

## 4-DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA INFECCIÓN POR VHC

En ausencia de técnicas de cultivo celular, el diagnóstico de infección activa por VHC requiere la detección del ARN viral. Dado que en esta infección la carga viral raramente excede  $10^8$  partículas/ml, deben emplearse técnicas de amplificación genética para su detección<sup>69</sup>. Dichas técnicas pueden dividirse en cuatro categorías: 1) técnicas que detectan la presencia o ausencia del RNA viral en suero/plasma o tejido hepático (cualitativas); 2) técnicas para la cuantificación de la carga viral en suero/plasma (cuantitativas); 3) técnicas para la identificación del genotipo viral; 4) técnicas para estimar la complejidad de la población viral circulante.

### 4.1-Técnicas cualitativas:

La técnica más empleada es la amplificación por PCR del DNA complementario (DNAc) a un fragmento del extremo 5'UTR, obtenido por retrotranscripción (RT-PCR). Numerosos laboratorios de investigación han desarrollado su propia variante de la técnica, que difieren en el método de extracción del RNA (proteinasas K + SDS, desnaturalización mediante agentes caotrópicos como el tiocianato de guanidina, seguidos de extracción con fenol y cloroformo y precipitación con etanol, etc.), la selección de cebadores de 5'UTR, el número de PCRs (simple o doble), el perfil bioquímico de los ciclos de amplificación, y el procedimiento de detección del producto amplificado (hibridación con sonda marcada, tinción con bromuro de etidio en gel de agarosa, enzima-inmunoanálisis, quimioluminiscencia, etc.). Debido a las diferencias en la sensibilidad y especificidad de estas técnicas, ha sido imposible su estandarización para el diagnóstico rutinario en la práctica clínica.

El único test cualitativo para RNA VHC estandarizado y comercialmente disponible es el kit Amplicor-HCV™ de Roche Molecular Diagnostics (RMS, Branchburg, NJ). Basado en la técnica de RT-PCR en tubo único, tiene un procedimiento de extracción simple, emplea cebadores biotinados, incluye controles internos para sensibilidad y especificidad y tiene dos ventajas fundamentales: 1) utiliza dUTP en lugar de dTTP para la síntesis y copias de DNA, y un enzima, la uracyl-N-glycosilasa (AmpErase™) que se añade antes de cada amplificación y es capaz de degradar hasta 10<sup>4</sup> moléculas de DNA conteniendo dUTPs, eliminando el problema de la contaminación cruzada por aerosol de amplicones y 2) el producto final biotinado, es fácilmente detectable por una simple reacción colorimétrica en microplaca mediante la adición de estreptavidina marcada con peroxidasa.

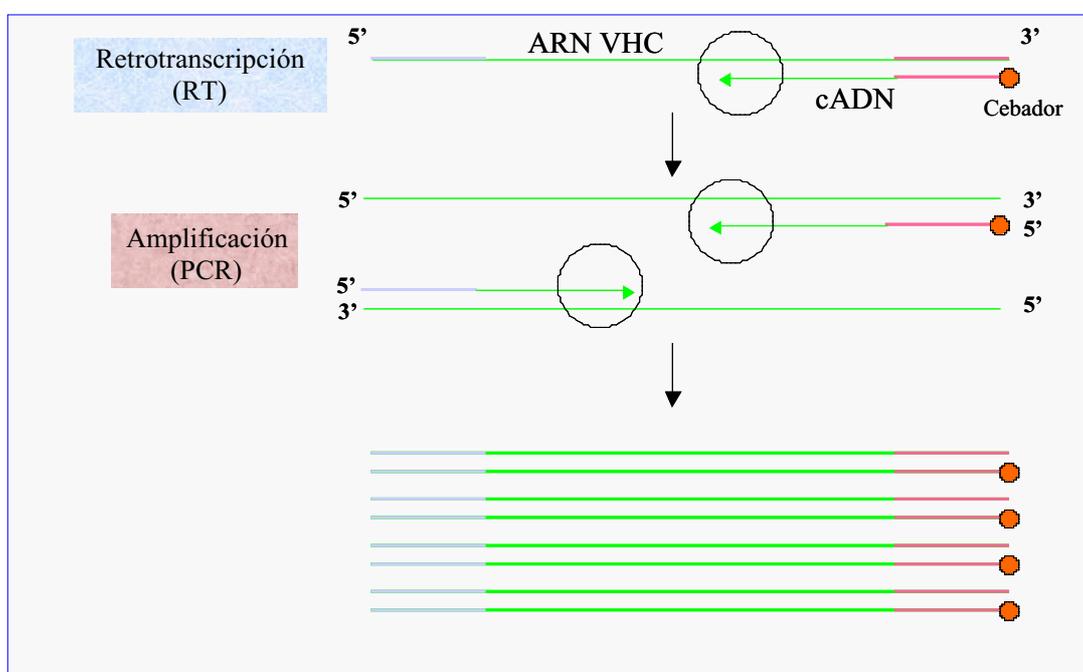


Figura 7. Representación esquemática del proceso de RT/PCR para el virus de VHC.

cADN: ADN complementario al ARN.

#### 4.2-Técnicas cuantitativas:

Los métodos de cuantificación diseñados para su uso en investigación incluyen la RT-PCR a dilución límite y la RT-PCR competitiva (basada en la coamplificación de un RNA standard sintético como control interno) resultan demasiado tediosas y complicadas para su empleo rutinario. Por ello, se han desarrollado diversas técnicas estandarizadas para la cuantificación del RNA del VHC en suero.

El test Amplicor HCV Monitor (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ) es el único test cuantitativo estandarizado basado en RT-PCR. Además del mismo sistema de prevención de contaminación y detección del test cualitativo, incluye un estándar cuantitativo interno (RNA sintético que se añade a la muestra antes de la extracción y que se coamplifica con el RNA diana), junto con su sonda específica, que permite monitorizar la eficacia del proceso de extracción y amplificación. Tras la evaluación de la primera versión del test en varios estudios clínicos, se han detectado algunas limitaciones técnicas: baja reproducibilidad, subestimación de la carga viral en los genotipos 2 y 3 en comparación con el genotipo 1<sup>73</sup>, y rango dinámico reducido (infravaloración de la carga viral en muestras que contienen más de  $5 \times 10^5$  copias de ARN del VHC/ml)<sup>74</sup>. En la segunda versión del test se ha modificado la secuencia de los cebadores y las condiciones de la PCR con la intención de superar estas limitaciones.

El test branched-DNA (Quantiplex HCV RNA, Chiron Diagnostics, Emeryville, CA) se basa en la captura del RNA viral por hibridación con sonda específica en un pocillo de microplaca, seguida de la hibridación de amplímeros de DNA ramificado a los que pueden unirse múltiples oligonucleótidos marcados con fosfatasa alcalina, cuya presencia es detectada por quimioluminiscencia. La intensidad de la señal es proporcional al nivel de ARN diana en la muestra. La segunda versión del test cuantifica con igual eficacia todos los genotipos del VHC, el límite inferior de detección es de aproximadamente  $2 \times 10^5$  equivalentes genómicos/ml de suero, y su rango dinámico comprende unos tres logaritmos<sup>75</sup> ( $5.3-8.1 \log_{10}$  Eq/ml).

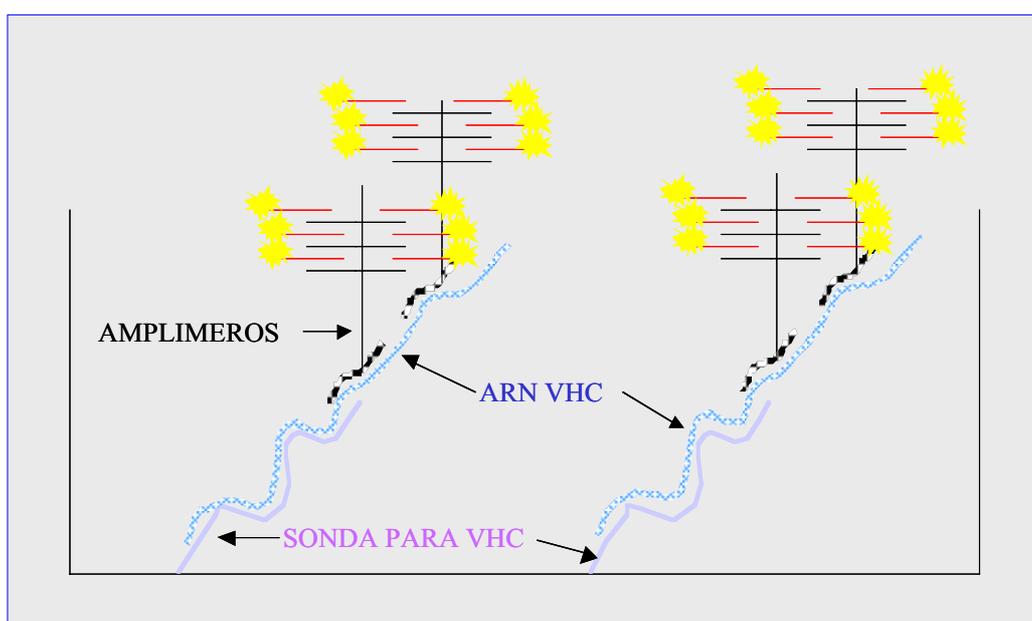


Figura 8. Representación esquemática del mecanismo del test Branched-DNA.

Un método de detección y cuantificación del ARN del VHC en vías de investigación y con un futuro prometedor consiste en la combinación de la tecnología Taqman (Roche) y el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700 (Perkin Elmer). Se trata de una RT-PCR en tubo único a la que se añade una sonda específica que emite

luz fluorescente solo en el caso de amplificación de una determinada secuencia del ARN del VHC situada entre las dianas de hibridación de los cebadores. La cantidad de fluorescencia emitida es medida por el ABI Prism 7700. La relación entre el nivel de fluorescencia y la carga viral se calcula a partir de muestras con concentración conocida de ARN del VHC (diluciones del estándar). Finalmente, conociendo el nivel de fluorescencia de cada muestra y su relación con la carga viral, se calcula la concentración de ARN de cada muestra<sup>76</sup>.

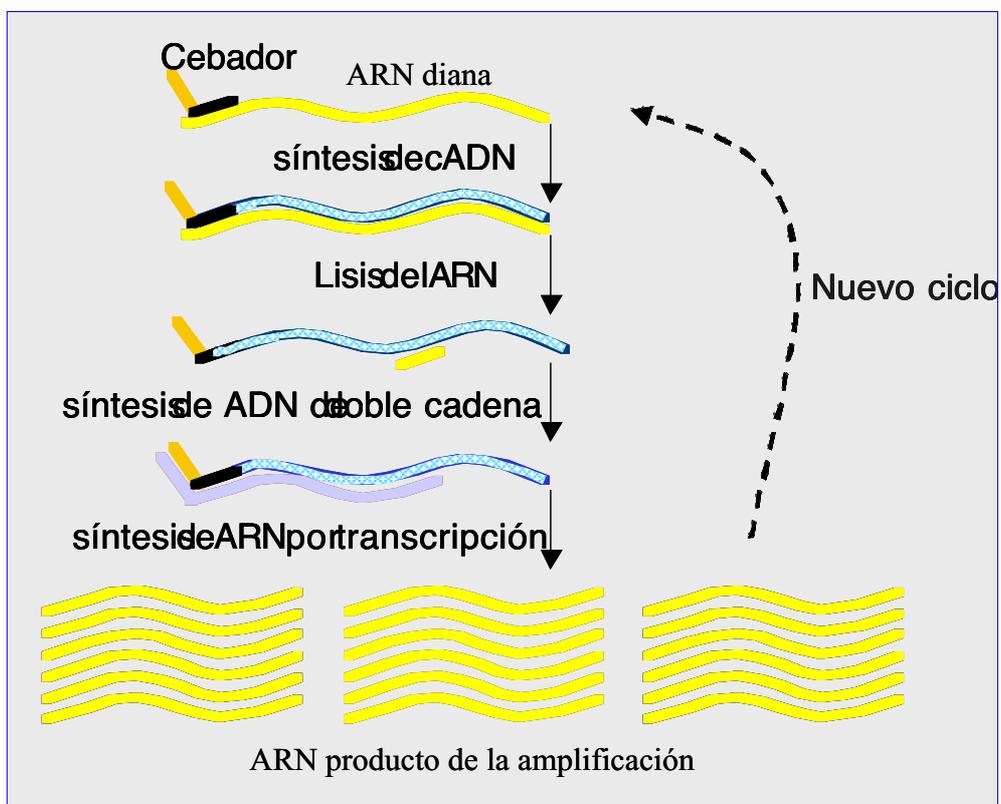


Figura 9. Representación simplificada del mecanismo de la TMA.

Recientemente se ha desarrollado una técnica de amplificación molecular para ARN que no se basa en la RT/PCR, la TMA (Transcription-mediated amplification). De forma resumida, los virus se someten a lisis y liberación del RNA genómico susceptible de ser amplificado “in vitro” (ver figura). En un primer paso de la

reacción, un cebador con un promotor de polimerasa T7 se une a la cadena de RNA viral y una transcriptasa reversa genera el DNA complementario. El mismo enzima, con actividad RNAsa H, degrada la cadena original de RNA. Al DNA complementario, con la secuencia del promotor de T7, se une un segundo cebador y se genera un DNA de doble cadena. En el último paso del primer ciclo, la RNA polimerasa DNA dependiente (T7) produce moléculas de RNA. En el siguiente ciclo, el cebador con el promotor se hibrida a las nuevas moléculas de RNA y el proceso se repite, generando al final el número suficiente de copias en RNA como para ser detectadas mediante sonda específica.

#### 4.3-Técnicas para determinación del genotipo viral:

El método más fiable para establecer el genotipo de VHC es la secuenciación de un fragmento de ARN amplificado por PCR. Existen otros métodos más sencillos, algunos disponibles comercialmente, para la identificación del genotipo en la práctica clínica: PCR con cebadores genotipo-específicos, polimorfismo de fragmentos de PCR tras digestión enzimática, hibridación diferencial a sondas genotipo-específicas, y detección de anticuerpos contra péptidos genotipo-específicos. Aunque todos ellos tienen sus limitaciones, su fiabilidad y concordancia son superiores al 90%<sup>77-80</sup>.

#### 4.4-Técnicas para estimación de la complejidad de la población viral :

Se han desarrollado varios métodos para estimar la heterogeneidad de la población viral menos complejos que la clásica clonación y secuenciación. Los principales son: análisis de desviación heterodúplex en gel (GSA), gel electroforesis en gradiente de temperatura (TGGE) y análisis de polimorfismo de conformación de cadena simple

(SSCP). Aunque son técnicas mucho menos sensibles que la clonación y secuenciación de múltiples clones, los resultados de los estudios llevados a cabo mediante estas son similares a los basados en la clonación y secuenciación<sup>81-83</sup>.

## 5-HISTORIA NATURAL

La infección aguda por VHC cursa de forma asintomática en la mayoría de los casos. Sin embargo, en el 80% de los casos la infección persiste dando lugar a una hepatitis crónica.

La hepatitis crónica C evoluciona de forma lenta e indolente. Los niveles de ALT fluctúan a lo largo del tiempo, mientras que la carga viral ( copias de ARN del VHC /ml) no presenta variaciones significativas. En la mayoría de casos (alrededor del 60%) la gravedad de la lesión histológica hepática aumenta progresivamente.

En estudios retrospectivos de pacientes con cirrosis hepática, el intervalo entre la infección y el desarrollo de cirrosis hepática se estimó en unos 20 años<sup>84,85</sup>, aunque esta cifra no es extrapolable a todos los pacientes infectados por VHC. De hecho, varios estudios sugieren que solo el 20% de los pacientes infectados por VHC alcanzarán el estadio histológico de cirrosis<sup>86</sup>. Se han relacionado varios factores con un riesgo mayor de cirrosis hepática: edad, edad de infección, duración de la infección, sexo, grado de lesión histológica en la primera biopsia, ingesta de alcohol y estatus inmune del huésped<sup>87-90</sup>.

De igual modo, el intervalo necesario para el desarrollo de hepatocarcinoma sobre cirrosis por VHC se estimó en unos 30 años de infección<sup>84,85</sup>. Su incidencia es del 1-4% por año en pacientes con cirrosis.

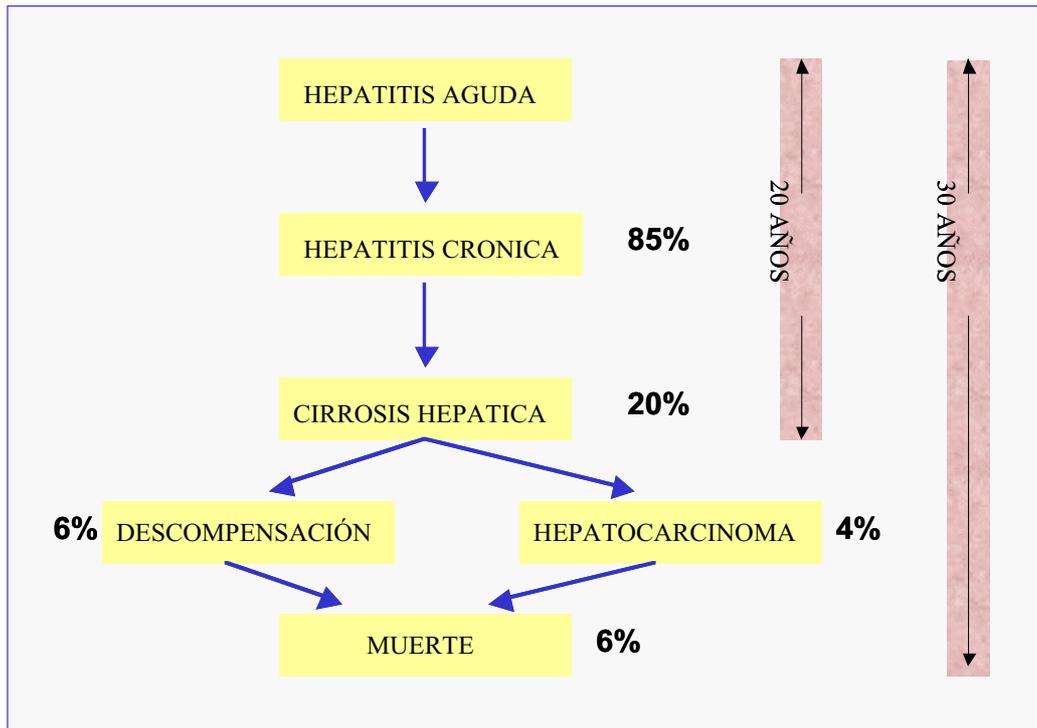


Figura 10. Progresión estimada de los pacientes infectados por el VHC a las diferentes complicaciones evolutivas (porcentaje referido al grupo original).

## 6-HISTOLOGÍA HEPÁTICA

### 6.1-Hepatitis aguda C:

En general, las características histológicas de la hepatitis aguda C son similares al resto de las hepatitis agudas. Algunos hallazgos han sido descritos como sugestivos de

infección por VHC<sup>91,92</sup>: degeneración eosinofílica de los hepatocitos, infiltrado linfocítico escaso, esteatosis microvesicular, infiltrado celular mononuclear sinusoidal denso y una lesión de conducto biliar específica con daño de las células del epitelio ductular y rotura ocasional de la membrana basal<sup>93</sup>. Sin embargo, todas estas características pueden hallarse en otros tipos de hepatitis aguda y crónica<sup>94</sup>.

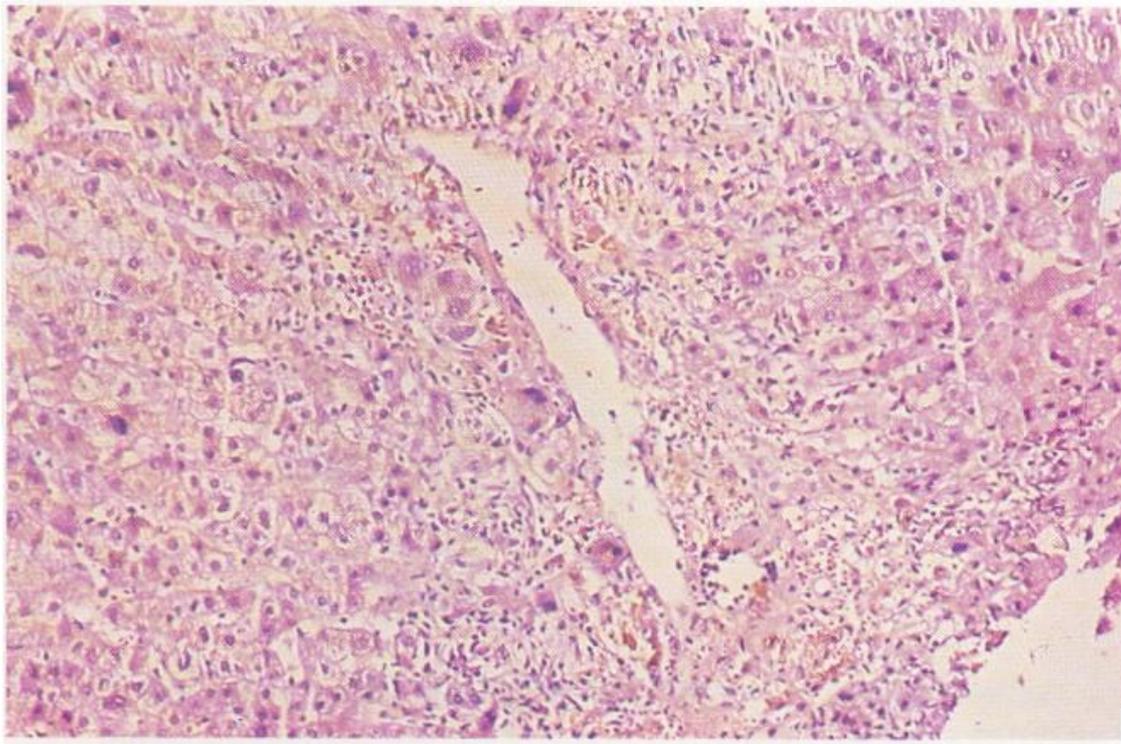


Figura 11. Histología de la hepatitis aguda C. Area centrolobulillar en la que se muestra necrosis hepatocitaria de predominio lítico, con infiltrado inflamatorio de células mononucleares. (Hematoxilina y Eosina).

## 6.2-Hepatitis crónica C:

El patrón histológico de la hepatitis crónica C es característico pero no diagnóstico. La imagen anatomopatológica más común es la hepatitis crónica leve con inflamación portal densa constituida por linfocitos y células plasmáticas ocasionales<sup>94,95</sup>. La

necrosis parcelar de la lámina limitante suele ser focal e irregular. La lesión de conducto biliar característica consiste en vacuolización, balonización o eosinofilia del citoplasma con picnosis nuclear y pseudoestratificación de las células del epitelio biliar. La esteatosis macrovesicular en grado ligero a moderado es otro hallazgo frecuente en la infección por VHC.

La fibrosis acompaña a la necroinflamación progresiva de la necrosis parcelar de la lámina limitante, y su grado es variable entre diferentes pacientes.

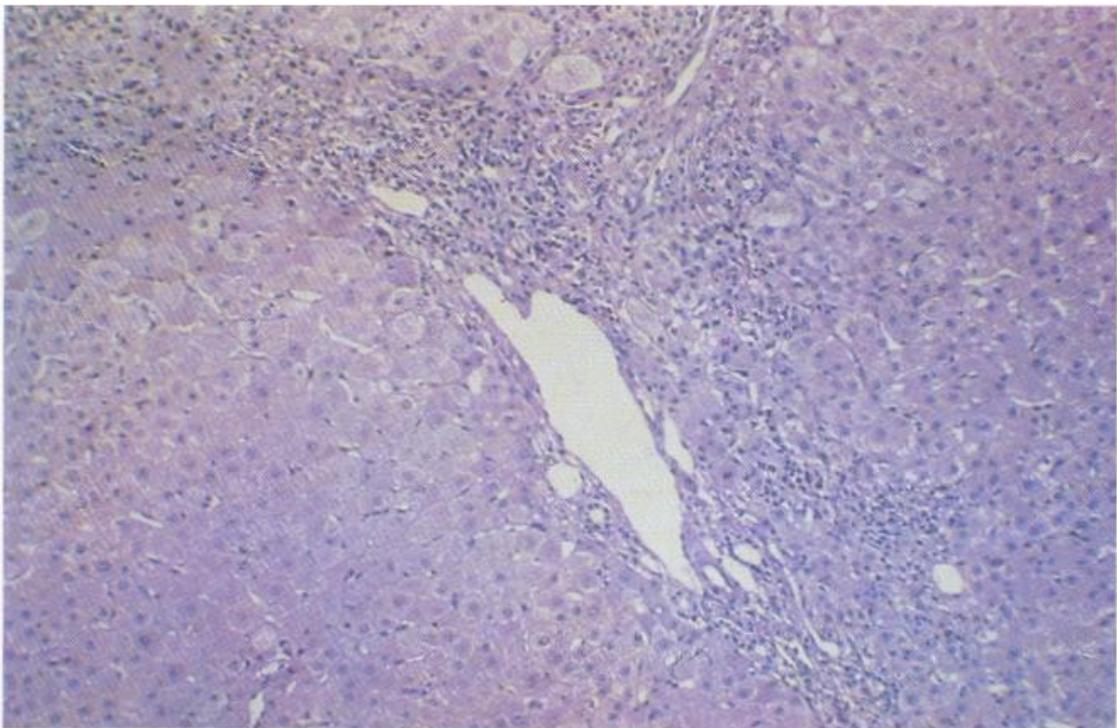


Figura 12. Histología de la hepatitis crónica C. Espacio porta con infiltrado inflamatorio que desborda los límites del mismo y necrosis parcelar de la lámina limitante. (Hematoxilina y Eosina).

## 7-TRATAMIENTO

### 7.1- Interferón:

Es el único fármaco que se ha mostrado capaz de erradicar la infección por VHC en monoterapia. Fue utilizado como tratamiento de la hepatitis no-A no-B antes del descubrimiento del VHC en un estudio piloto llevado a cabo por Hoofnagle y col.en 1986<sup>96</sup>.

**Indicación:** se recomienda la terapia en los pacientes con niveles elevados de transaminasas, anti-VHC en suero, ARN del VHC detectable e histología hepática compatible con hepatitis crónica<sup>97</sup>.

**Definición de respuesta:** en un primer momento se establecieron tres patrones de respuesta en función de la evolución de los niveles de transaminasas. Una respuesta mantenida bioquímica consiste en la normalización de los niveles de transaminasas durante el tratamiento que persiste 6 meses tras finalizar este. Una recidiva consiste en la normalización de los niveles de transaminasas y posterior elevación de los mismos tras la retirada de la terapia. La no respuesta consiste en la no normalización de los niveles de transaminasas durante el tratamiento.

El desarrollo de técnicas de detección del ARN del VHC y su progresivo uso en la clínica ha llevado a la definición de patrones de respuesta virológica, que constituyen los “end point” primarios de todo ensayo clínico sobre terapia antiviral del VHC en la actualidad.

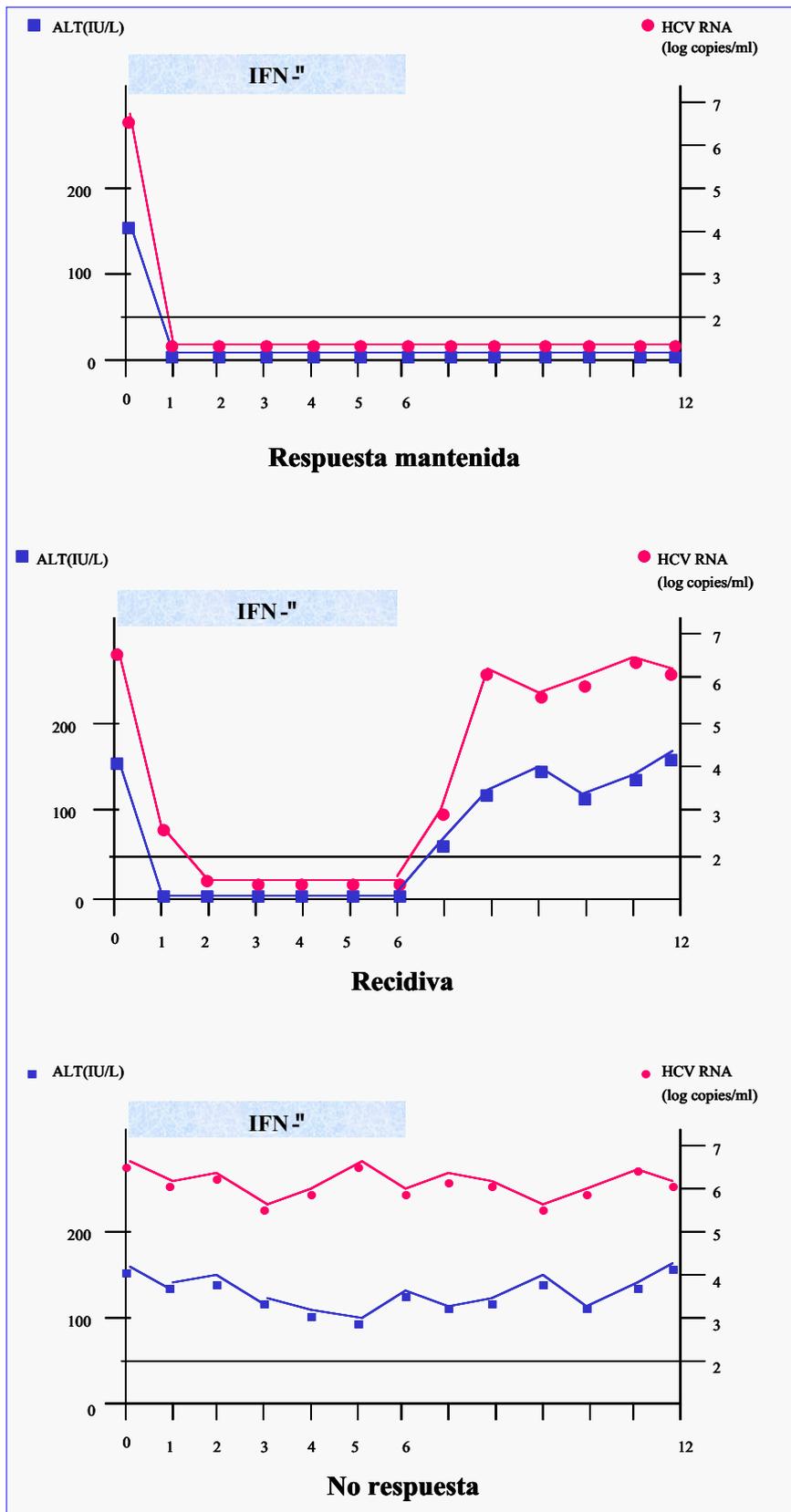


Figura 13. Patrones de respuesta al tratamiento con interferón.

### Patrones de respuesta virológica:

- **Respuesta mantenida:** se considera en los pacientes con ARN no detectable durante la terapia antiviral que persiste no detectable 6 meses tras la retirada de la terapia.
- **Recidiva:** se considera en los pacientes con ARN no detectable durante el tratamiento, que vuelve a ser detectable tras retirar la terapia.
- **No respuesta:** se considera en los pacientes con ARN detectable a pesar del tratamiento.

La gran mayoría de pacientes que presenta una respuesta mantenida bioquímica presenta así mismo una respuesta mantenida virológica.

**Dosis y duración:** la pauta más utilizada consiste en 3 MU de interferón-alfa tres veces/semana durante 6 meses. Sin embargo, un meta-análisis sugiere que el tratamiento durante 12 meses consigue una respuesta más favorable<sup>98</sup>. Dosis mayores de IFN han sido evaluadas en algunos estudios, con resultados contradictorios<sup>99,100</sup>; en la mayoría de casos hay un mayor índice de respuesta durante el tratamiento con recidiva tras la retirada de la terapia. En conjunto la tasa de respuesta mantenida al tratamiento con interferón es inferior al 20%.

**Efectos adversos:** el más frecuente es el síndrome pseudogripal (fiebre, escalofríos y artromialgias) que empieza usualmente unas 6-8 horas tras la primera inyección subcutánea de interferón y dura unas 12 horas. Tras las primeras semanas de tratamiento esta reacción disminuye de intensidad y tiende a desaparecer. Entonces pueden presentarse los efectos adversos de larga duración: astenia, mialgias, cefaleas,

irritabilidad, depresión e inhibición de la hematopoyesis en la médula ósea. Alrededor de un 2% de pacientes sufre efectos adversos severos como infecciones bacterianas, brote de enfermedad autoinmune, depresión severa (se han descrito casos de suicidio), convulsiones, insuficiencia renal o cardíaca, o neumonitis. El 5-10% de los pacientes que participan en ensayos clínicos controlados abandona el tratamiento con interferón a causa de los efectos adversos.

**Factores predictivos de respuesta:** la baja eficacia del interferón y sus múltiples efectos adversos han llevado a la búsqueda de factores predictivos de respuesta al tratamiento con el fin de seleccionar a los pacientes con mayores probabilidades de conseguir una respuesta mantenida. Se han descrito varios factores pretratamiento relacionados con una mejor respuesta: edad, menor duración de la infección, ausencia de cirrosis, bajos niveles de depósitos férricos hepáticos, carga viral baja y genotipo no 1 no 4<sup>101-103</sup>. A pesar de ello, en la práctica estos factores no son de gran utilidad en la toma de decisiones ante un paciente concreto.

**Monitorización durante el tratamiento:** el método clásico es la determinación de transaminasas una vez al mes, si estas permanecen elevadas tras tres meses de terapia es muy poco probable que se alcance una respuesta mantenida y se recomienda retirar la terapia. Esto permite evitar que los no respondedores reciban una pauta completa de interferón, pero no permite distinguir a los pacientes que presentarán una recidiva bioquímica de los que presentarán una respuesta mantenida, ya que ambos grupos normalizan los niveles de transaminasas durante el tratamiento.

El análisis de la evolución de la carga viral durante el tratamiento con interferón ha mostrado que la ausencia de ARN del VHC en plasma a las 4 semanas de tratamiento es el factor predictor de respuesta mantenida más potente descrito<sup>104-112</sup>, permite identificar tanto a los pacientes en los que la infección por VHC recidivará tras la terapia y a los no respondedores en la cuarta semana de tratamiento con un valor predictivo negativo mayor del 90% en la mayoría de estudios. En la mayoría de estos estudios la técnica de RT/PCR utilizada ha sido desarrollada por el laboratorio de investigación, por lo que no está estandarizada y requiere personal especializado.

### 7.2-Ribavirina:

Es un análogo de la guanosina que se comporta como un antiviral de amplio espectro. En monoterapia con ribavirina los niveles de transaminasas descienden en el 50-60% de los pacientes infectados por el VHC<sup>113</sup>. Sin embargo la carga viral no se modifica durante la terapia y los niveles de transaminasas vuelven a los valores previos a la terapia tras retirar esta. Su principal efecto adverso es la anemia hemolítica, la hemoglobina desciende una media de 3gr/dl y se detecta un aumento del recuento de reticulocitos durante los dos primeros meses de terapia. Después los niveles de hemoglobina permanecen estables y vuelven a los valores normales tras uno o dos meses de retirar el tratamiento.

### 7.3-Tratamiento combinado:

Desde 1993 a 1997 se llevaron a cabo varios estudios piloto que comparaban la terapia con interferón y el tratamiento combinado de interferón más ribavirina, sugiriendo una mayor eficacia en la erradicación de la infección<sup>114-116</sup>.

**Eficacia:** En 1998 fueron publicados dos ensayos clínicos multicéntricos (incluyeron más de 800 pacientes cada uno de ellos) que demostraron que el tratamiento de la hepatitis crónica C mediante la combinación de interferón y ribavirina es más eficaz que el tratamiento con interferón en monoterapia en pacientes no tratados previamente<sup>117,118</sup> (respuesta mantenida virológica del 6% en el grupo de monoterapia con interferón durante 6 meses, del 13% en el grupo de monoterapia con interferón durante 12 meses, del 31% en el grupo de tratamiento combinado durante 6 meses y del 38% en el grupo de tratamiento combinado durante 12 meses en McHutchinson et al<sup>117</sup>. Ver figura 14. Asimismo, se demostró que en pacientes que habían presentado una recidiva de la infección tras tratamiento con interferón, la terapia combinada de interferón más ribavirina obtiene una tasa de respuesta mantenida del 49%, mientras que el retratamiento con interferón solamente erradica la infección en el 5%<sup>119</sup>.

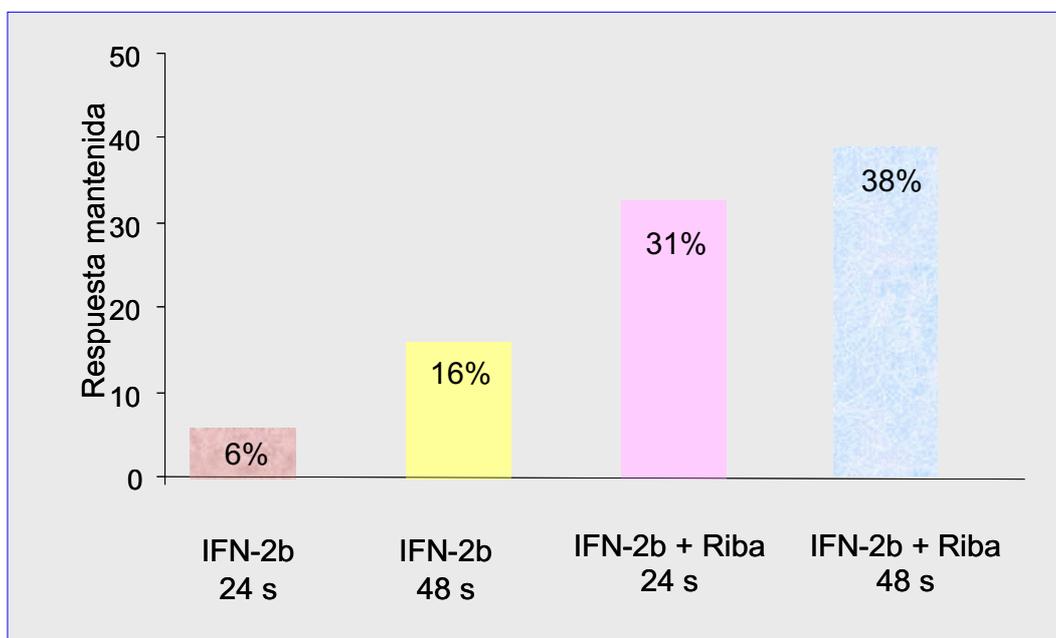


Figura 14. Respuesta al tratamiento combinado en comparación con la monoterapia con interferón. *McHutchinson et al. N Eng J Med 1998 ;339:1485-92.*

**Efectos adversos:** son los del interferón más la anemia hemolítica asociada a la ribavirina. En conjunto el 10-20% de los pacientes abandona el tratamiento por esta causa.

**Factores predictivos de respuesta:** Varios factores pretratamiento han sido relacionados con una mayor probabilidad de respuesta mantenida a la terapia combinada: edad, sexo femenino, ausencia de cirrosis, carga viral baja y genotipo no 1 no 4<sup>117-119</sup>. Se recomienda la pauta de tratamiento combinado de 12 meses para los pacientes con factores de baja probabilidad de respuesta, sobretodo a los pacientes con genotipo 1 y carga viral elevada. En los casos de asociación de factores de alta probabilidad de respuesta se recomienda la pauta de terapia de 6 meses.

**Monitorización durante el tratamiento:** los niveles de transaminasas descienden a valores normales en la mayoría de los pacientes bajo tratamiento combinado (65% en McHutchison et al y 71% en Poynard et al), por lo que no son útiles para predecir la respuesta al mismo.

La dinámica de la respuesta virológica al tratamiento combinado de interferón más ribavirina parece ser diferente a la de la monoterapia con interferón. En el estudio de McHutchison et al el ARN del VHC fue detectable hasta la semana 12 o 24 en el 59% de los pacientes con respuesta mantenida<sup>117</sup>. La utilidad del análisis del ARN del VHC durante el tratamiento combinado como factor predictor de respuesta no ha sido evaluada.

## OBJETIVOS

1. Evaluar la sensibilidad, especificidad, precisión y reproducibilidad de la segunda versión de un método comercial de RT/PCR cualitativa y cuantitativa para VHC.

2. Valorar la utilidad de la RT/PCR cualitativa como factor predictivo precoz de respuesta al tratamiento con interferón o terapia combinada (interferón más ribavirina) de la hepatitis crónica C.

3. Valorar la utilidad de la RT/PCR cuantitativa como factor predictivo precoz de respuesta al tratamiento combinado (interferón más ribavirina) de la hepatitis C.