo control a los 12 meses; en dicho control, 31 pacientes seguían un patrón de aclaramiento 1 (15 el 1a y 16 el 1b), mientras que sólo 3 tenían un patrón discordante (2 el 3a y 1 el 3b). Los pacientes con patrón 3a persistente eran los más preocupantes; la replicación intraglandular del virus podría justificar por qué en algunos pacientes el VHC es detectable en saliva pero paradójicamente no lo es en sangre (Harle et al, 1993; Nagao et al, 2000) y supondría una expresión de la potencialidad de las glándulas salivales para actuar como reservorio viral aún después de la administración del tratamiento; sin embargo, aunque no pudieron realizarse análisis posteriores de saliva, los pacientes siguieron sometiéndose a controles serológicos anuales, constatándose el aclaramiento del virus en sangre en los 2 pacientes con patrón 3a a los 2 y 3 años de finalizar la terapia, respectivamente; ambos tenían en común viremias VHC basales por encima de  $10^7$  UI/ml.

La concordancia del aclaramiento viral en sangre y saliva en términos de presencia/ausencia de VHC aumenta sustancialmente entre los 6 y 12 meses pos-tratamiento. La prevalencia del virus en saliva de los no respondedores aumenta del 73,3% a los 6 meses al 94,1% en el control efectuado a los 12 meses, lo cual podría expresar un repunte de la viremia, una activación de la replicación viral extrahepática u otros factores de virulencia. En los pacientes coinfectados respondedores persistentes, la prevalencia del virus en saliva cae del 36,9% a los 6 meses hasta el 11,8% a los 12 meses, lo que sugiere que el aclaramiento viral es más lento en saliva que en sangre; las causas de esta demora aún se desconocen, pero podrían estar implicados factores como la replicación intraglandular del virus o las alteraciones de las glándulas salivales secundarias a la infección por el VHC (Carrozzo and Gandolfo, 2003) y/o por el VIH (Lin et al, 2003), que podrían dificultar la penetración del fármaco.

## 5.5 Implicaciones clínicas

La detección de VHC-ARN en muestras de saliva de pacientes con hepatitis C crónica, proporciona una base biológica para la potencial transmisión del virus a través de saliva contaminada (Ferreiro et al, 2005; Lins et al, 2005; Suzuki et al, 2005; Pastore et al, 2006; Akhtar et al, 2007; Açikgöz et al, 2009). Aunque algunos autores han señalado que este vehículo podría contribuir a la propagación intrafamiliar del VHC (Mastromatteo et al, 2001), hasta la fecha no se ha determinado su capacidad infecciosa. Se ha identificado ARN-VHC en utensilios personales de pacientes con hepatitis C crónica como los cepillos de dientes (Lock et al, 2006), pero no existen pruebas concluyentes de que el virus se propague fácilmente por los besos, estornudos, tos, alimentos, agua o por compartir utensilios para comer o beber (Centers for Disease Control and Prevention, 1998), y los estudios epidemiológicos señalan que el potencial de transmisión, si es que existe, es extremadamente limitado (Castro Ferreiro et al, 2004). En este sentido, la prevalencia de la infección por VHC entre los trabajadores de las unidades de odontología - habitualmente expuestos al contacto con saliva-, es similar a la de la población general (Kuo et al, 1993; Lodi et al, 1998; Cleveland et al, 1999; Amón et al, 2000); sin embargo, los detractores de estos estudios señalan que la mayoría se realizaron en áreas de baja prevalencia poblacional de infección por VHC y/o en trabajadores sanitarios que observaban las medidas de protección universales adecuadas.

Coincidiendo con otros autores (Faría et al, 2010), en la presente serie no observamos una mayor prevalencia de ARN viral en la saliva de los pacientes coinfectados VIH-VHC que en la de los mono infectados, por lo que en este sentido ambos colectivos exhiben un potencial similar de transmisión del VHC por vía salival. Al igual que ocurre con la viremia del VHC en los pacientes coinfectados, podría especularse que la carga viral en saliva es mayor que en los mono infectados, aumentando su infecciosidad; los estudios sobre la cuantificación del ARN-VHC en saliva de pacientes coinfectados son escasos, pero señalan que su concentración es inferior a la observada en sangre y no se correlaciona con ésta (Rey et al, 2001). En un estudio de cohortes con 171 personas heterosexuales cuyas parejas eran anti-VIH y anti-VHC positivas, después de más de 25.000 contactos orogenitales sin protección, no se registró ninguna seroconversión al VHC, lo que confirma que la transmisión orogenital debe ser excepcional (Marincovich et al, 2003), y ratifica la escasa infectividad de la saliva. Se ha sugerido que

determinados mecanismos de defensa podrían atenuar o suprimir la capacidad infectiva de las partículas virales al igual que sucede con el VIH, como por ejemplo los anticuerpos neutralizantes específicos IgG e IgA que bloquean la adhesión viral a la célula huésped, detectados en la saliva de los pacientes con hepatitis C crónica (Belec et al, 2003).

En una serie recientemente publicada se demostró que no existe una correlación entre la presencia de anticuerpos anti-VHC en saliva y la detección de ARN-VHC en saliva ni en las glándulas salivales (Caldeira et al, 2012). Los pacientes con infección crónica por VHC con frecuencia desarrollan sialoadenitis, presumiblemente por acción directa de las proteínas virales, más que por la infección de las glándulas o por una reacción inmune contra las células ductales que expresan antígenos virales (Carrozzo and Gandolfo, 2003). La repercusión funcional de esta alteración glandular en términos de replicación o de aclaramiento viral aún se desconoce, pero podría estar especialmente comprometida en los pacientes coinfectados, ya que la infección por VIH también provoca una disfunción glandular como consecuencia de un proceso inmunopatológico específico (Vitali, 2011). Recientemente, se ha sugerido que la ribavirina también puede condicionar la funcionalidad de las glándulas salivales en pacientes con hepatitis C crónica que reciben terapia combinada con interferón (Aghemo et al, 2011), pero esta observación ha sido rebatida por otros autores (Mahboobi y Haghghi, 2011).

La replicación extrahepática del VHC puede ser responsable de las recidivas cuando el virus reinvasa el torrente circulatorio. Se ha sugerido, que el VHC puede persistir en células mononucleares de sangre periférica en pacientes con viremia indetectable después del tratamiento con interferón, y probablemente también en los neutrófilos y los linfocitos B, aunque la información disponible sobre reservorios extrahepáticos de replicación del VHC no son concluyentes. El presente trabajo confirma que tras el tratamiento combinado con PEG-IFN y ribavirina, en los pacientes con RVS también se constata un aclaramiento viral de la saliva, por lo que las glándulas salivales de los coinfectados no parecen actuar como un reservorio post-tratamiento. Dado que el aclaramiento salival es más lento que el sérico consideramos, como ya han sugerido otros autores, que en los pacientes coinfectados debe plantearse tanto la prolongación del tratamiento -en casos seleccionados- (Núñez et al, 2007), como la del seguimiento post-tratamiento (EASL, 2011).





6

Conclusiones



1. La prevalencia de ARN-VHC en muestras salivales de pacientes coinfectados VIH-VHC fue similar a la detectada en los mono infectados VHC. No se identificó ningún factor condicionante de la presencia del virus en saliva de los coinfectados, mientras que en los mono infectados resultó más frecuente cuando tenían viremias elevadas y determinados genotipos virales.
2. La detección del VHC en la saliva de los pacientes coinfectados al finalizar el tratamiento, no está condicionada por factores demográficos, ni ninguna de las variables analizadas en relación a la infección por VIH o a la hepatopatía. A los 6 y a los 12 meses de finalizar el tratamiento, la presencia del virus en saliva sólo se relacionó de forma estadísticamente significativa con su detección en sangre.
3. En los pacientes coinfectados, la detección de VHC en saliva basal no permite intuir la respuesta al tratamiento con interferón-ribavirina. La concordancia entre sangre y saliva en términos de presencia/ausencia de VHC detectable, confirma que en los respondedores persistentes las glándulas salivales probablemente no constituyan un santuario para el VHC, aunque el aclaramiento viral puede ser más lento en saliva que en sangre.





7

# Bibliografía



- Açikgöz G, Cengiz M, Keskiner I, Açikgöz S, Can M, Açikgöz A. Correlation of Hepatitis C antibody levels in gingival crevicular fluid and saliva of Hepatitis C seropositive hemodialysis patients. *Int J Dent* 2009;2009:247121.
- Aghemo A, Rumi MG, Monico S, Banderali M, Russo A, Ottaviani F et al. Ribavirin impairs salivary gland function during combination treatment with pegylated interferon alfa-2a in hepatitis C patients. *Hepat Mon* 2011;11:918-924.
- Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12766-12771.
- Ahmed SD, Cuevas LE, Brabin BJ, Kazembe P, Broadhead R, Verhoeff FH et al. Seroprevalence of hepatitis B and C and HIV in Malawian pregnant women. *J Infect* 1998;37:248-251.
- Akhtar S y Moatter T. Multilevel modeling of intra-household spread of hepatitis C virus infection, Karachi, Pakistan. *Am J Trop Med Hig* 2007;76:446-449.
- Allory Y, Charlotte F, Benhamou Y, Opolon P, Le Charpentier Y, Poynard T. Impact of human immunodeficiency virus infection on the histological features of chronic hepatitis C: A case-control study. *Human Pathology* 2000;31:69-74.
- Alter MJ. Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection. *J Hepatol* 2006;44:S6-S9.
- Alvarez D, Dieterich DT, Brau N, Moorehead L, Ball L, Sulkowski MS. Zidovudine use but not weight-based ribavirin dosing impacts anaemia during HCV treatment in HIV-infected persons. *J Viral Hepat* 2006;13:683-689.
- Amin J, Kaye M, Skidmore S, Pillay D, Cooper DA, Dore GJ. HIV and hepatitis C coinfection within the CAESAR study. *HIV Med* 2004;5:174-179.
- Ammon A, Reichart P, Pauli G, Petersen LR. Hepatitis B and C among Berlin dental personnel: Incidence, risk factors, and effectiveness of barrier prevention measures. *Epidemiol Infect* 2000;125:407-413.
- Anderson PL, Kakuda TN, Lichtenstein KA. The cellular pharmacology of nucleoside-and nucleotide-analogue reverse-transcriptase inhibitors and its relationship to clinical toxicities. *Clin Infect Dis* 2004;38:743-753.
- Arrieta JJ, Rodríguez-Iñigo E, Ortiz-Movilla N, Bartolomé J, Pardo M, Manzarbeitia F. In situ detection of hepatitis C virus RNA in salivary glands. *Am J Pathol* 2001;158:259-264.
- Augenbraun M, Goedert JJ, Thomas D, Feldman J, Seaberg EC, French AL et al. Incident hepatitis C in women with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 2003;37:1357-1364.
- Awad T, Thorlund K, Hauser G, Stimac D, Mabrouk M, Gluud C. Peginterferon alpha-2a is associated with higher sustained virological response than peginterferon alfa-2b in chronic hepatitis C: systematic review of randomized trials. *Hepatology* 2010;51:1176-1184.
- Babu CK, Suwansrinon K, Bren GD, Badley AD, Rizza SA. HIV induces TRAIL sensitivity in hepatocytes. *PLoS One* 2009;4:e4623.
- Backus L, Phillips B, Boothroyd D, Mole LA, Burgess J, Rigsby MO et al. Effects of hepatitis C virus coinfection on survival in veterans with HIV treated with highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;39:613-619.
- Ballesteros AL, Franco S, Fuster D, Planas R, Martínez MA, Acosta L et al. Early HCV dynamics on Peg-interferon and ribavirin in HIV/HCV co-infection: Indications for the investigation of new treatment approaches. *AIDS* 2004;18:59-66.

- Bani-Sadr F, Carrat F, Pol S, Hor R, Rosenthal E, Goujard C et al. Risk factors for symptomatic mitochondrial toxicity in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients during interferon plus ribavirin-based therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:47-52.
- Barreiro P, Labarga P, Martin-Carbonero L, Amor A, Ruiz-Sancho A, Castellares C et al. Sustained virological response following HCV therapy is associated with non-progression of liver fibrosis in HCV/HIV-coinfected patients. *Antivir Ther* 2006;11:869-877.
- Barreiro P, Tuma P, Rivero A, Cervantes M, Santos I, Camacho AM et al. Length of peginterferon-ribavirin therapy according to hcv genotype and rapid virological response in HIV/HCV coinfectd patients: The EXTENT trial. 61st Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2010). Boston, 2010.
- Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 2003a;197:633-642.
- Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S, et al. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* 2003b;278:41624-41630.
- Beld M, Penning M, Lukashov V, McMorro M, Roos M, Pakker N et al. Evidence that both HIV and HIV-induced immunodeficiency enhance HCV replication among HCV seroconverters. *Virology* 1998;244:504-512.
- Belec L, Legoff J, Si-Mohamed A, Bloch F, Mbopi Keou FX, Becquart P et al. Mucosal humoral immune response to hepatitis C virus E1/E2 surface glycoproteins and HCV shedding in saliva and cervicovaginal fluids from chronically-infected patients. *J Hepatol* 2003;38:833-842.
- 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 coinfectd patients. *Hepatology* 1999;30:1054-1058.
- Benhamou Y, Di Martino V, Bochet M, Colombet G, Thibault V, Liou A et al. Factors affecting liver fibrosis in human immunodeficiency virus-and hepatitis C virus-coinfected patients: Impact of protease inhibitor therapy. *Hepatology* 2001;34:283-287.
- Berenguer J, Álvarez Pellicer J, Miralles P (Gesida 3603 Cohort Study Group). Clinical consequences of achieving end of treatment response (ETR) but not sustained serologic response (SVR) to interferon plus ribavirin (IF-RB) in HIV/HCV-coinfected patients. 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC 2010). Boston, 2010.
- Berg T, Hopf U, Stark K, Baumgarten R, Lobeck H, Schreier E. Distribution of hepatitis C virus genotypes in German patients with chronic hepatitis C: Correlation with clinical and virological parameters. *J Hepatol* 1997;26:484-491.
- Berg T, Sarrazin C, Herrmann E, Hinrichsen H, Gerlach T, Zachoval R et al. Prediction of treatment outcome in patients with chronic hepatitis C: Significance of baseline parameters and viral dynamics during therapy. *Hepatology* 2003;37:600-609.
- Berg T, von Wagner M, 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;130:1086-1097.
- Bhattacharya D, Umbleja T, Carrat F, Chung RT, Peters MG, Torriani F et al. Women experience higher rates of adverse events during hepatitis C virus therapy in HIV infection: A meta-analysis. *JAIDS* 2010;55:170-175.
- Bica I, McGovern B, Dhar R, Stone D, McGowan K, Scheib R et al. Increasing mortality due to end-stage liver disease in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 2001;32:492-497.

- Bodenheimer HC Jr, Lindsay KL, Davis GL, Lewis JH, Thung SN, Seeff LB. Tolerance and efficacy of oral ribavirin treatment of chronic hepatitis C: A multicenter trial. *Hepatology* 1997;26:473-477.
- Bonacini M, Govindarajan S, Blatt LM, Schmid P, Conrad A, Lindsay KL. Patients co-infected with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus demonstrate higher levels of hepatic HCV RNA. *J Viral Hepat* 1999;6:203-208.
- Bonacini M, Puoti M. Hepatitis C in patients with human immunodeficiency virus infection. *Arch Intern Med* 2000;160:3365-3373.
- Braü N, Rodriguez-Torres M, Prokupek D, Bonacini M, Giffen CA, Smith JJ et al. Treatment of chronic hepatitis C in HIV/HCV- coinfection with interferon alpha-2b + full-course vs 16-week delayed ribavirin. *Hepatology* 2004;39:989-998.
- Cadafalch J, Enriquez J, Matas L, Mauri A, Muñoz J, Margall N et al. Comparación entre la carga viral basal y el genotipo VHC en pacientes infectados por VHC y pacientes VIH coinfectados por VHC. Una misma enfermedad con dos formas diferentes. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2004;22:227.
- Caldeira PC, Oliveira E Silva KR, Silva TA, De Mattos Camargo Grossmann S, Teixeira R et al. Correlation between salivary anti-HCV antibodies and HCV RNA in saliva and salivary glands of patients with chronic hepatitis C. *J Oral Pathol Med* 2012 [Epub ahead of print].
- Caldwell SH, Sue M, Bowden JH, Dickson RC, Discroll CJ, Yeaton P et al. Hepatitis C virus in body fluids after liver transplantation. *Liver Transpl Surg* 1996;2:124-129.
- Caliendo AM, Valsamakis A, Zhou Y, Yen-Lieberman B, Andersen J, Young S et al. Multilaboratory comparison of hepatitis C virus viral load assays. *J Clin Microbiol* 2006;44:1726-1732.
- Carithers RL, Marquardt A, Gretch DR. Diagnostic tests for hepatitis C. *Sem Liver Dis* 2000;20:159-171.
- Carrat F, Bani-Sdar F, Pol S, Rosenthal E, Lunel-Fabiani F, Benzekri A et al. Pegilated interferon alpha-2b vs standard interferon alpha-2b, plus ribavirin, for chronic hepatitis C in HIV-infected patients: A randomized controlled trial. *JAMA* 2004;292:2839-2848.
- Carrozzo M, Gandolfo S. Oral diseases possibly associated with hepatitis C virus. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14:115-127.
- Carrozzo M, Quadri R, Latorre P, Pentenero M, Paganin S, Bertolusso G et al: Molecular evidence that the hepatitis C virus replicates in the oral mucosa. *J Hepatol* 2002;37:364-369.
- Castro Ferreira M, Hermida Prieto M, Diz Dios P. Sporadic transmission of hepatitis C in dental practice. *Med Clin (Barc)* 2004;123:271-275.
- Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. *MMWR* 1998;47:1-33.
- Chang CH, Chen KY, Lai MY, Chan KA. Meta-analysis: ribavirin-induced haemolytic anaemia in patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1623-1632.
- Chang MH, Gordon LA, Fung HB. Boceprevir: a protease inhibitor for the treatment of hepatitis C. *Clin Ther* 2012;34:2021-2038.
- Charlton MR, Thompson AJ, Veldt BJ. IL28B polymorphisms are associated with histological recurrence and treatment response following liver transplantation in patients with HCV with HCV Infection. 61st Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2010). Boston, 2010.

- Chattopadhyay A, Gray LR, Patton LL, Caplan DJ, Slade GD, Tien HC et al: Salivary secretory leukocyte protease inhibitor and oral candidiasis in human immunodeficiency virus type 1-infected persons. *Infect Immun* 2004;72:1956-1963.
- Chen M, Yun ZB, Salberg M, Schwarcz R, Bergquist I, Berglund HB et al. Detection of hepatitis C virus RNA in the cell fraction of saliva before and after oral surgery. *J Med Virol* 1995;45:223-226.
- Chen T, Ding E, Seage G, Kim A. Meta-Analysis: Increased mortality associated with Hepatitis C in HIV-infected persons is unrelated to HIV disease progression. *Clin Infect Dis* 2009;49:1605-1615.
- Chen WL, Chen XP, Chen XF, Huang J, Luo XD. Individualized response guided treatment of chronic hepatitis C with combination of peginterferon  $\alpha$ -2a and ribavirin. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2010;18:585-589.
- Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Brillet R, Pawlostky JM. Overestimation and underestimation of hepatitis C virus RNA levels in a widely used real-time polymerase chain reaction-based method. *Hepatology* 2007;46:22-31.
- Chung RT, Anderson J, Volberding P, Robbins GK, Liu T, Sherman KE et al. Peginterferon alpha-2a plus ribavirin versus interferon alpha-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C in HIV-coinfected persons. *N Engl J Med* 2004;351:451-459.
- Chung RT, Evans SR, Yang Y, Theodore D, Valdez H, Clark R et al. Immune recovery is associated with persistent rise in hepatitis C virus RNA, infrequent liver test flares, and is not impaired by hepatitis C virus in co-infected subjects. *AIDS* 2002;16:1915-1923.
- Cleveland JL, Gooch B, Shearer BG, Lyerla RL. Risk and prevention of hepatitis C virus infection. Implications for dentistry. *JADA* 1999;130:641-647.
- Collazos J, Carton JA, Asensi V. Immunological status does not influence hepatitis C virus or liver fibrosis in human immunodeficiency virus-hepatitis C virus-coinfected patients. 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC 2010). Boston, 2010.
- Collier J, Heathcote J. Hepatitis C infection in the immunosuppressed patient. *Hepatology* 1998;27:2-6.
- Colson P, Motte A, Tamalet C. Broad differences between the COBAS Ampliprep total nucleic acid isolation-COBAS TaqMan 48 hepatitis C virus (HCV) and COBAS HCV Monitor v2.0 assays for quantification of serum HCV RNA of non-1 genotypes. *J Clin Microbiol* 2006;44:1602-1603.
- Coto-Llerena M, Perez-del-Pulga S, Crespo G, González P, Mensa L, Dragun J et al. IL28B polymorphisms may improve response to hepatitis C therapy after liver transplantation. 61st Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2010). Boston, 2010.
- Couzigou P, Richard L, Dumas F, Schouler L, Fleury H. Detection of HCV-RNA in saliva of patients with chronic hepatitis C. *Gut* 1993;34: S59-S60.
- Crespo M, Esteban JI, Ribera E, Falco V, Sauleda S, Buti M et al. Utility of week-4 viral response to tailor treatment duration in hepatitis C virus genotype 3/HIV co-infected patients. *AIDS* 2007a;21:477-481.
- Crespo M, Sauleda S, Esteban JI, Juarez A, Ribera E, Andreu AL et al. Peginterferon alpha-2b plus ribavirin vs interferon alpha-2b plus ribavirin for chronic hepatitis C in HIV-coinfected patients. *J Viral Hepat* 2007b;14:228-238.
- Cribrier B, Rey D, Schmitt C, Lang JM, Dim A, Stoll-Keller F. High hepatitis C viraemia and impaired antibody response in patients coinfecting with HIV. *AIDS* 1995;9:1131-1136.

- Cribier B, Rey D, Uhi G, Schmitt C, Libbrecht E, Vetter D et al. Quantification of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells: a comparison between patients chronically infected by HCV and patients coinfected by HIV. *Res Virol* 1996;147:325-332.
- Cribier B, Schmitt C, Rey D, Uhi G, Lang JM, Vetter D et al. HIV increases hepatitis C viraemia irrespective of hepatitis C virus genotype. *Res Virol* 1997;148:267-271.
- Danta M, Brown D, Baghani S, Pybus OG, Sabin CA, Nelson M et al. Recent epidemic of acute hepatitis C virus in HIV-positive men who have sex with men linked to high-risk sexual behaviours. *AIDS* 2007;21:983-991.
- Davis GL. Monitoring of viral levels during therapy of hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S145-S151.
- De Araujo ES, Dahari H, Cotler SJ, Layden TJ, Neumann AU, Melo CE et al. Pharmacodynamics of PEG-IFN alpha-2a and HCV response as a function of IL28B polymorphism in HIV/HCV co-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011;56:95-99.
- De Ledinghen V, Douvin C, Kettaneh A, Ziol M, Roulot D, Marcellin P et al. Diagnosis of hepatic fibrosis and cirrhosis by transient elastography in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;41:175-179.
- Del Rio RA, Post AB, Singer ME. Cost-effectiveness of hematologic growth factors for anemia occurring during hepatitis C combination therapy. *Hepatology* 2006;44:1598-1606.
- Delgado-Iribarren A, Echebarría JM, León P. Serología de las hepatitis víricas. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. SEIMC 2004.
- Di Martino V, Rufat P, Boyer N, Renard P, Degos F, Martinot-Peignoux M et al. The influence of human immunodeficiency virus coinfection on chronic hepatitis C in injection drug users: a long-term retrospective cohort study. *Hepatology* 2001;34:1193-1199.
- Diallo DA, Baby M, Dembele M, Kéita A, Sidibé AT, Cissé IA et al. Frequency, risk factors and prognostic value of anemia associated with HIV/AIDS in the adult in Mali. *Bull Soc Pathol Exot* 2003;96:123-127.
- Diamond C. Ribavirin-associated hemoglobinuria with treatment of hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 2004;38:1042.
- Dieterich DT, Purow JM, Rajapaksa R. Activity of combination therapy with interferon alfa-2b plus ribavirin in chronic hepatitis C patients co-infected with HIV. *Semin Liver Dis* 1999;19:87-94.
- Dieterich DT, Spivak JL. Hematologic disorders associated with hepatitis C virus infection and their management. *Clin Infect Dis* 2003;37:533-541.
- Dieterich DT. Treatment of hepatitis C and anemia in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 2002;185:128-137.
- Dixit V, Quan S, Martin P, Larson D, Brezina M, Dinello R et al. Evaluation of a novel serotyping system for hepatitis C virus: Strong correlation with standard genotyping methodologies. *J Clin Microbiol* 1995;33:2978-2983.
- Diz Dios P, Castro A, Rodríguez I, Reforma NG, Castro M, Eirea M et al. HCV clearance patterns in saliva and serum of patients with chronic HCV infection under interferon plus ribavirin therapy. *J Oral Pathol Med* 2005;34:308-311.
- Dore GJ, Hellard M, Matthews G, Grebely J, Haber PS, Petoumenos K et al. Effective treatment of injecting drug users with recently acquired Hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2010;138:123-135.

- Dorrucci M, Pezzotti P, Phillips AN, Lepri AC, Rezza G. Coinfection of hepatitis C virus with human immunodeficiency virus and progression to AIDS. *J Infect Dis* 1995;172:1503-1508.
- Dubé MP. Disorders of glucose metabolism in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 2000;31:1467-1475.
- Dusheiko G, Main J, Thomas H, Reichard O, Lee C, Dhillon A et al. Ribavirin treatment for patients with chronic hepatitis C: Results of a placebo-controlled study. *J Hepatol* 1996;25:591-598.
- EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2011;55:245-264.
- EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. *J Hepatol* 1999;30:956-961.
- Esteban JL, Sauleda S. Diagnóstico de laboratorio de la infección por el virus de la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol* 2006;29(Supl 2):107-112.
- European AIDS Clinical Society. Guidelines Version 6.0 - October 2011. <http://www.europeanaidsclinicalsociety.org> (acceso noviembre de 2012).
- European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2011;55:245-264.
- Eyster ME, Alter HJ, Aledort LM, Quan S, Hatzakis A, Goedert JJ. Heterosexual transmission of hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV). *Ann Intern Med* 1991;15:764-768.
- Eyster ME, Diamondstone LS, Lien JM, Ehmann WC, Quan S, Goedert JJ. Natural history of hepatitis C virus infection in multitransfused hemophiliacs: Effect of coinfection with human immunodeficiency virus. *JAIDS* 1993;6:602-610.
- Fabian J, Katz I, Gerntholtz T, Goetsch S, Naiker S. Chronic kidney disease in human immunodeficiency virus infection. *Panminerva Med* 2007;49:51-66.
- Fabris P, Infantolino D, Biasin MR, Marchelle G, Venza E, Terribile Wiel Marin V et al. High prevalence of HCV-RNA in the saliva fraction of patients with chronic hepatitis C but no evidence of HCV transmission among sexual partners. *Infection* 1999;27:86-91.
- Fanning L, Kenny E, Sheehan M, Cannon B, Whelton M, O'Connell J et al. Viral load and clinicopathological features of chronic hepatitis C in a homogeneous patient population. *Hepatology* 1999;29:904-907.
- Farel C, Kottlil M, Mc Laughlin M, Campbell C, Koratic C, Masur H et al. Serious ophthalmologic pathology with visual compromise in HIV/HCV co-infected patients treated with pegylated interferon alpha-2b and ribavirin. *AIDS* 2004;18:1805-1809.
- Farías A, Ré V, Mengarelli S, Kremer L, Pisano MB, Allende L et al. Detection of hepatitis C virus (HCV) in body fluids from HCV monoinfected and HCV/HIV coinfecting patients. *Hepatogastroenterology* 2010;57:300-304.
- Ferreira-González A, Shiffman ML. Use of diagnostic testing for managing hepatitis C virus infection. *Semin Liver Dis* 2004;140:465-479.
- Ferreiro MC, Dios PD, Scully C. Transmission of hepatitis C virus by saliva?. *Oral Dis* 2005;11:230-235.
- Filippini P, Coppola N, Scolastico C, Liorre G, Nocera R, Sagnelli E et al. Can HCV affect the efficacy of anti-HIV treatment?. *Arch Virol* 2000;145:937-944.
- Fleischer R, Boxwell D, Sherman KE. Nucleoside analogues and mitochondrial toxicity. *Clin Infect Dis* 2004;38:79-80.
- Foster GR. Pegylated interferons for the treatment of chronic hepatitis C: pharmacological and clinical differences between peginterferon-alpha-2a and peginterferon-alpha-2b. *Drugs* 2010;70:147-165.

- Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçalves FL et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002b;347:975-982.
- Fried MW, Shindo M, Fong TI, Fox PC, Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Absence of hepatitis C viral RNA from saliva and semen of patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1992;102:1306-1308.
- Fried MW. Side effects of hepatitis C and their management. *Hepatology* 2002a;36:S237-S244.
- Fultz SL, Chang CH, Butt AA. Impact of hepatitis C, HIV, or both on survival in veterans in care before and after the introduction of HAART (1996). 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (abstract 836). Boston, 2003.
- Fuping G, Wei L, Yang H, Zhifeng Q, Lingyan Z, Yanling L et al. Impact of hepatitis C virus coinfection on HAART in HIV-infected individuals: Multicentric observation cohort. *JAIDS* 2010;54:137-142.
- García-Alvarez M, Berenguer J, Miralles P, Catalán P, López J, Cosín J et al. Torque Teno Virus (TTV) and Torque Teno Mini Virus (TTMV) in HIV/HCV co-infected patients: Prevalence and role in liver disease. 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC 2010). Boston, 2010.
- García-Benayas T, Rondón AL, Rodríguez-Novoa S, Barrios A, Maida I, Blanco F et al. Higher risk of hyperglycemia in HIV-infected patients treated with didanosine plus tenofovir. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006;22:333-337.
- García-Samaniego J, Bravo R, Castilla J, Gómez-Cano M, Laguna F, Muñoz F et al. Lack of benefit of protease inhibitors on HCV viraemia in HIV-infected patients. *J Hepatol* 1998;28:256-257.
- Gebo KA, Fleishman JA, Moore RD. Recent trends in HIV-related hospitalizations by selected diagnoses: a 12-state study. 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (abstract 827). Boston, 2003.
- George SL, Bacon BR, Brunt EM, Mihindukulasuriya KL, Hoffmann J, Di Bisceglie AM. Clinical, virologic, histologic, and biochemical outcomes after successful HCV therapy: A 5-year follow-up of 150 patients. *Hepatology* 2008;49:729-738.
- Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff B. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 2009;49:1335-1374.
- Gish RG, Qian KP, Quan S, Xu YL, Pike I, Polito A et al. Concordance between hepatitis C virus serotyping assays. *J Viral Hepatol* 1997;4:421-422.
- Goedert JJ, Eyster ME, Lederman MM, Mandalaki T, De Moerloose P, White GC 2nd et al. End-stage liver disease in persons with hemophilia and transfusion-associated infections. *Blood* 2002;100:1584-1589.
- Golie P. A preliminary study of growth factors versus dose reduction for peg interferon alfa-2b and ribavirin associated neutropenia and anemia in HIV-HCV coinfecting patients. Abstracts of Digestive Disease Week (abstract 1207). Orlando, 2003.
- Greub G, Ledergerber M, Battegay P, Grob P, Perrin L, Furrer H et al. Clinical progression, survival and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HIV-1 and hepatitis C virus coinfection: The Swiss HIV cohort study. *Lancet* 2000;356:1800-1805.
- Guarnier C, Enriquez J. Hepatitis C (Avances en patología digestiva). ICG Marge SL, Barcelona 2008.
- Hadigan C, Kottlil S. Hepatitis C virus infection and coinfection with human immunodeficiency virus: Challenges and advancements in management. *JAMA* 2011;306:294-301.

- Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P et al. Peginterferon-alpha-2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: A randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004;140:346-355.
- Harle JR, Swiader L, Disdier P, Gerolami V, Cartouzou G, Weiller J. Identifying hepatitis C virus by the gene amplification technique in the saliva of patients for whom the search is simultaneously negative in their serum: 9 cases. *Rev Med Interne* 1993;14:1005.
- Hayashi PH, Flynn N, McCurdy SA, Kuramoto IK, Holland PV, Zeldis JB. Prevalence of hepatitis C virus antibodies among patients infected with human immunodeficiency virus. *J Med Virol* 1991;33:177-180.
- Hermida M, Ferreiro MC, Barral S, Laredo R, Castro A, Diz Dios P. Detection of HCV RNA in saliva of patients with hepatitis C virus infection by using a highly sensitive test. *J Virol Methods* 2002;101:29-35.
- Hernández MD, Sherman KE. HIV/hepatitis C coinfection natural history and disease progression. *Curr Opin HIV AIDS* 2011;6:478-482.
- Hézode C, Forestier N, Dusheiko G, Ferenci P, Pol S, Goeser T et al; PROVE2 Study Team. Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med* 2009;360:1839-1850.
- Highleyman L. HIV and hepatitis C coinfection. *BETA (Bull Exper Treat AIDS)* 2003;15:32-44.
- Hisada M, O'Brien TR, Rosenberg PS, Goedert JJ. Virus load and risk of heterosexual transmission of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus by men with hemophilia. *J Infect Dis* 2000;181:1475-1478.
- Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995;373:123-126.
- Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM et al. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7271-7276.
- Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH et al; ADVANCE Study Team. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2011;364:2405-2416.
- Jaeckel E, Cornberg M, Wedemeyer H, Santantonio T, Mayer J, Zankel M et al; German Acute Hepatitis C Therapy Group. Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b. *N Engl J Med* 2001;15:1452-1457.
- Jan JY, Shao RX, Lin W, Weinberg E, Chung WJ, Tsai WL et al. HIV infection increased HCV-induced hepatocyte apoptosis. *J Hepatol* 2011;54:612-620.
- Jones R, Brown D, Nelson M, Low E, Bhagani S, Atkins M et al. Re-emergent hepatitis C viremia after apparent clearance in HIV-positive men who have sex with men: Reinfection or late recurrence?. *JAIDS* 2010;53:547-550.
- Jorgensen C, Legouffe MC, Perney P, Coste J, Tissot B, Segarra C et al. Sicca syndrome associated with HCV virus infection. *Arthritis Rheum* 1996;39:1166-1171.
- Joshi D, O'Grady J, Dieterich D, Gazzard B, Agarwal K. Increasing burden of liver disease in patients with HIV infection. *Lancet* 2011;377:1198-1209.
- Kage M, Ogasawara S, Kosai K, Nakashima E, Shimamatsu K, Kojiro M et al. Hepatitis C virus RNA present in saliva but absent in breast-milk of the hepatitis C carrier mother. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:518-521.
- Katsounas A, Trippler M, Kottlilil S, Lempicki RA, Gerken G, Schlaak JF. Altered expression of SHIP, a Toll-like receptor pathway inhibitor, is associated with the severity of liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2011;204:1181-1185.

- Kelleher TB, Mehta SH, Bhaskar K, Sulkowski MS, Astemborski J, Thomas DL et al. Prediction of hepatic fibrosis in HIV/HCV co-infected patients using serum fibrosis markers: the SHASTA index. *J Hepatol* 2005;43:78-84.
- Kim AY, Chung RT. Coinfection with HIV-1 and HCV -a one-two punch. *Gastroenterology* 2009;137:795-814.
- Kim JI, Kim SH, Lee BS, Lee HY, Lee TH, Kang YW, Lee H et al. Efficacy of initial treatment with peginterferon alpha-2a versus peginterferon alpha-2b in combination with ribavirin in naive chronic hepatitis C patients living in Daejeon and Chungcheong Province in Korea: A comparative study. *Korean J Hepatol* 2008;14:493-502.
- Körner C, Tolksdorf F, Schulte D, Krämer B, Coenen M, Glässner A et al. Hepatitis C co-infection sensitizes CD4+ T cells towards Fas-induced apoptosis in HIV-positive patients. 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL 2010). Vienna, 2010.
- Koskinas J, Merkouraki P, Manesis E, Hadziyannis S. Assessment of depression in patients with chronic hepatitis: effect of interferon treatment. *Dig Dis* 2002;20:284-288.
- Kraus MR, Schafer A, Faller H, Csef H, Scheurlen M. Paroxetine for the treatment of interferon-alpha-induced depression in chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1091-1099.
- Kraus MR, Schafer A, Faller H, Csef H, Scheurlen M. Psychiatric symptoms in patients with chronic hepatitis C receiving interferon alfa-2b therapy. *J Clin Psychiatry* 2003;64:708-714.
- Kuo MY, Hahn LJ, Hong CY, Kao JH, Chen DS. Low prevalence of hepatitis C virus infection among dentists in Taiwan. *J Med Virol* 1993;40:10-13.
- Kuritzkes DR. Neutropenia, neutrophil dysfunction, and bacterial infection in patients with human immunodeficiency virus disease: the role of granulocyte colony-stimulating factor. *Clin Infect Dis* 2000;30:256-260.
- Lacombe K, Rockstroh J. HIV and viral hepatitis coinfections: advances and challenges. *Gut* 2012;61:47-58.
- Lafeuillade A, Hittinger G, Chapadaud S. Increased mitochondrial toxicity with ribavirin in HIV/HCV coinfection. *Lancet* 2001;357:280-281.
- Laguno M, Blanch J, Murillas J, Blanco JL, León A, Lonca M et al. Depressive symptoms after initiation of interferon therapy in human immunodeficiency virus-infected patients with chronic hepatitis C. *J Antivir Ther* 2004b;9:905-909.
- Laguno M, Murillas J, Blanco JL, Martínez E, Miquel R, Sánchez-Tapias JM et al. Peginterferon alpha-2b plus ribavirin compared with interferon alpha-2b plus ribavirin for treatment of HIV/HCV coinfecting patients. *AIDS* 2004a;18:27-36.
- Laskus T, Radkowski M, Jablonska J, Kibler K, Wilkinson J, Adair D et al: Human immunodeficiency virus facilitates infection/replication of hepatitis C virus in native human macrophages. *Blood* 2004;103:3854-3859.
- Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Nowicki M, Rakela J. Uneven distribution of hepatitis C virus quasispecies in tissues from subjects with end-stage liver disease: Confounding effect of viral adsorption and mounting evidence for the presence of low-level extrahepatic replication. *J Virol* 2000;74:1014-1017.
- Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345:41-52.
- Laufer N, Bolcic F, Rolón MJ, Martínez A, Reynoso R, Pérez H et al. HCV RNA decline in the first 24 h exhibits high negative predictive value of sustained virologic response in HIV/HCV genotype 1 co-infected patients treated with peginterferon and ribavirin. *Antiviral Res* 2011;90:92-97.

- Lesens O, Deschênes M, Steben M, Bélanger G, Tsoukas CM. Hepatitis C virus is related to progressive liver disease in human immunodeficiency virus-positive hemophiliacs and should be treated as an opportunistic infection. *J Infect Dis* 1999;179:1254-1258.
- Levine AM, Berhane K, Masri-Lavine L, Sanchez M, Young M, Augenbraun M et al. Prevalence and correlates of anemia in a large cohort of HIV-infected women: Women's Interagency HIV Study. *JAIDS* 2001;26:28-35.
- Lin AL, Johnson DA, Stephen KT, Yeh CK. Alteration in salivary function in early HIV infection. *J Dent Res* 2003;82:719-724.
- Lin AL, Johnson DA, Stephen KT, Yeh CK. Salivary secretory leukocyte protease inhibitor increases in HIV infection. *J Oral Pathol Med* 2004;33:410-416.
- Lindahl K, Stahle L, Bruchfeld A, Schvarcz R. High-dose ribavirin in combination with standard dose peginterferon for treatment of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005;41:275-279.
- Lindsay KL, Trepo C, Heintges T, Shiffman ML, Gordon SC, Hoefs JC et al. A randomized, double-blind trial comparing pegylated interferon alfa-2b to interferon alfa-2b as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001;34:395-403.
- Lins L, Almeida H, Vitvisk L, Carmo T, Paraná R, Reis MG. Detection of Hepatitis C virus in saliva is not related to oral health status or viral load. *J Med Virol* 2005;77:216-220.
- Liou TC, Chanf TT, Young KC, Lin XZ, Wu HL. Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid and ascites. *J Med Virol* 1992;37:197-202.
- Lissen E, Alter HJ, Abad MA, Torres Y, Perez-Romero M, Leal M et al. Hepatitis C virus infection among sexually promiscuous groups and the heterosexual partners of hepatitis C virus infected index cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:827-831.
- Lissen E, Clumeck N, Sola R, Mendes-Correa M, Montaner J, Nelson M et al. Histological response to pegIFNalpha-2a (40KD) plus ribavirin in HIV-hepatitis C virus co-infection. *AIDS* 2006;20:2175-2181.
- Lock G, Dirscherl M, Obermeier F, Gelbmann CM, Hellerbrand C, Knöll A et al. Hepatitis C - contamination of toothbrushes: myth or reality?. *J Viral Hepat* 2006;13:571-573.
- Lodi G, Porter SR, Scully C. Hepatitis C virus infection. Review and implications for the dentistry. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;86:8-22.
- Lundgren JD, Mocroft A. Anemia and survival in human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 2003;37:297-303.
- Mach TH, Cieśla A, Warunek W, Janas-Skulina U, Cibor D, Owczarek D et al. Efficacy of peginterferons alfa-2a or alfa-2b with ribavirin in the treatment of chronic hepatitis caused by HCV genotype 1b in patients from the southern region of Poland. *Pol Arch Med Wewn* 2011;121:434-439.
- Macías J, Pineda JA, Leal M, Abad MA, García-Pesquera F, Delgado J et al. Influence of hepatitis C virus infection on the mortality of antiretroviral-treated patients with HIV disease. *Eur J Clin Microbiol Infect* 1998;17:167-170.
- Macías J, Recio E, Vispo E, Rivero A, López-Cortés LF, Ríos MJ et al. Application of transient elastometry to differentiate mild from moderate to severe liver fibrosis in HIV/HCV co-infected patients. *J Hepatol* 2008;49:916-922.
- Macías MA, Rendón P, Tejada M, Infante JM, Corroero F, Díaz F et al. Risk Factors for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. *Rev Esp Enferm Dig* 2000;92:458- 469.

- Maggi F, Fornai C, Vatteroni ML, Giorgi M, Morrica A, Pistello M et al. Differences in hepatitis C virus quasispecies composition between liver, peripheral blood mononuclear cells and plasma. *J Gen Virol* 1997;78:1521-1525.
- Mahboobi N, Haghigh Z. Effect of ribavirin therapy on salivary gland function: An Oral Medicine Perspective. *Hepat Mon* 2011;11:925-926.
- Manning DS, Afdhal NH. Diagnosis and quantitation of fibrosis. *Gastroenterology* 2008;134:1670-1681.
- 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 the initial treatment of chronic hepatitis C: A randomized trial. *Lancet* 2001;358:958-965.
- Mariette X, Loiseau P, Morinet F. Hepatitis C virus in saliva. *Ann Intern Med* 1995;122:556.
- Marincovich B, Castilla J, del Romero J, García S, Hernando V, Raposo M et al. Absence of hepatitis C virus transmission in a prospective cohort of heterosexual serodiscordant couples. *Sex Transm Infect* 2003;79:160-162.
- Martín J, López M, Arranz M. Impact of hepatitis C in HIV-infected individuals in an urban center in Madrid, Spain. 8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (abstract 572). Chicago, 2001.
- Martín-Carbonero L, Benhamou Y, Puoti M, Berenguer J, Mallolas J, Quereda C et al. Incidence and predictors of severe liver fibrosis in human immunodeficiency virus-infected patients with chronic hepatitis C: A European collaborative study. *Clin Infect Dis* 2004;38:128-133.
- Martín-Carbonero L, Soriano V, Benhamou Y. Histological damage in liver biopsy samples from 492 HIV-HCV co-infected patients: a European collaborative study. 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (abstract 830). Boston, 2003.
- Martínez-Sierra C, Arizcorreta A, Díaz F, Roldán R, Martín-Herrera L, Pérez-Guzmán E et al. Progression of chronic hepatitis C to liver fibrosis and cirrhosis in patients coinfecting with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 2003;36:491-498.
- Massoud OI, Yousef WI, Mullen KD. Hemoglobinuria with ribavirin treatment. *J Clin Gastroenterol* 2003;36:367-368.
- Mastromatteo AM, Rapaccini GL, Pompili M, Ursino S, Romano-Spica V, Gasbarrini G et al. Hepatitis C virus infection: Other biological fluids than blood may be responsible for intrafamilial spread. *Hepatogastroenterology* 2001;48:193-196.
- Mathews G, Bhagani S. The epidemiology and natural history of HIV/HBV and HIV/HCV co-infections. *J HIV Ther* 2003;8:77-84.
- Mathews GV, Dore GJ. HIV and hepatitis C coinfection. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:1000-1008.
- Maticic M, Poljak M, Kramar B, Seme K, Brinovec V, Meglic-Volkar J et al. Detection of hepatitis C virus RNA from gingival crevicular fluid and its relation with virus presence in saliva. *J Periodontol* 2001;72:11-16.
- Mauss S, Valenti W, DePamphilis J, Duff F, Cupelli L, Passe S et al. Risk factors for hepatic decompensation in patients with HIV/HCV coinfection and liver cirrhosis during interferon-based therapy. *AIDS* 2004;18:21-25.
- McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998;339:1485-1492.

- McHutchison JG, Manns M, Patel K, Poynard T, Lindsay KL, Trepo C et al. Adherence to combination therapy enhances sustained response in genotype-1-infected patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;123:1061-1069.
- McHutchison JG, Polito A, Person JL, Govindarajan S, Valinluck B, Dinello R et al. Assessment of hepatitis C antibody tests in homosexual men with hyperglobulinemia. *J Infect Dis* 1991;164:217-218.
- McNair AN, Main J, Thomas HC. Interactions of the human immunodeficiency virus and the hepatotropic viruses. *Semin Liver Dis* 1992;12:188-196.
- Mecenate F, Pellicelli AM, Barbaro G, Romano M, Barlattani A, Mazzone E et al. Short versus standard treatment with pegylated interferon alfa-2A plus ribavirin in patients with hepatitis C virus genotype 2 or 3: The CLEO trial. *BMC Gastroenterol* 2010;10:21.
- Medrano J, Barreiro P, Resino S, Tuma P, Rodríguez V, Vispo E et al. Rate and timing of hepatitis C virus relapse after a successful course of pegylated interferon plus ribavirin in HIV-infected and HIV-uninfected patients. *Clin Infect Dis* 2009;49:1397-1401.
- Medrano J, Neukam K, Rallon N, Rivero A, Resino S, Naggie S et al. Modeling the probability of sustained virological response to therapy with pegylated interferon plus ribavirin in patients coinfecting with hepatitis C virus and HIV. *Clin Infect Dis* 2010;51:1209-1216.
- Mehta SH, Brancati FL, Sulkowski MS, Strathdee SA, Szklo M, Thomas DL. Prevalence of type 2 diabetes mellitus among persons with hepatitis C virus infection in the United States. *Ann Intern Med* 2000;133:592-599.
- Mehta SH, Cox A, Hoover DH, Wang XH, Mao Q, Ray S et al. Protection against persistence of hepatitis C. *Lancet* 2002;359:1478-1483.
- Mellors J, Hawkins A, Simmonds P. Genotype dependence of hepatitis C virus load measurement in commercially available quantitative assays. *J Clin Microbiol* 1999;37:2525-2532.
- Mendel I, Clotteau L, Lambert S, Buffet-Janvresse C. Hepatitis C virus infection in an HIV-positive population in Normandy: Antibodies, HCV RNA and genotype prevalence. *J Med Virol* 1995;47:231-236.
- Milan M, Boninsegna S, Scribano L, Lobello S, Fagioli S, Fabris P et al. Viral kinetics during the first weeks of pegylated interferon and ribavirin treatment can identify patients at risk of relapse after its discontinuation: New strategies for such patients?. *Infection* 2012;40:173-179.
- Mira J, Lopez-Cortes LF, Vispo E. Concomitant nevirapine therapy is associated with higher efficacy of pegylated interferon plus ribavirin among HIV/hepatitis C virus-coinfecting patients. XVIII International AIDS Conference (abstract TUAB0101). Vienna, 2010.
- Mitsuyasu R. Prevention of bacterial infections in patients with advanced HIV infection. *AIDS* 1999;13:S19-S23.
- Mohsen AH, Easterbrook P, Taylor C, Norris S. Hepatitis C and HIV coinfection. *Gut* 2002;51:601-608.
- Morello J, Soriano V, Barreiro P, Medrano J, Madejón A, González-Pardo G et al. Plasma ribavirin trough concentrations at week 4 predict hepatitis C virus (HCV) relapse in HIV-HCV-coinfecting patients treated for chronic hepatitis C. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:1647-1649.
- Moreno L, Quereda C, Moreno A, Perez-Elias MJ, Antela A, Casado JL et al. Pegylated interferon a-2b plus ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C in HIV-infected patients. *AIDS* 2004;18:67-73.
- Moucari R, Ripault MP, Oulès V, Martinot-Peignoux M, Asselah T, Boyer N et al. High predictive value of early viral kinetics in retreatment with peginterferon and ribavirin of chronic hepatitis C patients non-responders to standard combination therapy. *J Hepatol* 2007;46:596-604.

- Myers RP, Benhamou Y, Bouchet M, Thibault V, Mehri D, Poynard T. Pegylated interferon alpha 2b and ribavirin in HIV/ hepatitis C virus co-infected non-responders and relapsers to interferon-based therapy. *AIDS* 2004;18:75-79.
- Myers RP, Benhamou Y, Imbert-Bismut F, Thibault V, Bochet M, Charlotte F et al. Serum biochemical markers accurately predict liver fibrosis in HIV and hepatitis C virus co-infected patients. *AIDS* 2003;17:721-725.
- Nagao Y, Sata M, Noguchi S, Seno'o T, Kinoshita M, Kameyama T et al. Detection of hepatitis C virus RNA in oral lichen planus and oral cancer tissues. *J Oral Pathol Med* 2000;29:259-266.
- Nasta P, Gatti F, Borghi F. Insulin resistance is associated with hepatitis C viremia and reduces the success of peginterferon alfa2a plus ribavirin in HIV/HCV co-infected patients. 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC 2010). Boston, 2010.
- National Centre in HIV Epidemiology and Clinical Research. HIV/AIDS, viral hepatitis and sexually transmissible infections in Australia. Annual Surveillance Report 2001. Sydney: National Centre in HIV Epidemiology and Clinical Research. The University of New South Wales, 2001.
- Navazesh M, Christensen CM. A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures. *J Dent Res* 1982;61:1158-1162.
- Navazesh M, Mulligan R, Barron Y, Redford M, Greenspan D, Alves M et al. A 4- year longitudinal evaluation of xerostomia and salivary gland hypofunction in the Women's Interagency HIV Study participants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95:693-698.
- Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 1998;282:103-107.
- Ngo-Giang-Huong N, Jourdain G, Sirirungsri W, Decker L, Khamduang W, Le Coeur S et al. Human immunodeficiency virus-hepatitis C virus co-infection in pregnant women and perinatal transmission to infants in Thailand. *Int J Infect Dis* 2010;14:e602-607.
- Nicot F, Legrand-Abravanel F, Lafont T, Dubois M, Sauné K, Pasquier C et al. Serum concentrations of ribavirin and pegylated interferon and viral responses in patients infected with HIV and HCV. *J Med Virol* 2008;80:1523-1529.
- Nolte FS, Caliendo AM. Molecular detection and identification of microorganism. *Manual of Clinical Microbiology*. Ed. Murray, 9ª edición, 2007;16:218-244.
- Nowicki M, Laskus T, Radkowski M. Presence of HCV RNA in cervico- vaginal lavages obtained from HIV-1/HCV co-infected women. 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (abstract 648-M). Seattle, 2002.
- Nübling CM, von Wangenheim G, Staszewski S, Löwer J. Hepatitis C virus antibody prevalence among human immunodeficiency virus-1-infected individuals: Analysis with different test systems. *J Med Virol* 1994;44:49-53.
- Numata N, Ohori H, Hayakawa Y, Sayito Y, Tsunoda A, Kanno A. Demonstration of hepatitis C virus genome in saliva and urine of patients with type C hepatitis: Usefulness of the single polymerase chain reaction method for detection of the HCV genome. *J Med Virol* 1993;41:120-128.
- Nunes D, Fleming C, Offner G, O'Brien M, Tumilty S, Fix O et al. HIV infection does not affect the performance of non-invasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus related liver disease. *JAIDS* 2005;40:538-544.

- Núñez M, Miralles C, Berdún MA, Losada E, Aguirrebengoa K, Ocampo A et al. Role of weight-based ribavirin dosing and extended duration of therapy in chronic hepatitis C in HIV-infected patients: The PRESCO trial. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007;23:972-982.
- Okamoto M, Nagata I, Murakami J, Kaji S, Iitaka T, Hoshika T et al. Prospective reevaluation of risk factors in mother-to-child transmission of hepatitis C virus: High viral load, vaginal delivery, and negative anti-NS4 antibody. *J Infect Dis* 2000;182:1511-1514.
- Operskalski EA y Kovacs A. HIV/HCV Co-infection: Pathogenesis, clinical complications, treatment, and new therapeutic technologies. *Curr HIV/AIDS Rep* 2011;8:12-22.
- Opravil M, Sasadeusz J, Cooper DA, Rockstroh JK, Clumeck N, Clotet B et al. Effect of baseline CD4 cell count on the efficacy and safety of peginterferon alfa-2a (40KD) plus ribavirin in patients with HIV/hepatitis C virus coinfection. *JAIDS* 2008;47:36-49.
- Orta N, Guna MR, Latorre JC, Ovies M, Pérez JL, Gimeno C. Análisis de resultados del programa externo de control de calidad SEIMC de carga viral del VIH-1 y del VHC. Año 2007. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26 (Supl 13):S8-S13.
- Orta N, Guna MR, Latorre JC, Pérez JL, Gimeno C. Análisis de resultados del Programa Externo de Control de Calidad SEIMC de carga viral del VIH-1 y del VHC. Año 2006. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007;25 (Supl 3):S8-S13.
- Panel de expertos de Gesida, SPNS y AEEH. Recomendaciones de Gesida / PNS / AEEH sobre tratamiento y manejo del paciente adulto coinfectado por VIH y virus de las hepatitis A, B y C. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010;28:e1-e31.
- Pappalardo BL. Influence of maternal human immunodeficiency virus (HIV) co-infection on vertical transmission of hepatitis C virus (HCV): A meta-analysis. *Int J Epidemiol* 2003;32:727-734.
- Pasquier C, Bujan L, Daudin M, Righi L, Berges L, Thauvin L et al. Intermittent detection of hepatitis C virus (HCV) in semen from men with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HCV. *J Med Virol* 2003;69:344-349.
- Pastore L, Fiore JR, Tateo M, De Benedittis M, Petrucci M, Casalino C et al. Detection of hepatitis C virus-RNA in saliva from chronically HCV-infected patients. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006;19217-19224.
- Pawlotsky JM, Taskiris 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;171:1607-1610.
- Pawlotsky JM. Diagnostic tests for hepatitis C. *J Hepatol* 1999;31:71-79.
- Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology* 2002;122:1554-1568.
- Pawlotsky JM. Treatment of hepatitis C: Don't put all your eggs in one basket! *Gastroenterology* 2007;132:1611-1615.
- Payan C, Pivert A, Morand P, Fafi-Kremer S, Carrat F, Pol S et al. Rapid and early virological response to chronic hepatitis C treatment with IFN alpha2b or PEG-IFN alpha2b plus ribavirin in HIV/HCV co-infected patients. *Gut* 2007;56:1111-1116.
- Pellicano R, Fagoonee S, Repici A, Rizzetto M. Hepatitis C virus and human immunodeficiency virus: A dangerous dealing. *Panminerva Med* 2007;49:79-82.
- Pérez-Olmeda M, García-Samaniego J, Soriano V. Hepatitis C viraemia in HIV-HCV co-infected patients having immune restoration with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2000;14:212.

- Pérez-Olmeda M, Núñez M, Romero M, González J, Castro A, Arribas JR et al. Pegylated IFN-a-2b plus ribavirin as therapy for chronic hepatitis C in HIV-infected patients. *AIDS* 2003;17:1024-1028.
- Perronne C, Carrat F, Bani Sadr F. Final results of ANRS HC02-RIBAVIC: A randomized controlled trial of pegylated interferon-a-2b plus ribavirin vs interferon-a-2b plus ribavirin for the initial treatment of chronic hepatitis C in HIV co-infected patients. 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (abstract 117LB). San Francisco, 2004.
- Perronne C, Carrat F, Bani Sadr F. RIBAVIC trial (ANRS HC02): A controlled randomized trial of pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin vs interferon alfa-2b plus ribavirin for the initial treatment of chronic hepatitis C in HIV co-infected patients: Preliminary results. XVI International AIDS Conference (abstract LBO16). Barcelona, 2002.
- Perronne C. Treatment of chronic hepatitis C in patients coinfecting with HIV: tolerability, drug interactions, therapeutic indications. *Gastroenterol Clin Biol* 2002; 26:274-282.
- Pialoux G, Gouezel P, Delarocque-Astagneau E. Epidemiology of patients with HIV and HCV co-infection. XIV International AIDS Conference (abstract ThPeC7518). Barcelona, 2002.
- Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998;282:938-941.
- Pilli M, Penna A, Zerbini A, Vescovi P, Manfredi M, Negro F et al. Oral lichen planus pathogenesis: A role for the HCV-specific cellular immune response. *Hepatology* 2002;36:1446-1452.
- Piroth L, Duong M, Quantin C, Abrahamowicz M, Michardiere R, Aho LS et al. Does hepatitis C virus co-infection accelerate clinical and immunological evolution of HIV-infected patients?. *AIDS* 1998;12:381-388.
- Pockros PJ, Duchini A, McMillian R, Nyberg LM, McHutchison J, Viernes E. Immune thrombocytopenic purpura in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2040-2045.
- Pomova NI, Ivanikov IO, Siutkin VE. Use of peg-intron in combined treatment of chronic liver disease caused by HIV infection. *Eksp Klin Gastroenterol* 2003;182:42-45.
- Poordad F, McCone J Jr, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS et al; SPRINT-2 investigators. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011;364:1195-1206.
- Porrino L, Bagaglio S, Morsica G, Gallotta G, Hasson H, Gal L et al. Mixed HCV genotypes infection and response to anti-HCV treatment in HIV/HCV co-infected patients. 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention (WEAB0102). Roma, 2011.
- Potter M, Oduyungbo A, Yang H, Saeed S, Klein MB; Canadian co-infection cohort study investigators. Impact of hepatitis C viral replication on CD4+ T-lymphocyte progression in HIV-HCV coinfection before and after antiretroviral therapy. *AIDS* 2010;24:1857-1865.
- Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G et al. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 1998;352:1426-1432.
- Public Health Service (USPHS) and Infectious Diseases Society of America (IDSA). 1999 USPHS/IDSA guidelines for the prevention of opportunistic infections in persons infected with human immunodeficiency virus. *U.S. MMWR Recomm Rep* 1999;48:1-59, 61-66.

- Puoti M, Bonancini M, Spinetti A, Putzolu V, Govindarajan S, Zaltron S et al. Liver fibrosis progression is related to CD4 cell depletion in patients coinfecting with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 2001;183:134-137.
- Pyne MT, Konnick EQ, Phansalkar A, Hillyard DR. Evaluation of the Abbott investigational use only RealTime hepatitis C virus (HCV) assay and comparison to the Roche TaqMan HCV analyte-specific reagent assay. *J Clin Microbiol* 2009;47:2872-2878.
- Quereda C, Moreno S, Moreno L, Moreno A, García-Sanmiguel L, Perez-Elias et al. The role of liver biopsy in the management of chronic hepatitis C in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Hum Pathol* 2004;35:1083-1087.
- Qurishi N, Kreuzberg C, Lüchters G, Lüchters G, Effenberger W, Kupfer B et al. Effect of antiretroviral therapy on liver-related mortality in patients with HIV and hepatitis C virus coinfection. *Lancet* 2003;362:1708-1713.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing 2012, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/> (acceso noviembre de 2012)
- Ragni MV, Belle SH. Impact of human immunodeficiency virus infection on progression to end-stage liver disease in individuals with hemophilia and hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2001;183:1112-1115.
- Rakela J, Radkowski M, Laskus T. HCV presence in genital secretions in HIV/HCV coinfecting women. 54th Annual Meeting of the Association for the Study of Liver Diseases (abstract 60). Boston 2003.
- Rallón NI, Soriano V, Naggie S, Restrepo C, Goldstein D, Vispo E et al. IL28B gene polymorphisms and viral kinetics in HIV/hepatitis C virus-coinfecting patients treated with pegylated interferon and ribavirin. *AIDS* 2011;25:1025-1033.
- Ramos B, Núñez M, Rendón A, Berdún MA, Losada E, Santos I et al. Critical role of ribavirin for the achievement of early virological response to HCV therapy in HCV/HIV-coinfecting patients. *J Viral Hepat* 2007;14:387-391.
- Ramos-Casals M, García-Carrasco M, López-Medrano F, Trejo O, Fornis X, López-Guillermo A et al. Severe autoimmune cytopenias in treatment-naïve hepatitis C virus infection: clinical description of 35 cases. *Medicine (Baltimore)* 2003;82:87-96.
- Rapiti E, Prüss-Üstün A, Hutin Y. Sharps injuries: assessing the burden of disease from sharps injuries to health-care workers at national and local levels. Geneva, World Health Organization, 2005; WHO Environmental Burden of Disease Series, No. 11.
- Ratziu V, Charlotte F, Jacqueminet S, Giral P, Podevin P, Sarfaty L et al. A one year randomized, placebo-controlled, double-blind trial of rosiglitazone in NASH; results of the FLIRT pilot trial. *J Hepatol* 2006;44(suppl 2):272.
- Reiberger T, Aberle JH, Kundi M, Kohrgruber N, Rieger A, Gangl A et al. IP-10 correlates with hepatitis C viral load, hepatic inflammation and fibrosis and predicts hepatitis C virus relapse or non-response in HIV-HCV coinfection. *Antivir Ther* 2008;13:969-976.
- Rey D, Fritsch S, Schmitt C, Meyer P, Lang JM, Stoll-Keller F. Quantitation of hepatitis C virus RNA in saliva and serum of patients coinfecting with HCV and human immunodeficiency virus. *J Med Virol* 2001;63:117-119.
- Rimland D, Guest JL. Mortality in the HIV Atlanta VA Cohort Study (HAVACS): A 22 year analysis. 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (abstract 873). San Francisco, 2004.
- Rivero-Juárez A, Mira JA, Pérez-Camacho I, Macías J, Camacho A, Neukam K et al; Viral Hepatitis Study Group, part of the Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas (SAEI) (Andalusian Society for Infectious Diseases).

- Twelve week post-treatment follow-up predicts sustained virological response to pegylated interferon and ribavirin therapy in HIV/hepatitis C virus co-infected patients. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1351-1353.
- Roberts EA, Yeung L. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2002;36:106-113.
- Rockstroh J, Spengler U. HIV/HCV coinfection. *Lancet Infect Dis* 2004;4:437-444.
- Rockstroh JK, Bhagani S, Benhamou Y, Bruno R, Mauss S, Peters L et al. European AIDS Clinical Society (EACS) guidelines for the clinical management and treatment of chronic hepatitis B and C coinfection in HIV-infected adults. *HIV Med* 2008;9:82-88.
- Rockstroh JK, Konopnicki D, Soriano V. Hepatitis B (HBV) and hepatitis C (HCV) in the EuroSIDA Cohort: Prevalence and impact on mortality, AIDS progression and response to HAART. 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (abstract 799). San Francisco, 2004.
- Rockstroh JK, Mocroft A, Soriano V, Tural C, Losso MH, Horban A et al; EuroSIDA Study Group. Influence of hepatitis C virus infection on HIV-1 disease progression and response to highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2005;192:992-1002.
- Rockstroh JK, Spengler U, Sudhop T, Ewig S, Theisen A, Hammerstein U et al. Immunosuppression may lead to progression of hepatitis C virus-associated liver disease in hemophiliacs coinfecting with HIV. *Am J Gastroenterol* 1996;91:2563-2568.
- Rockstroh JK, Theisen A, Kaiser R, Sauerbruch T, Spengler U. Antiretroviral triple therapy decreases HIV viral load but does not alter hepatitis C virus (HCV) serum levels in HIV-HCV-co-infected haemophiliacs. *AIDS* 1998;12:829-830.
- Romero-Gómez M, Del Mar Vitoria M, Andrade RJ, Salmerón J, Diago M, Fernández-Rodríguez CM et al. Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 2005;128:636-641.
- Ross RS, Viazov S, Hoffman S, Roqqendorf M. Performance characteristics of a transcription-mediated nucleic acid amplification assay for qualitative detection of hepatitis C virus RNA. *J Clin Lab Anal* 2001;15:308-313.
- Rotman Y, Liang TJ. Coinfection with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus: virological, immunological, and clinical outcomes. *J Virol* 2009;83:7366-7374.
- Roy KM, Bagg J, Bird GL, Spence E, Follett EA, Mills PR et al. Serological and salivary markers compared with biochemical markers for monitoring interferon treatment for hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 1995;47:429-434.
- Roy KM, Bagg J, Follet EA, Brewer A, Lowe GD. Hepatitis C virus in saliva of haemophiliacs patients attending an oral surgery unit. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1996;34:162-165.
- Roy KM, Bagg J, McCarron B, Good T, Cameron S, Pithie A. Predominance of HCV type 2a in saliva from intravenous drug users. *J Med Virol* 1998;54:271-275.
- Rutschmann OT, Negro F, Hirschel B, Hadengue A, Anwar D, Perrin LH. Impact of treatment with human immunodeficiency virus (HIV) protease inhibitors on hepatitis C viraemia in patients coinfecting with HIV. *J Infect Dis* 1998;177:783-785.
- Saha MK, Chakrabarti S, Panda S, Naik TM, Manna B, Chatterjee A et al. Prevalence of HCV and HBV infection amongst HIV seropositive intravenous drug users and their non-injecting wives in Manipur, India. *Indian J Med Res* 2000;111:37-39.

- Saldanha J, Lelie N, Heath A and WHO Collaborative Group. Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT). *Vox Sang* 1999;76:149-158.
- Sánchez-Conde M, Montes-Ramírez ML, Miralles P, Alvarez JM, Bellón JM, Ramírez M et al. Comparison of transient elastography and liver biopsy for the assessment of liver fibrosis in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients and correlation with noninvasive serum markers. *J Viral Hepat* 2010;17:280-286.
- Sánchez-Quijano A, Andreu J, Gavilán F, Luque F, Abad MA, Soto B et al. Influence of human immunodeficiency virus type 1 infection on the natural course of chronic parenterally acquired hepatitis C. *Eur J Clin Infect Dis* 1995;14:949-953.
- Sánchez-Tapias JM, Diago M, Escartín P, Enríquez J, Romero-Gómez M, Bárcena R et al. Peginterferon-alpha 2a plus ribavirin for 72 weeks in chronic hepatitis C patients without a response by week 4. *Gastroenterology* 2006;131:451-460.
- Sarrazin C, Gärtner BC, Sizmman 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;44:729-737.
- Scaradavou A. HIV-related thrombocytopenia. *Blood Rev* 2002;16:73-76.
- Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 2002;21:5017-5025.
- Schutten M. Comparison of the Abbott Realtime HIV-1 and HCV viral load assays with commercial competitor assays. *Expert Rev Mol Diagn* 2008;8:369-377.
- Semba RD, Shah N, Klein RS, Mayer KH, Schuman P, Vlahov D. Prevalence and cumulative incidence of and risk factors for anemia in a multicenter cohort study of human immunodeficiency virus-infected and -uninfected women. *Clin Infect Dis* 2002;34:260-266.
- Sherman KE, O'Brien J, Gutierrez AG, Harrison S, Urdea M, Neuwald P et al. Quantitative evaluation of hepatitis C virus RNA in patients with concurrent human immunodeficiency virus infections. *J Clin Microbiol* 1993;31:2679-2682.
- Sherman KE, Rouster SD, Chung RT, Rajicic N. Hepatitis C prevalence among patients infected with human immunodeficiency virus: A cross-sectional analysis of the US adult AIDS clinical trials group. *Clin Infect Dis* 2002;34:831-837.
- Shiffman ML, Di Bisceglie AM, Lindsay KL, Morishima C, Wright EC, Everson GT et al. Peginterferon alfa-2a and ribavirin in patients with chronic hepatitis C who have failed prior treatment. *Gastroenterology* 2004;126:1015-1023.
- Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005;42:962-973.
- Sizmman D, Boeck C, Boelter J, Fischer D, Miethke M, Nicolaus S et al. Fully automated quantification of hepatitis C virus (HCV) RNA in human plasma and human serum by the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan system. *J Clin Virol* 2007;38:326-333.
- Slim J, John G, Smith S. Neutropenia as an adverse drug reaction in patients co-infected with HIV/HCV receiving interferon and ribavirin therapy. 2nd International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis and Treatment (abstract 977). Paris, 2003.

- Soriano V, Barreiro P, Nuñez M. Management of chronic hepatitis B and C in HIV-coinfected patients. *J Antimicrob Chemother* 2006a;57:815-818.
- Soriano V, García-Samaniego J, Valencia E, Rodríguez-Rosado R, Muñoz F, González-Lahoz J. Impact of chronic liver disease due to hepatitis viruses as cause of hospital admission and death in HIV-infected drug users. *Eur J Epidemiol* 1999;15:1-4.
- Soriano V, Kirk O, Atunes F. The influence of hepatitis C virus on the prognosis of HIV-infected persons: the EuroSIDA study. XIII International AIDS Conference (abstract ThOrB655). Durban, 2000.
- Soriano V, Labarga P, Ruiz-Sancho A, García-Samaniego J, Barreiro P. Regression of liver fibrosis in hepatitis C virus/HIV-co-infected patients after treatment with pegylated interferon plus ribavirin. *AIDS* 2006b;20:2225-2227.
- Soriano V, Martín-Carbonero L, García-Samaniego J. Treatment of chronic hepatitis C virus infection: We must target the virus or liver fibrosis?. *AIDS* 2003;17:751-763.
- Soriano V, Mocroft A, Rockstroh J, Ledergerber B, Knysz B, Chaplinskas S et al; EuroSIDA Study Group. Spontaneous viral clearance, viral load, and genotype distribution of hepatitis C virus (HCV) in HIV-infected patients with anti-HCV antibodies in Europe. *J Infect Dis* 2008;198:1337-1344.
- Soriano V, Nuñez M, Camino N, Maida I, Barreiro P, Romero M et al. Hepatitis C virus-RNA clearance in HIV-coinfected patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon plus ribavirin. *Antivir Ther* 2004b;9:505-509.
- Soriano V, Pérez-Olmeda M, Ríos P, Nuñez M, García-Samaniego J, González-Lahoz J. Hepatitis C virus (HCV) relapses after anti-HCV therapy are more frequent in HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004e;20:351-354.
- Soriano V, Puoti M, Sulkowski M, Cargnel A, Benhamou Y, Peters M et al. Care of patients coinfecting with HIV and hepatitis C virus: 2007 updated recommendations from the HCV-HIV International Panel. *AIDS* 2007;21:1073-1089.
- Soriano V, Puoti M, Sulkowski M, Mauss S, Cacoub P, Cargnel A et al. Care of patients with hepatitis C and HIV coinfection. *AIDS* 2004a;17:1-12.
- Soriano V, Sherman KE, Rockstroh J, Dieterich D, Back D, Sulkowski M, et al. Challenges and opportunities for hepatitis C drug development in HIV-hepatitis C virus-co-infected patients. *AIDS* 2011;25:2197-2208.
- Soriano V, Sulkowski M, Bergin C, Hatzakis A, Cacoub P, Katlama C et al. Care of patients with chronic hepatitis C and HIV co-infection: Recommendations from the HIV-HCV International Panel. *AIDS* 2002;16:813-826.
- Soriano V. Hepatitis C Virus (HCV) relapses after anti-HCV therapy are more frequent in HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004c;20:351-353.
- Soto B, Sánchez-Quijano A, Rodrigo L, Del Olmo JA, García-Bengoechea M, Hernández-Quero J et al. Human immunodeficiency virus infection modifies the natural history of chronic parenterally-acquired hepatitis C with an unusually rapid progression to cirrhosis. *J Hepatol* 1997;26:1-5.
- Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* 2006;43:1317-1325.
- Straeder DB, Wright T, Thomas DL, Sheeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology* 2004;39:1147-1171.
- Sugimura H, Yamamoto H, Watabiki H, Ogawa H, Harada H, Sayito I et al. Correlation of detectability of hepatitis C virus genome in saliva of elderly Japanese symptomatic HCV carriers with their hepatic function. *Infection* 1995;23:258-262.

- Sulkowski M, Mehta S, Torbenson M, Moore R, Thomas D. Unexpected Significant Liver Disease among HIV/HCV-coinfected Persons with Minimal Fibrosis on Initial Liver Biopsy. 12th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections (abstract 21). Boston, 2005b.
- Sulkowski MS, Dieterich DT, Bini EJ, Bräu N, Alvarez D, Dejesus E et al. Epoetin alfa once weekly improves anemia in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients treated with interferon/ribavirin: A randomized controlled trial. *JAIDS* 2005a;39:504-506.
- Sulkowski MS, Mast EE, Seeff LB, Thomas DL. Hepatitis C virus infection as an opportunistic disease in persons infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 2000b;30:S77-S84.
- Sulkowski MS, Moore RD, Mehta SH, Chaisson RE, Thomas DL. Hepatitis C and progression of HIV disease. *JAMA* 2002;288:199-206.
- Sulkowski MS, Thomas DL, Chaisson RE, Moore RD. Hepatotoxicity associated with antiretroviral therapy in adults infected with human immunodeficiency virus and the role of hepatitis C or B virus infection. *JAMA* 2000a;283:74-80.
- Sulkowski MS, Thomas DL. Hepatitis C in the HIV-infected person. *Ann Intern Med* 2003;138:197-207.
- Sullivan P. Associations of anemia, treatments for anemia, and survival in patients with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 2002;185:138-142.
- Sullivan PS, Hanson DL, Chu SY, Jones JL, Ward JW. Epidemiology of anemia in human immunodeficiency virus (HIV)-infected persons: results from the Multistate Adult and Adolescent Spectrum of HIV Disease Surveillance Project. *Blood* 1998;91:301-308.
- Suzuki T, Omata K, Satoh T, Miyasaka T, Arai C, Maeda M et al. Quantitative detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in saliva and gingival crevicular fluid of HCV-infected patients. *J Clin Microbiol* 2005;43:4413-4417.
- Tajiri H, Miyoshi Y, Funada S, Etani Y, Abe J, Onodera T et al. Prospective study of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:10-14.
- Takamatsu K, Koyanagi Y, Okita K, Yamamoto N. Hepatitis C virus in saliva. *Lancet* 1990;336:1515.
- Taliani G, Celestino D, Badolato MC, Pennica A, Bozza A, Poliandri G et al. Hepatitis C virus infection of salivary gland epithelial cells. *J Hepatol* 1997;26:1200-1206.
- Tang Z, Yang D, Hao L, Tang Z, Huang Y, Wang S. Detection and significance of HCV RNA in saliva, seminal fluid and vaginal discharge in patients with hepatitis C. *J Tongji Med Univ* 1996;16:11-13.
- Tanwar S, Trembling PM, Dusheiko GM. MC435 for the treatment of chronic hepatitis C. *Expert Opin Investig Drugs* 2012;21:1193-209.
- Tate D, Paul RH, Flanigan TP, Tashima K, Nash J, Adair C et al. The impact of apathy and depression on quality of life in patients infected with HIV. *AIDS Patient Care STDS* 2003;17:115-120.
- Tavares FN, Gonçalves PL, Porto SAC, Pereira FEL, Ribeiro-Rodrigues R. Nitric oxide levels are not changed in saliva of patients infected with hepatitis C virus. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005;38:453-455.
- Tedaldi EM, Hullsiek K, Malvestutto CD, Arduino RC, Fisher EJ, Gaglio PJ et al. Prevalence and characteristics of hepatitis C virus coinfection in a human immunodeficiency virus clinical trials group: The Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. *Clin Infect Dis* 2003;36:1313-1328.
- Telfer P, Sabin C, Devereux H, Scott F, Dusheiko G, Lee C. The progression of HCV-associated liver disease in a cohort of haemophilic patients. *Br J Haematol* 1994;87:555-561.

- Thomas DL, Astemborski J, Rai RM, Anania FA, Schaeffer M, Galai N et al. The natural history of hepatitis C infection: Host, viral, and environmental factors. *JAMA* 2000;284:450-456.
- Thomas DL, Shih JW, Alter HJ, Vlahov D, Cohn S, Hoover DR et al. Effect of human immunodeficiency virus on hepatitis C virus infection among injecting drug users. *J Infect Dis* 1996;174:690-695.
- Thomas DL, Villano SA, Riester KA, Hershov R, Mofenson LM, Landesman SH et al. Perinatal transmission of hepatitis C virus from human immunodeficiency virus type 1-infected mothers. Women and Infants Transmission Study. *J Infect Dis* 1998;177:1480-1488.
- Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, Shih JW, Galai N, Carella AV et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore - an analysis of 309 sex partnerships. *J Infect Dis* 1995;171:768-775.
- Thomas DL. Hepatitis C and human immunodeficiency virus infection. *Hepatology* 2002;36:S201-S209.
- Thomas DL. The challenge of hepatitis C in the HIV-infected person. *Annu Rev Med* 2008;59:473-485.
- Torriani FJ, Byrnes C, Asensi V. A comparison of hepatotoxicity and response to potent antiretroviral therapy (ARV) in HIV/HCV-infected and matched HIV-infected patients. 8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (abstract 575). Chicago, 2001.
- Torriani FJ, Ribeiro RM, Gilbert TL, Schrenk UM, Clauson M, Pacheco DM et al. Hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV) dynamics during HCV treatment in HCV/HIV coinfection. *J Infect Dis* 2003;188:1498-1507.
- Torriani FJ, Rodríguez-Torres M, Rockstroh J, Lissen E, Gonzalez-García J, Lazzarin A et al. Peginterferon Alpha-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV-patients. *N Engl J Med* 2004;351:438-450.
- Tovo PA, Palomba E, Ferraris G, Principi N, Ruga E, Dallacasa P et al. Increased risk of maternal-infant hepatitis C virus transmission for women coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. Italian Study Group for HCV Infection in Children. *Clin Infect Dis* 1997;25:1121-1124.
- Toyoda H, Fukuda Y, Koyama Y, Takamatsu J, Saito H, Hayakawa T. Effect of immunosuppression on composition of quasispecies population of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C coinfecting with human immunodeficiency virus. *J Hepatol* 1997;26:975-982.
- Tuailon E, Mondain AM, Ottomani L, Roudière L, Perney P, Picot MC et al. Impact of hepatitis C virus (HCV) genotypes on quantification of HCV RNA in serum by COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV test, Abbott HCV RealTime assay, and VERSANT HCV RNA assay. *J Clin Microbiol* 2007;45:3077-3081.
- Tuyama AC, Hong F, Saiman Y, Wang C, Ozkok D, Mosoian D et al. Human immunodeficiency virus (HIV)-1 infects human hepatic stellate cells and promotes collagen I and monocyte chemoattractant protein-1 expression: Implications for the pathogenesis of HIV/hepatitis C virus-induced liver fibrosis. *Hepatology* 2010;52:612-622.
- Uberti-Foppa C, De Bona A, Morsica G, Galli L, Gallotta G, Boeri E et al. Pretreatment of chronic active hepatitis C in patients coinfecting with HIV and hepatitis C virus reduces the hepatotoxicity associated with subsequent antiretroviral therapy. *JAIDS* 2003;33:146-152.
- Urbanus AT, van de Laar TJ, Stolte IG, Schinkel J, Heijman T, Coutinho RA et al. Hepatitis C virus infections among HIV-infected men who have sex with men: An expanding epidemic. *AIDS* 2009;23:1-7.
- Ustundag Y, Hizel N, Boyacioglu S, Akalin E. Detection of hepatitis GB virus-C and HCV genomes in the saliva of patients undergoing maintenance haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:2087.
- Valente SM. Depression and HIV disease. *J Assoc Nurses AIDS Care* 2003;14:41-51.

- Van den Eynde E, Tiraboschi JM, Tural C, Solà R, Mira JA, Podzamczar D et al. Ability of treatment week 12 viral response to predict long-term outcome in genotype 1 hepatitis C virus/HIV coinfecting patients. *AIDS* 2010;24:975-982.
- Vento S, Garofano T, Renzini C, Casali F, Ferraro T, Concia E. Enhancement of hepatitis C virus replication and liver damage in HIV-coinfecting patients on antiretroviral combination therapy. *AIDS* 1998;12:116-117.
- Venturi G, Catucci M, Romano L, Corsi P, Leoncini F, Valensin PE et al. Antiretroviral resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and protease from paired cerebrospinal fluid and plasma samples. *J Infect Dis* 2000;181:740-745.
- Vergara S, Macías J, Rivero A, Gutiérrez-Valencia A, González-Serrano M, Merino D, et al. The use of transient elastometry for assessing liver fibrosis in patients with HIV and hepatitis C virus coinfection. *Clin Infect Dis* 2007;45:969-974.
- Vermehren J, Kau A, Gärtner BC, Göbel 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;46:3880-3891.
- Vispo E, Barreiro P, Rodríguez-Novoa S, Morello J, Labarga P, Martín-Carbonero L et al. Distinct hepatitis C virus kinetics in HIV-infected patients treated with ribavirin plus either pegylated interferon alpha2a or alpha2b. *Antivir Ther* 2008;13:511-517.
- Vitali C. Immunopathologic differences of Sjögren's syndrome versus sicca syndrome in HCV and HIV infection. *Arthritis Res Ther* 2011;13:233.
- Voirin N, Trépo C, Mialhes P. Survival of patients infected with HIV and HCV in the era of highly active antiretroviral therapy. 2nd International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis and Treatment (abstract 956). Paris, 2003.
- Volberding PA, Levine AM, Dieterich D, Mildvan D, Mitsuyasu R, Saag M. Anemia in HIV infection: clinical impact and evidence-based management strategies. *Clin Infect Dis* 2004;38:1459-1467.
- Vrielink H, Reesink HW, van den Burg PJ, Zaaijer HL, Cuipers HT, Lelie PN et al. Performance of three generations of anti-hepatitis C virus enzyme-linked immunosorbent assays in donors and patients. *Transfusion* 1997;37:845-849.
- Vrolijk J, Kwekkeboom J, Janssen H, Hansen B, Zondervan P, Osterhaus A et al. Pre-treatment intrahepatic CD8+ cell count correlates with virological response to antiviral therapy in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2003;188:1528-1532.
- Wade JR, Snoeck E, Duff F, Lamb M, Jorga K. Pharmacokinetics of ribavirin in patients with hepatitis C virus. *Br J Clin Pharmacol* 2006;62:710-714.
- Wang CC, Sullivan B, Morishima C. Salivary shedding of HCV is associated with serum HCV-RNA level and the presence of periodontal disease. 43rd ANNUAL ICAAC. Chicago, 2003.
- Wang JY, Wang TH, Sheu JC, Lin JT, Chen DS. Hepatitis C virus RNA in saliva of patients with posttransfusion hepatitis and low efficiency of transmission among spouses. *J Med Virol* 1992;36:28-31.
- Wanke CA, Silva M, Knox TA, Forrester J, Speigleman D, Gorbach SL. Weight loss and wasting remain common complications in individuals infected with human immunodeficiency virus in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2000;31:803-805.

- Watson JP, Brind AM, Chapman CE, Bates CL, Gould FK, Johnson SJ et al. Hepatitis C virus: epidemiology and genotypes in the north east of England. *Gut* 1996;38:269-276.
- Weber R, Sabin CA, Friis-Moller N, Reiss P, El Sadr WM, Kira O et al. Liver-related deaths in persons infected with the human immunodeficiency virus: The DAD study. *Arch Intern Med* 2006;166:1632-1641.
- Wheeler DA, Gilbert CL, Launer CA, Muurahainen N, Elion RA, Abrams DI et al. Weight loss as a predictor of survival and disease progression in HIV infection. Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retroviro* 1998;18:80-85.
- Wheeler DA. Weight loss and disease progression in HIV infection. *AIDS Read* 1999;9:347-353.
- WHO/UNAIDS. Global HIV/AIDS response: Epidemic update and health sector progress towards Universal Acces. Progress report 2011. [http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublication/2011/20111130\\_ua\\_report\\_en.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublication/2011/20111130_ua_report_en.pdf) (acceso diciembre de 2012).
- Williams B, Waters B, Parker K. Evaluation and treatment of weight loss in adults with HIV disease. *Am Fam Physician* 1999;60:843-54,857-860.
- Wilson LE, Torbenson M, Astemborski J, Faruki H, Spoler C, Rai R et al. Progression of liver fibrosis among injection drug users with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2006;43:788-795.
- Wolk D, Jones MF, Rosenblatt JE. Laboratory diagnosis of viral hepatitis. *Infect Dis Clin North Am* 2001;15:1109-1126.
- Wright TL, Hollander H, Pu X, Held MJ, Lipson P, Quan S et al. Hepatitis C in HIV-infected patients with and without AIDS: Prevalence and relationship to patient survival. *Hepatology* 1994;20:1152-1155.
- Yacisin K, Maida I, Ríos MJ, Soriano V, Nuñez M. Hepatitis C virus coinfection does not affect CD4 restoration in HIV-infected patients after initiation of antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008;24:935-940.
- Yee TW, Wild CJ. Vector Generalized Additive Models. *J R Statist Soc B* 1996;58:481-493.
- Yee TW. VGAM: Vector Generalized Linear and Additive Models. R package version 0.9-0. URL, 2012. <http://CRAN.R-project.org/package=VGAM> (acceso junio de 2012).
- Yeung LT, King SM, Roberts EA. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Hepatology* 2001;34:223-227.
- Young KC, Chang TT, Liou TC, Wu HL. Detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and in saliva. *J Med Virol* 1993;41:55-60.
- Younossi ZM, Nader FH, Bai C, Sjogren R, Ong JP, Collantes R et al. A phase II dosefinding study of darbepoetin alpha and filgrastim for the management of anaemia and neutropenia in chronic hepatitis C treatment. *J Viral Hep* 2008;15:370-378.
- Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:223-235.
- Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J, Heathcote EJ, Lai MY, Gane E et al. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 2000;343:1666-1672.
- Zylberberg H, Chaix ML, Rabian C, Rouzioux C, Aulong B, Bréchet C et al. Tritherapy for human immunodeficiency virus infection does not modify replication of hepatitis C virus in coinfecting subjects. *Clin Infect Dis* 1998;26:1104-1106.