

**FACULTAD DE MEDICINA**  
**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

---

**HEPATITIS C TRAS EL TRASPLANTE HEPÁTICO: HISTORIA NATURAL Y  
FACTORES DE RIESGO DE EVOLUCIÓN DESFAVORABLE.**

---

**Tesis doctoral presentada por:**  
**MARINA BERENGUER HAYM**

**Dirigida por:**  
**Dr. Joaquín Berenguer Lapuerta**

**Dr. Joaquín Berenguer Lapuerta**, Doctor en Medicina, Jefe del Servicio de Hepato-Gastroenterología del Hospital Universitario La FE de Valencia,

**CERTIFICA:**

Que la Tesis Doctoral titulada "**Hepatitis C tras el trasplante hepático: historia natural y factores de riesgo de evolución desfavorable**", ha sido realizada bajo mi dirección por la Licenciada en Medicina y Cirugía **D<sup>a</sup> Marina Berenguer Haym**.

Y para que así conste a todos los efectos se extiende la presente certificación en el lugar y fecha indicados.

Valencia, a 25 de Enero del 2000.

Fdo. Dr. Joaquín Berenguer Lapuerta

Quiero dedicar esta Tesis Doctoral a mi padre, director de esta tesis, Dr. Joaquín Berenguer Lapuerta, por haberme enseñado gran parte de lo que sé sobre la Medicina y por su apoyo constante a todos mis proyectos profesionales y personales.

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la generosa colaboración de varias otras personas a las que también deseo expresar mi agradecimiento.

En primer lugar, a la Dra Teresa L. Wright de la Universidad de California San Francisco. Tres de los trabajos presentados se han llevado a cabo en su centro y bajo su tutela. Sin su estímulo constante, apoyo incondicional, y sobre todo, gran cariño, no habría sido posible realizarlos.

Mi reconocimiento va también dirigido a mis compañeros del Servicio de Hepato-Gastroenterología, de la Unidad de Cirugía de Trasplante Hepático, del Servicio de Microbiología y del Servicio de Patología del Hospital Universitario La Fe de Valencia. En particular, quiero agradecer a los Dres. Martín Prieto y Domingo Carrasco, por su amistad, colaboración y ayuda continua; al Dr. Miguel Rayón por su valiosa contribución en la revisión histológica; al equipo de cirujanos, dirigidos por el Dr. José Mir, Dres. Manuel de Juan-Burgueño, Fernando San Juan, Francisco Orbis, Rafael López-Andujar y Angel Moya por hacer que mi día a día del hospital sea más ameno e instructivo.

También deseo dejar constancia de mi gratitud al personal administrativo y de enfermería del Servicio de Hepato-Gastroenterología y de la Unidad de Cirugía de Trasplante Hepático del Hospital La Fe, en particular a Marisa Galera, Amparo Ombuena y Pilar Saez por su inestimable ayuda, paciencia y generosidad durante todos estos años.

Por último, me gustaría agradecer al tutor de esta tesis, Dr. Miguel Bruguera por ayudarme a ultimar los detalles finales, y a mi prima y Doctora Beatriz Berenguer por sus ánimos continuos.

I would like to dedicate this Doctoral thesis to my father, director of the thesis, Dr. Joaquín Berenguer Lapuerta. He has taught me most of what I know in Medicine and has brought his continuous help and support not only to my professional projects but also to my personal life.

The accomplishment of this Doctoral Thesis was possible thanks to valuable contributions from several other people to whom I would like to express my deepest gratitude.

First of all, to Dr. Teresa L. Wright. Three of the studies presented in this thesis were performed at the University of California, San Francisco under her mentorship. I would not have finished this project without her constant incentives, wholehearted help, and mainly deep friendship.

My acknowledgement to my colleagues from the Hepato-Gastroenterology Service, the Liver Transplant Unit, the Pathology Service and the Microbiology Service of the Hospital Universitario La Fe in Valencia, specially to Dr. Martin Prieto and Dr. Domingo Carrasco, for their friendship, support and collaboration; to Dr. Miguel Rayón for his contribution with the histologic review; to the surgical team directed by Dr. José Mir, Drs. Manuel de Juan-Burgueño, Fernando San Juan, Francisco Orbis, Rafael López-Andujar and Angel Moya who besides their continuous instruction, make my daily work a much more enjoyable task.

My gratitude to the nursing and secretariat personnel from both the Hepato-Gastroenterology Service and the Liver Transplant Unit of the Hospital Universitario La Fe in Valencia, specially to Marisa Galera, Amparo Ombuena and Pilar Saez for their generosity, patience and help all along these years.

Finally, I would like to thank Dr. Miguel Bruguera for his help in ultimating the details of this thesis, and my cousin Dr. Beatriz Berenguer for her continuous encouragements.

**A Javier y Carlos**

**A mis padres y hermanos**

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>Página</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. ANTECEDENTES</b>	6
<b>1.El Virus de la hepatitis C (VHC)</b>	6
1.1. Estructura viral	6
1.2. Heterogeneidad del VHC: Genotipos/ <i>Cuasiespecies</i>	6
1- <i>Cuasiespecies</i>	6
2- Genotipos	7
<b>2.Infección por el VHC</b>	8
2.1. Métodos diagnósticos	8
1- Métodos serológicos	8
2- Métodos virológicos	9
a- <i>Detección cualitativa del ARN-VHC</i>	9
b- <i>Cuantificación viral</i>	10
c- <i>Métodos de genotipaje</i>	10
2.2. Factores de riesgo para la transmisión del VHC	10
2.3. Histología	12
2.4. Historia natural	12
<b>III. INFECCIÓN POR EL VHC ANTES DEL TRASPLANTE HEPÁTICO.</b>	
<b>1. Prevalencia: “Post-transplantation hepatitis C in Spain (J Gastroenterol Hepatol 1998; 10(9):771-6)”</b>	13

2. <b>Indicación de trasplante.</b>	17
1.1. Pronóstico de la cirrosis por el VHC	18
1- Tratamiento antivírico pre-trasplante	19
2- Donantes anti-VHC positivos	19
<b>IV. INFECCIÓN POR EL VHC DESPUÉS DEL TRASPLANTE HEPÁTICO</b>	
1. <b>Origen de la infección.</b>	23
1.1. Recurrencia de la infección VHC	24
1.2. Infección VHC <i>de novo</i>	24
2. <b>Definición y Diagnóstico.</b>	25
3. <b>Historia natural.</b>	27
* <b>“High incidence of allograft cirrhosis in hepatitis C virus genotype 1b infection following transplantation: relationship with rejection episodes (Hepatology 1999; 29: 250-256)”</b>	30
* <b>“HCV-related fibrosis progression following liver transplantation: Increase in recent years (J Hepatol 2000; 32: 673-684)”</b>	49
4. <b>Histología</b>	68
4.1. Hallazgos típicos	68
4.2. Hallazgos atípicos	68
4.3. Hepatitis colestásica	69
5. <b>Factores asociados con el desarrollo de la hepatitis C del injerto</b>	69
5.1. Factores víricos	69
1- Genotipo viral	70

2- Viremia	70
3- Diversidad del VHC: <b>“Evolution of hepatitis C (HCV) quasispecies in patients with fibrosing cholestatic hepatitis following liver transplantation (Hepatology 1999; 30: 1513-20)”</b>	73
5.2. Factores del huésped	85
1- HLA	85
2- Lesión histológica inicial	85
5.3. Factores externos	85
1- Grado de inmunosupresión: <b>“Early development of chronic active hepatitis in recurrent hepatitis C virus infection after liver transplantation: association with treatment of rejection (J hepatol 1998; 28: 756-763)”</b>	87
2- Otros factores	94
a- Alcohol	94
b- Virus: <b>“Hepatitis G virus infection in patients with hepatitis C virus infection undergoing liver transplantation (Gastroenterology 1996; 111:1569-1575)”</b>	95
<b>6. Tratamiento</b>	100
<b>6.1. Tratamiento de la hepatitis establecida</b>	100
1. Tratamiento con interferón	100

2. Tratamiento con ribavirina	100
3. Tratamiento con interferón en combinación con ribavirina	101
6.2. <b>Tratamiento precoz post-trasplante</b>	102
1. Tratamiento con interferón	102
2. Tratamiento con interferón en combinación con ribavirina	102
6.3. <b>Retrasplante</b>	103
<b>V. CONCLUSIONES</b>	104
<b>VI. REFERENCIAS</b>	106
<b>VII. ARTÍCULOS</b>	122

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1:</b> Evolución de las indicaciones de trasplante en Estados Unidos.	2
<b>Figura 2.</b> Ausencia de correlación bioquímica-histológica en pacientes con hepatitis C recurrente.	26
<b>Figura 3:</b> Resultados histológicos post-trasplante en los pacientes con infección por el VHC (Estudio multicéntrico Español 1992).	27
<b>Figura 4.</b> Supervivencia post-trasplante: VHC frente a controles sin enfermedad tumoral.	28
<b>Figura 5:</b> Probabilidad acumulada de desarrollar cirrosis VHC del injerto (n=81).	29
<b>Figura 6:</b> Hepatitis C post-trasplante: Grado de actividad inflamatoria en el último seguimiento histológico (n=81)	33
<b>Figura 7.</b> Evolución de la actividad inflamatoria durante los primeros 5 años post-trasplante (n=81).	34
<b>Figura 8.</b> Hepatitis C post-trasplante: estadio de fibrosis en el último seguimiento histológico (n=81).	35
<b>Figura 9.</b> Evolución del estadio de fibrosis durante los primeros 5 años post-trasplante.	36
<b>Figura 10:</b> Supervivencia del paciente con hepatitis C recurrente: cirróticos frente a no-cirróticos.	38
<b>Figura 11.</b> Correlación entre el número de episodios de rechazo agudo celular y el desarrollo de cirrosis VHC del injerto.	39
<b>Figura 12.</b> Actividad inflamatoria de la primera biopsia anual post-trasplante: variable predictiva de desarrollo posterior de cirrosis VHC del injerto.	41
<b>Figura 13.</b> Estadio de fibrosis de la primera biopsia anual post-trasplante: variable predictiva de desarrollo posterior de cirrosis VHC del injerto.	42

<b>Figura 14.</b> Niveles séricos de ALT correspondientes a la primera biopsia anual post -trasplante: variable predictiva de desarrollo posterior de cirrosis VHC del injerto.	43
<b>Figura 15.</b> Niveles séricos de AST correspondientes a la primera biopsia anual post-trasplante: variable predictiva de desarrollo posterior de cirrosis VHC del injerto.	43
<b>Figura 16.</b> Tiempo medio para el desarrollo de los distintos estadios de fibrosis.	52
<b>Figura 17:</b> Porcentaje de pacientes que desarrollan fibrosis 4 (=cirrosis) anualmente tras el trasplante hepático.	53
<b>Figura 18:</b> Tasa de progresión del estadio de fibrosis después del trasplante hepático.	53
<b>Figura 19:</b> Tasa de progresión del grado de actividad inflamatoria después del trasplante hepático.	54
<b>Figura 20:</b> Supervivencia del injerto en los dos centros (UCSF y la FE).	55
<b>Figura 21:</b> Supervivencia del paciente en los dos centros (UCSF y la FE).	56
<b>Figura 22:</b> Tasa de progresión del estadio de fibrosis por niveles pre-trasplante de ARN-VHC.	58
<b>Figura 23:</b> Tasa de progresión del estadio de fibrosis según la raza.	58
<b>Figura 24:</b> Tasa de progresión del estadio de fibrosis según el número de episodios de rechazo.	59
<b>Figura 25:</b> Tasa de progresión del estadio de fibrosis según el número de bolos de metil-prednisolona.	59
<b>Figura 26:</b> Tasa de progresión del estadio de fibrosis por centro transplantador.	60
<b>Figura 27:</b> Tasa de progresión del estadio de fibrosis por año de trasplante.	60
<b>Figura 28:</b> Tasa de progresión del estadio de fibrosis según el uso de OKT3.	61
<b>Figura 29:</b> Tasa de progresión del estadio de fibrosis según el uso de micofenolato.	61

<b>Figura 30:</b> Probabilidad acumulada de desarrollar cirrosis por el VHC del injerto según el año del trasplante y los niveles pre-trasplante de viremia.	67
<b>Figura 31:</b> Ejemplo de un gel de HMA correspondiente a un paciente con hepatitis colestásica.	75
<b>Figura 32:</b> Ejemplo de un gel de HMA correspondiente a un paciente con hepatitis mínima.	76
<b>Figura 33:</b> Típico gel de HMA correspondiente a un paciente control	76
<b>Figura 34:</b> Curva de validación de la técnica de movilidad del heteroduplex: comparación entre el gradiente de movilidad de heteroduplex y la diversidad genética.	77
<b>Figura 35:</b> Aparición de nuevas variantes con el tiempo en pacientes inmunodeprimidos frente a pacientes controles inmunocompetentes.	82
<b>Figura 36:</b> Alineamiento de las secuencias de variantes pre y post-trasplante correspondientes a dos pacientes típicos.	83
<b>Figura 37:</b> Evolución histológica al primer y segundo año posttrasplante.	89
<b>Figura 38:</b> Correlación entre los niveles séricos de transaminasas y el grado de lesión histológica	90
<b>Figura 39:</b> Correlación entre la gravedad de la lesión histológica y la infección por el VHG.	98
<b>Figura 40:</b> Supervivencia del paciente con y sin coinfección por el VHG	99

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Distribución de causas de cirrosis en los pacientes sometidos a trasplante hepático en España en 1992 (n= 269 pacientes).	15
<b>Tabla 2.</b> Características básicas de la población de estudio (n=269)	16
<b>Tabla 3.</b> Infección por el VHC tras el trasplante hepático	23
<b>Tabla 4.</b> Hepatitis C post-trasplante: Grado de actividad inflamatoria en el último seguimiento histológico.	32
<b>Tabla 5.</b> Evolución de la actividad inflamatoria durante los primeros 5 años post-trasplante.	33
<b>Tabla 6.</b> Hepatitis C post-trasplante: estadio de fibrosis en el último seguimiento histológico (n=81).	35
<b>Tabla 7.</b> Evolución del estadio de fibrosis durante los primeros 5 años post-trasplante.	36
<b>Tabla 8.</b> Variables asociadas con el desarrollo de cirrosis VHC del injerto.	40
<b>Tabla 9.</b> Variables histológicas del primer año predictivas de cirrosis VHC del injerto.	41
<b>Tabla 10.</b> Variables bioquímicas del primer año predictivas de cirrosis VHC del injerto.	42
<b>Tabla 11:</b> Características de los 284 pacientes sometidos a trasplante hepático por cirrosis VHC en la Universidad de California, San Francisco (UCSF) y en el Hospital La FE.	50
<b>Tabla 12:</b> Tasa de progresión del estadio de fibrosis por país antes y después del trasplante hepático.	54
<b>Tabla 13:</b> Factores predictivos de progresión del estadio de fibrosis en análisis univariado y multivariado.	57

<b>Tabla 14:</b> Mediana estimada de tiempo para el desarrollo de cirrosis del injerto según los factores de riesgo.	62
<b>Tabla 15:</b> Cambios en inmunosupresión con el tiempo.	64
<b>Tabla 16:</b> Mediana estimada de tiempo para el desarrollo de cirrosis del injerto por factores de riesgo agrupados.	66
<b>Tabla 17:</b> Características básicas de los tres grupos de pacientes incluidos	73
<b>Tabla 18:</b> Diferencias cuantitativas observadas con el tiempo: efecto de la inmunosupresión y de la gravedad de la hepatitis.	78
<b>Tabla 19:</b> Cambios cualitativos de las variantes con el tiempo: efecto de la inmunosupresión.	79
<b>Tabla 20:</b> Cambios cualitativos de las variantes con el tiempo: efecto de la gravedad de la hepatitis C recurrente	80
<b>Tabla 21:</b> Aparición de nuevas variantes: Efecto de la inmunosupresión y de la gravedad de la hepatitis C recurrente.	82
<b>Tabla 22:</b> Características de los pacientes con seguimiento mayor del año	87
<b>Tabla 23:</b> Factores predictivos de lesión histológica al año postraspanante (n=63).	91
<b>Tabla 24:</b> Factores predictivos de lesión histológica a los dos años postraspanante (n=40).	92
<b>Tabla 25:</b> Características básicas de los pacientes co-infectados o no por el virus de la hepatitis G (VHG).	96
<b>Tabla 26:</b> Asociación entre la infección por el VHG antes del trasplante y la infección por VHG tras el trasplante (n=114).	97

## **ABREVIATURAS Y SIGLAS**

**ALT:** Alanino aminotransferasa

**AST:** Aspartato aminotransferasa

**b-DNA:** Del inglés, “Branched DNA assay”

**CHC:** Carcinoma hepatocelular

**DE:** desviación estándar

**ELISA:** Enzimo-inmuno ensayo

**H:**Hombre

**HCL:** Hepatitis crónica lobular.

**HCP:** Hepatitis crónica persistente

**HCA:** Hepatitis crónica activa

**HMA:** Técnica de movilidad del heteroduplex.

**HVR1:** la región hipervariable 1 del virus de la hepatitis C

**IC:** Intervalo de confianza

**M:** Mujer

**MP:** Metilprednisolona

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**RIBA:** Del inglés, “Recombinant immuno-blotting assay”

**THO:** Trasplante hepático

**UNOS:** Del inglés, “United Network for Organ Sharing”

**VHB:** Virus de la hepatitis B

**VHC:** Virus de la hepatitis C

**VHG:** Virus de la hepatitis G

## **RESUMEN**

La cirrosis por el virus de la hepatitis C constituye la principal indicación de trasplante hepático en la mayoría de centros trasplantadores. Pese a la recurrencia universal de la infección o viremia, la supervivencia a 5 años, tanto del injerto como del paciente, no difiere de la de grupos controles no infectados. Sin embargo, la mayoría de los pacientes desarrolla hepatitis crónica que con el tiempo progresa a cirrosis y fallo del injerto hasta en un 30% de casos tras cinco años de seguimiento. Es probable que con seguimientos más prolongados aumente la incidencia de fallo hepático secundario a la hepatitis C recurrente. En efecto, la progresión histológica es significativamente más rápida en los pacientes trasplantados que en aquellos inmunocompetentes, lo cual sugiere que el tiempo necesario para el desarrollo de cirrosis sea menor. Esta progresión histológica es, no obstante, variable, y depende de la presencia o no de ciertos factores de riesgo, tales como la carga vírica pre-trasplante y el grado de inmunosupresión. Otros factores, tales como la coinfección por el virus de la hepatitis G, no desempeñan ningún papel en esta evolución. Los cambios en la inmunosupresión con la introducción de nuevos y potentes fármacos inmunosupresores parece ser responsable del empeoramiento de la progresión de la hepatitis C recurrente observado en años recientes.

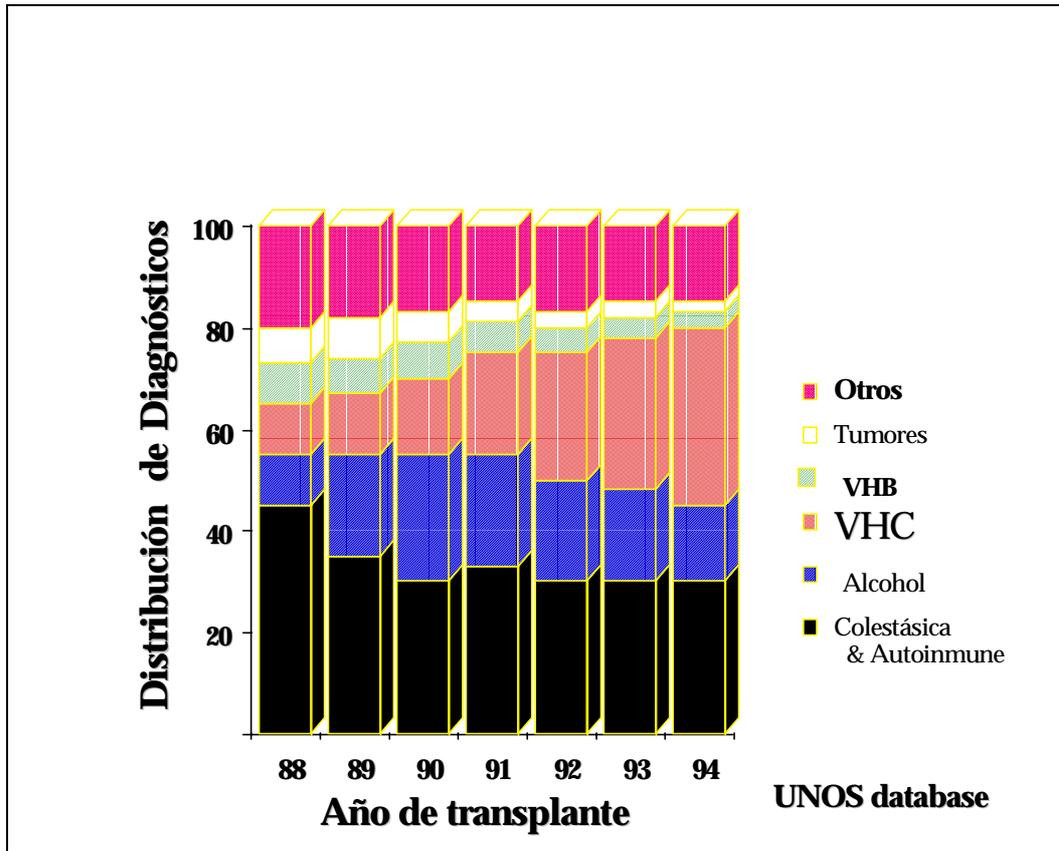
## **SUMMARY**

Hepatitis C virus-associated end-stage liver disease is a leading diagnosis in patients undergoing liver transplantation in the majority of transplant centers. In spite of universal viral recurrence or viremia, both patient and graft survival are similar to those observed in non-infected controls, at least for the first 5 years. However, the majority of transplant recipients develop chronic hepatitis with progression to cirrhosis and graft failure in a substantial proportion, up to 30% after 5 years of follow up. The full consequences of HCV recurrence will likely result in reduced graft and patient survival compared with patients transplanted for non-viral causes with longer follow-up. Indeed, histologic progression is significantly faster among transplant patients than among those immunocompetent suggesting that the time required to develop HCV-related cirrhosis is shorter. Progression is however highly variable depending on the presence of risk factors. Factors which may influence the outcome include viral load at transplantation and the type/amount of immunosuppression. Other factors, such as coinfection with hepatitis G virus do not play a role in HCV-related disease progression. The development of new immunosuppressive agents of varying potency and changes in immunosuppressive regimens in individual patients over time may be responsible for the increase in disease progression observed in recent years.

## I. INTRODUCCIÓN

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) constituye un problema sociosanitario de gran magnitud, no sólo en individuos inmunocompetentes sino también en pacientes inmunodeprimidos tales como trasplantados hepáticos. La trascendencia de la infección por el VHC en este último colectivo deriva de 4 aspectos fundamentales: (i) La cirrosis secundaria a la infección crónica por el VHC se ha convertido en la mayoría de centros Europeos y Norteamericanos en la primera indicación de trasplante [1,2] (**Figura 1**), y a falta de un tratamiento eficaz, es de prever un incremento en el número de individuos con hepatopatía terminal por el VHC; (ii) La recurrencia de la infección viral o viremia es prácticamente universal [3,4], con posterior desarrollo de hepatitis en una elevada proporción de pacientes y progresión a cirrosis en algunos casos [5-16]. En este sentido, el VHC es el principal responsable de hepatitis post-trasplante; (iii) Aunque la lesión histológica del injerto es generalmente leve tras un seguimiento corto de tiempo (1-3 años) [5, 8], y la supervivencia del injerto y del paciente equiparable a la observada en otros grupos de pacientes sometidos a trasplante por hepatopatías no víricas [11-13, 15], un bajo porcentaje de casos (aproximadamente 5%-10%) desarrolla una forma de hepatitis colestásica agresiva con fallo del injerto en poco tiempo [17], y un porcentaje adicional (aproximadamente 8%-30%) desarrolla cirrosis del injerto tras seguimientos más prolongados [11, 14, 16]. No obstante, se desconocen todavía las consecuencias a largo plazo de la recidiva viral; (iv) A medida que el seguimiento posttrasplante de estos pacientes se acerca a la segunda década, aumentan los casos descritos de fallo del injerto por el VHC y necesidad de retrasplante. Desafortunadamente, el aumento en el número de candidatos a trasplante hepático no se asocia con un aumento paralelo en el número de donantes [18]. Determinar la idoneidad de esta nueva indicación de trasplante va a constituir muy probablemente uno de los mayores retos de los hepatólogos/cirujanos para la próxima década.

Figura 1: **Evolución de las indicaciones de trasplante en Estados Unidos.**



El trasplante hepático constituye una oportunidad única en el estudio de la infección por el VHC por las siguientes razones: (i) Capacidad para estimar con exactitud el momento de la infección del injerto [19], mientras que éste se desconoce en una gran proporción de individuos inmunocompetentes, dada la ausencia o escasa sintomatología de la infección inicial [20]; (ii) Fácil identificación de las fuentes de infección del VHC que incluyen o bien la infección pre-trasplante o bien la derivada del órgano donante y/o hemoderivados transfundidos en la intervención [3]. Por contra, en un gran número de personas infectadas por el VHC, no se identifica un factor de riesgo evidente [20]; (iii) Frecuente disponibilidad de muestras de suero seriadas; (iv) Seguimiento histológico de la hepatitis C del injerto merced a las múltiples biopsias hepáticas que se realizan en los trasplantados.

Tras 10-15 años de seguimiento en varios centros, y pese al avance acontecido en los últimos años, aún se desconocen varios aspectos tales como: (1) ¿En qué momento de la evolución de la hepatopatía por el VHC, deberíamos considerar al trasplante hepático como una alternativa terapéutica, y en tal caso, existe algún tratamiento pre-trasplante que sea

capaz de mejorar el pronóstico post-trasplante de estos pacientes? (2) Dada la escasez de órganos, ¿es lícito utilizar hígados de pacientes infectados por el VHC? (3) ¿Cuál es la historia natural a largo plazo de la hepatitis C post-trasplante? (4) ¿Existe algún tratamiento capaz de modificar esta historia natural? (5) Dado que la recidiva de la infección por el VHC tras el trasplante hepático evoluciona de forma muy variable, ¿cuales son los factores implicados en esta progresión tan dispar? (6) ¿Debemos considerar la cirrosis del injerto por el VHC como una nueva indicación de trasplante en todo paciente?

Los proyectos de investigación que se presentan en esta tesis doctoral han intentado contestar a la tercera y quinta preguntas. Se presentaran resultados de 6 estudios distintos en los que la tesitante ha participado de manera activa, 3 de ellos realizados en el laboratorio de la Doctora Teresa L. Wright en la “Universidad de California, San Francisco”, y 3 en el Servicio del Doctor Joaquín Berenguer en el “Hospital Universitario La FE” de Valencia.

El primer estudio “**Liver transplantation in hepatitis C. A Spanish multicentre experience**”, publicado en “European Journal of Gastroenterology and Hepatology” en Septiembre de 1998 (Volumen10:771-6) es un estudio multicéntrico Español diseñado en 1994 con los objetivos de: (i) analizar la prevalencia de la infección por el VHC en los pacientes sometidos a trasplante hepático en los distintos centros trasplantadores en España; (ii) determinar la tasa de recurrencia y de infección de novo de la infección VHC; y (iii) definir la historia natural a corto-medio plazo de la infección por el VHC tras el trasplante hepático. Este estudio pone de relieve la importancia de este agente en el contexto del trasplante hepático en España al evidenciar una elevada prevalencia de infección por el VHC en pacientes sometidos a trasplante hepático y una recurrencia de la infección prácticamente universal tras el trasplante. Por otra parte, la buena supervivencia tanto del paciente como del injerto, al menos a corto medio-plazo, confirma datos de otros estudios y constituye la base para continuar considerando la cirrosis por el VHC una indicación aceptable de trasplante.

El segundo y tercer estudios “**High incidence of allograft cirrhosis in hepatitis C virus genotype 1b infection following transplantation: relationship with rejection episode**” publicado en “Hepatology” en Enero de 1999 (Volumen 29: 250-6) y “**HCV-related fibrosis progression following liver transplantation: increase in recent years**” publicado en “Journal of Hepatology” en 2000 (volumen 32: 673-84) definen la historia natural de la hepatitis C post-trasplante a medio y largo plazo en dos cohortes de pacientes, un primer grupo de pacientes sometidos a trasplante hepático en el “Hospital Universitario La

Fe” y otro grupo de pacientes trasplantados en la “Universidad de California, San Francisco”. En ambos estudios, se pone de relieve la naturaleza progresiva de la hepatitis C post-trasplante, con una evolución hacia formas graves de hepatitis más rápida que la descrita en pacientes inmunocompetentes. En particular, el segundo estudio define la progresión histológica de la hepatitis C post-trasplante mediante el análisis del cambio anual en el estadio de fibrosis. Este cambio o “tasa de progresión anual del estadio de fibrosis” sigue una progresión lineal ascendente con el tiempo, con una mediana de progresión de 0,3 unidades de fibrosis al año. Mediante un modelo matemático y basándose en la linealidad de la “tasa de progresión de fibrosis”, se puede predecir el tiempo medio en desarrollar una cirrosis del injerto por el VHC en este tipo de pacientes, tiempo significativamente más corto que el requerido en pacientes no trasplantados. Estos datos sugieren pues que la historia natural de la hepatitis C post-trasplante es más agresiva que la observada en pacientes inmunocompetentes. A medida que nos acerquemos a la segunda década tras el trasplante, es muy probable, por tanto, que observemos un aumento en el número de trasplantados que desarrollan una cirrosis por el VHC del injerto. De ser cierto, este aumento conllevará un aumento en la necesidad de retrasplante, situación difícil en una época de escasez de órganos.

Los tres últimos estudios **“HCV quasispecies evolution: a mechanism of severe posttransplantation recurrence (Hepatology 1999; 30: 1513-20)”**, **“Early development of chronic active hepatitis in recurrent hepatitis C virus infection after liver transplantation: association with treatment of rejection (J Hepatol 1998,28: 756-63)”** y **“Hepatitis G virus infection in patients with hepatitis C virus infection undergoing liver transplantation (Gastroenterology 1996; 111: 1569-75)”** y parte del segundo y tercer estudio intentan determinar los factores tanto pre- como del post-trasplante responsables de una peor o mejor evolución de la hepatitis C post-trasplante, con el objetivo de agrupar a los pacientes en pacientes de bajo o alto riesgo de desarrollar hepatitis C grave del injerto. Este agrupamiento permitiría por su parte un manejo más adecuado de los pacientes, o una mayor racionalidad a la hora de indicar la idoneidad de un trasplante. En particular, los resultados del segundo, tercero y quinto estudios ponen de relieve la importancia del tipo y cantidad de inmunosupresión en la evolución de la hepatitis C del injerto. Los resultados del tercer estudio también hacen referencia al papel desempeñado por la carga viral pre-trasplante como factor predictivo de evolución post-trasplante. Finalmente, el sexto estudio, primero en evaluar el papel desempeñado por el recientemente identificado virus de la hepatitis G en el

trasplantado infectado por el VHC, determinó que este virus no constituye un agente hepatotrofo.

Aunque no son temas en los que la doctoranda ha estado involucrada directamente, en esta tesis se abordará de forma sucinta la histología de la hepatitis C recurrente y su tratamiento por la relación que tienen con los trabajos presentados.

## II. ANTECEDENTES

### 1. El Virus de la Hepatitis C (VHC)

#### 1.1 Estructura viral

El VHC es un virus ARN de cadena simple y polaridad positiva, perteneciente a la familia flaviviridae, de aproximadamente 9500 bases que codifica una única poliproteína de 3000 aminoácidos [21, 22]. Tras el procesamiento de esta proteína precursora por acción de proteasas virales y celulares, se producen las diversas proteínas estructurales y no estructurales virales [22, 23]. En el extremo 5' terminal del genoma viral, se localiza una región no codificante de alta estabilidad [24], seguida de una región estructural que codifica las proteínas estructurales del “core” y de la “envoltura” (E1 y E2). La región no estructural se compone de varios genes (NS2 a NS5) que codifican proteínas con acción enzimática [22,23].

#### 1.2 Heterogeneidad del VHC: Genotipos/*Cuasiespecies*

El VHC se caracteriza por una alta tasa de mutación [25-28]. Esta característica se refleja en la gran heterogeneidad del genoma viral, distinta según las regiones del genoma. La región 5' no codificante representa la región más fielmente conservada frente a la alta variabilidad en las regiones codificantes de las proteínas de la envuelta [28].

La heterogeneidad genética se refleja a dos niveles: la existencia de genotipos o “variantes” entre distintos aislados, y la existencia de cuasiespecies en un único individuo.

##### 1- Cuasiespecies:

Se refiere a la heterogeneidad genética entre las diversas secuencias del VHC presentes en un individuo [27, 29]. La población de genomas del VHC existentes en un individuo, aunque estrechamente relacionados entre si, son heterogéneos, como consecuencia del elevado número de mutaciones que ocurren durante la replicación viral (tasa de mutación calculada en un individuo con infección crónica por el VHC de  $1,9 \times 10^{-3}$  bases sustituidas por región genómica y por año) [25, 26]. La variante que predomina puede diferir en el individuo con el tiempo y con el estadio de la enfermedad hepática [30, 31]. La región del genoma que presenta la tasa más alta de mutaciones está situada en una pequeña zona de la región codificante de las proteínas de la envuelta (HVR1) [32]. Los cambios secuenciales en esta región durante la infección por el VHC, dan lugar a la generación de variantes diferentes

con neoantígenos no reconocidos por los anticuerpos originados en una etapa previa de la infección [30, 33]. La existencia de *cuasiespecies* y la habilidad de mutar rápidamente ante la presión inmune, permiten al VHC escapar a la respuesta inmune del huésped y perpetuar la infección [30, 31, 33, 34].

## 2- Genotipos:

La elevada heterogeneidad del genoma del VHC ha permitido no sólo la inclusión del VHC dentro del modelo de *cuasiespecies* sino también la introducción del concepto de genotipos [28]. Así como el término *cuasiespecies* hace referencia a la variabilidad genética de la población del VHC en un mismo individuo [29], el término genotipo se aplica a la heterogeneidad observada entre diferentes aislados del VHC [28]. Estos diferentes aislados se pueden clasificar en grupos genéticos distintos como resultado del acúmulo de mutaciones que el VHC ha experimentado durante su proceso de evolución [28].

En la actualidad está asumido que podemos hablar de diferentes genotipos del VHC y que a su vez los podemos subdividir en subtipos. Los conocimientos actuales sobre la clasificación en genotipos del VHC se basan en el análisis de secuencias víricas completas y también de secuencias de regiones subgenómicas. En función de la región examinada y de su variabilidad, se han establecido diferentes clasificaciones [35-38] creando confusión en la nomenclatura hasta el año 1994, año en que se propuso un sistema estándar que posibilita la inclusión de futuras variantes [39].

Existe una distribución geográfica variable de estos genotipos, y mientras algunos se reparten universalmente (1 y 2), otros parecen confinados a ciertas zonas (1b en Japón, Indonesia, Nepal y Tailandia; 4 en Africa central y del Norte y 5 en Africa del Sur; 6 en Hong-Kong) [28]. Por otra parte también se han observado diferencias en función del tipo de población estudiada, siendo la distribución de genotipos distinta si se analizan enfermos con hepatopatía crónica o donantes de sangre [28, 40]. Igualmente, se han descrito cambios en la distribución según la edad, detectándose con mayor frecuencia el genotipo 3a en personas jóvenes [41]. Este hecho podría reflejar la introducción de diferentes tipos víricos a través de determinadas prácticas tales como el uso de drogas por vía parenteral [42]. Las implicaciones que se derivan de la existencia de estos genotipos son varias. Los estudios respecto al papel de la heterogeneidad del VHC en la progresión de la enfermedad hepática son discordantes, y mientras algunos autores han encontrado una asociación entre el VHC genotipo 1b y una lesión hepática más grave, incluyendo el desarrollo de carcinoma hepatocelular [43-47], otros

consideran que el genotipo viral no es un factor determinante de mayor gravedad de la hepatopatía [48, 49]. Estas discrepancias pueden deberse a (i) diferencias en la distribución de genotipos; (ii) diferencias en los métodos de genotipaje; (iii) diferencias en la definición de la gravedad de la hepatopatía; (iv) presencia de factores de confusión tales como la edad y/o duración de la infección C. Se ha comprobado que la prevalencia del genotipo 1b es más alta en enfermos de edad avanzada con una duración superior de la enfermedad, hecho que podría actuar como un factor de confusión al evaluar el peso real del genotipos en la historia natural de la hepatitis crónica C [50, 51].

Existe consenso no obstante, en la asociación entre el VHC genotipo 1b y una menor respuesta al tratamiento con interferón [52].

La tercera implicación clínica es la dificultad en la generación de vacunas frente a la hepatitis C, por el elevado número de antígenos necesarios (correspondientes a cada genotipo y subtipo) para ser efectivas.

## **2. Infección por el VHC**

### **2.1 Métodos diagnósticos**

#### **1- Métodos serológicos**

Las pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico de la infección VHC utilizan antígenos, bien recombinantes bien sintéticos, derivados de las diversas regiones del genoma viral. La selección de estos antígenos ha ido mejorando desde el descubrimiento del VHC con lo que se ha conseguido mejorar la sensibilidad y especificidad de estas pruebas. Así, en el primer radioinmuno-ensayo de primera generación, se utilizaba el antígeno c100-3, codificado por la región NS4 [53]. Aunque con este método, el 80%-90% de las muestras de suero de pacientes con hepatitis crónica no-A no-B eran reactivas, existía una alta tasa de falsos positivos, sobre todo al realizar cribajes en poblaciones de bajo riesgo [54, 55]. Con los nuevos tests de segunda y tercera generación, no sólo ha disminuido el tiempo ventana de seronegatividad tras la infección aguda, sino que tanto la sensibilidad como la especificidad han alcanzado prácticamente el 100% [56]. En pacientes de alto riesgo o con sospecha clínica de hepatitis crónica, un ELISA II positivo es prácticamente sinónimo de infección por el VHC, por lo que no se considera necesario realizar pruebas de confirmación [57]. Por contra, en pacientes de bajo riesgo tales como donantes de sangre, los resultados positivos por ELISA II deben confirmarse mediante pruebas de confirmación, ya que en este contexto, no es infrecuente detectar resultados falsos positivos [57]. Las pruebas de confirmación RIBA-2

incorporan 4 antígenos virales (5-1-1, c100-3, c22-3, c33c), existiendo una elevada correlación entre la positividad de 2 o más bandas con la detección de viremia [58]. Los resultados indeterminados (positividad de una sola banda) son, no obstante, más problemáticos. En estos casos, el tipo de antígeno reactivo es importante, habiéndose demostrado que existe una elevada correlación entre la positividad de c22-3 o de c33c, y la presencia de viremia o la positividad de las pruebas RIBA de tercera generación (incorporan un nuevo antígeno derivado de la región NS5) [59, 60]. Por contra, aquellas muestras con RIBA 2 indeterminado, positivo para 5-1-1 o para c100-3, suelen dar resultados negativos o indeterminados con RIBA-3 y no suelen asociarse con viremia, por lo que se consideran falsos positivos [59-61].

## 2- Métodos virológicos

Permiten detectar el genoma viral directamente de la sangre, de tejido hepático y de células mononucleares de sangre periférica [62, 63]. La detección del ARN-VHC y su cuantificación no es solamente útil para el diagnóstico de la infección aguda, y para aquellos casos seronegativos, sino que aporta información adicional relevante para el pronóstico, la indicación de tratamiento y la respuesta antiviral. Debería por tanto reservarse para (i) pacientes seronegativos en los que existe una fuerte sospecha clínica; (ii) pacientes con resultados serológicos discordantes; (iii) pacientes con hepatitis aguda; (iv) pacientes con hepatitis crónica idiopática; (v) pacientes con hepatitis crónica cuya etiología puede ser mixta incluyendo seropositividad para el VHC; (vi) pacientes seropositivos para el VHC con transaminasas normales; (vii) monitorización del tratamiento antiviral; (viii) confirmación de la infección por el VHC en recién nacidos de madres anti-VHC positivas; y (ix) situaciones de inmunodepresión en las que la capacidad de desarrollar anticuerpos está alterada tal como sucede tras el trasplante hepático [3, 61].

a- *Detección cualitativa del ARN-VHC*: El ARN-VHC se detecta mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite detectar cantidades mínimas de genomas virales en sangre [62-64]. Existe una elevada variabilidad entre diferentes laboratorios al determinar la viremia mediante esta técnica [64, 65]. Ello se debe a: (i) tipo de cebadores seleccionados para la amplificación [62, 63], (ii) condiciones de la reacción, y (iii) forma como se han recogido las muestras de suero [66, 67]. Es imprescindible que los laboratorios incluyan un control negativo para controlar la contaminación y un control positivo débil para garantizar la sensibilidad del procedimiento cuando se procesan muestras.

b- *Cuantificación viral*: En cuanto a la cuantificación viral, existen varios métodos [68], de los cuales el más utilizado por ser más sencillo es el b-DNA [69, 70]. La sensibilidad del b-DNA2 no es, sin embargo, óptima (200.000 copias/ml) [71]. Cuando se procede a cuantificar el ARN del VHC, son fundamentales las condiciones de procesado y conservación de las muestras, ya que pueden influir bastante en los resultados obtenidos [67]. Otro de los sistemas para medir los niveles de viremia es la PCR competitiva, ya sea mediante la introducción de un estándar interno de ARN o de ADN [72]. Este sistema se basa en la co-amplificación del RNA extraído (o del cADN) de la muestra con una cantidad conocida de un fragmento de tamaño y/o secuencia diferente al diana pero que se amplifica con los mismos cebadores. La cantidad de ARN de las muestras se deduce a partir de una curva estándar. Estos métodos se suelen desarrollar en cada laboratorio con pequeñas modificaciones, dificultando la comparación de los resultados obtenidos por cada grupo [70].

c- *Métodos de genotipaje*: La forma más concluyente de determinar el genotipo vírico se obtiene mediante la secuenciación del genoma o parte del genoma del virus. Esto comportaría, no obstante, un trabajo inabarcable por lo que se han diseñado métodos alternativos más eficientes [28]. Los métodos basados en el análisis de la secuencia nucleotídica consisten esquemáticamente en la síntesis de cDNA y posterior amplificación con cebadores de zonas muy conservadas (cebadores universales). A continuación se pueden diferenciar los genotipos ya sea mediante una segunda amplificación con cebadores específicos para cada tipo [73], utilizando una hibridación con sondas específicas (Inno-Lipa) [74] o bien con una digestión con enzimas de restricción para obtener un patrón de restricción específico (RFLP) [75]. Mediante estas técnicas, la tipificación del VHC no es aplicable si las muestras de suero no se han almacenado de forma correcta y el ARN se ha degradado durante su manipulación, o si las muestras no son virémicas. En estas situaciones, se puede determinar el sero-tipo mediante ELISA que utiliza oligopéptidos ramificados sintetizados a partir del mapeo de epítomos de la proteína NS4. La aplicación de este método permite detectar anticuerpos tipo-específicos frente a la mayoría de genotipos [76].

## **2.2 Factores de riesgo para la transmisión del VHC**

La exposición percutánea directa, a través de sangre y hemoderivados, trasplante de órganos, o uso de jeringuillas compartidas entre los adictos a drogas, constituye la vía de

transmisión más eficaz del VHC [61]. En este sentido, el VHC es el responsable de la gran mayoría de hepatitis post-transfusionales no-A no-B. Tras la introducción de los tests de screening en los bancos de sangre, el riesgo de transmisión por esta vía es prácticamente nulo [77]. Igualmente, las medidas de inactivación viral junto a los test de screening han logrado disminuir de forma importante la tasa de contagio en el colectivo de pacientes con discrasias sanguíneas. Desafortunadamente, un 90% de pacientes hemofílicos que recibieron factores de coagulación no tratados están infectados por el VHC. Sólo un 5% de personas infectadas por el VHC refieren como factor de riesgo un antecedente de transfusión de productos sanguíneos, pese a la gran eficacia de transmisión mediante esta vía [61, 78].

Los adictos a drogas por vía parenteral tienen una prevalencia de anti-C (2ª generación) del 70-90%, que aumenta si la duración de la adicción ha sido superior a 10 años. Un antecedente de drogadicción intravenosa está presente hasta en un 35-40% de las personas infectadas por el VHC [61, 78].

Entre los pacientes hemodializados, la prevalencia de anti-C varía según los centros y se sitúa entre 20 y 50%. La tasa de infección por el VHC se asocia con los años en diálisis y el número de transfusiones sanguíneas. Este grupo representa un 1% de los casos de hepatitis C [61, 78].

La transmisión del VHC a través de pinchazos accidentales ha sido claramente demostrada en personal sanitario [61], habiéndose calculado que el riesgo de infectarse se sitúa entre 5 y 10% tras un pinchazo accidental con sangre contaminada. No obstante, la prevalencia de anti-C entre el personal sanitario es relativamente baja (0,3%-5%), similar a la de la población general, por lo que, si bien esta vía de transmisión existe, es poco eficiente. Un 2% de los pacientes infectados por el VHC refiere este factor de riesgo [79].

En cuanto al trasplante de órganos, el riesgo de transmisión de un donante infectado (ARN-VHC positivo) a un receptor no infectado es del 100% [80]. El riesgo disminuye notablemente cuando el donante es anti-C positivo pero ARN negativo (50%), lo cual permitiría el uso de estos órganos en ciertas circunstancias, tales como receptores ya infectados por el VHC o en situaciones de extrema gravedad.

Las exploraciones médicas y dentales también suponen un peligro de transmisión, aunque no cuantificado hasta el momento [81, 82]. Es probable que la utilización de material no desechable durante los años 1950-1970 haya supuesto un mecanismo de transmisión relevante.

### **2.3 Histología**

El grado de actividad de la enfermedad se reconoce por el alcance del daño celular, tanto en el ámbito periportal como en el lobular. Knodell et al [83] confeccionaron un índice numérico para determinar el grado de actividad histológica de acuerdo con la concesión de puntos a una serie de caracteres morfológicos: la necrosis periportal, la inflamación portal, la necrosis lobular y la fibrosis.

Recientemente se han descrito nuevas clasificaciones que diferencian el estadiaje de la actividad. La *actividad* consiste en la medida de la gravedad del proceso necroinflamatorio, mientras que el *estadiaje* de la hepatitis crónica está basado en la extensión de la fibrosis y la presencia de cirrosis. Para medir la actividad, se valora la necrosis periportal, la necrosis confluyente, la inflamación intraacinar y la inflamación portal [84, 85]. La valoración del estadiaje de la enfermedad de forma separada es importante, ya que se ha relacionado con el tiempos de evolución y tiene implicaciones terapéuticas y pronósticas [86].

### **2.4 Historia natural**

Utilizando criterios virológicos, se ha comprobado que en la práctica totalidad de pacientes con infección aguda por el VHC, se sigue detectando el ARN-VHC en suero más allá de los 6 meses [87]. El pronóstico de estos individuos infectados aún no está claramente definido, y ello sea probablemente debido al largo intervalo de tiempo que normalmente transcurre entre la infección y el desarrollo de complicaciones. El curso de la enfermedad se calcula en décadas [88], al menos en pacientes sin otros factores de riesgo, tales como el alcohol. La hepatitis crónica por el VHC cursa de forma clínicamente silente en la mayoría de los casos, con hipertransaminasemia mantenida en el transcurso de muchos años, aunque puedan observarse períodos de remisión intercalados [61, 87]. La práctica de biopsias hepáticas a pacientes con infección crónica por el VHC objetiva la presencia de hepatitis crónica activa en la mitad de los casos, mientras que en un 10-20% de los enfermos ya se evidencian signos de cirrosis [89]. El seguimiento posterior muestra una marcada heterogeneidad, y mientras las lesiones se mantienen estables durante muchos años en algunos casos, en otros empeoran rápidamente. En conjunto se ha podido comprobar la transición a cirrosis en aproximadamente un 20% de pacientes después de un seguimiento de unos 10 años [61, 87]. Sin embargo, no existen muchos estudios que evalúen de forma correcta la historia natural de la infección por el VHC desde el momento del contagio, y que diferencien aquellos pacientes con transaminasas

elevadas de aquellos con transaminasas normales. Aunque en la mayoría de pacientes pertenecientes a este último colectivo, se han objetivado mediante biopsia hepática lesiones inflamatorias leves y moderadas [90], ningún estudio ha aportado información sobre la historia natural de este grupo particular de pacientes.

El curso lento de la enfermedad hace difícil evaluar la mortalidad asociada con la hepatitis C. Algún estudio no ha encontrado diferencias comparando enfermos con hepatitis posttransfusional C respecto a grupos control [91]. Aún no se dispone, no obstante, de suficiente perspectiva para contestar con certeza esta cuestión. Una forma alternativa de determinar la evolución a largo plazo de los pacientes con hepatitis crónica es mediante el cálculo de la tasa de progresión de la fibrosis hepática. A través de ésta, se puede estimar el tiempo necesario para el desarrollo de cirrosis. En un estudio reciente basado en este sistema, Poynard y cols. determinaron que la progresión de fibrosis sigue un patrón lineal con el tiempo con un cambio anual del estadio de fibrosis de 0,133 unidades (0,125-0,143) [86]. A este ritmo, los autores estimaron que el tiempo necesario para el desarrollo de cirrosis es de aproximadamente 30 años (28-32 años) [86]. Tanto la edad en el momento de la infección aguda, como el sexo y el antecedente de ingesta enólica se asociaron con la tasa de progresión de la fibrosis, de tal forma que el tiempo estimado para desarrollar una cirrosis varía entre 13 años en hombres infectados a partir de los 40, a 42 años en mujeres infectadas antes de los 40 sin historia de ingesta de alcohol. En este estudio, la progresión de fibrosis no se distribuyó normalmente, existiendo un porcentaje de pacientes con progresión acelerada hacia formas avanzadas de lesión hepática, catalogados como “high fibrosers” frente a otro grupo de pacientes con muy lenta evolución a cirrosis catalogados como “slow fibrosers”. Esta gran variabilidad en la evolución de la enfermedad queda reflejada en la amplia diferencia de años para desarrollar cirrosis entre estos dos grupos, de tal forma que un tercio de los pacientes requiere menos de 20 años para desarrollar una cirrosis mientras que otro tercio no alcanzará probablemente este estadio tras 50 años de seguimiento [86].

### **III- INFECCIÓN POR EL VHC ANTES DEL TRASPLANTE HEPÁTICO**

#### **1. Prevalencia:**

La cirrosis secundaria a la infección crónica por el VHC constituye en la actualidad una de las principales indicaciones de trasplante en los centros Europeos y Americanos [1, 2] (**Figura 1**). En Estados Unidos, aproximadamente un tercio de los pacientes trasplantados está infectado por el VHC [1]. En España, un estudio multicéntrico realizado en 1992

demonstró que el 46% de los pacientes sometidos a trasplante hepático eran anti-VHC positivos [92] {**Posttransplantation hepatitis C in Spain**}.

---

**POSTTRANSPLANTATION HEPATITIS C IN SPAIN (Referencia # 92):**

Diez centros Españoles participaron en el estudio. Se incluyeron 269 pacientes afectados de cirrosis hepática de diversa etiología sometidos a trasplante hepático en 1992. Los pacientes sometidos a trasplante por otro tipo de indicaciones tales como hepatitis fulminante o tumor sobre hígado no cirrótico fueron excluidos.

De los 269 pacientes, se detectaron anticuerpos anti-VHC en 124 (46%) (Grupo VHC). Los 145 pacientes restantes (54%) fueron catalogados como grupo control. Tal como era de prever, otras condiciones estaban presentes en un porcentaje relevante (26%) de pacientes anti-VHC positivos. En concreto, 23 pacientes (72%) tenían antecedentes de ingesta enólica significativa y 4 (12%) estaban coinfectados por el virus de la hepatitis B (VHB). La gran mayoría de pacientes diagnosticados inicialmente como cirrosis noA noB (97%) o como cirrosis criptogenética (79%) estaban infectados por el VHC, mientras que la prevalencia de la infección por el VHC fue menor en pacientes con diagnóstico de cirrosis alcohólica y cirrosis asociada al VHB (22% y 20%, respectivamente) (Tabla 1).

Tabla 1. **Distribución de causas de cirrosis en los pacientes sometidos a trasplante hepático en España en 1992 (n= 269 pacientes).**

Causas de cirrosis	VHC positivo pre-trasplante, n (%)	VHC negativo pre-trasplante, n (%)	Total, n
Virus de la hepatitis B	4 (20)	16 (80)	20
Alcohol	23 (22)	82 (78)	105
Criptogenética*	56 (79)	15 (21)	71
Hepatitis No-A no-B*	36 (97)	1 (3)	37
Autoimmune	1 (20)	4 (80)	5
CBP/CEP	1 (4)	23 (96)	24
Hemocromatosis/ alfa 1-antitripsina/Wilson	1(20)	4 (80)	5
Porfiria Cutánea Tarda	2 (100)	0(0)	2
<b>TOTAL</b>	<b>124 (46)</b>	<b>145 (54)</b>	<b>269</b>

\* Los pacientes con cirrosis de etiología desconocida pero con antecedentes de factores de riesgo tales como transfusión sanguínea o drogadicción intravenosa, se incluyeron en el grupo de “hepatitis no-A no-B”. Por contra, aquellos pacientes con cirrosis de etiología desconocida y sin factores de riesgo se incluyeron en el grupo de cirrosis criptogenética.

Los pacientes con diagnóstico previo de hepatitis no-A no-B y en menor grado aquellos diagnosticados de cirrosis criptogenética constituyeron la mayoría de pacientes infectados por el VHC, y por tanto con elevado riesgo de desarrollar hepatitis C del injerto. Otros grupos en los que debería investigarse la presencia del VHC dada su relativa elevada prevalencia son los pacientes con diagnóstico de cirrosis alcohólica y aquellos infectados por el virus de la hepatitis B. Por contra, la infección por el VHC es extremadamente infrecuente en los pacientes con diagnóstico de cirrosis biliar primaria o colangitis esclerosante primaria.

Otro de los hallazgos significativos del estudio fue la elevada prevalencia de seropositividad frente al VHC en el grupo de pacientes con carcinoma hepatocelular (82%). En concreto, un 22% de los pacientes anti-VHC positivos habían desarrollado un carcinoma hepatocelular frente a un 4% en el grupo control ( $p=0,0001$ ), confirmando el papel relevante del VHC en el desarrollo del carcinoma hepatocelular (Tabla 2) [93].

Tabla 2. Características básicas de la población de estudio (n=269)

	VHC positivo (n=124)	VHC negativo (n=145)	p
Edad (años) (Media $\pm$ DE)	53,3 $\pm$ 7,9	47,6 $\pm$ 9,7	0,0001
Sexo (H/M)	63%	70%	0,24
Tiempo de seguimiento (meses) (Media $\pm$ DE)	20,5 $\pm$ 9	18,8 $\pm$ 10,5	0,17
Carcinoma Hepatocelular, n (%)	27 (22)	6 (4)	0,00001

DE: desviación estándar; H: Hombre; M: Mujer

Los pacientes infectados por el VHC eran mayores (53,3  $\pm$  7,9 años) que los no infectados (47,6  $\pm$  9,7 años) ( $p<0,00001$ ). Entre los pacientes infectados por el VHC, los que no tenían ninguna condición asociada tal como coinfección por el VHB o alcohol, también eran mayores que los que tenían condiciones asociadas a la infección por el VHC (54,8  $\pm$  7,2 vs 49  $\pm$  8,4 años,  $p<0,0001$ ).

Por otra parte, la hepatitis C es una de las causas más comunes de hepatitis crónica en el mundo, afectando aproximadamente un 0,5%-2% de la población general en los países industrializados [61, 94]. En un número elevado de casos, se desconoce el factor de riesgo de adquisición viral [95], dificultando el desarrollo de estrategias eficaces destinadas a impedir la difusión viral. Además, y pese al descenso de la incidencia de hepatitis por el VHC, la

prevalencia de la infección por el VHC es significativamente superior entre las personas de 30-50 años frente a aquellos menores o mayores [96]. Tras la infección aguda, la resolución espontánea es un hecho infrecuente, y hasta en el 80% de los pacientes se sigue detectando el ARN-VHC en suero tras 6 meses de seguimiento [20, 87]. Eventualmente, una proporción de estos individuos acaba desarrollando una cirrosis y un subgrupo evoluciona a carcinoma hepatocelular [86-90].

Desafortunadamente, la eficacia del tratamiento actual de la hepatitis crónica C con interferón aisladamente o en combinación con ribavirina es bastante limitada [87].

En consecuencia, y dada la elevada prevalencia de personas infectadas sin factores de riesgo aparentes, la mayor prevalencia de infección en los individuos de 30 a 50 años, la elevada tasa de cronicidad tras la infección aguda y la escasa eficacia del tratamiento actual, es de prever que el número de trasplantes hepáticos en pacientes con infección VHC continúe incrementándose en el futuro.

Como hemos visto previamente, la infección por el VHC es frecuente en otros grupos de pacientes, tales como cirrosis alcohólica (30%) or cirrosis por VHB (12-55%) [61, 92, 94], por lo que la investigación de la posible infección C debe formar parte del proceso de evaluación de cualquier candidato a trasplante.

## **2. Indicación de trasplante.**

El número creciente de pacientes anti-VHC positivos que requieren un trasplante hepático como última medida terapéutica contrasta con la relativa estabilidad en el número de donantes. Existe pues un desequilibrio entre el número de posibles candidatos y el de donantes [18], que muy probablemente empeore en el futuro a medida que aumente el “pool” de pacientes infectados por el VHC. Ante esta situación de escasez de órganos, los hepatólogos y cirujanos de trasplante debemos asentar con claridad las indicaciones de trasplante hepático en este colectivo, y las maneras de aprovechar al máximo los recursos existentes.

El trasplante debería considerarse una alternativa terapéutica en caso de enfermedad hepática suficientemente avanzada con consiguiente escasa probabilidad de supervivencia a medio plazo en ausencia de éste. Un objetivo fundamental es pues la identificación del momento idóneo para la realización del trasplante, lo que implica que existan complicaciones que ponen en peligro la vida paciente, pero aún queda suficiente reserva funcional para

tolerar la cirugía.

Existen varias preguntas que uno se debe plantear en la evaluación de un paciente con hepatopatía por el VHC como candidato a trasplante hepático: (i) ¿Cuál es el pronóstico sin trasplante del paciente con cirrosis por el VHC?; (ii) ¿Cómo podemos disminuir el tiempo en la lista de espera?; y (iii) ¿Existe algún fármaco capaz de modificar la historia natural de la hepatopatía terminal por el VHC?

### **2.1. Pronóstico de la cirrosis por VHC**

Hoy por hoy, y a diferencia de la cirrosis biliar primaria [97], no se dispone de un modelo que sea capaz de predecir con suficiente fiabilidad la supervivencia del paciente con cirrosis VHC en ausencia de trasplante. Además, el pronóstico de la cirrosis por el VHC, tanto compensada como descompensada, no está claramente definido. En ausencia de cirrosis, la expectativa de vida es similar a la de individuos no infectados. Incluso tras el desarrollo de cirrosis evidenciada histológicamente, solamente un 30% de los pacientes presentan complicaciones significativas en los siguientes 10 años, siendo el riesgo anual de desarrollo de CHC del 2-3% [98, 99]. En efecto, en un estudio Europeo reciente [98], en el que se evaluaron 384 cirróticos seropositivos durante un período medio de 5 años, la supervivencia de los pacientes con cirrosis descompensada alcanzó solamente el 50%, cifra inferior a la obtenida tras el trasplante hepático (aproximadamente 65%). El trasplante hepático parece, por tanto, una opción evidente en el caso de pacientes con hepatopatía descompensada por el VHC. En pacientes con cirrosis por el VHC compensada, las decisiones son más difíciles. En el estudio Europeo [98], la supervivencia a 5 años de los pacientes con cirrosis por el VHC compensada fue del 91%, siendo las tasas de descompensación hepática y de desarrollo de carcinoma hepatocelular del 18% y del 7%, respectivamente. En otro estudio reciente [100], la supervivencia a 4 años de 103 cirróticos fue del 84%, siendo las tasas de descompensación hepática y carcinoma hepatocelular del 20% y 11,5%, respectivamente. Por tanto, y en ausencia de estudios controlados que evalúen la eficacia del trasplante hepático, el pronóstico a 5 años de los pacientes con cirrosis compensada VHC parece favorecer la abstención frente al trasplante. El incremento progresivo de las listas de trasplante y el consiguiente aumento de la mortalidad de los candidatos [18] dificulta aún más la toma de decisiones, que frecuentemente deben tomarse con bastante tiempo de antelación.

Existen dos vías para intentar disminuir la mortalidad de los candidatos seropositivos. Una de ellas es el uso de terapia antiviral en cirróticos VHC con el objetivo de reducir las

complicaciones, y eventualmente la necesidad de trasplante. La segunda opción consiste en aumentar el número de donantes mediante la inclusión de los individuos anti-VHC positivos.

#### 1- Tratamiento antivírico pre-trasplante:

Prácticamente todos los ensayos realizados con interferón han mostrado tasas menores de respuesta sostenida en pacientes cirróticos (9%-16%) respecto a los no cirróticos (17%-34%) [87]. En análisis multivariados, la presencia de cirrosis aparece constantemente como un factor independiente de ausencia de respuesta inicial y de recaída [52]. Además, el impacto clínico del tratamiento con interferón en pacientes con cirrosis VHC no está claramente establecido [101]. Algunos estudios han descrito una reducción, tanto en la incidencia del hepatocarcinoma como de la descompensación hepática, entre los pacientes tratados con interferón respecto a los no tratados [100, 102-104]. Los resultados, no obstante, no son claramente convincentes [99, 101], y requieren confirmación en estudios prospectivos bien diseñados. Los resultados de diversos estudios han demostrado una mayor eficacia del tratamiento combinado interferón-ribavirina en pacientes con hepatitis crónica C con o sin cirrosis, tanto en pacientes no tratados previamente con interferón como en aquellos tratados con recaída post-tratamiento [105-108]. Aún se desconoce si este tratamiento puede tener algún impacto en la incidencia de las complicaciones de la cirrosis por el VHC.

Hoy por hoy, no se recomienda el tratamiento de la cirrosis descompensada con interferón con o sin ribavirina, dada la escasa eficacia y la mala tolerancia de estos fármacos en esta situación [87].

#### 2- Donantes anti-VHC positivos:

El uso de órganos de pacientes seropositivos constituye una opción para superar la escasez de órganos donantes. En este sentido, se ha demostrado que la transmisión de la infección vírica es prácticamente universal cuando el donante es virémico, mientras que es de aproximadamente la mitad cuando no se detecta viremia en el donante [80]. No obstante, la detección de viremia en el donante mediante técnicas de biología molecular no constituye una técnica apropiada de cribaje dada las limitaciones en cuanto a tiempo y requerimientos técnicos [62, 64]. Las implicaciones derivadas del uso o desecho de estos órganos están relacionadas con dos aspectos: (1) la prevalencia de órganos anti-VHC positivos en la población general de donantes, y (2) la historia natural del paciente que recibe un órgano de

estas características. En Estados Unidos, la tasa de donantes seropositivos por RIBA 2 es del 4,2% mientras que la tasa de donantes virémicos es del 2,4% [109]. Un 50% aproximadamente de los donantes seropositivos no son, por tanto, virémicos, y poseen un riesgo escaso de transmisión del VHC [80]. En resumen, aunque la no utilización de órganos de pacientes seropositivos permitiría la práctica eliminación de la transmisión a partir del órgano donante, esto implicaría la pérdida de aproximadamente un 2% de órganos, que pese a ser seropositivos, poseen un riesgo muy escaso de estar verdaderamente infectados por el VHC.

En segundo lugar, la idoneidad de estos órganos depende del pronóstico de los pacientes que reciben órganos infectados por el VHC, información que aún no está claramente establecida. En un estudio reciente y tras un seguimiento de 6-7 años, no se detectaron diferencias respecto a la supervivencia del injerto o del paciente (40% y 70%, respectivamente) entre 24 receptores de órganos seropositivos y 74 receptores de órganos seronegativos [110]. La interpretación de estos datos debe, no obstante, realizarse con cautela en el contexto del trasplante hepático, pues la gran mayoría de individuos incluidos en este estudio eran pacientes sometidos a trasplante de riñón, y solamente un 13,8% de los pacientes estudiados recibió un hígado de un donante seropositivo. La documentación cada vez más frecuente de casos de cirrosis del injerto por el VHC en pacientes con recidiva de la infección por el VHC [11, 14, 16] constituye una limitación de esta práctica, ya que es bastante probable que la historia natural de los pacientes con infección *de novo* VHC del injerto no difiera de la descrita en pacientes con recidiva de la infección.

El uso de órganos de donantes infectados para candidatos previamente infectados por el VHC es otra alternativa. En esta situación, se han descrito fenómenos de superinfección por la cepa pre-existente en el donante y viceversa [111]. La evolución post-trasplante parece, no obstante, no diferir de la observada en pacientes infectados por el VHC que reciben un órgano de un paciente seronegativo frente al VHC [112, 113]. En un estudio sobre 14 pacientes que recibieron hígados infectados por el VHC, el genotipo 1/1b se convirtió en el predominante tras el trasplante en todos los casos en los que éste infectaba bien al donante o al receptor, sugiriendo que este genotipo posee ventajas adaptativas sobre el resto [111]. Tras un año de seguimiento, la gravedad de la hepatitis C del injerto fue mayor en aquellos casos en que el genotipo detectado tras el trasplante era el mismo que tenía el receptor antes del trasplante. En otra serie, la supervivencia a 5 años tanto del paciente como del injerto no difirió entre 25 cirróticos seropositivos que recibieron un órgano infectado y un grupo control

de 175 cirróticos seropositivos que recibieron un órgano no infectado [112]. Además, la incidencia de hepatitis C del injerto no fue estadísticamente diferente en ambos grupos (44% frente a 75%, respectivamente). El número de pacientes incluidos en estos estudios es, sin embargo, reducido por lo que son necesarios estudios adicionales que permitan definir el impacto a largo plazo del fenómeno de superinfección. Hasta entonces, los órganos de donantes seropositivos deberían continuar usándose en situaciones de emergencia, las cuales muy probablemente, continúen aumentando en el futuro.

En resumen, la cirrosis secundaria a la infección crónica por el VHC se ha convertido en la principal indicación de trasplante hepático en la mayoría de Centros Españoles. A diferencia de las hepatopatías metabólicas o colestásicas, tales como la cirrosis biliar primaria [97], no existe un modelo capaz de predecir el pronóstico en pacientes con hepatopatía terminal secundaria a la infección por el VHC. Los pacientes cirróticos con antecedentes de algún episodio de descompensación hepática tales como ascitis, encefalopatía o peritonitis bacteriana espontánea, deberían remitirse a un centro de trasplante dada la mala supervivencia con los tratamientos tradicionales. Por contra, el pronóstico de los pacientes cirróticos compensados parece favorecer la abstención frente al trasplante.

La escasez de órganos donantes constituye actualmente uno de los problemas fundamentales. El uso de donantes considerados hasta el momento inadecuados, tales como aquellos seropositivos para el VHC, constituye una posible solución para incrementar el pool de donantes.

La búsqueda de nuevos fármacos capaces de prevenir la descompensación hepática y ulteriormente la necesidad del trasplante es uno de los objetivos más esperados para la próxima década.

La vacunación frente al VHB y el virus de la hepatitis A debería formar parte del manejo de los pacientes cirróticos VHC positivos ya que se ha sugerido una mayor mortalidad en este colectivo en caso de sobreinfección por alguno de estos virus [114, 115].



#### IV. INFECCIÓN POR EL VHC DESPUÉS DEL TRASPLANTE HEPÁTICO

##### 1. Origen de la infección:

El VHC es el principal responsable de hepatitis crónica después del trasplante (60%-90%). Habitualmente, se debe a la recurrencia viral en pacientes con infección por el VHC pretrasplante [3]. Por contra, la infección *de novo* a partir del órgano donante o a partir de los productos sanguíneos trasfundidos es hoy en día excepcional [92, 116, 117].

En la tabla 3 se muestran los resultados del estudio multicéntrico Español realizado en 1992, donde se comprueba que la infección por el VHC *de novo* es un hecho extremadamente infrecuente tras la implementación de los tests de cribaje en los bancos de sangre. Por contra, la recurrencia de la infección VHC es prácticamente universal, tanto si evalúa mediante técnicas virológicas como serológicas [92].

Tabla 3. Infección por el VHC tras el trasplante hepático

Pre-trasplante	Post-trasplante	
	anti-VHC positivo	Anti-VHC negativo
anti-VHC positivo (n=107)	105 (98%)	2 (2%)
anti-VHC negativo (n=110)	4 (3,6%)	106 (96%)

Pre-trasplante	Post-trasplante	
	ARN-VHC positivo	ARN-VHC negativo
ARN-VHC positivo (n=56)	52 (93%)	4 (7%)
ARN- VHC negativo (n=62)	3 (4,8%)	59 (95%)

**La infección por VHC tras el trasplante hepático se asoció de manera significativa con la infección por el VHC antes del trasplante, tanto si se evaluaba la infección C por métodos serológicos ( $p < 0,001$ ) como virológicos ( $p < 0,001$ ).**

### **1.1 Recurrencia de la infección por el VHC:**

En pacientes con infección por el VHC pre-trasplante, la recurrencia de la infección es prácticamente universal ( $> 95\%$ ), ya que no se toman medidas para inhibir la replicación viral antes del trasplante [3, 4]. Aunque la replicación viral en localizaciones extra-hepáticas puede constituir una fuente de infección del injerto, los datos más recientes cuestionan su importancia. Fukomoto y cols [19] han medido los niveles de ARN-VHC a intervalos frecuentes antes, justo inmediatamente después y hasta el mes del trasplante, observando: (1) una rápida disminución de estos tras extraer el hígado infectado, (2) niveles permanentemente bajos durante las primeras 48 horas post-trasplante, e (3) incremento progresivo de los niveles de viremia hasta alcanzar y superar los niveles pre-trasplante a partir de las 72 horas. Estos datos sugieren que el hígado es la principal localización de replicación viral, la cual se encuentra estimulada en situaciones de inmunosupresión, mientras que las localizaciones extra-hepáticas contribuyen poco a los niveles en suero.

### **1.2. Infección por el VHC *de novo*:**

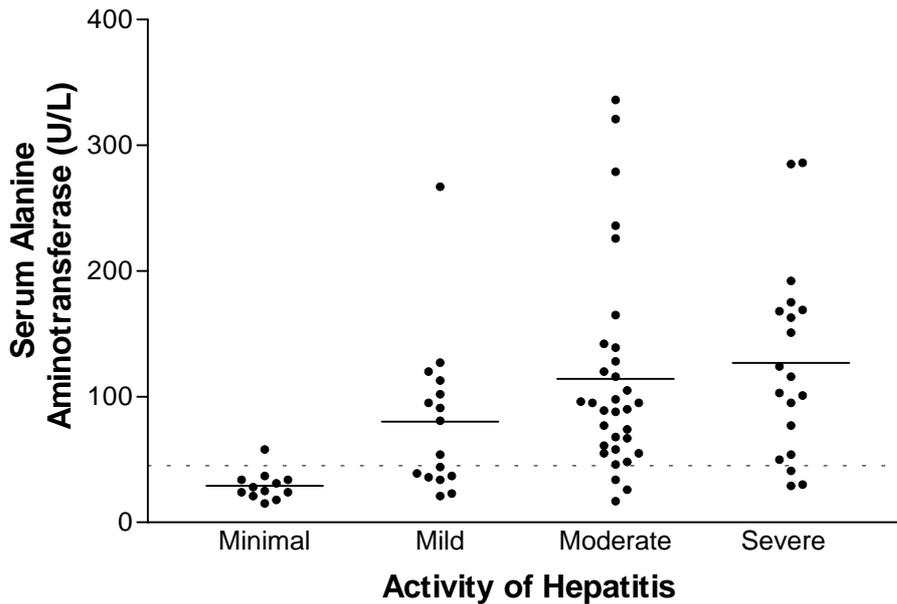
La segunda fuente del VHC proviene de los productos sanguíneos transfundidos o del órgano donante. El riesgo de adquirir el VHC a través del trasplante ha disminuido significativamente y se encuentra en la actualidad alrededor del 0-3% [92, 116, 117]. Varios hechos han contribuido a este descenso, incluyendo: (i) la baja sensibilidad de los test de primera generación utilizados para el diagnóstico de infección VHC en cirróticos candidatos a trasplante en estudios iniciales [3], (ii) la práctica eliminación de la hepatitis postrasfusional tras la introducción de los test de cribaje en los bancos de sangre (0,01- 001% por unidad de sangre) [77], (iii) la disminución de los requerimientos de sangre durante la intervención quirúrgica y en el postoperativo con las mejoras técnicas; (iv) la utilización de distintos métodos de preservación y perfusión del injerto, lo cual podría teóricamente variar la cantidad de virus transmitida por el órgano, tal como se ha demostrado en el caso del trasplante de riñón [118].

## **2. Definición y Diagnóstico:**

Varios centros han investigado la historia natural de la infección por el VHC del injerto [5-16]. Desafortunadamente, la ausencia de uniformidad a la hora de definir la hepatitis C recurrente ha dificultado la comparación de los resultados. La “infección C recurrente” debería diferenciarse de la “hepatitis C recurrente”, ya que la primera hace referencia a la presencia de viremia detectada por técnicas de biología molecular, mientras que “hepatitis C recurrente” implica desarrollo de lesión histológica del injerto secundaria al VHC. Otras definiciones, basadas en marcadores bioquímicos o serológicos, no alcanzan la suficiente precisión dada la escasa especificidad de los marcadores bioquímicos [14] y la relativa falta de sensibilidad de los test serológicos en el contexto del trasplante hepático [118]. En particular, en esta situación, se ha detectado un descenso significativo en el título de ciertos anticuerpos frente a antígenos del VHC, tales como el C100-3, C-33 y NS5 [119]. Los títulos de otros anticuerpos tales como aquellos dirigidos hacia a C22 y C25 parecen más estables, lo cual explicaría la mayor sensibilidad de los test de segunda generación [120]. En cuanto a los marcadores bioquímicos, y al igual que sucede en el paciente inmunocompetente, no existe una correlación entre los niveles de las transaminasas y el grado de afectación histológica [14].

**En un estudio realizado recientemente en el Hospital La FE en el que colaboró la doctoranda [14], y en el que los pacientes sometidos a trasplante hepático por cirrosis por el VHC seguían un riguroso seguimiento histológico con biopsias anuales independientemente de los niveles de transaminasas, se pudo observar esta falta de correlación bioquímica-histológica (Figura 2).**

Figura 2. Ausencia de correlación bioquímica-histológica en pacientes con hepatitis C recurrente.



La figura muestra la relación entre los niveles séricos de ALT y la actividad de la hepatitis C recurrente en el último seguimiento. La actividad se estimó a partir del índice de Knodell y se basó en el grado de infiltrado inflamatorio y necrosis hepatocitaria {necrosis periportal (0-6), actividad lobular (0-4) y actividad portal (0-4)}, obteniéndose la siguiente clasificación: 1-2, mínima; 3-6, leve; 7-10, moderada; 11-14, grave. Las barras indican los niveles medios. El rango normal de ALT es 0-40 U/L (línea de puntos).

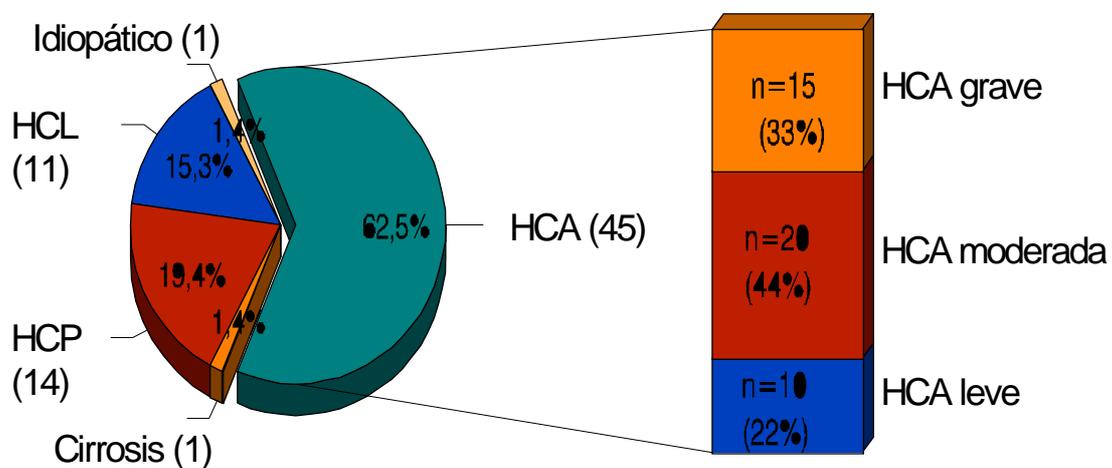
De los 79 pacientes que desarrollaron una hepatitis del injerto, un 30% mantuvo niveles en suero normales de ALT (0-40 U/L), y aunque estos niveles fueron inferiores en el grupo de pacientes con hepatitis mínima, no difirieron entre aquellos con hepatitis leve, moderada o grave (Figura 2). La mayoría de pacientes con hepatitis mínima mantuvo niveles en el rango de la normalidad (92%). Por contra, el porcentaje de pacientes con ALT normal fue significativamente menor entre los pacientes con hepatitis leve (37,5 %), hepatitis moderada (9,5%), o hepatitis grave (10,5 %) ( $p=0,0001$ ). {Referencia # 14: High incidence of allograft cirrhosis in hepatitis C virus genotype 1b infection following transplantation: relationship with rejection episodes}.

### 3. Historia natural:

El conocimiento de la historia natural de la hepatitis C post-trasplante y los factores implicados en la progresión de la enfermedad son importantes para: (1) la selección del paciente; (2) la modificación racional de la inmunosupresión en caso de hepatitis C grave del injerto; y (3) la identificación de los pacientes con mayor necesidad de tratamiento.

Las consecuencias de la infección por el VHC postrasplante son variables, aunque generalmente menos dramáticas que en el caso de la infección por el VHB [121, 122]. Aunque la recurrencia del VHC constituye prácticamente la norma [3], solamente entre un 50%-90% de los pacientes virémicos presentan evidencias histológicas de hepatitis dentro del primer año, siendo el espectro histológico muy variable [5, 8, 10, 11, 14, 16, 92]. La mayoría desarrolla lesiones de hepatitis crónica activa entre el primer y el tercer año. **En la Figura 3 se detallan las lesiones histológicas observadas en los pacientes incluidos en el estudio multicéntrico Español infectados por el VHC [92].**

Figura 3: Resultados histológicos post-trasplante en los pacientes con infección por el VHC (Estudio multicéntrico Español 1992).



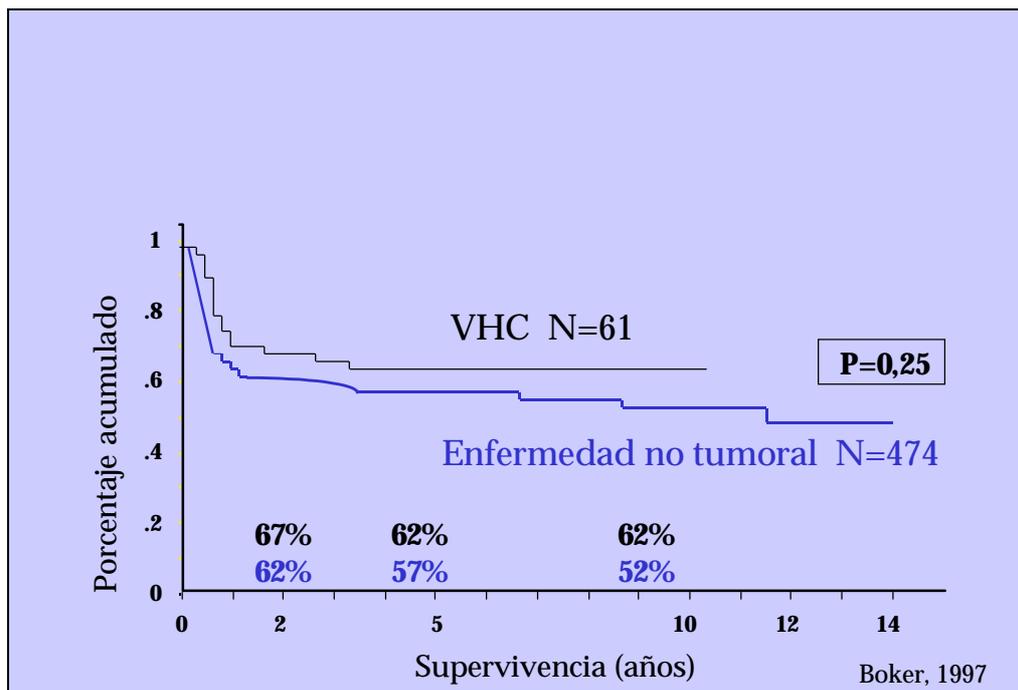
Abreviaturas: HCA=Hepatitis crónica activa; HCP=Hepatitis crónica persistente; HCL= Hepatitis crónica lobular;

En la mayoría de pacientes sometidos a trasplante hepático por cirrosis VHC y con seguimiento histológico superior a 6 meses, los hallazgos histológicos observados son de hepatitis crónica activa con o sin cirrosis.

En un porcentaje que varía entre el 6% y 10%, los pacientes desarrollan una forma acelerada de hepatitis [17], semejante a la hepatitis colestásica fibrosante descrita en pacientes infectados por el VHB [121]. Por contra, otro subgrupo de pacientes con viremia positiva, e incluso niveles elevados de ARN-VHC en suero, no tiene lesiones histológicas tras varios años de seguimiento [5, 14, 123, 124] sugiriendo que, al igual que sucede en el individuo inmunocompetente [90], existe un estado de portador sano.

Las consecuencias a largo plazo de la infección por el VHC post-trasplante no están todavía claramente definidas [11-16]. Aunque la infección por el VHC no parece repercutir negativamente sobre la supervivencia del paciente [11-15] (**Figura 4**), se están documentado cada vez con mayor frecuencia casos de hepatitis C progresiva del injerto tras 5 o más años de seguimiento [11, 14, 16].

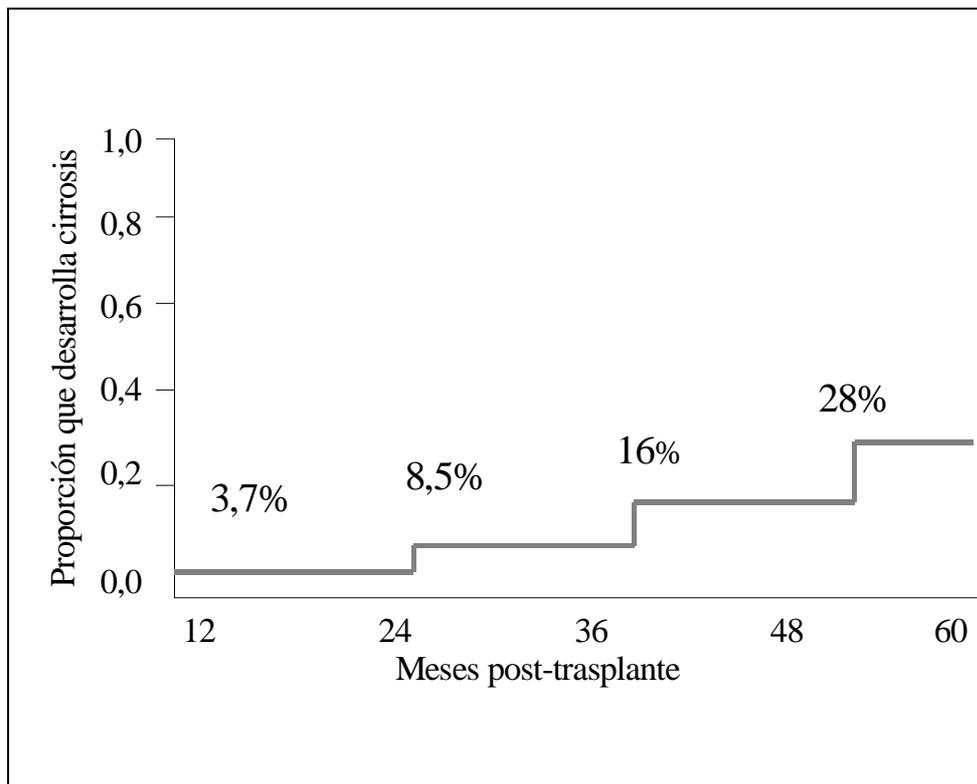
Figura 4. **Supervivencia post-trasplante: VHC frente a controles sin enfermedad tumoral [12].**



En un primer estudio, los autores observaron una evolución a formas más graves de lesión histología con el tiempo; de tal forma que tras 35 meses de seguimiento, un 27% de pacientes había desarrollado una hepatitis crónica moderada, mientras que tras 51 meses, esta había progresado a cirrosis en un 8% de los casos [10]. **En otro estudio realizado recientemente en el Hospital La FE en el que colaboró la doctoranda [14], y en el cual el 97% de los pacientes tenía signos histológicos de hepatitis en la biopsia más reciente, el**

riesgo actuarial de desarrollar cirrosis pasó de 3,7% al año a 28% a los 5 años [14] (Figura 5){High incidence of allograft cirrhosis in hepatitis C virus genotype 1b infection following transplantation: relationship with rejection episodes}.

Figura 5: **Probabilidad acumulada de desarrollar cirrosis VHC del injerto (n=81).**



La probabilidad acumulada de desarrollar una cirrosis por el VHC del injerto aumentó progresivamente hasta alcanzar 28% a los 4 y 5 años post-trasplante.

## **HIGH INCIDENCE OF ALLOGRAFT CIRRHOSIS IN HEPATITIS C VIRUS GENOTYPE 1B INFECTION FOLLOWING TRANSPLANTATION: RELATIONSHIP WITH REJECTION EPISODES (REFERENCIA # 14)**

El objetivo fundamental de este estudio fue evaluar la historia natural de la infección por el VHC recurrente, y los factores involucrados en ella. Los estudios previos cuyo objetivo era el mismo habían obtenido resultados discrepantes, tanto en la incidencia de hepatitis C recurrente como en su gravedad. Estas discrepancias reflejaban probablemente la existencia de poblaciones de estudio heterogéneas y la presencia de distintas variables potencialmente relacionadas con la evolución de la hepatitis C post-trasplante. En particular, en estudios previos, los regímenes inmunosupresores eran diferentes entre pacientes, la infección por el VHC genotipo 1b era menor, y no siempre se realizaba un seguimiento histológico a todos los pacientes.

Las ventajas de evaluar la historia natural de la infección por el VHC postrasplante en nuestro centro fueron: (1) inclusión de un grupo homogéneo de pacientes infectados por el genotipo 1b, (2) realización de biopsias de protocolo anuales, y (3) tratamiento universal de inducción con triple terapia ciclosporina-azatioprina-prednisona. La selección de un grupo de estudio tan homogéneo reduce el riesgo de asociaciones falsas, al disminuir el número de variables potencialmente relacionadas con la evolución de la hepatitis C post-trasplante.

Los objetivos específicos fueron (i) evaluar la progresión histológica de la hepatitis C post-trasplante, y en particular determinar la incidencia de cirrosis del injerto secundaria a la reinfección por el VHC; (ii) comprobar el efecto negativo de los episodios de rechazo y su tratamiento sobre la gravedad de la hepatitis C del injerto; (iii) definir si los hallazgos histológicos de la primera biopsia anual predicen la evolución histológica posterior; y (iv) determinar si los hallazgos histológicos se correlacionan con las pruebas de función hepática.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes: (i) infección por el VHC post-trasplante definido por positividad en suero del ARN-VHC (detectado por PCR); (ii) seguimiento histológico mayor de un año; y (iii) ausencia de infección por el VHB. De

los 239 pacientes sometidos a trasplante hepático en el Hospital La FE entre 1991 y 1996, 118 lo fueron por cirrosis secundaria a la infección por el VHC. De ellos, se excluyeron 39 por las siguientes razones: (1) supervivencia menor a un año post-trasplante (n=28); (2) infección por el VHB post-trasplante (n=4); (3) seguimiento histológico inadecuado (n=4); (4) complicaciones biliares concomitantes (n=2); y (5) indetectabilidad del ARN-VHC en suero tras el trasplante (n=1). Solamente en un paciente excluido, la causa de fallecimiento estaba relacionado con el VHC. Se añadieron dos pacientes con infección por el VHC de novo, por lo que finalmente, el grupo de pacientes estuvo formado por 81 pacientes (56 hombres, 25 mujeres con una edad media de  $54 \pm 8$  años, rango 24-65 años) infectados en su gran mayoría por el VHC genotipo 1b (96%), y sometidos uniformemente a la clásica inmunosupresión de inducción con ciclosporina-azatioprina-prednisona. En 17 casos, la indicación de trasplante incluyó la presencia de carcinoma hepatocelular sobre la cirrosis por el VHC. En dos casos, se descubrieron pequeños carcinomas incidentales en el explante. El grupo de pacientes excluidos no difirió del grupo de estudio respecto a la edad, sexo, ingesta previa de alcohol y prevalencia de carcinoma hepatocelular.

Durante los primeros 5 años post-trasplante, se realizaron biopsias anuales a todos los pacientes, independientemente del nivel sérico de transaminasas, con un total de 202 biopsias de protocolo. Se realizaron biopsias adicionales en caso de elevación de transaminasas 1,5 veces el límite superior de la normalidad, o para confirmar la resolución de los episodios de rechazo. El seguimiento histológico medio fue de 32 meses con un rango entre 12 y 60 meses. Las biopsias se evaluaron prospectivamente para el estudio, diferenciando la actividad inflamatoria del estadio de fibrosis. Se utilizó un método cuantitativo similar al índice de Knodell que diferencia por un lado el grado de infiltrado inflamatorio {necrosis periportal (0-6), actividad lobular (0-4) y actividad portal (0-4)} y por otro lado el estadio de fibrosis en una escala de 0 a 4 (1=fibrosis periportal, 3= fibrosis en puente, 4=cirrosis).

El tratamiento inmunosupresor consistió en triple terapia con ciclosporina (dosis ajustadas según niveles: 250-350 ng/ml durante el primer mes, 150-250 ng/ml durante el 2o y tercer mes, 100-150 ng/ml hasta el año, y alrededor de 100 ng/ml posteriormente), azatioprina (1-2 mg/Kg/día) y prednisona (empezando con 200 mg y disminuyendo a 20

mg/día a partir del 6<sup>o</sup> día). En 76 pacientes, se discontinuó el tratamiento con azatioprina tras una media de 190 días (rango 23-1260 días). En el último seguimiento, se había retirado la prednisona a 75 pacientes (93%) tras un seguimiento media de 720 días (rango 210-1800 días). Los episodios de rechazo confirmados histológicamente en todos los casos se trataron con 3 bolos de metil-prednisolona, y en caso de resistencia se recurrió al uso de OKT3, lo cual sucedió en 6 % de pacientes.

Las variables que se analizaron como factores predictivos de lesión histológica fueron la edad, el sexo, la presencia de carcinoma hepatocelular, el número de rechazos ocurridos durante el primer año post-trasplante, el número de bolos de metilprednisolona administrados durante el primer año, la utilización de OKT3, la dosis acumulada de prednisona y azatioprina y niveles de ciclosporina a los 3, 6, 9 y 12 meses, y los niveles séricos de ALT anuales.

Los resultados pueden resumirse en los siguientes puntos:

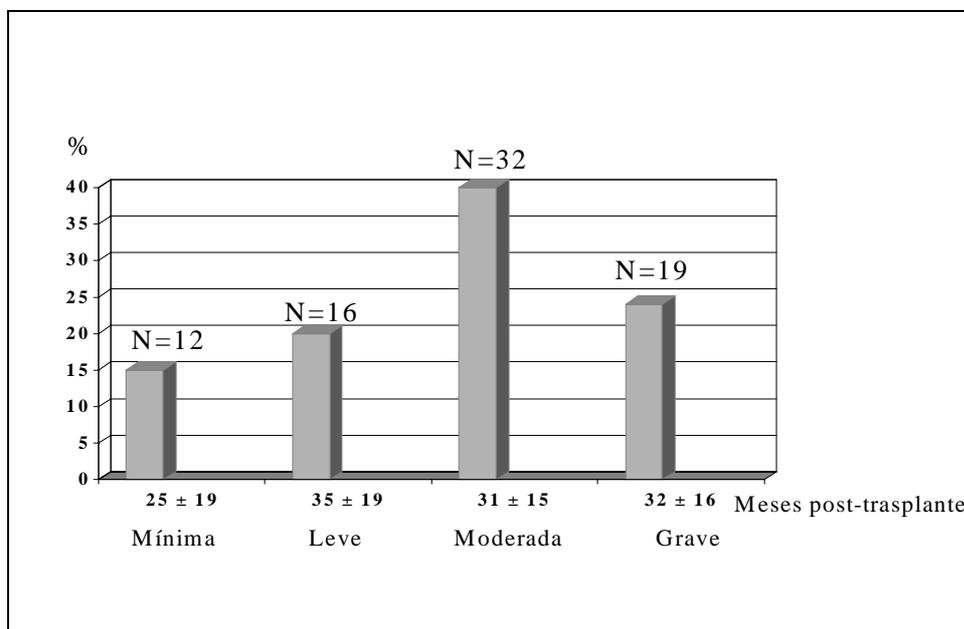
(i) **Progresión de la actividad inflamatoria de la hepatitis C del injerto:** En la biopsia mas reciente, se evidenciaron signos histológicos de hepatitis en 79 pacientes (97,5%), la cual fue mínima en el 15%, leve en el 20%, moderada en el 41% y grave en el 24% (Tabla 4) (Figura 6).

Tabla 4. Hepatitis C post-trasplante: Grado de actividad inflamatoria en el último seguimiento histológico.

Grado (actividad)*	n (%)	Seguimiento medio $\pm$ DE (meses)
Mínima	12 (15,1)	25 $\pm$ 19
Leve	16 (20,2)	35 $\pm$ 19
Moderada	32 (40,5)	31 $\pm$ 15
Grave	19 (24,1)	32 $\pm$ 16

\*Calculado a partir de la puntuación separada de necrosis periportal (0-6), necrosis y degeneración lobular (0-4) e inflamación portal (0-4), definiendo los siguientes grupos: 1-2, mínima; 3-6, leve; 7-10, moderada; 11-14, grave.

Figura 6: **Hepatitis C post-trasplante: Grado de actividad inflamatoria en el último seguimiento histológico (n=81)**

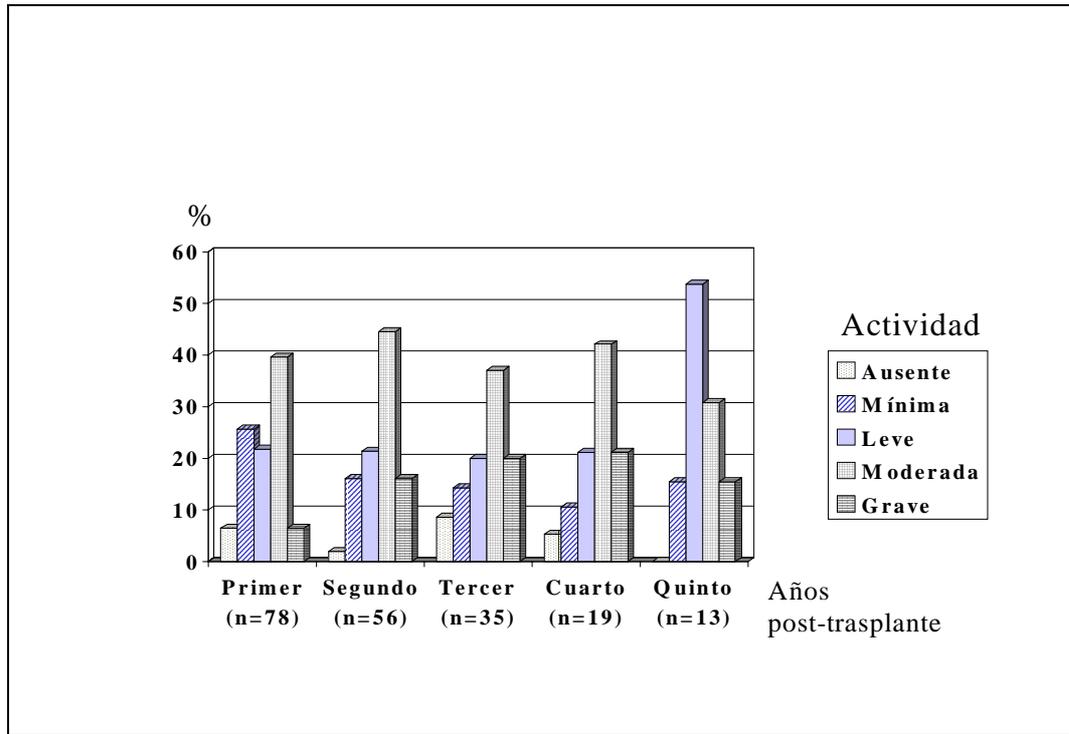


La evolución de la actividad inflamatoria durante los primeros 5 años post-trasplante queda reflejada en la tabla 5 y figura 7 .

Tabla 5. **Evolución de la actividad inflamatoria durante los primeros 5 años post-trasplante.**

Puntuación Grado (actividad)*	Primer año (n=78)	Segundo año (n=56)	Tercer año (n=35)	Cuarto año (n=19)	Quinto año (n=13)
No hepatitis, n (%)	5 (6,4)	1 (1,8)	3 (8,6)	1 (5,3)	0 (0)
Mínima, n (%)	20 (25,6)	9 (16,1)	5 (14,3)	2 (10,5)	2 (15,4)
Leve, n (%)	17 (21,8)	12 (21,4)	7 (20)	4 (21,1)	5 (53,8)
Moderada, n (%)	31 (39,7)	25 (44,6)	13 (37,1)	8 (42,1)	4 (30,8)
Grave, n (%)	5 (6,4)	9 (16,1)	7 (20)	4 (21,1)	2 (15,4)

Figura 7. **Evolución de la actividad inflamatoria durante los primeros 5 años post-trasplante (n=81).**



Al comparar las biopsias del primer y quinto año, no se detectaron diferencias significativas en el número de injertos sin hepatitis ( $p=0,45$ ), con hepatitis mínima ( $p=0,42$ ), hepatitis leve ( $p=0,29$ ), moderada ( $p=0,76$ ), o grave ( $p=0,26$ ). En los 11 pacientes con biopsias anuales hasta el quinto año, la tendencia fue al empeoramiento de la actividad inflamatoria con el tiempo, sin alcanzar significación estadística.

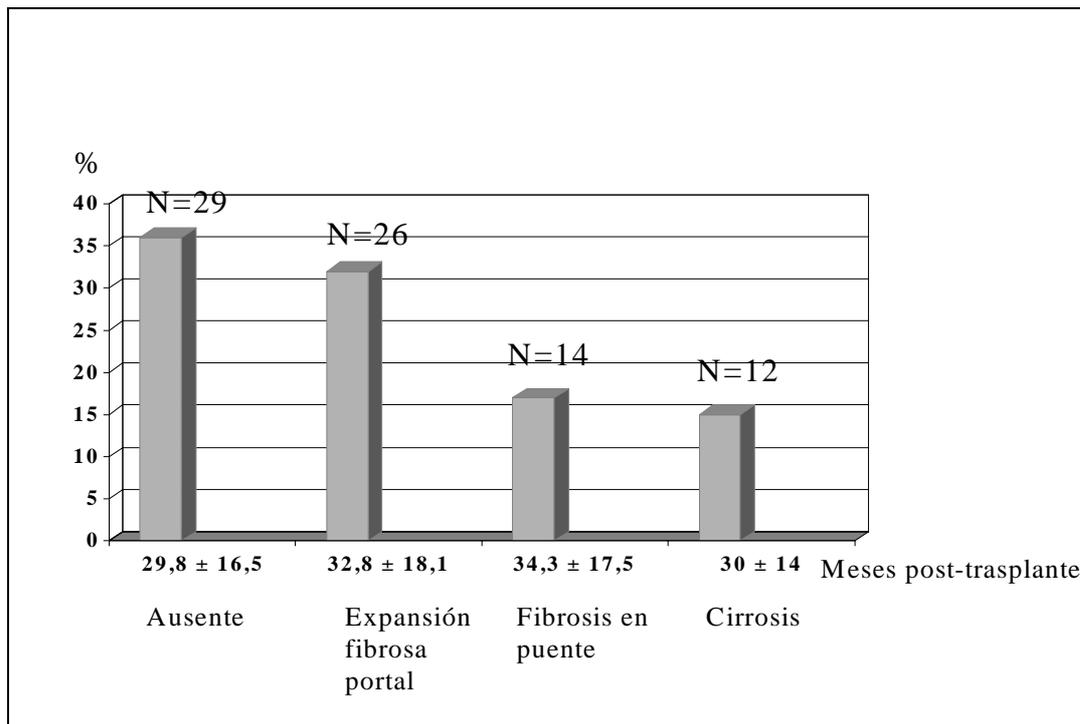
(ii) **Progresión del estadio de fibrosis post-trasplante:** En la biopsia mas reciente, se evidenciaron signos de fibrosis en 52 pacientes (64 %). De estos, 32% consistieron en expansión fibrosa portal, 17,3% fibrosis en puente y 14,8% cirrosis (tabla 6, figura 8 ).

Tabla 6. **Hepatitis C post-trasplante: estadio de fibrosis en el último seguimiento histológico (n=81).**

Estadio (Fibrosis)†	n (%)	Seguimiento medio $\pm$ DE (meses)
No	29 (35.8)	29,8 $\pm$ 16,5
Expansión Fibrosa Portal	26 (32,1)	32,8 $\pm$ 18,1
Fibrosis en puente	14 (17.3)	34,3 $\pm$ 17,5
Cirrosis	12 (14,8)	30 $\pm$ 14

†Estadios de fibrosis (basado en la clasificación de Knodell): 0, ausencia de fibrosis; 1, expansión fibrosa portal; 3, fibrosis en puente; 4, cirrosis.

Figura 8. **Hepatitis C post-trasplante: estadio de fibrosis en el último seguimiento histológico (n=81).**

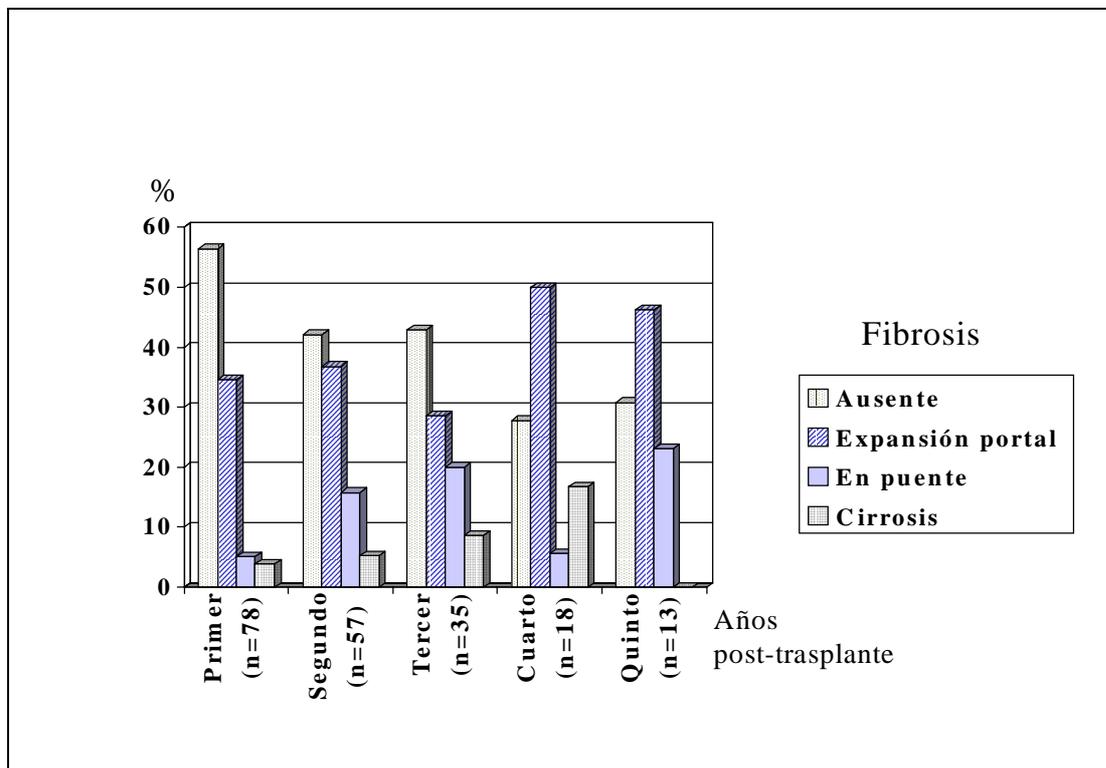


La evolución del estadio de fibrosis durante los primeros 5 años post-trasplante queda reflejada en la tabla 7 y figura 9.

Tabla 7. Evolución del estadio de fibrosis durante los primeros 5 años post-trasplante.

Estadio (Fibrosis)	n=78	n=57	n=35	n=18	n=13
No, n(%)	44 (56,4)	24 (42,1)	15 (42,9)	5 (27,8)	4 (30,8)
Expansión fibrosa portal , n(%)	27 (34,6)	21 (36,8)	10 (28,6)	9 (50)	6 (46,2)
Fibrosis en puente,n (%)	4 (5,1)	9 (15,8)	7 (20)	1 (5,6)	3 (23,1)
Cirrosis, n(%)	3 (3,8)	3 (5,3)	3 (8,6)	3 (16,7)	0 (0)

Figura 9. Evolución del estadio de fibrosis durante los primeros 5 años post-trasplante.



Al comparar las biopsias del primer y quinto año, no se detectaron diferencias significativas en el número de injertos sin fibrosis ( $p=0,13$ ), o con expansión fibrosa portal ( $p=0,53$ ). Por contra, el número de injertos con fibrosis en puente fue significativamente menos frecuente al primer año que al quinto año ( $p=0,057$ ). En los 11 pacientes con biopsias anuales hasta el quinto año, la tendencia fue al empeoramiento

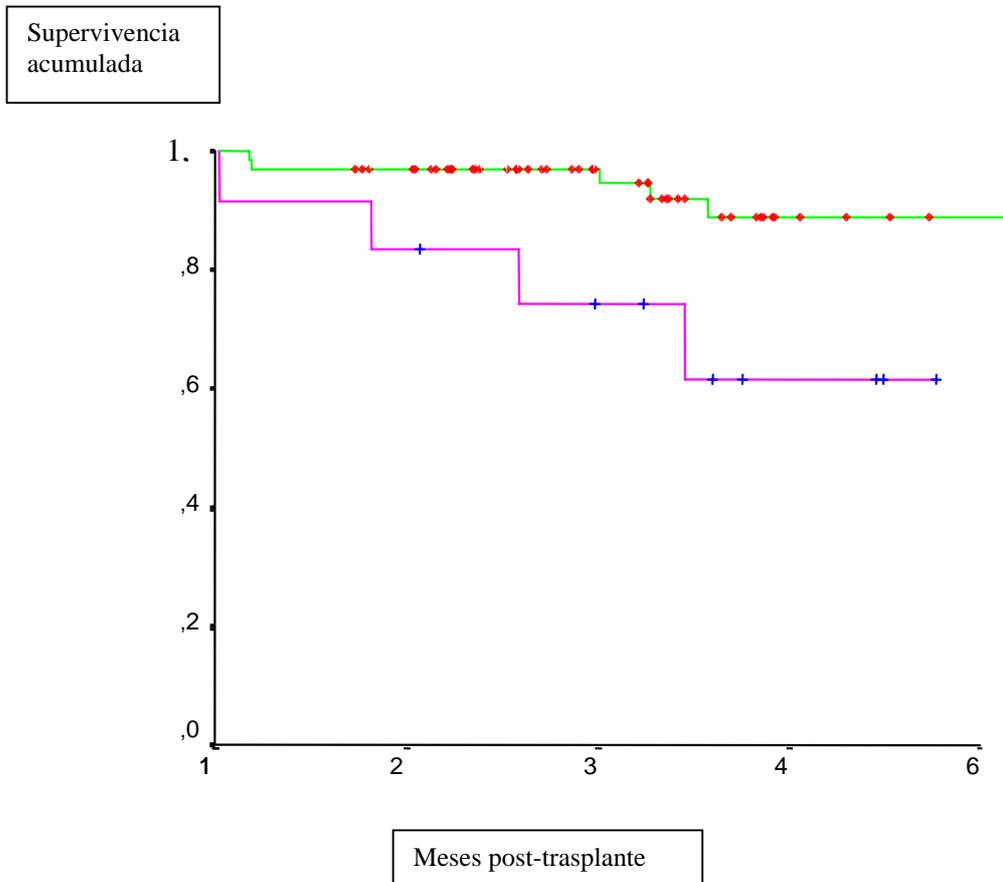
del estadio de fibrosis con el tiempo, alcanzando significación estadística al comparar el estadio de fibrosis del primer y quinto año ( $0,1 \pm 0,3$  vs  $1,3 \pm 1,2$ ,  $p < 0,05$ ).

Doce pacientes desarrollaron una cirrosis del injerto por el VHC tras una mediana de seguimiento de 24 meses (rango: 12-48 meses) post-trasplante. En 3 de ellos, la cirrosis se evidenció en la biopsia del primer año. La tasa actuarial de desarrollo de cirrosis C del injerto aumentó progresivamente con los años desde el trasplante, siendo de 3,7%, 8,%, 16%, 28% y 28% al primer, segundo, tercero, cuarto y quinto año post-trasplante, respectivamente (Figura 5).

(iii) Ausencia de correlación entre los hallazgos histológicos y los niveles séricos de transaminasas: De los 79 pacientes que desarrollaron una hepatitis del injerto, un 30% mantuvo niveles en suero normales de ALT (0-40 U/L), y aunque estos niveles fueron inferiores en el grupo de pacientes con hepatitis mínima, no difirieron entre los pacientes con hepatitis leve, aquellos con hepatitis moderada o grave (Figura 3). La mayoría de pacientes con hepatitis mínima mantuvo niveles de ALT en el rango de la normalidad (92%). Por contra, el porcentaje de pacientes con ALT normal fue significativamente menor entre los pacientes con hepatitis leve (37,5 %), hepatitis moderada (9,5%) o hepatitis grave (10,5 %) ( $p=0,0001$ ).

(iv) Evolución desfavorable de los pacientes con cirrosis C del injerto. Pese a observarse una supervivencia similar entre el grupo de estudio y un grupo control de pacientes sometidos a trasplante hepático en las mismas fechas por otras etiologías y con seguimiento mínimo de un año (95%, 91%, y 84% al 2º, 3º y 5º año frente a 96%, 92%, y 83%, respectivamente), el desarrollo de cirrosis C del injerto condicionó un peor pronóstico, de forma que la supervivencia de los pacientes con cirrosis C del injerto fue significativamente inferior a la del resto de pacientes con infección por el VHC post-trasplante (82%, 72% y 54% al 2º, 3º y 5º año frente a 97%, 94%, y 86%, respectivamente,  $p=0,01$ ) (Figura 10).

Figura 10: **Supervivencia del paciente con hepatitis C recurrente: cirróticos frente a no-cirróticos.**

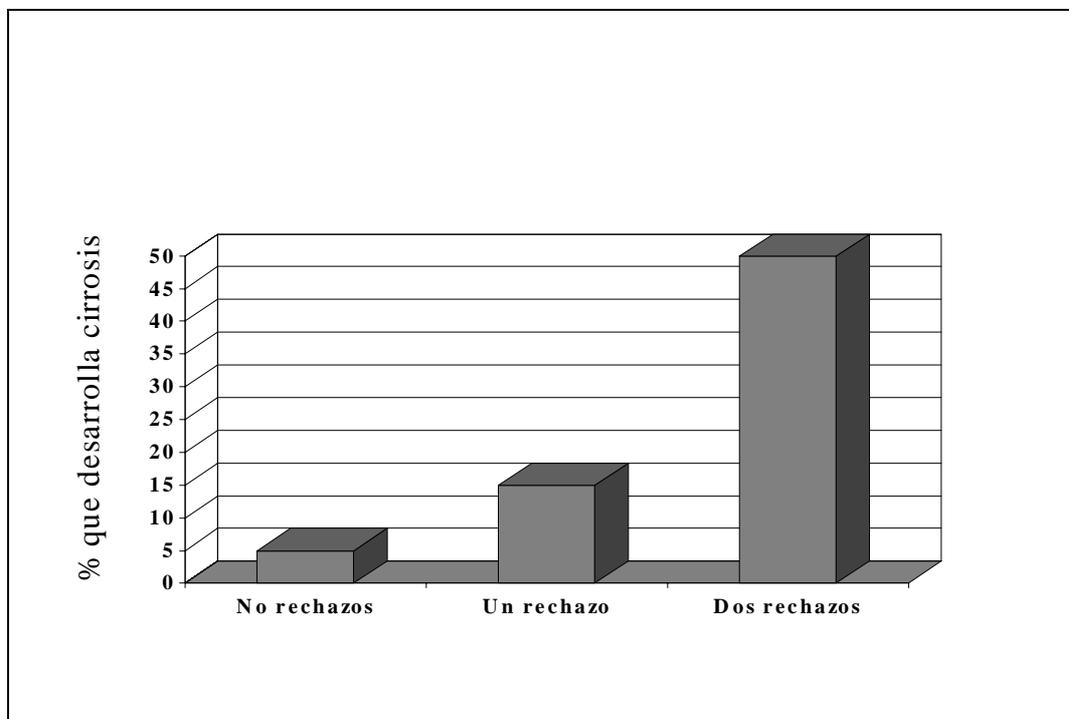


De los 12 pacientes que desarrollaron una cirrosis C del injerto (6 hombres, 6 mujeres, edad media  $53,2 \pm 10,8$  años), solamente 5 seguían en situación compensada tras un seguimiento medio de  $8,2 \pm 2,5$  meses (rango: 6-12 meses) desde el diagnóstico de cirrosis. Los 7 restantes desarrollaron un fallo del injerto, falleciendo 4 a consecuencia de éste (uno tras ser retrasplantado).

(v) Tres variables se asociaron con la evolución histológica de la hepatitis C del injerto: el número de rechazos y el grado de inmunosupresión del primer año, los hallazgos histológicos de la primera biopsia anual, y los niveles séricos de transaminasas correspondientes al primer año post-trasplante; de tal forma que los pacientes con desarrollo de cirrosis C del injerto se caracterizaron por:

- Haber tenido con mayor frecuencia episodios de rechazo celular (83% frente a 48% en el resto de pacientes,  $p=0,02$ ) (Tabla 8), existiendo una correlación entre el número de rechazos y la incidencia de cirrosis C del injerto (5% entre los pacientes sin historia de rechazos, 15% entre aquellos con historia de un episodio de rechazo, y 50% entre los que habían tenido 2 episodios de rechazo agudo ( $p=0,001$ ) (Figura 11).

Figura 11. Correlación entre el número de episodios de rechazo celular y el desarrollo de cirrosis VHC del injerto.



Igualmente el número de bolos de 1 gramo de metilprednisolona y el porcentaje de pacientes tratados con OKT3 fueron significativamente superiores en los pacientes que desarrollaron posteriormente una cirrosis C del injerto frente a aquellos que no la desarrollaron (tabla 8). Aunque la dosis acumulada de prednisona y azatioprina y los niveles en sangre de ciclosporina fueron superiores en el grupo de pacientes con desarrollo de cirrosis que en el resto de pacientes, la diferencia no alcanzó significación estadística.

Tabla 8. Variables asociadas con el desarrollo de cirrosis VHC del injerto.

	<b>Pacientes con cirrosis (n=12)</b>	<b>Pacientes sin cirrosis (n=69)</b>	<b>p</b>
<b>Edad (Media ± DE)</b>	53,2 ± 10,8	54,7 ± 7,4	0,53
<b>Sexo Mujer, n (%)</b>	6 (50)	19 (27,5)	0,12
<b>Carcinoma hepatocelular Pre-trasplante, n (%)</b>	2 (17)	17 (25)	0,55
<b>Duración del seguimiento histológico (meses)</b>	30 ± 14	31,8 ± 17,2	0,32
<b>Pacientes con rechazo, n (%)</b>	10 (83)	33 (48)	0,02
<b>Pacientes tratados por rechazo, n (%)</b>	9 (75)	29 (42)	0,03
<b>Pacientes tratados con OKT3 por rechazo corticorresistente, n (%)</b>	2 (17)	3 (4)	0,32
<b>Pacientes con rechazo precoz*, n (%)</b>	9 (75)	28 (41)	0,03
<b>Pacientes tratados por rechazo precoz, n (%)</b>	8 (67)	25 (36)	0,05
<b>Pacientes con rechazo tardío*, n (%)</b>	5 (42)	8 (12)	0,009
<b>Pacientes tratados por rechazo tardío, n (%)</b>	4 (33)	8 (12)	0,05
<b>Pacientes con rechazo leve, n (%)</b>	5 (42)	19 (27)	0,32
<b>Pacientes con rechazo moderado, n (%)</b>	4 (33)	15 (22)	0,38
<b>Pacientes con rechazo grave, n (%)</b>	3 (25)	1 (1)	0,009
<b>Número de rechazos</b>	1,2 ± 0,7	0,5 ± 0,6	0,001
<b>Número de bolos de metilprednisolona</b>	3 ± 2,2	1,5 ± 2,1	0,03

\*Se definió el rechazo precoz como aquel desarrollado durante las primeras 4 semanas post-trasplante mientras que el rechazo tardío fue aquel que ocurrió posteriormente.

- Mayor gravedad de la actividad inflamatoria y de la fibrosis en la biopsia del primer año. Así, la actividad de la hepatitis C en la primera biopsia anual fue significativamente mayor entre los pacientes que desarrollaron posteriormente una cirrosis que entre los que no la desarrollaron ( $7,6 \pm 3,4$  vs  $4,4 \pm 3,1$ ,  $p=0,008$ ) (Tabla 9).

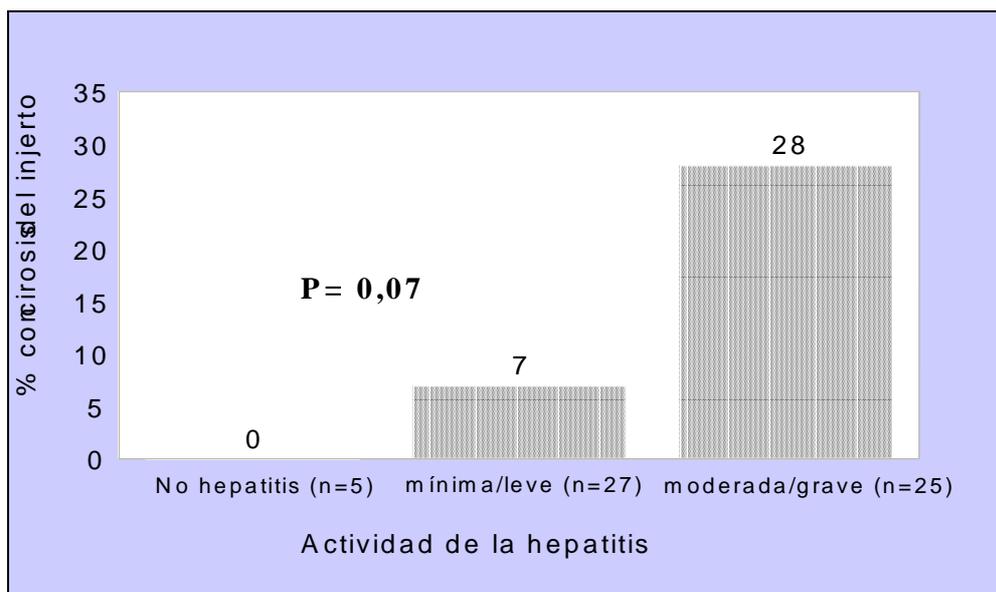
El estadio de fibrosis también fue superior, sin alcanzar significación estadística ( $p=0,18$ ) (Tabla 9).

Tabla 9. Variables histológicas del primer año predictivas de cirrosis VHC del injerto.

	Pacientes con cirrosis (n=9)	Pacientes sin cirrosis (n=48)	p
Actividad	7,6 ± 3,4	4,4 ± 3,1	0,008
Necrosis periportal	2,7 ± 1,7	1,3 ± 1,4	0,02
Degeneración intralobular	2,2 ± 1,2	1,3 ± 1,1	0,02
Inflamación portal	2,7 ± 1,3	1,8 ± 1,3	0,09
Fibrosis	0,7 ± 0,5	0,4 ± 0,6	0,18

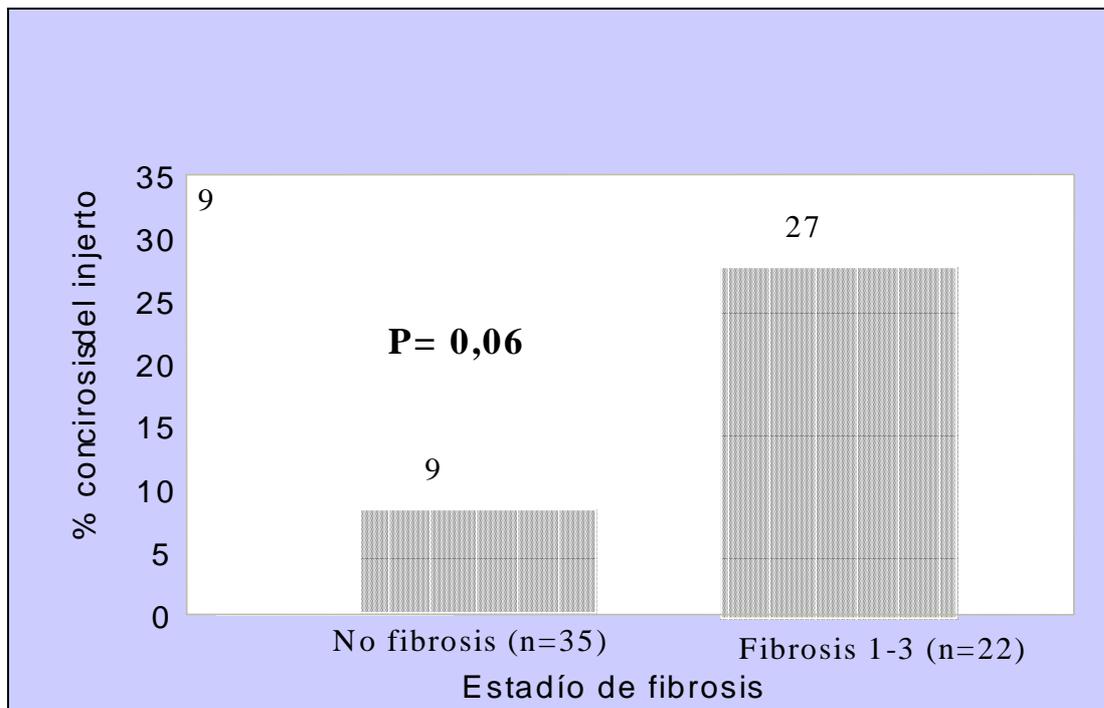
Ninguno de los 5 pacientes con histología normal desarrollo una cirrosis C del injerto. Por contra, 2 de los 27 con hepatitis mínima o leve (7%), y 7 de los 25 con hepatitis moderada o grave (28%), desarrollaron posteriormente una cirrosis por el VHC ( $p=0,07$ ) (Figura 12).

Figura 12. Actividad inflamatoria de la primera biopsia anual post-trasplante: variable predictiva de desarrollo posterior de cirrosis VHC del injerto



Igualmente, solamente 3 de los 35 pacientes sin fibrosis en la primera biopsia anual desarrollaron una cirrosis, frente a 6 de los 22 (27%) con signos de fibrosis ( $p=0,06$ ) (Figura 13).

Figura 13. Estadio de fibrosis de la primera biopsia anual post-trasplante: variable predictiva de desarrollo posterior de cirrosis VHC del injerto.



- Mayor elevación de los niveles séricos de transaminasas correspondientes al primer año post-trasplante (Tabla 10).

Tabla 10. Variables bioquímicas del primer año predictivas de cirrosis VHC del injerto

	Pacientes con cirrosis (n=9)	Pacientes sin cirrosis (n=48)	p
AST (U/L)	114 ± 40	64 ± 44	0,002
ALT (U/L)	176 ± 85	95 ± 80	0,008

Los pacientes con niveles de ALT mayores a 100 U/L o aquellos con niveles de AST mayores a 70 U/L desarrollaron con mayor frecuencia una cirrosis C del injerto que aquellos con niveles inferiores ( 29,2% vs 5,9%,  $p=0,02$ ; y 34,8% vs 2,8%,  $p=0,0008$ , respectivamente) (Figuras 14 y 15).

Figura 14. Niveles séricos de ALT correspondientes a la primera biopsia anual post-trasplante: variable predictiva de desarrollo posterior de cirrosis VHC del injerto.

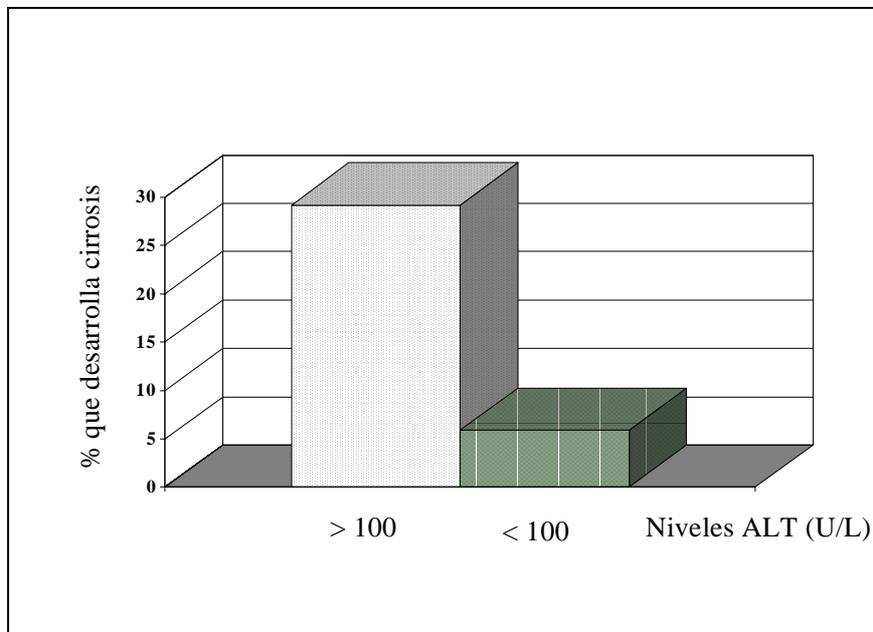
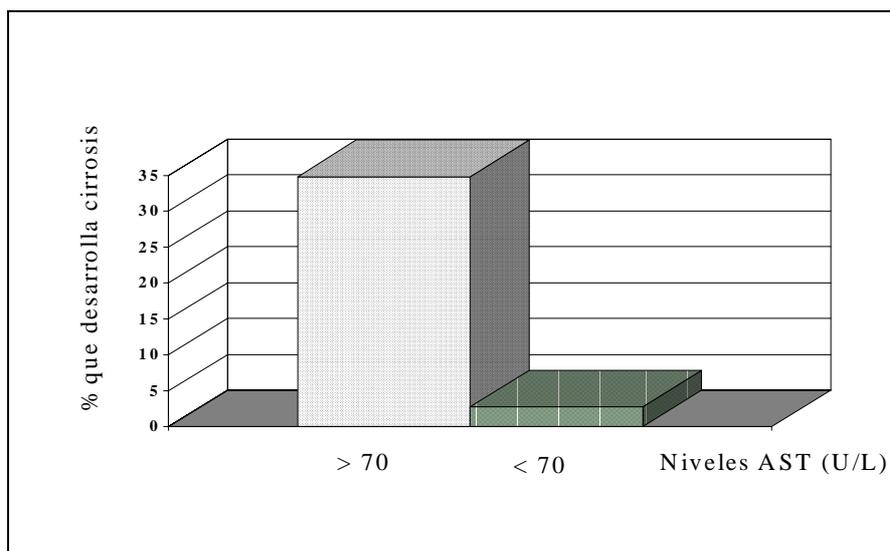


Figura 15. Niveles séricos de AST correspondientes a la primera biopsia anual post-trasplante: variable predictiva de desarrollo posterior de cirrosis VHC del injerto



**Por contra, los niveles séricos de bilirrubina, fosfatasas alcalinas y gammaglutamil-transpeptidasa no difirieron entre los dos grupos.**

**Los resultados generados en este estudio nos permiten extraer una serie de conclusiones relevantes tanto para el seguimiento y manejo de los pacientes con hepatitis C recurrente como para el esclarecimiento de los mecanismos patogénicos implicados en la lesión hepática por el VHC.**

**En primer lugar, los datos obtenidos sugieren que la hepatitis C recurrente no es una condición tan inocua como se desprendía de estudios previos, por lo menos en pacientes trasplantados por cirrosis VHC infectados por el genotipo 1b y sometidos al tratamiento inmunosupresor clásico de ciclosporina-azatioprina-prednisona. Así, aunque la supervivencia de este grupo de individuos durante los primeros 5 años post-trasplante no difiere de la observada en un grupo control, la probabilidad acumulada de desarrollar una cirrosis del injerto por el VHC alcanza el 28% al quinto año post-trasplante, y en un 17% adicional de pacientes se objetiva fibrosis de grado 3 en la última biopsia disponible. Por otra parte, la evolución de la fibrosis y de la actividad inflamatoria es hacia el empeoramiento progresivo desde la fecha del trasplante, por lo que cabe esperar que en los próximos años asistamos a un incremento en el número de trasplantados por cirrosis VHC que necesiten un retrasplante. Estos resultados, no obstante, deben validarse en otras poblaciones de estudio tales como trasplantados infectados por otros genotipos y sometidos a nuevos protocolos de inmunosupresión. En efecto, la tasa de cirrosis observada en este estudio es superior a la descrita en estudios previos. Esto podría estar en relación no solamente con el hecho de haber realizado un seguimiento histológico estricto, sino también de haber evaluado una población muy homogénea de pacientes infectados por un genotipo que se ha asociado con peor evolución histológica en otros estudios tanto en pacientes inmunocompetentes como en inmunodeprimidos.**

**En segundo lugar, la ausencia de correlación bioquímica-histológica sugiere que las biopsias de protocolo continúan siendo un instrumento esencial en el manejo del paciente trasplantado por el VHC, ya que los marcadores bioquímicos no poseen la suficiente sensibilidad ni especificidad para determinar la presencia y gravedad de la hepatitis C.**

**Finalmente, se ha descrito la existencia de una serie de factores relacionados con una peor evolución histológica de la hepatitis C recurrente. Estos datos nos pueden ayudar en: (1) la selección precoz de pacientes para tratamiento antivírico, de tal forma que los pacientes con lesión histológica significativa en la biopsia del primer año se beneficiarían muy probablemente de un seguimiento especial, incluyéndose en estudios de tratamiento precoz anti-vírico; y (2) el manejo de los pacientes, fundamentalmente en lo que se refiere a la inmunosupresión. Así, deberían evitarse los bolos de metilprednisolona en los pacientes trasplantados por cirrosis VHC, por lo que ante una disfunción del injerto, debería evitarse el tratamiento anti-rechazo sin existir datos histológicos concluyentes. En caso de hallazgos histológicos dudosos, en los que existen datos tanto a favor de hepatitis recurrente como de rechazo, es preferible tener una actitud expectante y repetir las biopsias hepáticas.**

Hay que ser cautos a la hora de interpretar los resultados referentes a la supervivencia de los pacientes, ya que la mayoría de estudios no ha incluido el número suficiente de pacientes para detectar diferencias leves en la evolución. Datos provenientes de estudios multicéntricos como la United Network for Organ Sharing (UNOS) en Estados Unidos sugieren que la infección por el VHC afecta negativamente tanto la supervivencia del injerto como la del paciente. Tras ajustar los grupos respecto a distintas variables tales como edad, sexo, raza, edad del donante, compatibilidad ABO y año del trasplante, tanto la mortalidad tras 2 años como la pérdida del injerto fueron superiores en el grupo de paciente infectados por el VHC que en el grupo control de enfermedades colestásicas (43% y 24% más, respectivamente) y el grupo de pacientes con cirrosis alcohólica (18% y 21% más, respectivamente) [125]. Es probable que con seguimientos más prolongados, las diferencias entre estos grupos sean más aparentes. Existe otra serie de problemas a la hora de analizar y comparar estudios sobre la influencia del VHC en la supervivencia del injerto y del paciente, tales como: (1) establecimiento del grupo control más adecuado, ya que existe una gran variabilidad en la evolución post-trasplante según la etiología inicial [12, 13, 117]. Así, los pacientes con enfermedades colestásicas o autoinmunes constituyen generalmente el grupo con mejor pronóstico, mientras que los pacientes con carcinoma hepatocelular han sido históricamente los peores candidatos. Los pacientes con diagnóstico inicial de cirrosis alcohólica constituyen un grupo control adecuado sólo y cuando se excluya meticulosamente a aquellos infectados por el VHC; (2) Distribución adecuada entre los grupos de una serie de factores tanto del pre (edad, clasificación Child Pugh, edad del donante, año del trasplante) como del post-trasplante (datos de inmunosupresión) que muy probablemente influyeran la evolución de la hepatitis C recurrente, pero que desafortunadamente no siempre están referidos en los estudios; (3) Comprobación de la calidad de recogida de datos, ya que ésta suele variar según se trate de estudios individuales, con acceso a información más detallada, frente a estudios multicéntricos con inherentes desventajas en cuanto a la calidad de datos; (4) Bajo poder estadístico, ya que los objetivos elegidos generalmente (mortalidad, pérdida del injerto) ocurren infrecuentemente durante el período de seguimiento, que habitualmente abarca de 3 a 5 años.

La manera teóricamente más adecuada de evaluar la historia natural de la hepatitis C del injerto es mediante el seguimiento prospectivo a largo plazo de un número suficiente de trasplantados no sometidos a tratamiento antivírico. Este tipo de estudio es prácticamente imposible de realizar por razones obvias. Una alternativa, utilizada recientemente en el

estudio de la historia natural de la hepatitis C en pacientes inmunocompetentes [86] se basa en un objetivo intermedio o “progresión histológica”, más fácilmente alcanzable (ver sección 2.4). Este tipo de análisis utiliza un objetivo dinámico (tasa de progresión histológica) y no estático (mortalidad), para predecir el futuro. En el estudio de Poynard y col [86], los autores definen la tasa de progresión de la fibrosis hepática como el gradiente entre el estadio de fibrosis dividido por la duración de la infección. Mediante esta tasa, los autores estiman el tiempo necesario para el desarrollo de cirrosis (estadio de fibrosis 4) en una población de pacientes con hepatitis crónica C. Una premisa esencial para este tipo de análisis es que la progresión del estadio de fibrosis siga un patrón lineal con el tiempo, y en consecuencia permita realizar extrapolaciones en el futuro. En este estudio, los autores estudiaron 2235 pacientes con hepatitis crónica C con al menos una valoración histológica. Los resultados de este estudio se resumen en: (1) A diferencia de la progresión del grado inflamatorio, la tasa de progresión del estadio de fibrosis sigue un patrón lineal con el tiempo; (2) Esta progresión no obstante no sigue una distribución normal, ya que existen pacientes con apenas progresión y otros con progresión acelerada a cirrosis; (3) La mediana de progresión del estadio de fibrosis es de 0,133 unidades de fibrosis (95% CI 0,125-0,143) por año; (4) A este ritmo, la mediana de tiempo necesario para el desarrollo de fibrosis 4 o cirrosis es de 32 años; (5) Tres factores se asocian con un incremento en la tasa de progresión: edad en el momento de la infección mayor de 40 años, consumo diario de alcohol superior a los 50 gramos, y ser hombre; (6) Teniendo en cuenta estos factores, un tercio de los pacientes desarrolla cirrosis en menos de 20 años, mientras que otro tercio requiere 50 años o más para alcanzar este estadio de lesión histológica [86].

**Nosotros utilizamos un modelo similar para evaluar la tasa de progresión del estadio de fibrosis hepática en pacientes sometidos a trasplante hepático con el objetivo de estimar el tiempo medio en el desarrollo de cirrosis en esta población de individuos inmunodeprimidos [16]. Los datos que permitieron formular nuestra hipótesis de trabajo fueron los siguientes: (1) datos indirectos que sugieren que la historia natural de la infección por el VHC es más agresiva en pacientes inmunodeprimidos que en individuos inmunocompetentes [126, 127]; (2) la existencia de una creencia que la evolución de la hepatitis C post-trasplante es más agresiva en Europa que en Estados Unidos. Hasta el momento, sin embargo, no se habían realizado comparaciones directas entre estos grupos. Con el objetivo de comprobar estas hipótesis, obtuvimos prospectivamente datos epidemiológicos de trasplantados hepáticos infectados por el**

**VHC provenientes de dos centros, uno Europeo y uno Norte-americano. Más específicamente, nos propusimos comprobar si: (i) la historia natural de la hepatitis C recurrente difiere de la historia natural de la hepatitis C antes del trasplante hepático; (ii) existen factores del pre o posttrasplante que desempeñan un papel en la progresión de la hepatitis C post-trasplante. La historia natural de la infección por el VHC tanto antes como después del trasplante hepático se basó en la evaluación de la progresión histológica (fibrosis y actividad) con el tiempo, utilizando a cada paciente como su propio control {HCV-related fibrosis progression following liver transplantation: increase in recent years}.**

El trasplante hepático tiene dos ventajas importantes respecto a los pacientes inmunocompetentes para realizar este tipo de análisis. En primer lugar se conoce con exactitud el momento de la infección del injerto [19]. Esto contrasta con los pacientes inmunocompetentes en los que hasta en un 50% de los casos no somos capaces de identificar el momento inicial de la infección al no existir un factor de riesgo evidente [128]. En el estudio de Poynard y cols. [86], se conocía la duración de la infección en solamente un 52% de los pacientes. La segunda ventaja del modelo del trasplante es la frecuente disponibilidad de muestras histológicas seriadas, dado el elevado número de biopsias hepáticas que se realizan en los trasplantados. De nuevo, esto contrasta con el escaso número de biopsias disponibles en los pacientes inmunocompetentes, fundamentalmente en caso de normalidad de las transaminasas séricas. En este sentido, solamente un 3% de los pacientes en el estudio de Poynard y cols. [86] tenía más de una biopsia, por lo que la valoración de la tasa de progresión del estadio de fibrosis se basó fundamentalmente en el resultado de una sola evaluación histológica.

**HCV-RELATED FIBROSIS PROGRESSION FOLLOWING LIVER TRANSPLANTATION: INCREASE IN RECENT YEARS (REFERENCIA # 16):**

**Nuestro estudio incluyó 284 trasplantados hepáticos provenientes de dos centros, El Hospital Universitario La FE de Valencia, y La University of California, San Francisco de Estados Unidos. De los 284 pacientes, 203 habían sido sometidos a trasplante hepático en San Francisco entre 1988 y 1996, mientras que los 81 pacientes restantes provenían del Hospital La FE habiendo recibido un trasplante hepático entre 1991 y 1996 (Tabla 11). Se utilizaron los siguientes criterios de selección: (1) viremia positiva por PCR tras el trasplante hepático; (2) ausencia de infección por el VHB, (3) seguimiento histológico mayor de 6 meses; y (4) ausencia de otras causas de lesión histológica.**

**Tabla 11: Características de los 284 pacientes sometidos a trasplante hepático por cirrosis VHC en la Universidad de California, San Francisco (UCSF) y en el Hospital La FE.**

Variable	Todos los pacientes (n= 284)	UCSF (n= 203)	La FE (n=81)	p
Sexo (% Hombres)	69%	69%	68%	0,9
Edad (años)	51 (21-70)	48 (21-70)	56 (26-66)	<0,001
Raza (% Caucásicos)	77%	67%	100%	≤0,001
Child-Pugh (A, B, C)	14%/46%/40%	8%/46%/45%	28%/46%/26%	≤0,001
CHC (Conocido/incidental)	13.5%	9.5%	23.5%	0,002
Ingesta significativa de alcohol pre-OLT (%)	60%	67%	37%	≤0,001
Factores de riesgo				≤0,001
Transfusión	39%	40%	35%	
Drogadicción intravenosa	24%	33%	0	
Otros factores de riesgo de transmisión parenteral	12%	11%	15%	
Familiar/sexual	3%	2%	5%	
Desconocida	22%	14%	45%	
Tiempo presumible de infección pre-OLT				0,02
5-14 años	16%	14%	23%	
15-29 años	60%	65%	43%	
>30 años	24%	21%	34%	
Año del trasplante				≤0,001
1988-89	8%	11%	0	
1990-91	21%	27%	5%	
1992-93	28%	29%	27%	
1994-95	33%	22%	60%	
1996	10%	11%	7%	
Genotipo 1 (%)	85%	80%	96%	≤0,001
Genotipo 1b (%)	57%	38%	94%	≤0,001
Niveles pre-OLT de ARN-VHC (%)				≤0,001
Indetectable*	43%	54%	0	
Baja viremia	17%	13%	32%	
Viremia intermedia	20%	17%	34%	
Alta viremia	20%	17%	34%	
Inmunosupresión de inducción				
Ciclosporina	93%	91%	100%	0,004
Azatioprina	81%	74%	100%	≤0,001
Micofenolato	14%	19%	0	≤0,001
FK506	7%	10%	0	0,004
# de rechazos (mediana, rango)	1 (0-5)	1 (0-5)	1 (0-2)	0,03
Terapia de rescate				
OKT3	18%	22%	7,5%	0,004
Bolos de MP > 3	19%	21%	14%	0,2
# de pacientes tratados con interferón post-trasplante	25%	25%	0	<0,001

MP= Metil-prednisolona, CHC=Carcinoma hepatocelular, OLT=Trasplante hepático

\* Indetectable= debajo del límite de detección del b-DNA (0,2 Meq/ml) o del Amplicor (1000 copias/ml); Baja viremia= 0,2-0,5 Meq/ml o 1000-54000 copias/ml, respectivamente; Viremia intermedia= 0,5- 1,7 Meq/ml o 54000- 243589 copias/ml); Alta viremia: > 1,7 Meq/ml o 243589 copias/ml.

Se analizaron 843 biopsias, 72% de las cuales correspondían a biopsias de protocolo, con una media de  $3\pm 1.6$  por paciente. En cada biopsia se valoró por separado el grado de actividad y el estadio de fibrosis, utilizando una escala de 0 a 4, respectivamente. A partir del estudio histológico, se generaron dos curvas por centro: una representando la progresión del estadio de fibrosis y la otra, la progresión del grado de actividad con el tiempo desde el trasplante. Estas curvas se utilizaron como base para definir la tasa de progresión histológica anual post-trasplante.

La tasa de progresión del estadio de fibrosis pre-trasplante se definió como el gradiente entre 4 (estadio de cirrosis en el momento del trasplante) dividido por la presunta duración de la infección por el VHC. A su vez, definimos la duración de la infección por el VHC antes del trasplante como el tiempo transcurrido entre el momento de la infección y la fecha del trasplante.

Para determinar con mayor precisión el momento de la infección, administramos un cuestionario muy detallado sobre factores de riesgo de adquisición viral a la mayoría de pacientes incluidos en el estudio. En aquellos casos en que no se pudo administrar el cuestionario (n=130), los datos se obtuvieron a partir de las historias clínicas.

Los factores de riesgo de adquisición viral se agruparon en 5 grupos: (1) drogadicción intravenosa, (2) transfusión sanguínea, (3) otros factores asociados con transmisión parenteral (trabajadores de la salud, tatuajes, acupuntura, cirugía mayor), (4) sexual/familiar (convivencia con un familiar seropositivo, homosexualidad o promiscuidad sexual), y (5) esporádico en caso de no identificar un factor de riesgo. Cuando un paciente refería más de un factor de riesgo, seleccionamos aquel más probable según la siguiente escala (1) transfusión sanguínea y drogadicción intravenosa, (2) otros factores asociados con transmisión parenteral, (3) sexual/familiar. Si algún paciente tenía más de un factor de riesgo perteneciente a la misma categoría, elegimos aquel que había ocurrido antes en el tiempo.

Los factores evaluados como posibles factores asociados con mayor progresión histológica fueron los siguientes: (1) factores dependientes del virus, tales como genotipo y nivel de viremia pre-trasplante; (2) factores dependientes del huésped tales como edad, raza, sexo, edad al infectarse, presencia de carcinoma hepatocelular, clasificación de Child-Pugh, y número/fecha de episodios de rechazo ocurridos durante el primer año

del trasplante; (3) factores de riesgo externos tales como vía de infección, ingesta ética pre-trasplante, tipo y cantidad de inmunosupresión utilizada durante el primer año post-trasplante (“bolos” de 1 gramo de metilprednisolona y uso de OKT3), y fecha del trasplante (en cohortes de 2 años desde 1988 hasta 1996).

Los resultados se exponen a continuación:

(1) En primer lugar evaluamos los cambios en el estadio de fibrosis y grado de inflamación antes y después del trasplante hepático, como marcadores indirectos de la historia natural de la infección por el VHC en pacientes inmunocompetentes frente a pacientes inmunodeprimidos. En las figuras 16 y 17 se representan los resultados de las biopsias. En particular, la figura 16 refleja el tiempo medio para desarrollar los distintos estadios de fibrosis en cada centro, mientras que la figura 17 refleja el porcentaje de pacientes que alcanzan un estadio de fibrosis 4 o cirrosis anualmente.

Figura 16. Tiempo medio para el desarrollo de los distintos estadios de fibrosis.

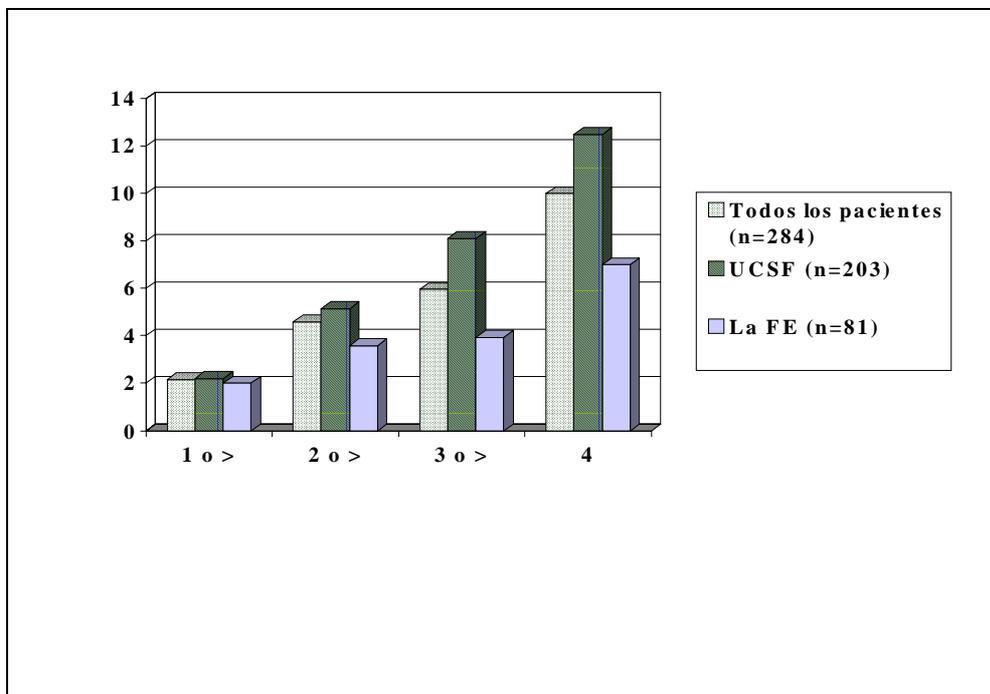
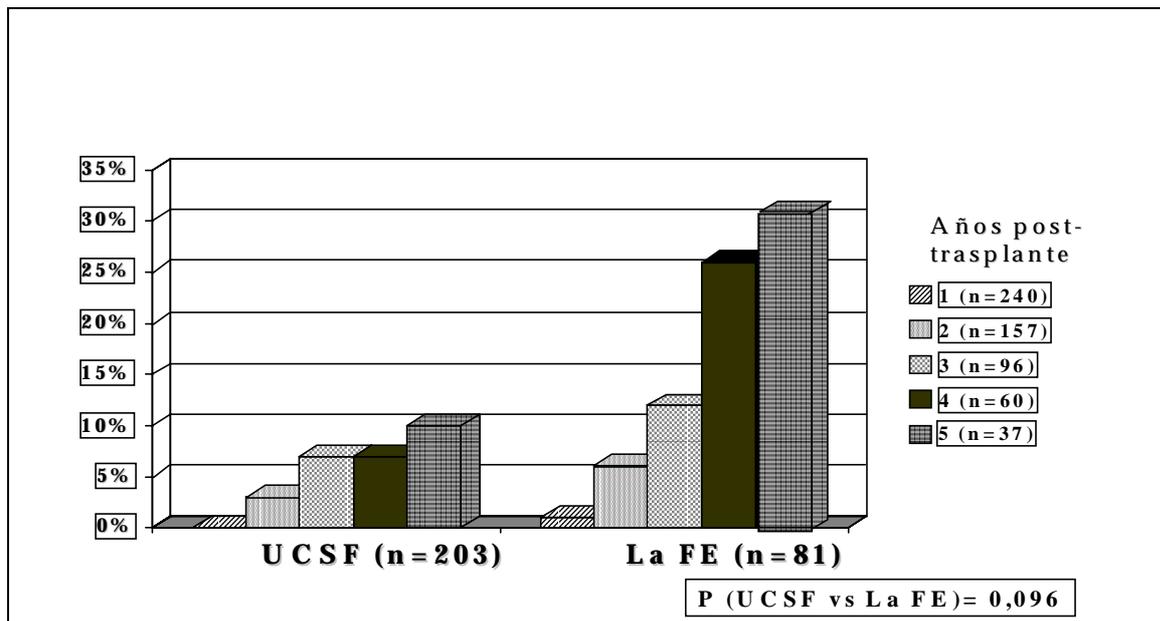
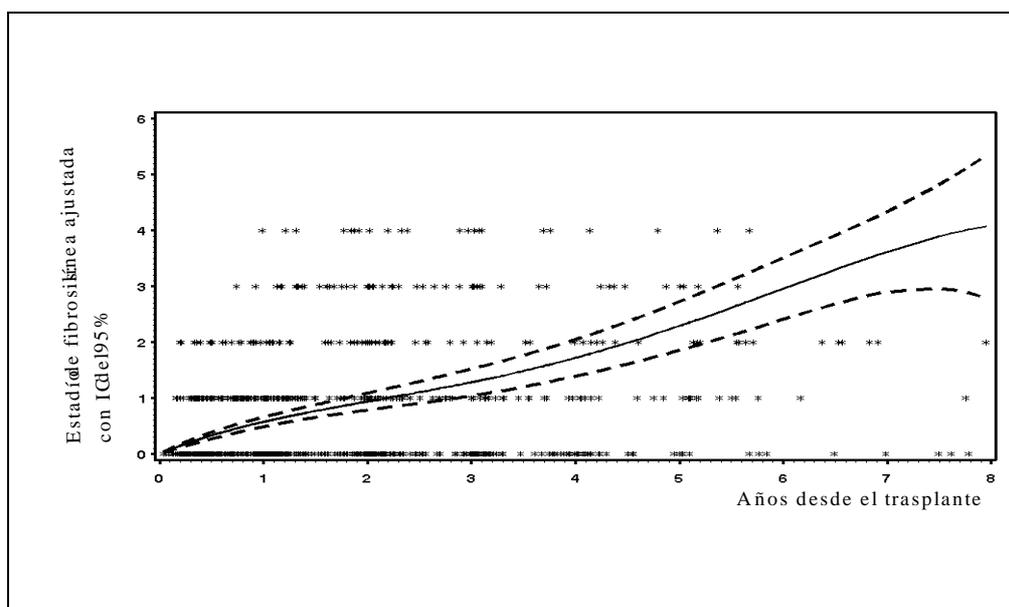


Figura 17: **Porcentaje de pacientes que desarrollan fibrosis 4 (=cirrosis) anualmente tras el trasplante hepático.**



A partir de estos datos construimos la curva representando la tasa de progresión del estadio de fibrosis. Los cambios en el estadio de fibrosis siguieron un patrón lineal en relación con el tiempo desde el trasplante (Figura 18) con una mediana de progresión de fibrosis del 0,3 (0,004-2,19) por año.

Figura 18: **Tasa de progresión del estadio de fibrosis después del trasplante hepático.**



Antes del trasplante, la tasa de progresión del estadio de fibrosis fue significativamente inferior {0,2/ año (0,09-0,8)} a la observada después del trasplante ( $p < 0,0001$ ) (Tabla 12), y muy similar a la descrita previamente en el estudio de Poynard y cols. [85].

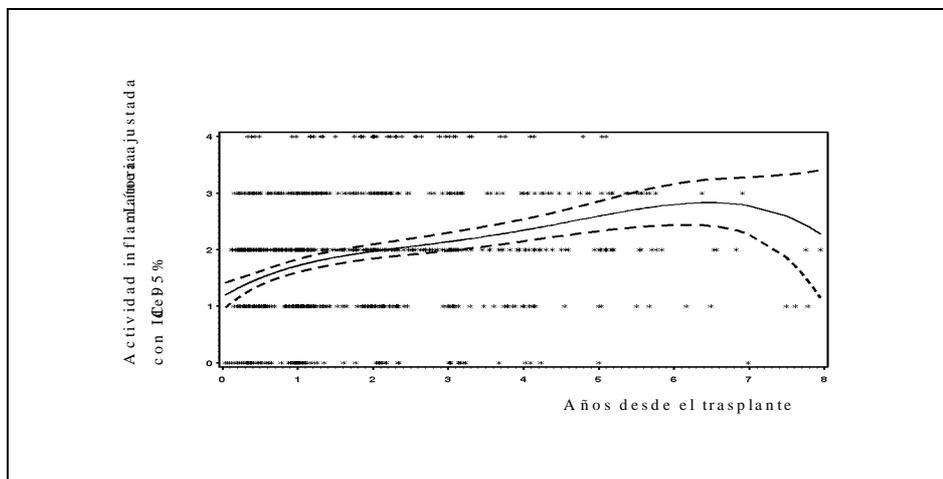
Tabla 12: Tasa de progresión del estadio de fibrosis por país antes y después del trasplante hepático.

Variable	Todos los pacientes (n= 284)	U.C.S.F.(n= 203)	La FE (n=81)	p
Tasa de progresión de fibrosis post-OLT (estadio/año): Mediana (rango); Media (95% IC)	0,3 (0,004-2.19) 0,49 (0,43-0.55)	0,28 (0,004-2,08) 0,45 (0,39-0,51)	0,48 (0,01-2,19) 0,59 (0,47-0,72)	0,09
Tasa de progresión de fibrosis pre-OLT (4/duración estimada de infección C): Mediana (rango); Media (95% IC)	0,2 (0,09-0.8) 0,23 (0,21-0,25)	0,2 (0,09-0,8) 0,23 (0,21-0,25)	0,2 (0,09-0,8) 0,25 (0,21-0,30)	0,9

IC=Intervalo de confianza, OLT=Trasplante hepático

El grado de actividad también aumentó con el tiempo desde el trasplante, obteniéndose una relación prácticamente lineal hasta el sexto año post-trasplante, perdiéndose la linealidad a partir de esa fecha.

Figura 19: Tasa de progresión del grado de actividad inflamatoria después del trasplante hepático



Estos datos sugieren que la progresión histológica, en particular la progresión del estadio de fibrosis es mayor en pacientes inmunodeprimidos que en pacientes inmunocompetentes.

A este ritmo de progresión, y utilizando un modelo matemático, estimamos que la mediana de tiempo desde el trasplante hasta el desarrollo de fibrosis 4 o cirrosis del injerto es de aproximadamente 10 años (9-12 años).

(2) A continuación, analizamos los mismos parámetros en el grupo de pacientes sometidos a trasplante hepático en la Universidad de California, San Francisco frente a aquellos intervenidos en el Hospital Universitario La Fe de Valencia, para comprobar si la historia natural de la hepatitis C post-trasplante difiere en estos dos centros. Pese a que tanto la tasa global de mortalidad a 5 años como aquella relacionada con el VHC fueron similares en ambos grupos (Figuras 20 y 21), la tasa de progresión post-trasplante del estadio de fibrosis fue superior en el grupo de pacientes Españoles que en el grupo de San Francisco {0,48 (0,01-2,19) frente a 0,28 (0,004-2,08);  $p=0,09$ } (Tabla 12).

Por tanto, el tiempo transcurrido entre el trasplante hasta el desarrollo de cirrosis fue significativamente menor en el grupo de la FE (Valencia) que en el grupo de UCSF (San Francisco) ( $p=0,09$ ), con una mediana de tiempo estimada hasta cirrosis del injerto de 7 (6,5-7,4) y 12,5 (11,2-14,4) años respectivamente.

Figura 20: Supervivencia del injerto en los dos centros (UCSF y la FE)

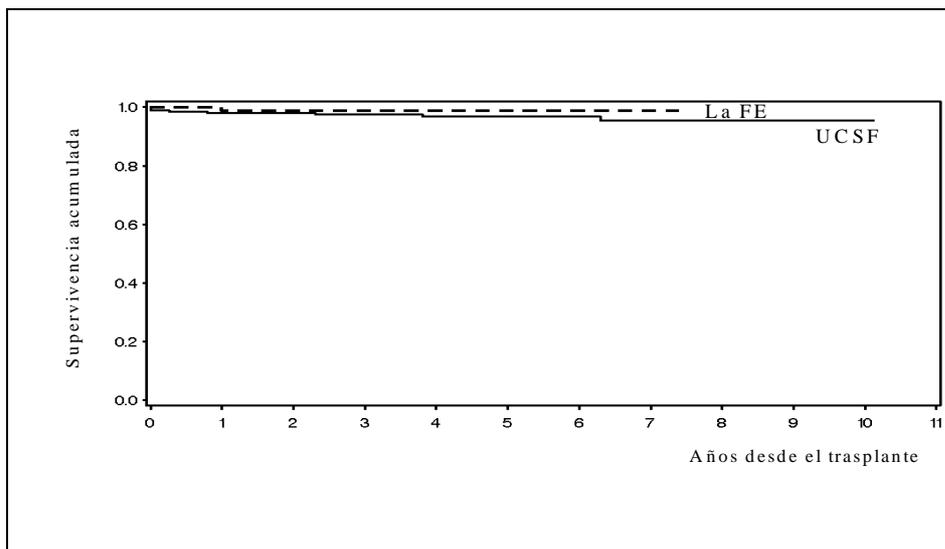
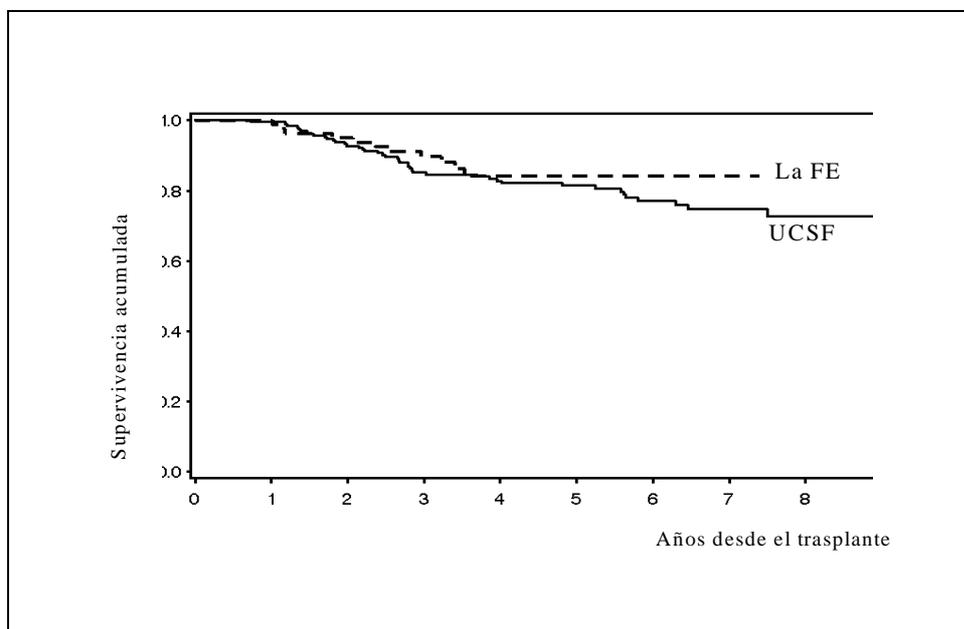


Figura 21: Supervivencia del paciente en los dos centros (UCSF y la FE)



(3) En contra de lo observado en el período post-trasplante, la tasa de progresión del estadio de fibrosis pre-trasplante no difirió entre el grupo de pacientes Españoles y el grupo de pacientes Norte-Americanos (Tabla 12), sugiriendo que la mayor agresividad de la historia natural de la hepatitis C recurrente observada en Valencia en comparación con la de San Francisco no se debe a diferencias intrínsecas del huésped o del virus sino a factores externos relacionados con el manejo del trasplantado o del órgano donante.

(4) El siguiente paso fue determinar las variables asociadas con la progresión de fibrosis post-trasplante. Las características de los dos grupos de pacientes incluidos están resumidas en la tabla 11. Los pacientes Españoles eran mayores en el momento del trasplante, estaban más frecuentemente infectados por el VHC genotipo 1b, y tenían una mayor prevalencia de carcinoma hepatocelular en el momento del trasplante que el grupo de pacientes de San Francisco. Estos por su parte, eran más heterogéneos en cuanto a raza, y tenían una función hepática más grave al trasplantarse. Tanto la inmunosupresión de inducción como la terapia de rescate fueron más agresivas en el grupo de San Francisco que en el Español.

En el análisis univariado, las variables asociadas con una mayor tasa de progresión del estadio de fibrosis incluyeron: (i) variables pre-trasplante tales como los niveles de ARN-VHC en el momento del trasplante, el centro trasplantador, y la raza; y (ii) variables post-trasplante tales como la fecha del trasplante, el número de episodios de rechazo y número de bolos de metilprednisolona durante el primer año post-trasplante, el uso de OKT3 y el tratamiento de inducción con micofenolato (Tabla 13, figuras 22-9).

Tabla 13: **Factores predictivos de progresión del estadio de fibrosis en análisis univariado y multivariado.**

Variable	p para todos los pacientes	p para los pacientes de U.C.S.F.	p para los pacientes de La FE
Niveles pre-trasplante de ARN-VHC*	0,003	0,04	0,3
Raza (Caucásica vs otras)*	0,04	0,004	NA
Año del trasplante*	<0,0001	<0,0001	0,005
Inducción con Micofenolato	0,05	0,01	NA
OKT 3	0,1	0,08	0,4
Número de rechazos	0,03	0,1	0,02
Número de bolos de metil-prednisolona*	0,03	0,2	0,05

NA= No aplicable, NS=no significativo

En el estudio multivariado, los niveles de ARN-VHC pre-trasplante ( $p=0,01$ ), la raza ( $p=0,02$ ), el año del trasplante ( $p=0,0001$ ) y el número de bolos metil-prednisolona ( $p=0,03$ ) se asociaron independientemente con la tasa de progresión post-trasplante del estadio de fibrosis.

Figura 22: **Tasa de progresión del estadio de fibrosis por niveles pre-trasplante de ARN-VHC**

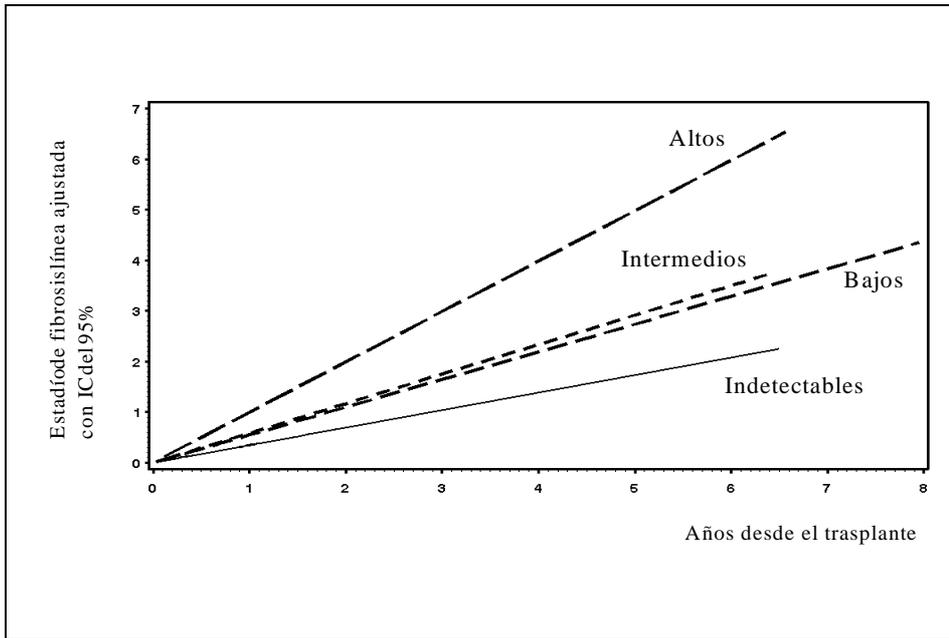


Figura 23: **Tasa de progresión del estadio de fibrosis según la raza.**

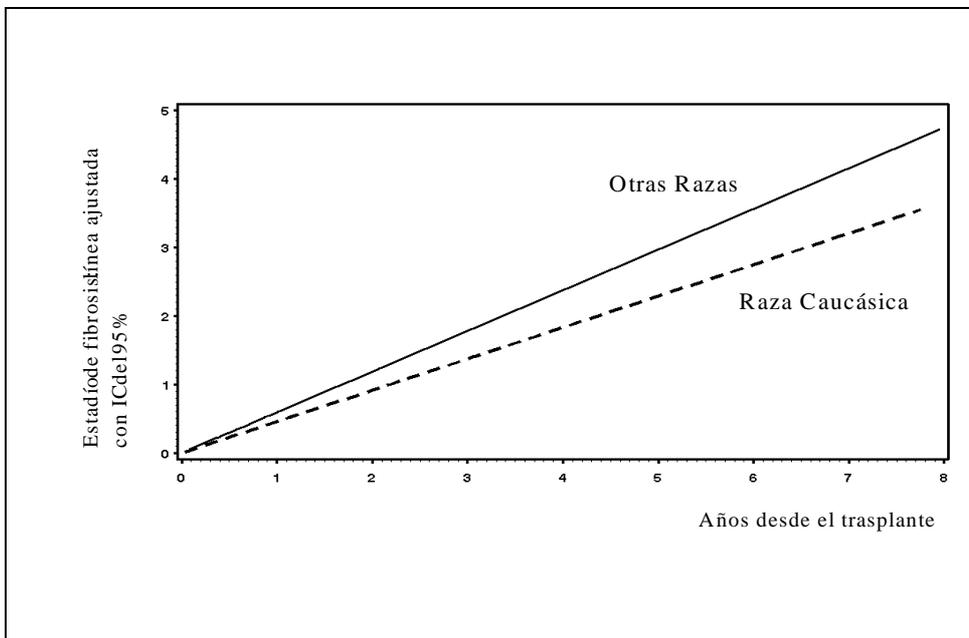


Figura 24: **Tasa de progresión del estadio de fibrosis según el número de episodios de rechazo.**

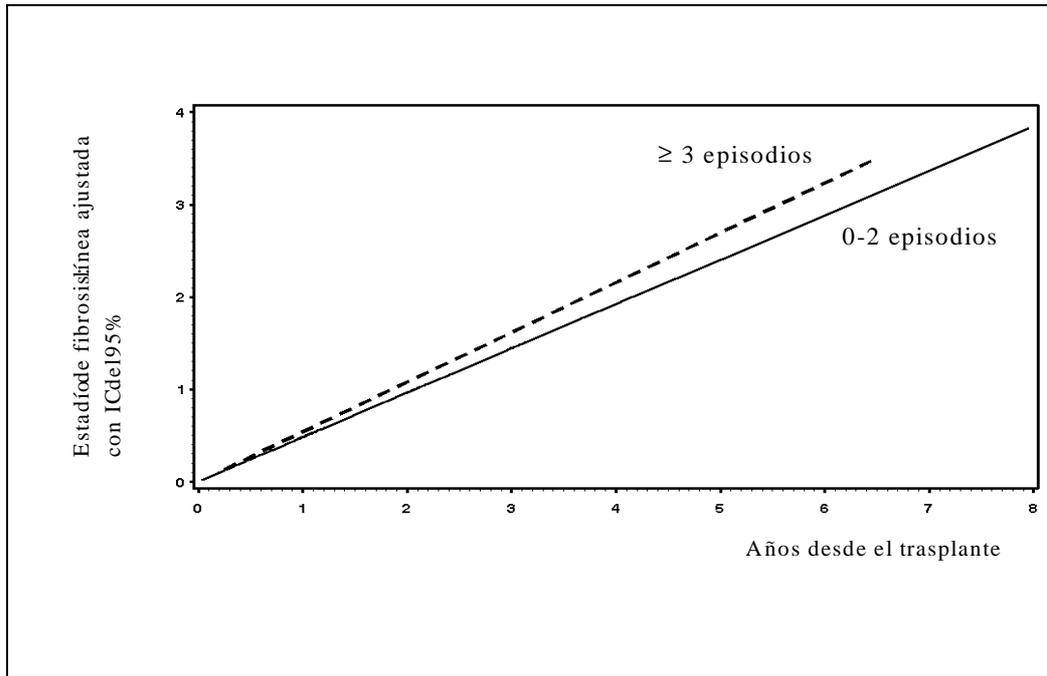


Figura 25: **Tasa de progresión del estadio de fibrosis según el número de bolos de metilprednisolona.**

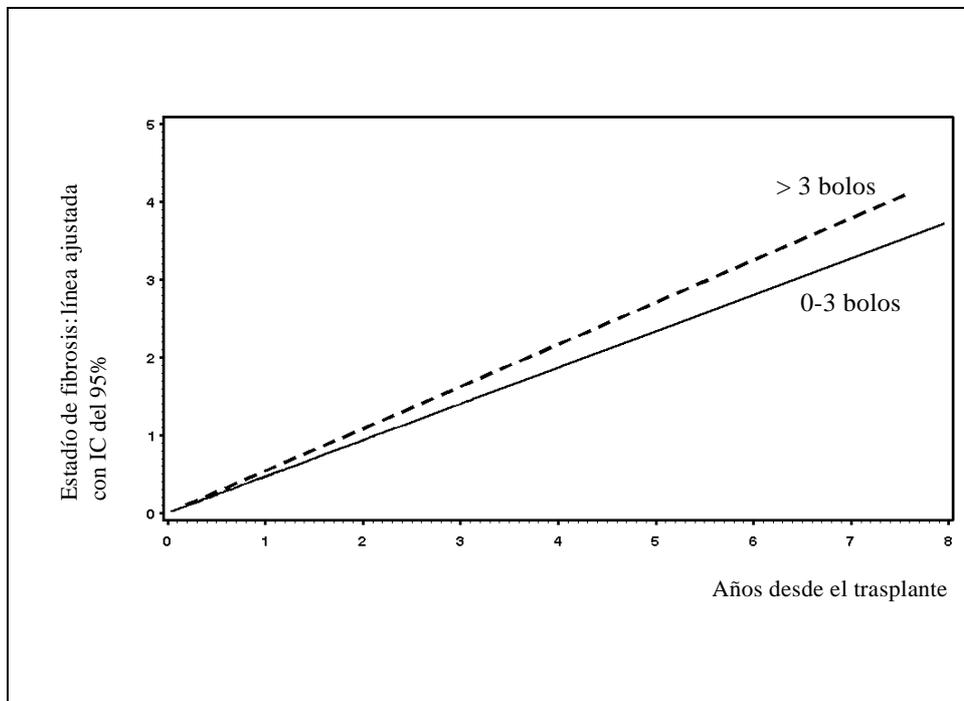


Figura 26: **Tasa de progresión del estadio de fibrosis por centro transplantador**

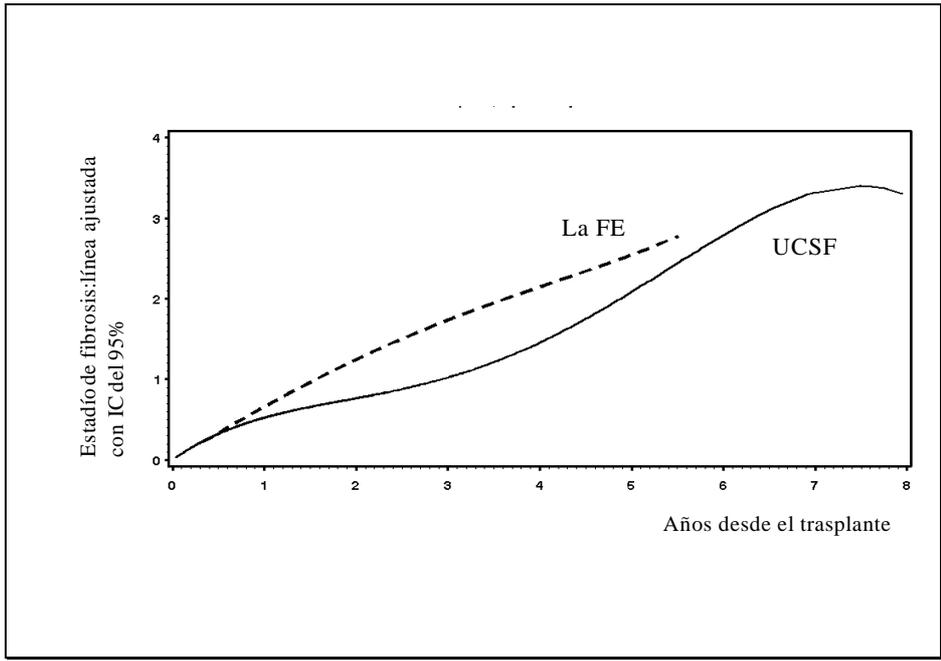


Figura 27: **Tasa de progresión del estadio de fibrosis por año de trasplante.**

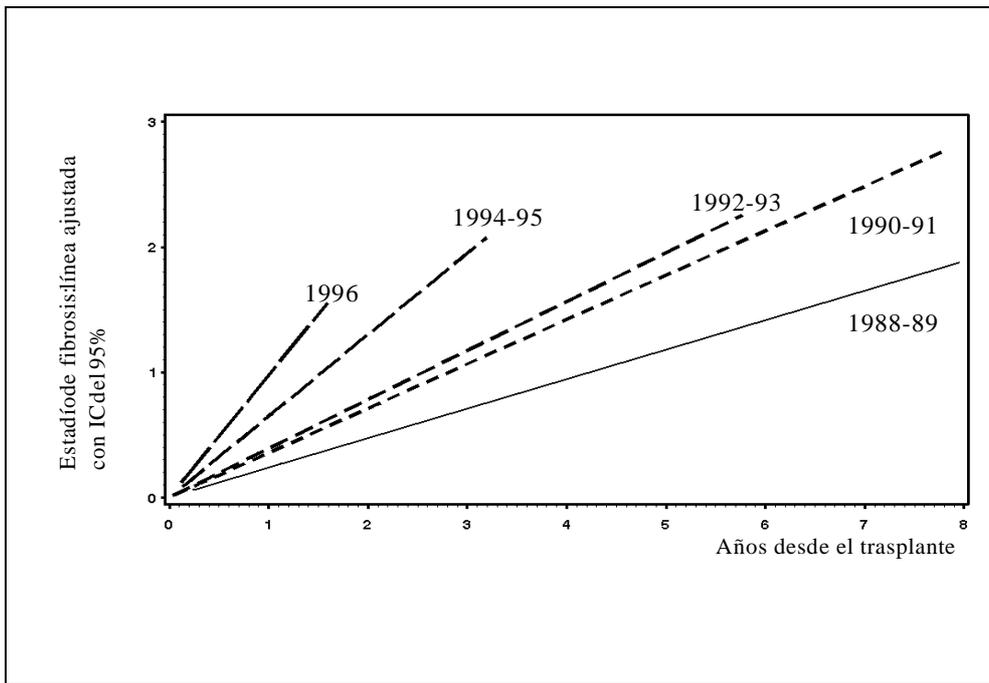


Figura 28: **Tasa de progresión del estadio de fibrosis según el uso de OKT3.**

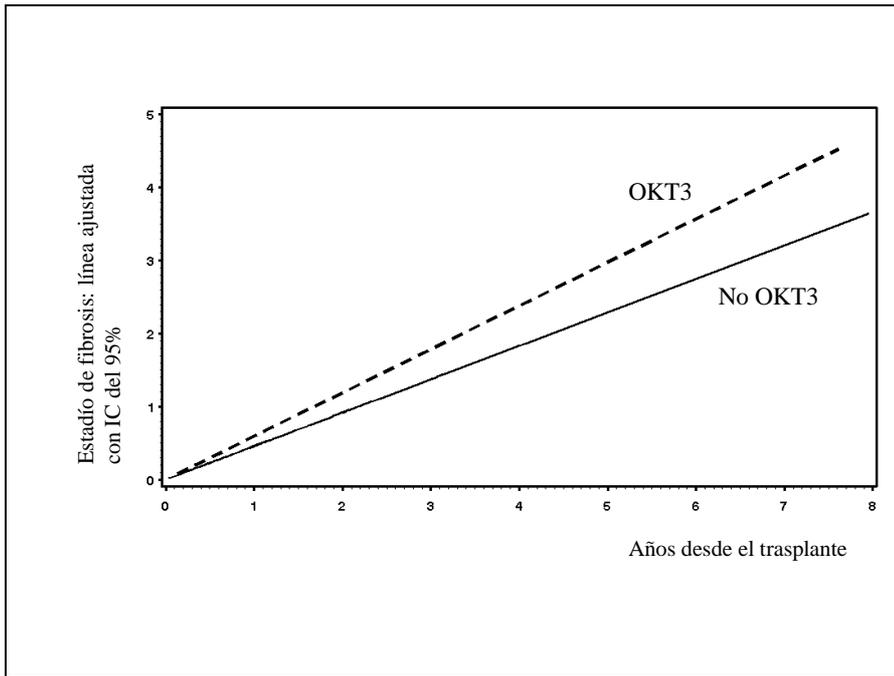
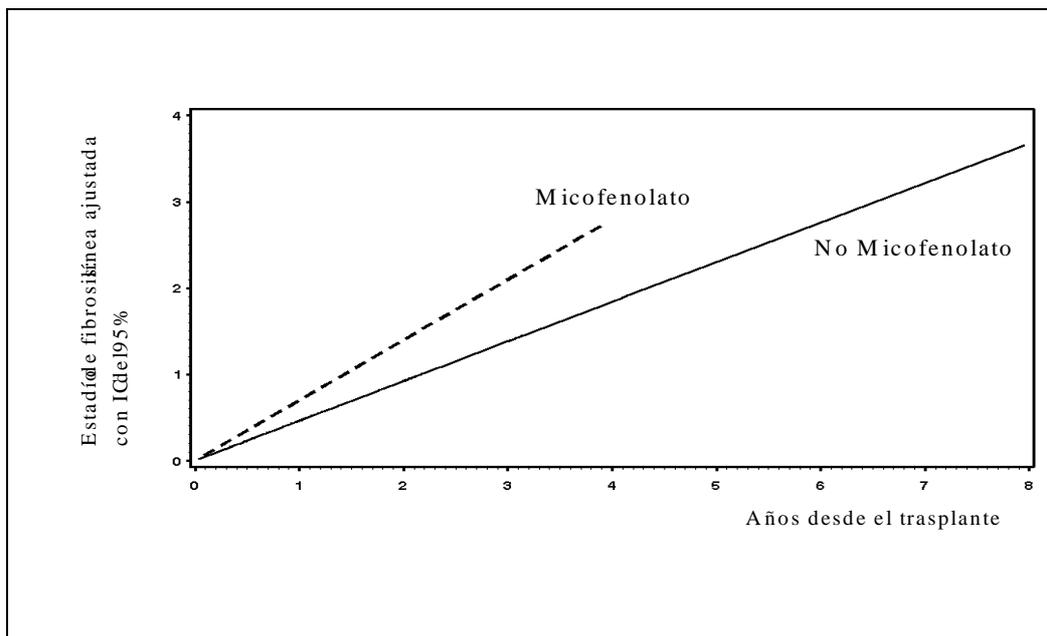


Figura 29: **Tasa de progresión del estadio de fibrosis según el uso de micofenolato.**



En el análisis multivariado, las variables independientemente asociadas con la tasa de progresión del estadio de fibrosis incluyeron: año del trasplante ( $p=0,0001$ ), raza ( $p=0,02$ ), número de bolos de metil-prednisolona ( $p=0,03$ ), y niveles pre-trasplante de

ARN-VHC en suero ( $p=0,01$ ) (Tabla 13); De tal forma que aquellos pacientes con una mayor tasa de progresión, y por tanto menor tiempo para desarrollar cirrosis, se caracterizaban por haber sido sometidos a trasplante más recientemente, no pertenecer a la raza caucásica, historia de tratamiento con un número elevado de bolos de metilprednisolona, y tener niveles elevados pre-trasplante de ARN-VHC (Tablas 13 y 14, Figuras 22, 23, 25, 27).

Tabla 14: Mediana estimada de tiempo para el desarrollo de cirrosis del injerto según los factores de riesgo.

Variable	No	Tasa de progresión post-trasplante del estadio de fibrosis (mediana, rango)	Mediana estimada de tiempo para el desarrollo de cirrosis del injerto (años)
<b>Año del trasplante</b>			
<b>1988-89</b>	23	0,13 (0,006-1,05)	*
<b>1990-91</b>	59	0,24 (0,004-1,80)	9,8-13
<b>1992-93</b>	80	0,30 (0,008-1,57)	6,8-7,5
<b>1994-95</b>	93	0,44 (0,03-2,15)	3,5-3,9
<b>1996</b>	29	0,64 (0,2-2,19)	1,62-1,64
<b>Niveles pre-OLT de ARN-VHC</b>			
<b>Indetectable</b>	84	0,26 (0,01-1,77)	7,7-8,5
<b>Baja viremia</b>	33	0,38 (0,04-2,09)	7,5-8,7
<b>Intermedia</b>	39	0,25 (0,01-2,19)	*
<b>Alta viremia</b>	39	0,65 (0,02-2,15)	5,9-6,1
<b>Raza</b>			
<b>Caucásica</b>	218	0,27 (0,004-2,19)	9,5-11,8
<b>No-caucásica</b>	66	0,44 (0,02-1,9)	9,1-9,9
<b>Número de rechazos</b>			
<b>≥ 3</b>	24	0,39 (0,01-1,80)	7,1-7,5
<b>&lt; 3</b>	257	0,29 (0,004-2,19)	9,8-12,1
<b>Bolos de Metilprednisolona</b>			
<b>Yes</b>	146	0,37 (0,004-2,19)	8,3-9,9
<b>No</b>	135	0,26 (0,009-2,08)	11,7-15,1
<b>OKT 3</b>			
<b>Sí</b>	50	0,45 (0,004-2,15)	10,2-14,1
<b>No</b>	231	0,27 (0,008-2,19)	9,3-10,8
<b>Inducción con Micofenolato</b>			
<b>Sí</b>	38	0,42 (0,02-1,9)	4,0-4,3
<b>No</b>	243	0,29 (0,004-2,19)	9,7-11,9

\* Imposible de estimar la mediana de tiempo para el desarrollo de cirrosis del injerto por el escaso número de eventos.

Uno de los hallazgos más significativos del estudio fue la observación de un empeoramiento progresivo en la evolución histológica de la hepatitis C post-trasplante con los años, de tal forma que aquellos pacientes trasplantados a partir de 1994 tenían una mediana de progresión de fibrosis hepática de 0,64 frente a una mediana de 0,13 en aquellos trasplantados en 1988-89, lo cual se traduce en un menor tiempo para el desarrollo de cirrosis del injerto en los últimos años (Tabla 14 y figura 27 ). Teniendo en cuenta que los niveles de viremia pre-trasplante y la distribución de razas no han variado con el tiempo (datos no mostrados), estos hallazgos sugieren que con los años se han producido cierto tipo de cambios en el manejo del paciente responsables de la mayor progresión del estadio de fibrosis observado recientemente. En un intento de verificar esta hipótesis, analizamos el cambio en tratamiento inmunosupresor con el tiempo. Pese a observarse una disminución en el uso de OKT3 y bolos de metilprednisolona con el tiempo, el uso de nuevos y más potentes fármacos inmunosupresores, tales como micofenolato han aumentado con el tiempo (Tabla 15 ).

Tabla 15: Cambios en inmunosupresión con el tiempo.

Variable Pacientes (n=284)	1988- 89	1990- 91	1992- 93	1994- 95	1996	P
<b>OKT3</b>	39 %	28 %	15 %	13 %	4 %	0,001
<b># bolos de MP &gt;3</b>	30 %	22 %	21 %	13 %	11 %	0,02
<b>Inducción con micofenolato*</b>	0	0	6 %	13 %	75 %	0,001
<b>Inducción con azatioprina*</b>	96 %	84 %	91 %	84 %	25 %	0,001
<b>Inducción con tacrolimus*</b>	0	16 %	4 %	7 %	4 %	0,4
<b>Inducción con ciclosporina*</b>	100 %	84 %	96 %	93 %	96 %	0,4
<b># rechazos &gt; 2*</b>	13 %	16 %	6 %	5 %	7 %	0,06

**UCSF (n=203)**

<b>OKT3 (%)</b>	39 %	30 %	17 %	19 %	5 %	0,002
<b># MP boluses &gt;3</b>	30 %	22 %	19 %	19 %	14 %	0,18
<b>Inducción con micofenolato</b>	0	0	9 %	28 %	95 %	0,001
<b>Inducción con azatioprina</b>	96 %	83 %	88 %	65 %	5 %	0,001
<b>Inducción con tacrolimus</b>	0	17 %	5 %	13 %	5 %	0,96
<b>Inducción con ciclosporina</b>	100%	83 %	95 %	86 %	95 %	0,96
<b># Rechazos &gt; 2</b>	13 %	17 %	9 %	12 %	9 %	0,4

**La FE (n=81)**

<b>OKT3 (%)</b>	NA	0	9 %	8%	0	0,9
<b># Bolos de MP &gt; 3</b>	NA	25 %	27 %	8%	0	0,02

MP=Metil-prednisolona

\* Los pacientes de La FE fueron tratados durante el primer año de todo el período de estudio con triple terapia ciclosporina-azatioprina-prednisona. Ninguno de estos pacientes experimentó más de dos episodios de rechazo.

Estos cambios en el tratamiento inmunosupresor son probablemente responsables del aumento en la tasa de progresión del estadio de fibrosis observado en los últimos años. El escaso número de pacientes tratados con nuevos fármacos inmunosupresores, la no evaluación de los niveles de ciclosporina o tacrolimus, y el hecho de determinar solamente la inmunosupresión del primer año constituyen desafortunadamente factores que han dificultado un análisis más detallado del efecto de la inmunosupresión sobre la historia natural de la hepatitis C recurrente. Son necesarios por tanto estudios con un mayor

número de pacientes tratados con nuevos inmunosupresores para poder responder adecuadamente a esta pregunta.

Los hallazgos más significativos de este estudio pueden resumirse, por tanto, en: (i) la tasa de progresión del estadio de fibrosis post-trasplante aumenta linealmente con el tiempo, observándose una tasa de progresión mayor después que antes del trasplante; (ii) La tasa de progresión pre-trasplante del estadio de fibrosis es similar en los pacientes Españoles y Norte-Americanos, y similar a la descrita previamente por Poynard y cols. en pacientes con hepatitis crónica C [86]; (iii) La mediana estimada de tiempo hasta el desarrollo de cirrosis del injerto varía entre 9 y 12 años; (iv) La tasa de progresión post-trasplante del estadio de fibrosis hepática es mayor en el Hospital La FE de Valencia que en la University of California, San Francisco. Esta tasa parece acercarse entre ambos centros en los últimos años, desde la introducción de nuevos fármacos inmunosupresores; (v) Las variables asociadas independientemente con una mayor tasa de progresión de fibrosis incluyen el año del trasplante, la raza, el número de bolos de metilprednisolona y la carga vírica pre-trasplante.

Este estudio es el primero en evaluar la historia natural de la hepatitis C recurrente a largo plazo utilizando un modelo matemático basado en el análisis de un gran número de biopsias de protocolo post-trasplante. Igualmente, es el primer estudio que compara directamente la historia natural de la hepatitis C en pacientes inmunocompetentes y pacientes inmunodeprimidos al utilizar a cada paciente como su propio control. Nuestros hallazgos (i) confirman los resultados de previos estudios no controlados que sugerían un efecto deletéreo de la inmunosupresión sobre la progresión de la enfermedad hepática por el VHC [126, 127]; y (ii) permiten explicar las discrepancias observadas en previos estudios sobre la historia natural de la hepatitis C post-trasplante, en particular el escaso efecto descrito de la infección por el VHC sobre la morbi-mortalidad del trasplantado [11-15]. En efecto, estos estudios se han caracterizado por (1) incluir períodos de seguimiento no superiores a una década, en general de 5-7 años; y (2) no realizar biopsias de protocolo en todos los pacientes; e (3) incluir pacientes con diferentes regímenes inmunosupresores. Todos estos factores muy probablemente expliquen las discrepancias entre estudios previos, y sugieren que en los próximos años, asistiremos a un aumento progresivo en la incidencia de cirrosis del injerto por el VHC. Con estas premisas y teniendo en cuenta la falta de órganos donantes, el gran problema que van a encontrarse los cirujanos y

hepatólogos es la de decidir la inclusión o no de esta nueva etiología como indicación rutinaria de trasplante.

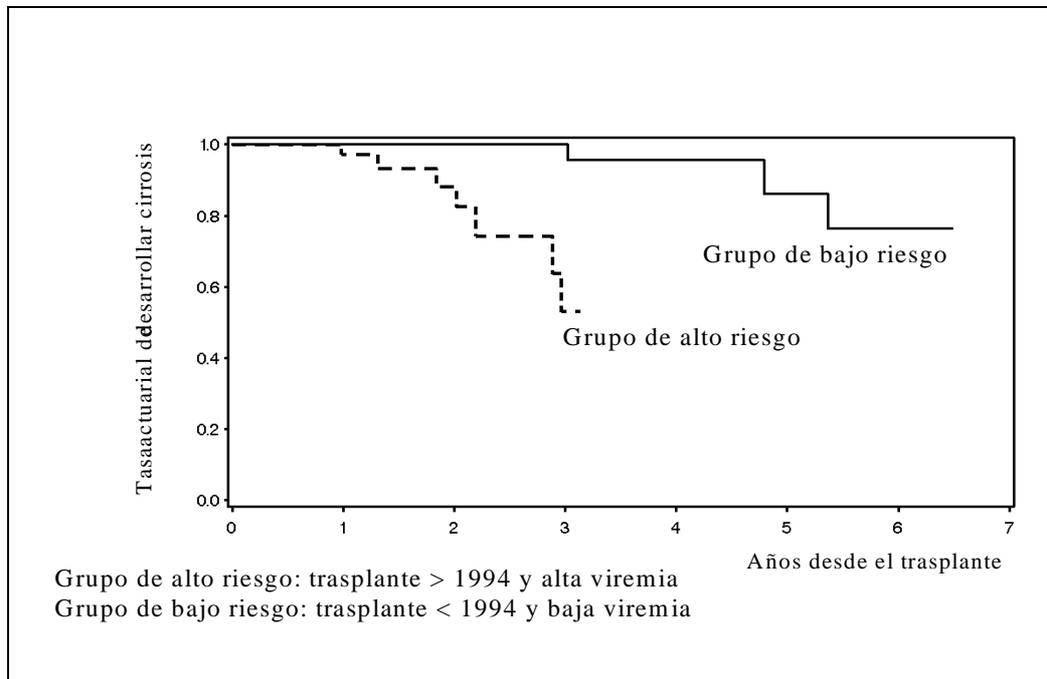
No todos los enfermos, sin embargo, se caracterizan por una progresión del estadio de fibrosis con el tiempo. En efecto, aunque la tasa de progresión del estadio de fibrosis se representó como una línea ascendente con el tiempo, estos cambios no siguieron una distribución normal, existiendo pacientes con una progresión acelerada y otros con prácticamente escasos o nulos cambios tras varios años de seguimiento. Aún desconocemos si estos pacientes desarrollarán eventualmente lesiones histológicas más graves. Esto es sin embargo poco esperable ya que estos pacientes representan muy probablemente un grupo de pacientes catalogados como “slow fibrosers”, una terminología utilizada previamente por Poynard y cols., para definir aquellos pacientes sin factores de riesgo de progresión [86]. En este sentido, nosotros también definimos un subgrupo de pacientes con una tasa lenta de progresión frente a otros subgrupo con una tasa rápida de progresión; de tal forma que aquellos sometidos a trasplante después de 1994 y con alta carga viral pre-trasplante se caracterizaban por tener una elevada probabilidad de desarrollar una cirrosis del injerto en menos de 4 años, mientras que aquellos pacientes trasplantados antes de 1994 y baja carga viral tenían pocas probabilidades de desarrollar una cirrosis del injerto en menos de 8 años (tabla 16, Figura 30).

Tabla 16: Mediana estimada de tiempo para el desarrollo de cirrosis del injerto por factores de riesgo agrupados.

Riesgo	Pacientes agrupados por factores de riesgo	Mediana de tiempo hasta fibrosis= 4
<b>Elevado (1)</b>	Cohorte 1994-96, Niveles de viremia intermedios o altos	3,1-3,3
<b>Bajo (1)</b>	Cohorte 1988-93, Niveles de viremia indetectables o bajos	7,3-8,1
<b>Elevado (2)</b>	Cohorte 1994-96, > 3 bolos de metilprednisolona	3,4-3,6
<b>Bajo (2)</b>	Cohorte 1988-93, Número de bolos de metilprednisolona 0-3	10,7-14,2

Indetectable= debajo del límite de detección del b-DNA (0,2 Meq/ml) o del Amplicor (1000 copias/ml); Baja viremia= 0,2-0,5 Meq/ml o 1000-54000 copias/ml, respectivamente; Viremia intermedia= 0,5- 1,7 Meq/ml o 54000- 243589 copias/ml); Alta viremia: > 1,7 Meq/ml o 243589 copias/ml.

Figura 30: **Probabilidad acumulada de desarrollar cirrosis por el VHC del injerto según el año del trasplante y los niveles pre-trasplante de viremia.**



#### **4. Histología:**

La hepatitis aguda C del injerto suele hacer su aparición a partir de la 3ª semana posttrasplante, cursando por lo común de forma asintomática. Por lo general, se pone de manifiesto por disfunción del injerto, al igual que sucede con el rechazo agudo celular. El examen histológico de la biopsia hepática es pues, esencial para confirmar el diagnóstico, si bien la distinción histológica entre hepatitis y rechazo, a menudo, resulta difícil por la superposición de hallazgos histológicos. El examen histológico de la biopsia hepática [5] puede revelar:

##### **4.1 Hallazgos típicos:**

La lesión inicial consiste en la necrosis hepatocitaria. Al cabo de 2-4 semanas, ésta se asocia a infiltrado mononuclear del espacio porta y del parénquima. No es infrecuente encontrar balonización perivenular de los hepatocitos, esteatosis y agregados linfoides. Las lesiones de los ductulos/ductos suelen ser poco intensas y consisten típicamente en un infiltrado periductular linfocitario con infiltración ocasional de la pared ductal.

##### **4.2 Hallazgos atípicos:**

Incluyen 1) extensa balonización de los hepatocitos o necrosis acidófila con escasa inflamación, simulando un cuadro de isquemia; 2) Lesión ductal/ductular severa con infiltrado mixto del espacio porta, simulando un rechazo agudo; 3) proliferación ductular marcada en los espacios porta simulando un cuadro de obstrucción biliar. En estos casos, la realización de otras pruebas diagnósticas (colangiografía, ecografía doppler, arteriografía), y/o la realización de biopsias seriadas facilitan el diagnóstico. Pese a todo, y ante la duda diagnóstica, fundamentalmente entre rechazo y hepatitis C del injerto, ha sido bastante frecuente el iniciar tratamiento anti-rechazo y valorar la respuesta, “decisión” que hoy en día se cuestiona por sus posibles consecuencias desfavorables a largo plazo. En caso de existir datos que apoyen la presencia de ambas entidades, es lícito intentar un tratamiento anti-rechazo. En estos casos, la biopsia de control post-tratamiento puede ayudar en el diagnóstico. Algunos autores sugieren que la cuantificación seriada del ARN-VHC puede ser de utilidad, al existir una correlación entre hepatitis aguda C y pico de viremia [129].

##### **4.3 Hepatitis colestásica:**

Una minoría de pacientes (<10%) desarrolla una forma agresiva y acelerada de hepatitis que ocasiona el fallo del injerto dentro del primer año [17] . Se caracteriza fundamentalmente por una colestasis progresiva, siendo la hiperbilirrubinemia el único indicador fiable de un pronóstico desfavorable. Aunque los signos histológicos iniciales no se diferencian del resto de pacientes con hepatitis postrasplante, la histología del injerto muestra signos de cirrosis o de necrosis hepatocitaria confluyente, con escaso infiltrado inflamatorio, y colestasis severa. El lapso de tiempo existente entre el trasplante y el inicio del cuadro colestásico es de aproximadamente 10 meses, y entre éste y la necesidad de retrasplante unos 4 meses. Los resultados del retrasplante han sido hasta el momento extremadamente malos, probablemente en relación con la tardanza en decidir el retrasplante, siendo la causa más frecuente de muerte, el desarrollo de un cuadro séptico, fundamentalmente en presencia de insuficiencia renal. Se han descrito tasas de recidiva de la hepatitis C tras el retrasplante similares a las observadas con el primer injerto [130].

## 5. **Factores asociados con el desarrollo de la hepatitis C del injerto:**

Los factores que predisponen a una evolución desfavorable no están definidos pero probablemente estén relacionados con i) las características intrínsecas de la cepa vírica infectante, ii) las características genéticas del trasplantado, e iii) influencias externas del entorno y/o iatrogénicas.

### **5.1 Factores víricos:**

Los factores dependientes del virus pueden ser importantes en la patogénesis de la lesión hepática bien directamente a través del daño celular relacionado con el acúmulo de viriones o proteínas víricas, bien indirectamente a través de la respuesta inmune variable asociada con una u otra cepa.

#### 1- Genotipo viral:

Existen controversias respecto al papel que desempeña el genotipo en la evolución de la hepatitis C post-trasplante. Aunque algunos autores, fundamentalmente Europeos, han descrito la asociación entre la infección por el genotipo 1b y el desarrollo de hepatitis agresiva [11, 15, 131], con independencia de la duración de la infección C postrasplante, otros autores no han obtenido los mismos resultados [13, 16, 132, 133]. Diversas causas

contribuyen probablemente a las discrepancias: (i) distribución variable de los genotipos según la localización donde se haya realizado el estudio; (ii) métodos de genotipaje, (iii) tipo y cantidad de inmunosupresión utilizada; (iv) tiempo de seguimiento; y (v) métodos y definición de la gravedad de la enfermedad. **En el estudio comparativo España-Estados Unidos con más de 200 pacientes incluidos, el genotipo no constituyó un factor predictivo de la tasa de progresión del estadio de fibrosis tras el trasplante hepático [16].**

## 2- Viremia:

Los niveles de ARN-VHC aumentan unas 10-20 veces respecto a los niveles pre-trasplante a partir de las 72 horas tras el trasplante [19, 114, 123, 124], con una correlación positiva entre los niveles pre y post-trasplante [123]. La mayoría de estudios que han valorado la relación entre la gravedad de la hepatitis C post-trasplante y la carga viral, no han encontrado una asociación entre estas dos variables [123, 124], sugiriendo que el mecanismo patogénico de lesión celular no es por vía citopática directa sino a través de la respuesta inmune del huésped. En general, sin embargo, los estudios se han realizado de forma transversal cuantificándose la carga viral en tiempos distintos del seguimiento y solamente en suero. En el único estudio donde se midieron longitudinalmente los niveles intra-hepáticos de ARN-VHC, los autores detectaron niveles elevados coincidiendo con el desarrollo de la hepatitis aguda con una posterior disminución coincidiendo con el paso a formas crónicas y de forma paralela a la disminución de la inmunosupresión [134]. Esta disminución fue más marcada en los pacientes infectados por el genotipo 1b. Estos datos podrían explicar la mayor gravedad de la hepatitis C recurrente en pacientes infectados por el VHC genotipo 1b. El sistema inmune del huésped sería capaz de controlar la replicación intrahepática del VHC a medida que disminuye la inmunosupresión, pero a costa de provocar daño hepático, siendo este proceso mayor en los pacientes infectados por el genotipo 1b.

En algunos casos de evolución desfavorable con desarrollo de hepatitis colestásica y fallo del injerto, los niveles de ARN-VHC aumentan progresivamente [135], por lo que se ha sugerido que en estos casos, y dada la ausencia de infiltrado inflamatorio hepático, la lesión histológica se produce fundamentalmente por vía citopática directa.

Recientemente se ha descrito una asociación entre niveles elevados de ARN-VHC pre-trasplante y peor evolución de los trasplantados por cirrosis VHC [13, 16]. En concreto, en el estudio multicéntrico Norte-Americano [13], la supervivencia a 5 años de los pacientes con niveles pre-trasplante de ARN-VHC  $\geq 1 \times 10^6$  vEq/mL fue significativamente peor que la de los

pacientes con niveles  $< 1 \times 10^6$  vEq/mL ( 57% vs 84%, respectivamente;  $p=0,0001$ ). **Igualmente, en el estudio comparativo España-Estados Unidos [16], la carga vírica pre-trasplante constituyó una de las variables independientes predictivas de mayor tasa de progresión del estadio de fibrosis post-trasplante (figura 22).**

### 3- Diversidad del VHC:

Varios estudios, fundamentalmente en inmunocompetentes han analizado el papel de la diversidad del VHC en la gravedad de la hepatopatía con resultados no siempre homogéneos [136]. Diversas causas contribuyen probablemente a las discrepancias entre estudios tanto en pacientes inmunocompetentes como en inmunodeprimidos en relación a la diversidad viral: (1) número escaso de pacientes, (2) diferencias en los métodos utilizados para evaluar la heterogeneidad del VHC (polimorfismos de conformación de la cadena sencilla, técnica de movilidad del heteroduplex, secuenciación), (3) diferencias en el objetivo evaluado (complejidad viral o número de variantes, diversidad viral o diferencia cualitativa entre variantes, o divergencia viral con el tiempo), (4) región del genoma analizada, y (5) diferencias en la definición de hepatitis grave/leve.

Los estudios que se han centrado en trasplantados hepáticos [137-140] han incluido en general un número reducido de pacientes y diversos métodos de análisis de la diversidad viral. En uno de éstos [137], la complejidad de la región hipervariable del VHC se analizó mediante la detección de polimorfismos de conformación de la cadena sencilla en 3 trasplantados hepáticos. El número de bandas o complejidad vírica disminuyó durante los 3 primeros meses post-trasplante para retornar posteriormente a la situación basal pre-trasplante, lo cual sugiere que la escasa presión inmunológica ejercida durante el período inicial post-trasplante condiciona una población VHC homogénea que varía con el tiempo. En otro estudio [138] de 5 trasplantados donde la diversidad del VHC se analizó mediante la nueva técnica de movilidad del heteroduplex, se constató que en los 3 pacientes con hepatitis grave del injerto, las variantes predominantes se propagaron de forma muy eficiente tras el trasplante, mientras que en los 2 pacientes con formas leves, las variantes menores pasaron a ser las predominantes tras el trasplante.

**En un estudio reciente en el que participó la doctoranda, [140], se comparó tanto la complejidad como la diversidad viral de un grupo de pacientes trasplantados con hepatitis C recurrente grave del injerto con la de un grupo de pacientes con hepatitis C leve del**

**injerto {HCV quasispecies evolution: a mechanism of severe posttransplantation recurrence}.**

## HCV QUASISPECIES EVOLUTION: A MECHANISM OF SEVERE POSTTRANSPLANTATION RECURRENCE (Referencia # 140):

En este estudio, se analizaron tanto la complejidad como la diversidad genética del virus en 6 pacientes con hepatitis C grave del injerto de tipo colestásica, en 6 pacientes con ausencia o mínima lesión histológica del injerto, y en 5 pacientes controles inmunocompetentes con hepatitis crónica por el VHC no tratados previamente con interferón. En la tabla 17 se resumen las características de estos pacientes.

Tabla 17: Características básicas de los tres grupos de pacientes incluidos

Pacientes	Controles (N=5)	Recidiva leve (N=6)	Recidiva Grave (N=6)
<b>Genotipo VHC</b>	2a,1a/1b, 1a,1a,ND	1a, 1a, 1 1b,1b, 1b	1a,1a, 1a 1b,1b, 1b
<b>Histología</b>	No aplicable		
Seguimiento precoz:			
Grado de actividad		1 (0-1)	1 (0-2)
Estadío de fibrosis*		0	0 (0-1)
Seguimiento tardío			
Grado de actividad	2 (0-2)	1 (1-2)	3 (0-4)
Estadío de fibrosis	1 (1-3)	0	1 (0-3)
<b>ARN VHC (MEq/mL)</b>			
Inicial/Pre-trasplante	8,6 (8,4 – 27,3) <sup>1</sup>	0,76 (0,2-2,9) <sup>2</sup>	0,53 (0,2-9,1) <sup>1,2</sup>
Post-trasplante precoz	No aplicable	3,5 (0,4-3,7) <sup>3</sup>	24,8 (3,9-1446,3) <sup>3</sup>
Post-trasplante tardío	6,5 (0,2-12,7) <sup>4</sup>	14,3 (0,2-41,0) <sup>5</sup>	11,9 (0,2-12,7) <sup>4,5</sup>
<b>Bioquímica hepática</b>			
Inicial/Pre-trasplante			
Bilirrubina sérica (mg/dL)	0,7 (0,6-1,0)	2,0 (0,8-2,6)	3,2 (1,3-31,5)
ALT sérica (IU/L)	64 (54-92)	156 (31-257)	72 (21-300)
Post-trasplante tardío			
Bilirrubina sérica (mg/dL)			
ALT sérica (IU/L)	0,5 (0,4-0,7) 79 (76-83)	0,9 (0,5-1,6) 78 (41-244)	3,4 (1,1-13,3) 126 (61-276)

**Abreviaturas:** ND = no disponible; Todos los valores se presentan como medianas con rango.

\* Los hallazgos histológicos se basaron en la biopsia hepática obtenida lo mas cerca posible al tiempo del seguimiento utilizado para evaluar la diversidad del VHC. En los pacientes con recidiva grave de la hepatitis C, la evolución histológica posterior fue hacia el empeoramiento con desarrollo de signos compatibles con hepatitis colestásica fibrosante.

<sup>1</sup> p=0,07; <sup>2</sup> p=0,927; <sup>3</sup> p=0,01; <sup>4</sup> p=0,713; <sup>5</sup> p=0,296

**El método utilizado para valorar tanto la complejidad como la diversidad fue la técnica de movilidad del heteroduplex (HMA, del inglés “Heteroduplex Mobility Assay”) Utilizando este método, las variantes víricas con cambios en la secuencia de nucleótidos de la región analizada migran en el gel como heteroduplex a diferente distancia de una sonda de referencia que representa una de las variantes elegidas al azar en cada paciente (homoduplex). Teóricamente, a mayor distancia en relación al homoduplex, más distintas son las variantes, y por tanto mayor es la diversidad del virus [139, 140, 141]. Se estudió la región hipervariable 1 (HVR1) del VHC. Se analizaron por la técnica de movilidad del heteroduplex de 10 a 20 clones por muestra en cada tiempo (total de 540).**

**La heterogeneidad vírica se evaluó en tres tiempos en los pacientes trasplantados {pre-trasplante, post-trasplante inmediato, y post-trasplante tardío (en caso de tratamiento antivírico en los pacientes con hepatitis grave, se eligió la muestra más cercana al inicio del tratamiento)} y en dos tiempos en los pacientes controles.**

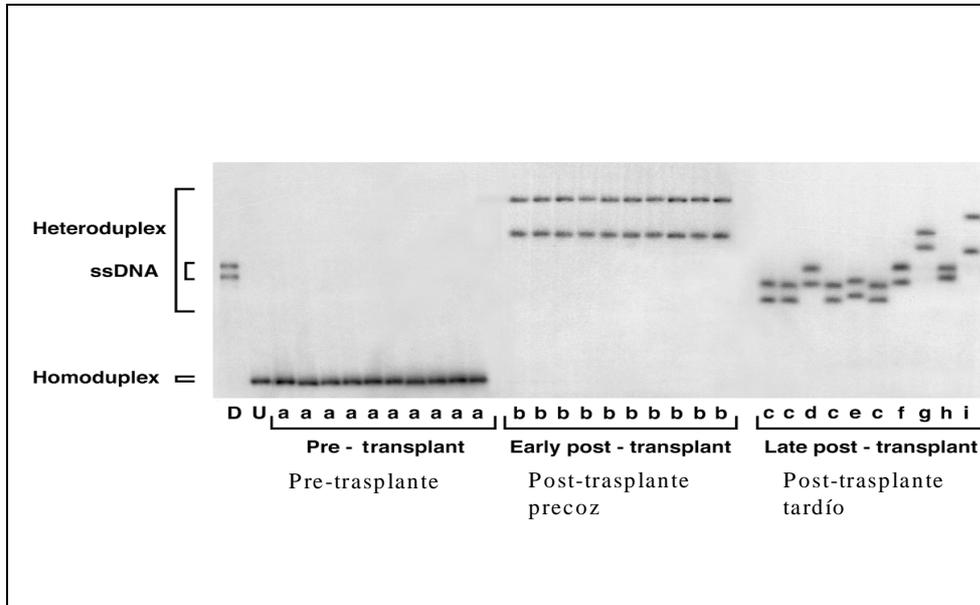
**Además, se secuenciaron un total de 294 clones para (i) validar la técnica de movilidad del heteroduplex, y (ii) construir árboles filogenéticos con el objetivo de confirmar los cambios en la filogenia de las variantes.**

**Las figuras 31 a 33 representan tres casos típicos: la primera de un paciente con hepatitis colestásica del injerto, la segunda de un paciente con hepatitis leve, y la tercera de un control con hepatitis crónica C no trasplantado. En estas figuras, se muestra el gel obtenido tras realizar el análisis de movilidad de heteroduplex de 20-30 clones en 3 tiempos de seguimiento para cada paciente.**

**En el eje de las abscisas, cada clon único es etiquetado con una letra distinta del alfabeto. Cuando la sonda se une a un clon homólogo, su migración en el gel es máxima,**

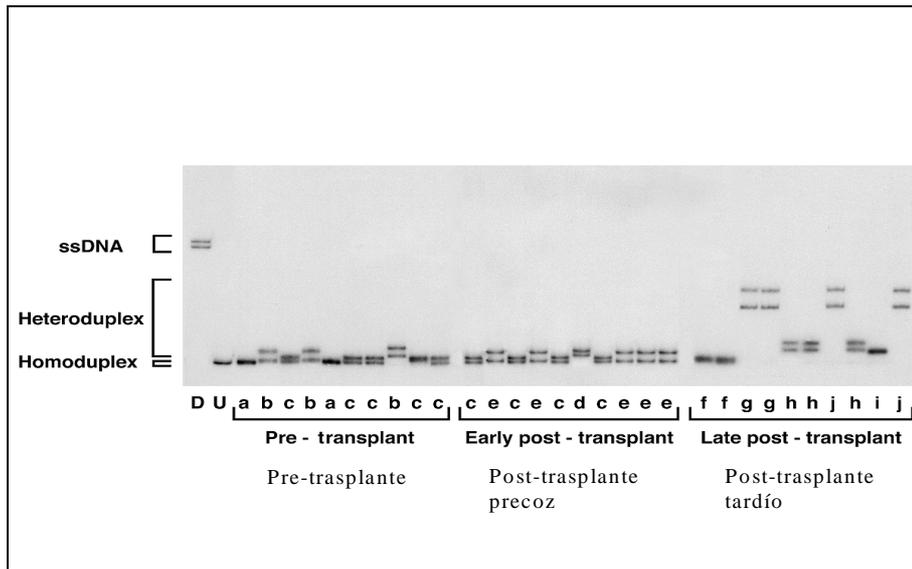
denominándose homoduplex. Por contra, cuando la sonda se une a un clon diferente a esta, su migración en el gel es menor, denominándose heteroduplex.

Figura 31: Ejemplo de un gel de HMA correspondiente a un paciente con hepatitis colestásica.



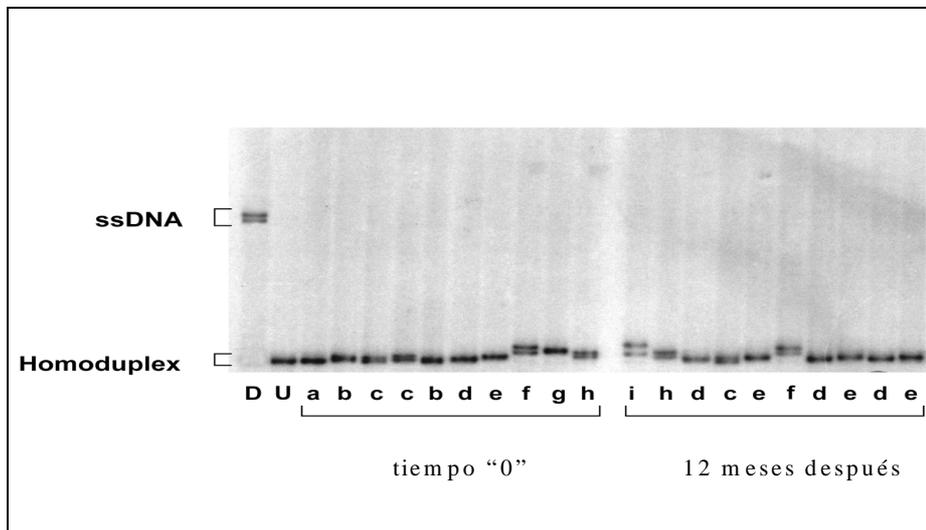
En la muestra obtenida antes del trasplante, solamente se identificó una variante. En el post-trasplante precoz, las variantes del pretrasplante habían desaparecido siendo remplazadas por nuevas especies. En el post-trasplante tardío, se produjo un nuevo cambio en el perfil del gel, observándose 6 nuevas variantes que no estaban presentes ni en el pretrasplante ni en el post-trasplante precoz.

Figura 32: Ejemplo de un gel de HMA correspondiente a un paciente con hepatitis mínima.



En la muestra del pre-trasplante, se observaron 3 variantes. En el post-trasplante precoz, aparecieron 2 nuevas variantes, las cuales representaron un 60% de los clones evaluados, pero siguieron persistiendo variantes del pre-trasplante. En el post-trasplante tardío, no se detectó ninguna de las variantes del pre-trasplante.

Figura 33: Típico gel de HMA correspondiente a un paciente control

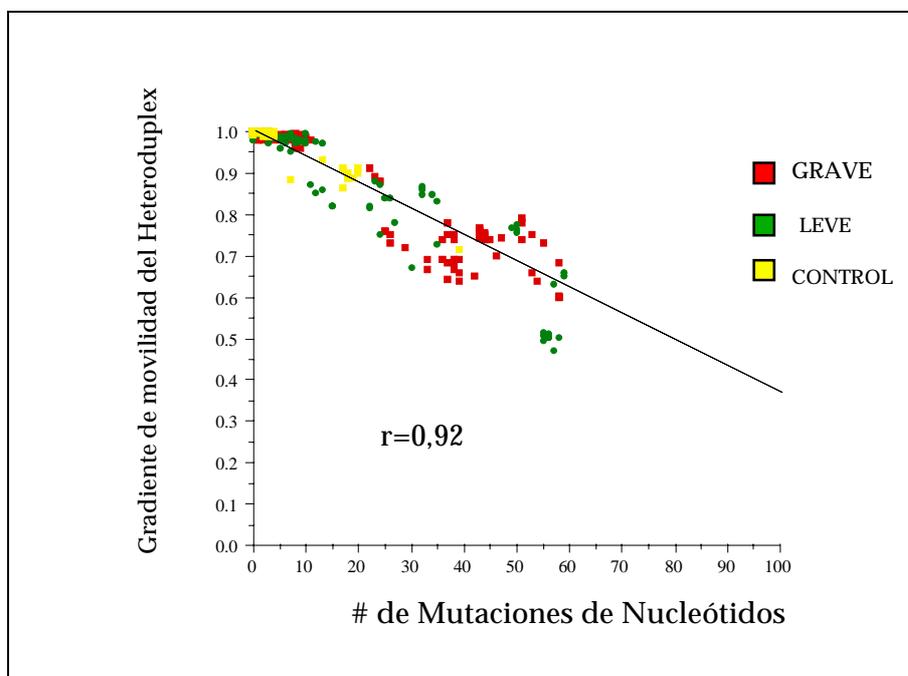


En la muestra inicial del paciente control, se identificaron 3 variantes, 1 homoduplex y 2 heteroduplexes, representando un 60%, 30% y 10% de los clones examinados, respectivamente. Un año después, dos variantes del punto inicial continuaron identificándose, y solamente apareció una nueva variante, la cual representó un 20% de los clones analizados.

Los resultados de este estudio son los siguientes:

- (i) **Validación de la técnica de movilidad del heteroduplex:** En la figura 34 se observa como el número de cambios de nucleótidos (evaluado mediante secuenciación) se correlaciona con la tasa de movilidad del heteroduplex (evaluada como el gradiente entre la movilidad del heteroduplex y la movilidad del homoduplex en el gel). Estos resultados confirman que esta técnica es adecuada para la evaluación de la diversidad del VHC.

Figura 34: Curva de validación de la técnica de movilidad del heteroduplex: comparación entre el gradiente de movilidad de heteroduplex y la diversidad genética.



En el eje de las abscisas, se representa la diversidad genética, definida como el número de cambios de nucleótidos de los clones secuenciados en tres tiempos en pacientes controles y en trasplantados con hepatitis C recurrente leve o grave. En el eje de las ordenadas se muestra la movilidad del Heteroduplex. Se obtuvo una elevada correlación entre la movilidad y los cambios de nucleótidos ( $r = 0,92$ ,  $p < 0,001$ ).

(ii) **Estabilidad de la complejidad del VHC: La tasa de complejidad del VHC (o número de variantes) de los pacientes trasplantados se situó entre 1 y 9 variantes tanto en el período pre-trasplante como en el post-trasplante, sin detectarse diferencias entre grupos (trasplantados con enfermedad grave frente a trasplantados sin enfermedad frente a controles), ni diferencias con el tiempo (tabla 18). Estos datos sugieren, pues, que ni el sistema inmune ni la gravedad de la hepatitis C tienen un efecto sobre el número de variantes del VHC.**

**Tabla 18. Diferencias cuantitativas observadas con el tiempo: efecto de la inmunosupresión y de la gravedad de la hepatitis.**

Pacientes (N)	Número de clones analizados	Complejidad vírica inicial (Pre-trasplante en caso de trasplantados y tiempo "0" en caso de controles)	Complejidad vírica en el post-trasplante precoz	Complejidad vírica en el postrasplante tardío
Controles (5)	100	2 (2-4)	No Aplicable	2 (2-4)
Recidiva leve (6)	220	4 (1-6)	4 (2-7)	5 (2-6)
Recidiva grave (6)	220	2,5 (1-7)	4 (1-8)	4 (2-9)

**Todos los valores se presentan como medianas con rango**

**En cada grupo, no se objetivaron diferencias entre la complejidad vírica determinada inicialmente y aquella determinada durante el seguimiento.**

(iii) **Evolución de la diversidad: la tasa de diversidad aumentó significativamente con el tiempo en los trasplantados, fundamentalmente y de forma precoz en aquellos con enfermedad grave frente a los pacientes con enfermedad leve del injerto (Tabla 19). Frente a estos cambios manifiestos en los pacientes trasplantados, no se detectaron cambios importantes en la tasa de diversidad en el grupo de pacientes controles (Tablas 19 y 20).**

**Tabla 19. Cambios cualitativos de las variantes con el tiempo: efecto de la inmunosupresión.**

Pacientes	Número de clones analizados por HMA (número secuenciado)	Gradiente de movilidad del Heteroduplex en el tiempo inicial	de en	Gradiente de movilidad del Heteroduplex en el último seguimiento	Diversidad de Nucleótidos en el tiempo inicial	Divergencia de Nucleótidos en el último seguimiento
Controles (N=5)	100 (62)	1 (0,71-1) <sup>1</sup>		1 (0,87-1) <sup>1,5</sup>	0 (0-30) <sup>3</sup>	2 (0-18) <sup>3,6</sup>
Trasplantados (leve + grave ) (N=12)	440 (242)	0,99 (0,59-1) <sup>2</sup>		0,77 (0,47-1) <sup>2,5</sup>	1 (0-59) <sup>4</sup>	31 (0-59) <sup>4,6</sup>

**HMA = técnica de movilidad del heteroduplex; Todos los valores se presentan como medianas con rango. El intervalo transcurrido entre el “tiempo inicial” y el seguimiento fue de 12 (12-36) y 22 (4-53) meses, para los controles y los pacientes trasplantados, respectivamente.**

- 1** – Comparación de movilidades – Tiempo inicial frente al seguimiento en controles (p=0,96)
- 2** - Comparación de movilidades - Tiempo inicial frente al seguimiento en pacientes inmunodeprimidos (p<0,001)
- 3** – Comparación de los cambios de nucleótidos - Tiempo inicial frente al seguimiento en controles (p=0,89)
- 4** - Comparación de los cambios de nucleótidos - Tiempo inicial frente al seguimiento en pacientes inmunodeprimidos (p<0,001)
- 5** - Comparación del cambio de movilidades - controles frente a pacientes inmunodeprimidos (p<0,001)
- 6** - Comparación de los cambios de nucleótidos - controles frente a pacientes inmunodeprimidos (p<0,001)

**Tabla 20. Cambios cualitativos de las variantes con el tiempo: efecto de la gravedad de la hepatitis C recurrente**

Pacientes	Número de clones analizados por HMA (número secuenciado)	Gradiente de movilidad del Heteroduplex en el tiempo inicial	Gradiente de movilidad del Heteroduplex en el postrasplante precoz*	Gradiente de movilidad del Heteroduplex en el postrasplante tardío*	Diversidad de nucleótidos en el tiempo inicial	Divergencia de Nucleótidos en el post-trasplante precoz*	Divergencia de Nucleótidos en el post-trasplante tardío*
Leve (N=6)	220 (135)	0,99(0,59-1) <sup>1</sup>	0,99(0,73-1) <sup>1,5</sup>	0,84(0,47-1) <sup>1,7</sup>	1(0-58) <sup>3</sup>	5(0-49) <sup>3,6</sup>	19(0-59) <sup>3,8</sup>
Grave (N=6)	220 (107)	1,00(0,64-1) <sup>2</sup>	0,76(0,60-1) <sup>2,5</sup>	0,76(0,64-1) <sup>2,7</sup>	3,5(0-46) <sup>4</sup>	38(1-58) <sup>4,6</sup>	41(0-54) <sup>4,8</sup>

HMA = técnica de movilidad del heteroduplex; Todos los valores se presentan como medianas con rango.

\* Las muestras del postrasplante precoz se obtuvieron a los 2,5 (1-23) y 3,5 (1-21) meses postrasplante en los pacientes con recidiva leve y grave, respectivamente;

\* Las muestras del postrasplante tardío se obtuvieron a los 20 (5-45) y 24 (4-53) meses postrasplante en los pacientes con recidiva leve y grave, respectivamente;

<sup>1</sup> - Comparación de movilidades – Tiempo inicial frente al postrasplante precoz; postrasplante precoz frente al postrasplante tardío en pacientes con recidiva leve (p= 0,06 y p<0,001, respectivamente)

<sup>2</sup> - Comparación de movilidades - Tiempo inicial frente al postrasplante precoz; postrasplante precoz frente al postrasplante tardío en pacientes con recidiva grave (p<0,001 y p= 0,002, respectivamente)

<sup>3</sup> - Comparación de los cambios de nucleótidos - Tiempo inicial frente al postrasplante precoz; postrasplante precoz frente al postrasplante tardío en pacientes con recidiva leve (p<0,001 y p=0,002, respectivamente)

<sup>4</sup> - Comparación de los cambios de nucleótidos - Tiempo inicial frente al postrasplante precoz; postrasplante precoz frente al postrasplante tardío en pacientes con recidiva grave (p<0,001 y p= 0,517, respectivamente)

<sup>5,6</sup> - Comparación de movilidades <sup>5</sup> y de los cambios de nucleótidos <sup>6</sup> en el postrasplante precoz – leve frente a grave (p<0,001 y p<0,001, respectivamente)

<sup>7,8</sup> - Comparación de movilidades <sup>7</sup> y de los cambios de nucleótidos <sup>8</sup> en el postrasplante tardío - leve frente a grave (p=0,07 y p=0,779, respectivamente)

(iv) **Aparición de variantes no relacionadas filogenéticamente:** El estudio filogenético confirmó que la mayoría de variantes detectadas en el post-trasplante diferían genéticamente de las detectadas antes del trasplante hepático, siendo el porcentaje de nuevas variantes distinto en los 3 grupos (Tabla 21, Figuras 35 y 36). En los pacientes inmunocompetentes la mayoría de las variantes detectadas durante el seguimiento ya estaban presentes en la muestra inicial. Solamente un 10% de las variantes detectadas durante el seguimiento difirieron de las existentes en la muestra inicial, y los cambios observados fueron escasos. Por contra, la mayoría de las variables presentes en la muestra pre-trasplante no se detectaron en las muestras del post-trasplante precoz, tanto en pacientes con hepatitis leve como en aquellos con hepatitis colestásica fibrosante. La evolución de las variantes continuó durante el seguimiento post-trasplante de forma que las variantes detectadas en la última muestra post-trasplante no estaban relacionadas filogenéticamente con las existentes en el post-trasplante precoz (Tabla 21, Figuras 35 y 36).

Tabla 21. **Aparición de nuevas variantes: Efecto de la inmunosupresión y de la gravedad de la hepatitis C recurrente.**

Pacientes	Número de clones analizados por HMA	Seguimiento precoz: porcentaje de nuevas variantes comparado con el tiempo inicial	Seguimiento tardío: porcentaje de nuevas variantes comparado con el tiempo inicial	Seguimiento tardío: porcentaje de nuevas variantes comparado con el seguimiento precoz
Controles (N=5)	100	No aplicable	10 (0-100) <sup>3,4</sup>	N/A
Leve (N=6)	220	87 (35-100) <sup>1</sup>	60 (50-100) <sup>1,3</sup>	90 (40-100)
Grave (N=6)	220	95 (10-100) <sup>2</sup>	90 (10-100) <sup>2,4</sup>	90 (70-100)

HMA = técnica de movilidad del heteroduplex; Todos los valores se presentan como medianas con rango.

- <sup>1</sup> - Comparación del porcentaje de nuevas variantes en pacientes con hepatitis leve – seguimiento precoz frente a tardío , comparadas con tiempo inicial (p=0,584)
- <sup>2</sup> - - Comparación del porcentaje de nuevas variantes en pacientes con hepatitis grave – seguimiento precoz frente a tardío , comparadas con tiempo inicial (p=0,855)
- <sup>3</sup> - Comparación del porcentaje de nuevas variantes en pacientes con hepatitis leve frente a controles - seguimiento tardío comparado con tiempo inicial (p=0,296)
- <sup>4</sup> - Comparación del porcentaje de nuevas variantes en pacientes con hepatitis grave frente a controles - seguimiento tardío comparado con tiempo inicial (p=0,175)

Figura 35: **Aparición de nuevas variantes con el tiempo en pacientes inmunodeprimidos frente a pacientes controles inmunocompetentes.**

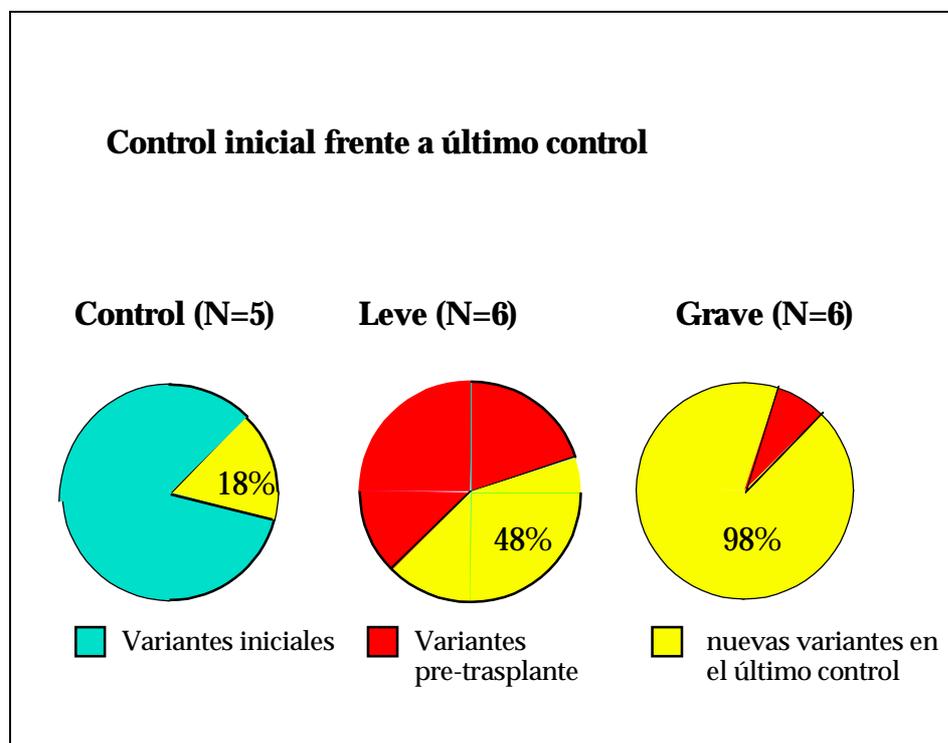
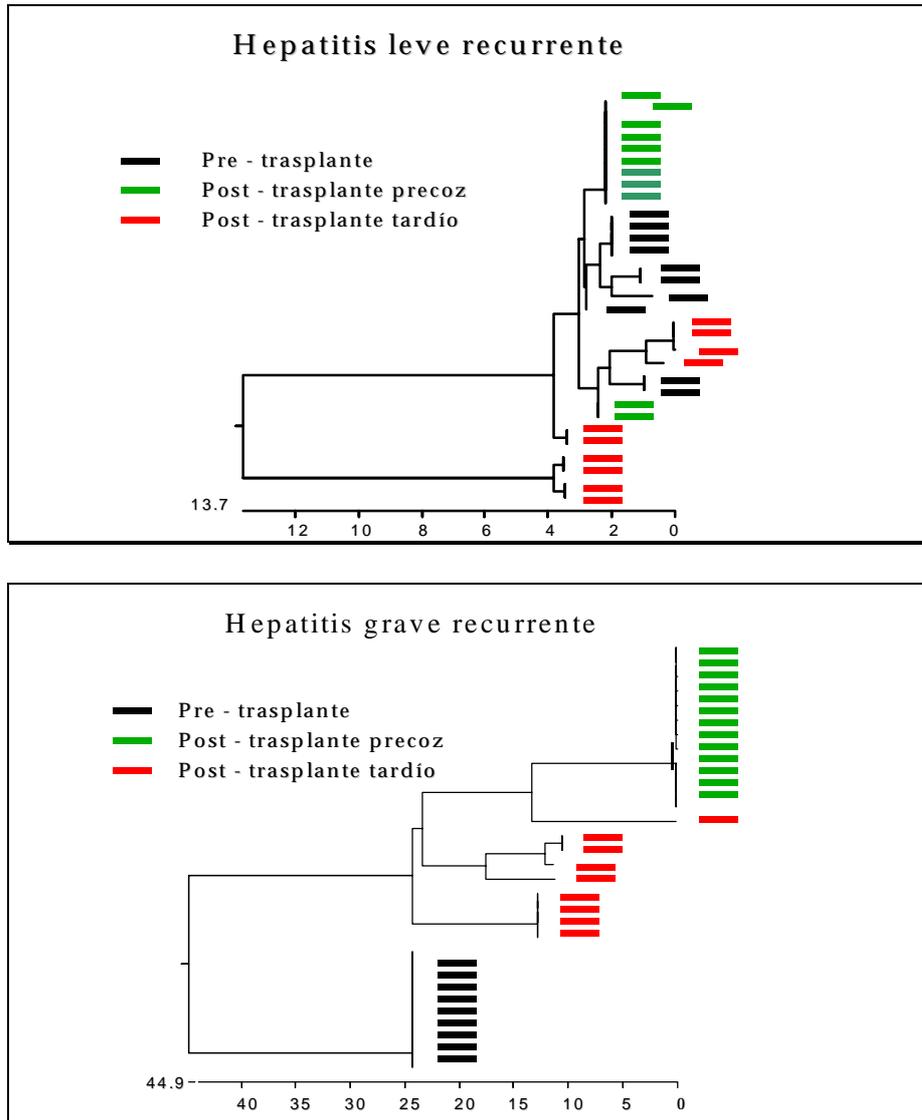


Figura 36. Alineamiento de las secuencias de variantes pre y post-trasplante correspondientes a dos pacientes típicos.



(a) En esta figura, se muestra el análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos correspondientes a un trasplantado típico con hepatitis C recurrente leve. (b) En esta figura, se muestra el análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos correspondientes a un trasplantado típico con hepatitis C recurrente grave de tipo colestásica. En ambas figuras, un valor de “bootstrap” mayor de 70 implica una separación en grupos genéticos distintos indicando la evolución de la variante hacia una nueva línea.

En resumen, en pacientes inmunocompetentes y en ausencia de tratamiento, ni la complejidad del VHC ni su diversidad cambian significativamente con el tiempo. Por contra, en pacientes inmunodeprimidos, tales como trasplantados hepáticos con hepatitis C recurrente, no existen cambios evidentes en el número de variantes o en su complejidad tras el trasplante, aunque se producen cambios significativos en la diversidad del VHC, fundamentalmente en aquellos pacientes con la forma mas grave de hepatitis C del injerto. En éstos, los cambios se evidencian en una fase precoz post-trasplante, mientras que en los pacientes con hepatitis leve del injerto, los cambios son menores y mas tardíos.

Por tanto, la divergencia de la región hipervariable HVR1 es significativamente mayor en pacientes inmunodeprimidos que en inmunocompetentes, lo cual sugiere que la inmunosupresión desempeña un papel en la diversificación del VHC. Igualmente, la diversificación de la región hipervariable HVR1 es significativamente mayor y mas precoz en trasplantados que han desarrollado la forma mas grave de hepatitis C del injerto que en aquellos con hepatitis leve del injerto, lo cual sugiere que la evolución de las *cuasiespecies* del virus desempeña un papel en la gravedad de la hepatitis C recurrente.

En conclusión, estos hallazgos sugieren que la diversificación del VHC está relacionada con la gravedad de la hepatitis del injerto y con la intensidad de la respuesta inmune.

## 5.2 Factores del huésped

- 1- HLA: Algunos estudios [142], aunque no todos [143] han sugerido que el apareamiento de los antígenos HLA-B entre donante y receptor facilita el desarrollo de hepatitis C del injerto a través de una mayor eficacia en la presentación de antígenos VHC asociados al complejo mayor de histocompatibilidad [142].
- 2- Lesión histológica inicial: Varios autores han descrito la asociación entre el grado de gravedad histológica en las biopsias iniciales (14, 16, 144) y la peor evolución posterior. **En el estudio reciente realizado en el Hospital La FE, en el que se realizó un seguimiento histológico estricto, los pacientes que desarrollaron una cirrosis del injerto dentro de los primeros 5 años post-trasplante se caracterizaron por tener mayor actividad inflamatoria en la primera biopsia anual que aquellos que no desarrollaron la cirrosis posteriormente ( $7,6 \pm 3,4$  frente a  $4,4 \pm 3,1$ ;  $p=0,008$ ) (Tabla 9, Figuras 12 y 13) (14).**

## 5.3. Factores externos:

### 1- Grado de inmunosupresión:

Pese a que algún estudio preliminar apuntó hacia un papel deletéreo de los regímenes inmunosupresores basados en FK506 [145], los estudios posteriores sobre la historia natural de la infección C post-trasplante no lo han confirmado [11, 13], y son por tanto la base racional para la realización de estudios prospectivos que comparen los dos regímenes básicos de inmunosupresión en pacientes infectados por el VHC. De igual forma, el papel que desempeña el micofenolato en la progresión histológica de la hepatitis C recurrente no está todavía definido. En un primer momento, se especuló sobre el papel beneficioso del micofenolato en pacientes con hepatitis C del injerto por su posible acción antivírica [146]. Los estudios posteriores no obstante, parecen contradecir este efecto. **En particular, en el estudio comparativo Valencia-San Francisco, los pacientes inducidos con un regimen inmunosupresor que incluyese micofenolato presentaron una tasa de progresión de la fibrosis hepática mayor que aquellos tratados con azatioprina (Figura 29) [16].** Son necesarios estudios prospectivos que confirmen o rechacen esta asociación.

El efecto de la inmunosupresión añadida sobre el grado de lesión hepática parece mas evidente, dada la asociación en varios estudios entre el tratamiento adicional corticoideo [14, 147, 148] y/o con OKT3 [149] frente al rechazo con el incremento de la carga viral y desarrollo posterior de mayor lesión hepática. **En un estudio reciente basado en un grupo**

homogéneo de 63 trasplantados hepáticos infectados por el VHC genotipo 1b y sometidos al régimen estándar de inmunosupresión, tanto la presencia de rechazo, fundamentalmente durante el primer año post-trasplante, como su tratamiento, el número de bolos de metil-prednisolona y las tasas acumuladas de azatioprina y corticoides fueron significativamente más frecuentes en los pacientes que posteriormente desarrollaron una hepatitis grave del injerto [148]. El papel del sistema inmune no puede descartarse en este contexto, ya que el aumento en la expresión hepática de antígenos del VHC por efecto de la inmunosupresión puede inducir una respuesta mayor por parte del sistema inmune del huésped, sobre todo cuanto la respuesta inmunitaria se restaura tras seguimientos prolongados. Una situación similar se ha descrito en portadores del VHC tras la supresión de quimioterapia o de corticoides [150, 151].

**EARLY DEVELOPMENT OF CHRONIC ACTIVE HEPATITIS IN RECURRENT HEPATITIS C VIRUS INFECTION AFTER LIVER TRANSPLANTATION: ASSOCIATION WITH TREATMENT OF REJECTION (Referencia # 148).**

El objetivo de este estudio fue evaluar el papel desempeñado por la inmunosupresión en el desarrollo de formas graves de hepatitis C post-trasplante. Las ventajas de evaluar esta asociación en nuestro centro fueron: (1) inclusión de un grupo homogéneo de pacientes infectados por el genotipo 1b, (2) realización de biopsias de protocolo anuales, y (3) tratamiento universal de inducción con triple terapia ciclosporina-azatioprina-prednisona. La selección de un grupo de estudio tan homogéneo reduce el riesgo de asociaciones falsas, al disminuir el número de variables potencialmente relacionadas con la evolución de la hepatitis C post-trasplante. Por otra parte, los resultados de estudios realizados en otros centros en donde la inmunosupresión de inducción no se ha mantenido estable con el tiempo, y el genotipo 1b sólo representa un tercio de los genotipos, podrían ser inaplicables en centros como el nuestro.

En este estudio se incluyeron 63 pacientes con viremia post-trasplante positiva y supervivencia mayor al año no coinfectados por el VHB. Las características de los pacientes incluidos quedan reflejadas en la tabla 22.

Tabla 22: Características de los pacientes con seguimiento mayor del año

<b>Número</b>	63
<b>Edad (Años)Media ± DE</b>	54 ± 8
<b>H/M (%)</b>	68%/32%
<b>Carcinoma hepatocelular</b>	
<b>Conocido</b>	10 (13%)
<b>Incidental</b>	2 (3%)
<b>Ingesta significativa alcohol</b>	9 (14%)

H/M= Hombre/Mujer

En su mayoría, los pacientes eran varones que habían sido sometidos a trasplante hepático entre 1991 y 1996 por cirrosis secundaria al VHC sin carcinoma hepatocelular añadido.

El tratamiento inmunosupresor consistió en triple terapia con ciclosporina (dosis ajustadas según niveles: 250-350 ng/ml durante el primer mes, 150-250 ng/ml durante el 2º y tercer mes, 100-150 ng/ml hasta el año, y alrededor de 100 ng/ml posteriormente), azatioprina (1-2 mg/Kg/día) y prednisona (empezando con 200 mg y disminuyendo a 20 mg/día a partir del 6º día). En 38 pacientes se discontinuó el tratamiento con azatioprina antes de finalizar el primer año. Al año los niveles medios de azatioprina y prednisona eran de  $59 \pm 14$  mg/día y  $6,5 \pm 3,4$  mg/día, respectivamente. Los episodios de rechazo, confirmados histológicamente en todos los casos, se trataron con 3 bolos de metil-prednisolona, y en caso de resistencia se recurrió al uso de OKT3, lo cual sucedió en 6,3% de pacientes.

Las biopsias se realizaron anualmente en todos los pacientes (63 pacientes al finalizar el primer año y 40 pacientes al finalizar el segundo año), y en caso de elevación de transaminasas 1,5 veces el límite superior de la normalidad (46 pacientes). La hepatitis aguda se definió por la presencia de necrosis periportal y/o infiltrado linfocitario en áreas portales, mientras que el diagnóstico de hepatitis crónica se basó en los criterios tradicionales diferenciando la hepatitis crónica persistente de la activa, y dividiendo a ésta en leve, moderada y grave. Para facilitar la comparación entre grupos y el análisis estadístico se utilizó igualmente un método cuantitativo similar al índice de Knodell que diferencia, por un lado el grado de infiltrado inflamatorio {necrosis periportal (0-6), actividad lobular (0-4) y actividad portal (0-4)}, y por otro lado el estadio de fibrosis en una escala de 0 a 4 (1=fibrosis periportal, 3= fibrosis en puente, 4=cirrosis)

Los pacientes se agruparon en: (1) pacientes con hepatitis C recurrente relevante, definidos como aquellos que desarrollaron hepatitis crónica activa con gradación histológica superior a 4 durante los dos primeros años; y (2) pacientes sin hepatitis C recurrente relevante.

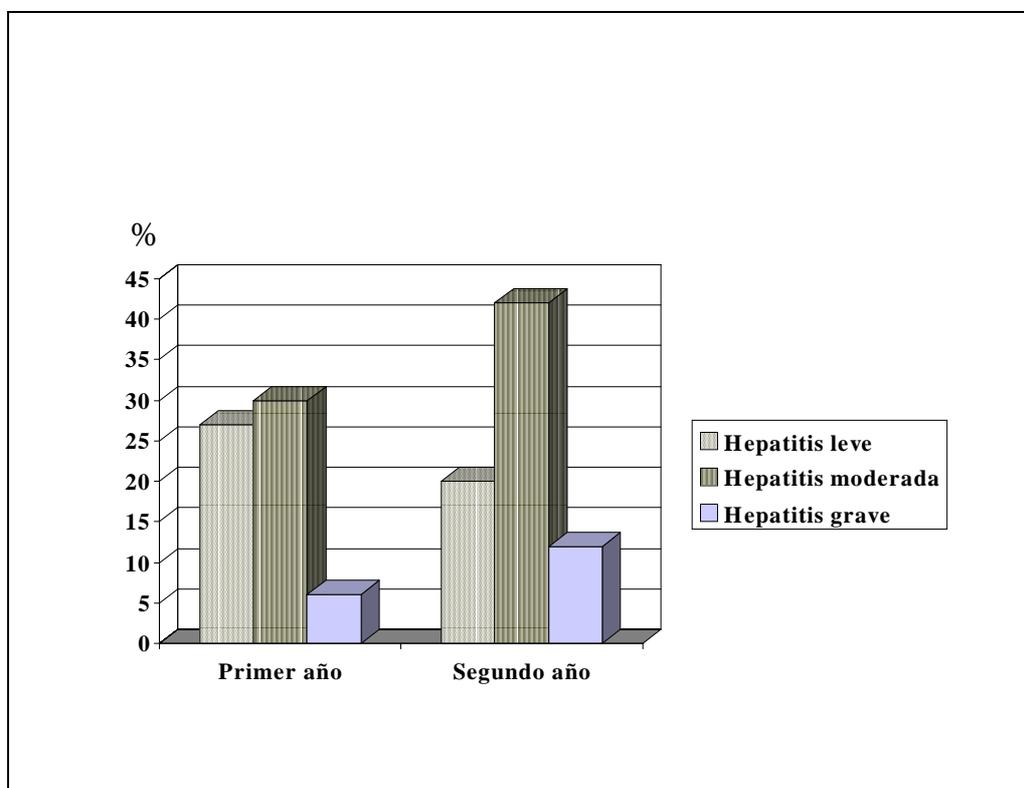
La supervivencia de la población de estudio fue del 95%, 93% y 83% a los 2, 3 y 5 años postrasplante, con una supervivencia del injerto del 94%, 91% y 82%, respectivamente.

Los resultados del estudio pueden resumirse en:

(1) Una elevación en los niveles séricos de transaminasas se observó en la práctica totalidad de pacientes en algún momento de la evolución. En 17 pacientes, sin embargo, ésta elevación no condujo a la realización de una biopsia hepática al no ser superior a 1,5 veces el límite superior de la normalidad. De los 46 pacientes sometidos a una biopsia hepática por indicación clínica, se demostró una hepatitis aguda en 20 tras una media de  $3 \pm 1,4$  meses.

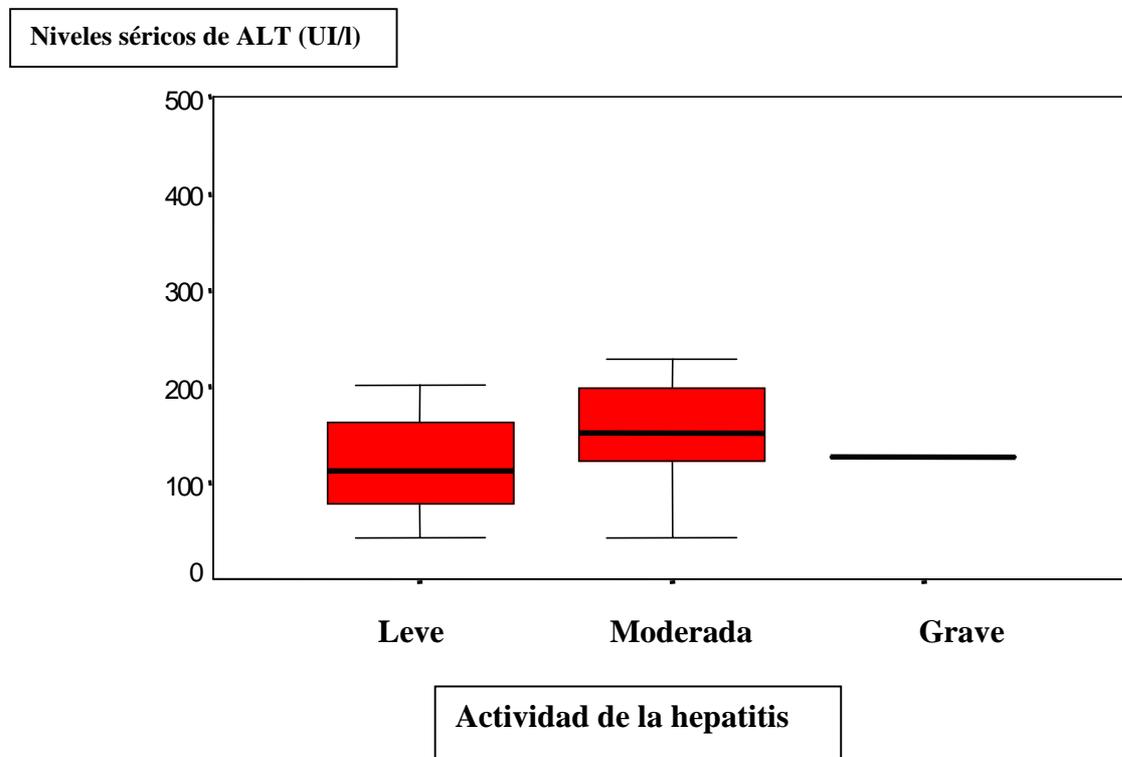
(2) Al año post-trasplante, 40 pacientes (64%) desarrollaron signos histológicos de hepatitis crónica relevante, leve en 17 (27%), moderada en 19 (30%) y grave en 4 (6%). A los dos años, el número de pacientes con hepatitis relevante aumentó a 75%, siendo leve en el 20%, moderada en el 42,5% y grave en el 12,5% (figura 37).

Figura 37: Evolución histológica al primer y segundo año posttrasplante.



Pese a observarse niveles séricos de transaminasas más elevados en pacientes con hepatitis crónica activa o relevante que en aquellos sin desarrollo de hepatitis crónica activa, estos niveles no se correlacionaron con la gravedad de la lesión histológica en aquellos pacientes con hepatitis crónica activa (figura 38).

Figura 38: Correlación entre los niveles séricos de transaminasas y el grado de lesión histológica



(3) Los factores asociados con el desarrollo de hepatitis relevante al primer y segundo año post-trasplante están resumidos en las tablas 23 y 24.

Tabla 23: Factores predictivos de lesión histológica al año postraspante (n=63).

	Hepatitis C relevante	Hepatitis C no relevante	p
Nº pacientes con historia de rechazo	25 (62,5%)	11 (48%)	0,2
Nº de pacientes con historia de tratamiento anti-rechazo	24 (60%)	10 (43,5%)	0,2
Nº de rechazos	0,8 ± 0,14	0,6 ± 0,1	0,1
Nº de pacientes ≥ 2 rechazos	5 (12,5%)	1 (4%)	0,07
Nº de bolos de MP*	2,7 ± 0,5	1,4 ± 0,4	0,06
Dosis acumulada de esteroides (mg)*	9445 ± 3411	8339 ± 1939	0,17
Dosis acumulada de azatioprina (mg)*	14494 ± 11269	6406 ± 6492	0,12
Genotipo 1b	39 (97,5%)	23 (100%)	NS

\*Media ± DE; MP= Metilprednisolona

Tabla 24: **Factores predictivos de lesión histológica a los dos años postrasplante (n=40).**

	<b>Hepatitis C relevante</b>	<b>Hepatitis C no relevante</b>	<b>p</b>
<b>Nº pacientes con historia de rechazo</b>	22 (73%)	2 (20%)	0,006
<b>Nº de pacientes con historia de tratamiento anti-rechazo</b>	23 (77%)	3 (30%)	0,05
<b>Nº de rechazos</b>	0,9 ± 0,12	0,2 ± 0,1	0,003
<b>Nº de pacientes ≥ 2 rechazos</b>	6 (20%)	0	0,3
<b>Nº de bolos de MP*</b>	2,7 ± 0,5	0,8 ± 0,5	0,001
<b>Dosis acumulada de esteroides (mg)*</b>	9447 ± 3176,5	7891,5 ± 2111	0,17
<b>Dosis acumulada de azatioprina (mg)*</b>	13472 ± 11154	6233,5 ± 5937	0,08
<b>Genotipo 1b</b>	29 (97%)	10 (100%)	NS

\*Media ± DE; MP= Metilprednisolona

Pese a no detectarse una asociación entre la existencia de rechazo y su tratamiento y el desarrollo de hepatitis relevante al año del trasplante, esta asociación si se demostró al segundo año post-trasplante (p=0,006 y p=0,005; respectivamente). De igual forma el número de episodios de rechazo y el número de pacientes con historia de 2 o más episodios de rechazo fueron superiores en el grupo de pacientes con hepatitis C relevante que en el grupo de pacientes sin hepatitis C relevante {(0,9 ± 0,1 frente a 0,2 ± 0,1, p=0,003); y (20% frente a 0%, p=0,3); respectivamente}. El número de bolos de metilprednisolona fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con hepatitis C relevante que en el grupo de pacientes sin hepatitis C relevante a los dos años del trasplante (2,7 ± 0,5 frente a 0,8 ± 0,5, respectivamente, p=0,001). Pese a que la dosis acumulada de corticoides y azatioprina fue superior en los pacientes con hepatitis C relevante al segundo año postrasplante que en los pacientes sin desarrollo de hepatitis C relevante, las diferencias no alcanzaron significación estadística.

**(4) Sólo 4 pacientes, 3 de los cuales desarrollaron una hepatitis C relevante al año posttrasplante, recibieron tratamiento con OKT3.**

**En resumen, este estudio pone de relieve la importancia de la inmunosupresión en el desarrollo posterior de la hepatitis C del injerto. En particular, nuestros resultados sugieren que los bolos de metilprednisolona, y posiblemente el uso de OKT3 y dosis elevadas de azatioprina repercuten negativamente en la hepatitis C del injerto, al menos en pacientes sometidos a triple terapia inmunosupresora e infectados por el genotipo 1b del VHC. Una de las limitaciones de este estudio es que no se analizaron los niveles de viremia post-trasplante para evaluar su asociación con el tratamiento inmunosupresor y la lesión histológica. Una asociación positiva entre estos 3 factores apuntaría hacia un mecanismo directo de lesión histológica, sin descartar, no obstante, la posibilidad de un mecanismo indirecto mediado por el sistema inmune en presencia de niveles elevados de antigenemia. En efecto, el desarrollo de una respuesta inmunológica adecuada al disminuir la inmunosupresión exógena podría constituir el mecanismo de lesión histológica. Esta respuesta inmunológica sería más agresiva en los pacientes con niveles previos elevados de ARN-VHC, y, por consiguiente, de antígenos VHC en tejido hepático. Este tipo de lesión histológica se ha descrito previamente en pacientes con hepatitis crónica C tras la retirada de quimioterapia o glucocorticoides [150, 151].**

**En el estudio comparativo España-San Francisco, los bolos de metilprednisolona también se asociaron de forma independiente con una tasa mayor de progresión de la fibrosis hepática (Figura 25). Por su parte el uso de OKT3 se asoció con mayor progresión sin llegar a alcanzar significación estadística en el análisis multivariado (Figura 28)[16].**

En conclusión, estos dos estudios ponen de relieve la importancia de la inmunosupresión en el desarrollo de la hepatitis C del injerto. Pese a que el papel de los nuevos fármacos inmunosupresores aún no está claramente definido, el tratamiento añadido con metilprednisolona y OKT3 debería limitarse al máximo en estos pacientes. Preguntas que quedan aún por contestar incluyen: (1) ¿Cuál es el mejor regimen inmunosupresor en pacientes sometidos a trasplante hepático por cirrosis VHC?; (2) ¿Es importante retirar precozmente los corticoides en estos pacientes, o es preferible mantener una dosis mínima para evitar una

respuesta inmunológica más agresiva, la cual puede inducir una mayor lesión histológica?; (3) ¿Es posible individualizar el tratamiento, retirando precozmente los corticoides en aquellos pacientes sin historia de rechazo y tratamiento adicional con corticoides, y manteniendo una dosis mínima en aquellos con historia de rechazo, tratamiento con altas dosis de metilprednisolona o uso de OKT3?

Otra de las conclusiones de estos estudios hace referencia a la importancia de las biopsias de protocolo. Estas son importantes por 3 razones fundamentalmente: (1) ausencia de correlación entre el desarrollo y gravedad de la lesión histológica y los niveles séricos de transaminasas [14]; (2) papel predictivo de lesión histológica posterior [14, 16]; (3) evaluación de la historia natural de la hepatitis C del injerto.

## 2- Otros factores:

*a-Alcohol:* En pacientes inmunocompetentes, la coexistencia de ambos factores etiológicos conduce en un número mayor de casos a hepatopatía terminal [61]. Faltan datos al respecto en los pacientes trasplantados infectados por el VHC.

*b-Virus.* La coinfección por otros virus, tales como el VHG [152] no parece desempeñar un papel fundamental en la evolución de la hepatitis C postrasplante. Los datos respecto a la coinfección por el VHB son controvertidos, y mientras algún estudio no ha encontrado ninguna relación [153], otros apuntan hacia un papel protector del VHB [15]. **En el primer estudio realizado sobre el papel del VHG en la evolución postrasplante de los pacientes con hepatitis C recurrente [152], concluimos que: (i) la prevalencia de la coinfección por el VHG es elevada en pacientes con hepatopatía terminal por VHC, lo cual sugiere mecanismos similares de adquisición viral; (ii) La infección pre-trasplante por el VHG se asocia con la infección post-trasplante, de tal forma que en la mayoría de pacientes con infección G pre-trasplante se detecta el VHG en suero post-trasplante, sugiriendo que, al igual que sucede con el VHC, la recurrencia del VHG es universal en pacientes con viremia VHG pre-trasplante; (iii) Ni la gravedad de la lesión histológica, ni la supervivencia del injerto o del paciente varían en caso de coinfección por el VHG, lo cual sugiere que el VHG no desempeña un papel relevante en la historia natural de la hepatitis C del injerto [152].**

**HEPATITIS G VIRUS INFECTION IN PATIENTS WITH HEPATITIS C VIRUS INFECTION UNDERGOING LIVER TRANSPLANTATION (Referencia # 152).**

Se incluyeron 123 pacientes sometidos a trasplante hepático en la Universidad de California, San Francisco entre 1988 y 1993, por cirrosis secundaria a infección VHC, con viremia VHC positiva post-trasplante, no coinfectados por el VHB y con una supervivencia mínima de 2 meses.

Los factores que se evaluaron como posibles factores predictivos de mayor gravedad de la hepatitis C recurrente fueron: coinfección por el VHG (determinado por RT-PCR en suero pre- y post-trasplante), genotipo del VHC (determinado solamente en 120 pacientes), raza, sexo, vías de adquisición del VHC, tipo de inmunosupresión, ingesta significativa de alcohol pre-trasplante, y presencia de carcinoma hepatocelular pre-trasplante.

Los tres parámetros que definieron el impacto de la coinfección por el VHG fueron: supervivencia del injerto, supervivencia del paciente y lesión histológica en la biopsia más reciente.

Para determinar si existía una interacción entre ambos virus se calcularon los niveles de viremia del VHC en 114 pacientes.

Los resultados del estudio pueden resumirse en:

- (1) Las características de los pacientes incluidos están resumidas en la tabla 25.

Tabla 25: Características básicas de los pacientes co-infectados o no por el virus de la hepatitis G (VHG).

	VHG positivo (n=28)	VHG negativo (n=89)	p
<b>Edad al trasplante (Años)</b>	47 (28-58)	47 (22-67)	NS
<b>H/M (%)</b>	19/9	57/32	NS
<b>Factores de riesgo (%)</b>			NS
<b>Drogadicción iv</b>	6 (23%)	30 (35%)	
<b>Transfusión</b>	7 (27%)	29 (34%)	
<b>Desconocido</b>	11 (42%)	22 (26%)	
<b>Otros</b>	2 (8%)	4 (5%)	
<b>Raza (%)</b>			NS
<b>Caucásica</b>	18 (65%)	65 (73%)	
<b>Hispánica</b>	5 (18%)	14 (16%)	
<b>Asiática</b>	2 (7%)	4 (4%)	
<b>Afro-Americana</b>	2 (7%)	4 (4%)	
<b>Otras</b>	1 (4%)	2 (2%)	
<b>Genotipo 1 (%)</b>	63%	67%	NS
<b>Genotipo 1a</b>	19%	48%	0,005
<b>Genotipo 1b</b>	44%	21%	0,02
<b>ARN-VHC<sup>1</sup></b> <b>rango)</b>	<b>(mediana,</b> 8,2 mEq/mL (0,35-1800 mEq/mL)	4,9 mEq/mL (0,35-420 mEq/mL)	0,006

H/M= Hombre/Mujer

La mayoría de los pacientes eran varones con una edad media de 48 años (22-69 años), sin presencia de carcinoma hepatocelular en el momento del trasplante. La inmunosupresión de inducción consistió en el 97% de los casos en triple terapia ciclosporina-azatioprina-prednisona.

(2) El VHG se detectó en el 24% de pacientes antes del trasplante y en el 28% de pacientes post-trasplante. La infección por el VHG post-trasplante se asoció significativamente con la infección por el VHG pre-trasplante ( $p < 0,001$ ), de tal forma que en el 73% de pacientes con infección por VHG pre-trasplante, este también se detectó en el suero post-trasplante. En un 13% de casos se detectó infección por el VHG *de novo* (Tabla 26).

Tabla 26: Asociación entre la infección por el VHG antes del trasplante y la infección por VHG tras el trasplante (n=114).

Pre-trasplante	Post-trasplante	
	ARN-VHG positivo	ARN-VHG negativo
ARN-VHG positivo (n=26)	19 (73%)	7 (27%)
ARN- VHG negativo (n=88)	11 (13%)	77 (87%)

La presencia de ARN- VHG posttrasplante se asoció significativamente con la presencia de ARN-VHG antes del trasplante ( $p < 0,001$ ,  $\chi^2$ )

Estos resultados confirmaron la recurrencia prácticamente universal del VHG en los pacientes virémicos antes del trasplante. Los resultados obtenidos también confirmaron que la infección por el VHG es muy frecuente entre pacientes con infección por el VHC, muy probablemente por el hecho de compartir vías de transmisión vírica.

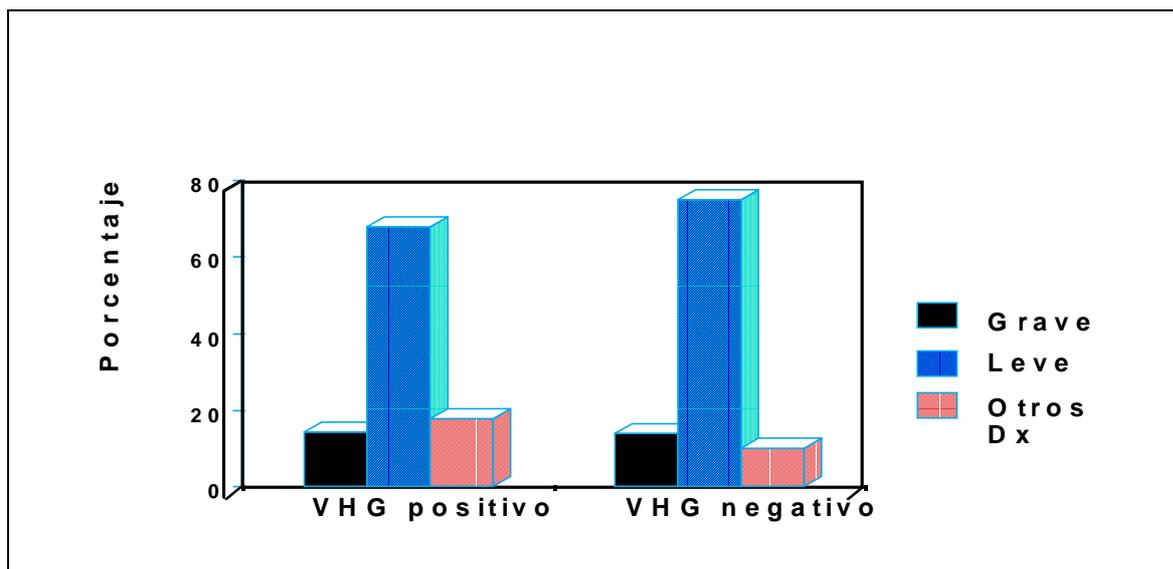
(3) Ninguna de las características pre-trasplante evaluadas difirieron entre los pacientes coinfectados por el VHG y aquellos infectados aisladamente por el VHC (Tabla 25), lo cual sugiere un escaso efecto del VHG sobre la hepatopatía terminal por el VHC.

(4) Aunque los niveles de ARN-VHC fueron superiores en los pacientes coinfectados que en aquellos infectados aisladamente por el VHC {8,2 (0,35-1800) mEq/mL vs 4,9 (0,35-420) mEq/mL}, las diferencias no alcanzaron significación estadística ( $p=0,06$ ), máxime al determinar los niveles de ARN-VHC tras estratificar por genotipo. Solamente en los pacientes infectados por el genotipo 3a se detectaron niveles de ARN-VHC superiores entre los pacientes coinfectados por el VHG que entre aquellos infectados aisladamente por el VHC (40,7 vs 1,46 mEq/mL;  $p=0,04$ ). Estos datos sugieren una ausencia de interacción virológica entre ambos virus.

(5) La distribución de genotipos del VHC fue distinta según la presencia o no del VHG, de tal forma que la infección por el genotipo 1a del VHC fue más frecuente en pacientes infectados aisladamente por el VHC que en pacientes coinfectados (48% vs 19%,  $p=0,005$ ), mientras que la infección por el genotipo 1b del VHC fue más frecuente en los pacientes coinfectados por el VHG que en aquellos infectados por el VHC aisladamente (44% vs 21%,  $p=0,02$ ).

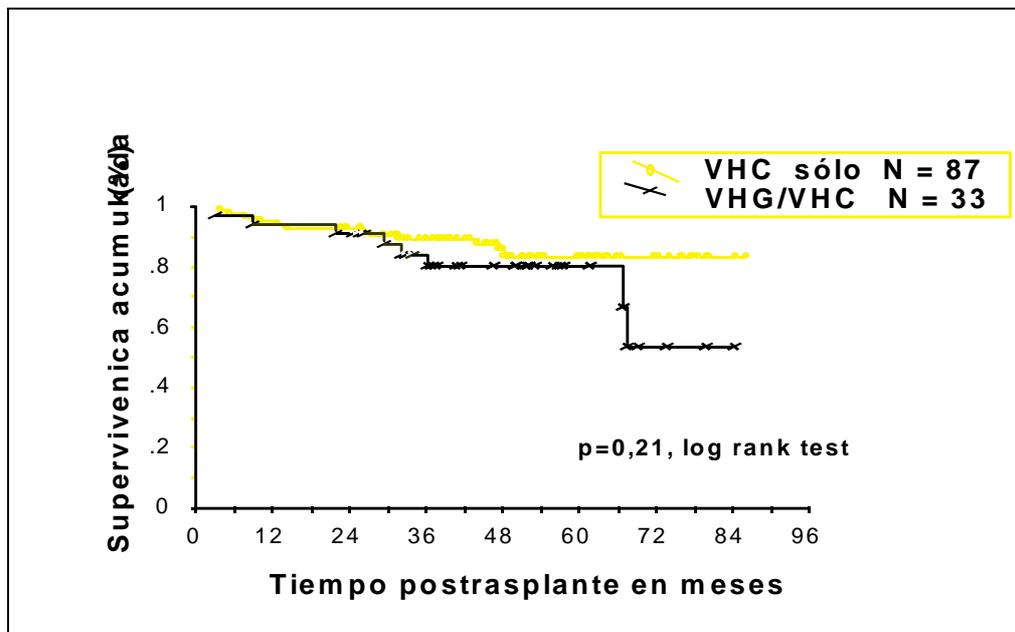
(6) Se pudo evaluar la gravedad de la lesión histológica en 120 pacientes tras una mediana de seguimiento de 27 meses, siendo esta similar independientemente de la coinfección por el VHG ( $p=0,48$ ) (Figura 39).

Figura 39: Correlación entre la gravedad de la lesión histológica y la infección por el VHG.



(7) Ni la supervivencia del injerto ni la del paciente difirieron entre los pacientes coinfectados por el VHG y aquellos infectados aisladamente por el VHC (74% vs 81% a los 5 años,  $p=0,12$ ; y 80% vs 83%,  $p=0,21$ ) (Figura 40).

Figura 40: Supervivencia del paciente con y sin coinfección por el VHG



En resumen, este estudio anticipó las conclusiones de estudios posteriores que confirmaron que el recientemente descubierto VHG no debía considerarse como un nuevo virus de la hepatitis.

Un estudio ha descrito la asociación entre viremia por citomegalovirus (CMV) y mayor riesgo de gravedad de la hepatitis C del injerto [154]. El mecanismo de esta asociación se desconoce, pero se postula que pueda deberse a (i) alteraciones inmunológicas que se producen en el contexto de la infección por el CMV, (ii) estimulación de la producción del factor de necrosis tumoral; (iii) la presencia de reactividad cruzada.

En resumen, existe una gran variedad de factores que se han relacionado con la evolución de la hepatitis C recurrente y la supervivencia del paciente. Hoy por hoy, no obstante, ninguno es capaz de discriminar con suficiente fiabilidad entre un paciente con elevado riesgo de evolución agresiva frente a aquel de evolución mas benigna.

## **6. Tratamiento:**

Para evitar el desarrollo de cirrosis a largo plazo, se han propuesto tres estrategias diferentes: 1) Prevenir la reinfección del injerto mediante la utilización profiláctica de inmunoglobulinas, al igual que se hace con el VHB. De momento este enfoque ha fracasado en animales, probablemente por la elevada variabilidad antigénica del VHC [28, 31]; 2) Tratamiento de la hepatitis C establecida mediante interferón, ribavirina o la combinación de ambos; y 3) Tratamiento precoz post-trasplante con el objetivo profiláctico de impedir el desarrollo de hepatitis del injerto.

### **6.1. Tratamiento de la hepatitis establecida**

#### **1- Tratamiento con interferón:**

Los ensayos clínicos con interferón son escasos [155, 156], y los resultados, tras dosis estándar, desalentadores, con tasas de respuesta bioquímica inferiores a las obtenidas en pacientes inmunocompetentes. Además, la recidiva bioquímica es prácticamente universal tras finalizar el tratamiento, sin observarse respuesta virológica o histológica. Es probable que esta baja tasa de respuesta esté en relación con los altos niveles de viremia y la alta tasa de infección por el VHC genotipo 1b, ambos factores relacionados con mala respuesta en los pacientes inmunocompetentes. Pese a ser un fármaco relativamente bien tolerado, existe cierta preocupación respecto a su uso en trasplantados, por el riesgo, al menos teórico, de desencadenar episodios de rechazo [157].

En un intento de mejorar los resultados obtenidos con interferón a dosis estándar en pacientes con hepatitis C establecida del injerto, algunos autores han optado por (i) prolongar la duración del tratamiento [158], o (ii) iniciar el tratamiento en el contexto de la hepatitis aguda para evitar la progresión a cronicidad [159, 160]. Pese a que los estudios al respecto no son aleatorizados e incluyen un número reducido de pacientes, los resultados no parecen ser mejores que los descritos previamente, y en el caso del uso precoz del interferón se han asociado con tasas elevadas de rechazo (28%). Son necesarios, por tanto, estudios prospectivos randomizados para evaluar adecuadamente estas alternativas.

#### **2- Tratamiento con ribavirina:**

La ribavirina es un análogo de guanósina, que ha sido recientemente utilizado con relativa buena tolerancia en el tratamiento de la hepatitis C, tanto en inmunocompetentes

[161] como en trasplantados hepáticos [162, 163]. En ambos grupos se obtiene una buena respuesta bioquímica inicial. Sin embargo, la recidiva es universal tras finalizar el tratamiento, los pacientes permanecen virémicos durante y tras finalizar éste, y no se observa mejoría histológica. El efecto secundario más incapacitante es la anemia hemolítica que se resuelve al interrumpir el tratamiento. En un ensayo aleatorizado reciente [163] se compararon 12 meses de ribavirina frente a interferón en 31 trasplantados hepáticos. Pese a que la respuesta bioquímica fue superior con ribavirina que con interferón (85% vs 43%,  $p < 0,05$ ), solamente en aquellos pacientes tratados con interferón se detectaron reducciones de los niveles de viremia.

### 3- Tratamiento con interferón en combinación con ribavirina

La estrategia más reciente y con resultados más prometedores es la combinación de ambos fármacos. En un estudio piloto no aleatorizado [164], Bizollon y cols han evaluado la eficacia de interferón- $\alpha$  2b (3MU/tres veces por semana) y ribavirina (1000 mg/día) durante 6 meses, seguido de ribavirina de mantenimiento en 21 trasplantados hepáticos con hepatitis C del injerto. Tras completar los 6 meses de tratamiento combinado, todos los pacientes normalizaron las transaminasas, mientras que el 50% negativizó el ARN-VHC en suero. En el 50% restante se observó una disminución en la carga viral. Durante los 6 meses de tratamiento de mantenimiento con ribavirina se produjo una sola recidiva bioquímica, pese a detectarse el ARN-VHC en el suero de 50% (5/10) de los pacientes que habían negativizado inicialmente la viremia. En la mayoría de pacientes se observó una mejoría histológica. El único efecto adverso que requirió una reducción e incluso retirada de la ribavirina fue el desarrollo de anemia hemolítica reversible. El uso de eritropoietina permitió la reintroducción de ribavirina en los 3 casos en los que fue necesario interrumpir el tratamiento por anemia sintomática. El tratamiento de mantenimiento parece esencial, ya que en estos 3 casos se observó una recidiva bioquímica al interrumpir la ribavirina, con empeoramiento histológico. Estos tres pacientes, no obstante, eran virémicos, por lo que queda por determinar la posibilidad de interrumpir el tratamiento de mantenimiento en caso de erradicación del ARN-VHC en suero. Estos resultados son claramente alentadores, máxime cuando los niveles de viremia pre-tratamiento eran elevados en todos los pacientes (media de 125 Meq/mL) y el 92% estaba infectado por el genotipo 1b. Estos mismos autores han seguido a 11 pacientes de 30 tratados, que negativizaron el ARN-VHC, tanto en suero como en hígado, tras 6 meses de tratamiento combinado y 12 de monoterapia con ribavirina. Tras 12 meses de seguimiento, el

90% (10/11) de los pacientes mantuvieron una respuesta bioquímica y virológica, siendo los hallazgos histológicos similares a los observados al finalizar los 18 meses de tratamiento [165]. Actualmente se están realizando estudios controlados multicéntricos con el propósito de confirmar estos resultados preliminares.

## **6.2. Tratamiento precoz post-trasplante**

En un intento de prevenir la reinfección del injerto, algunos autores han intentado la terapia con interferón sólo o en combinación con ribavirina de forma profiláctica, iniciando el tratamiento de forma precoz tras el trasplante.

### 1- Tratamiento con interferón:

En un primer estudio [166], 86 trasplantados fueron aleatorizados durante las dos primeras semanas posttrasplante en dos grupos. El primer grupo (n=38) recibió interferón durante un año, mientras que los 48 pacientes restantes fueron asignados al grupo control. Pese a que tras dos años de seguimiento, ni la tasa de supervivencia del injerto/paciente, ni la tasa de persistencia viral difirieron entre los dos grupos, la recidiva histológica fue menor en el grupo de interferón (26%) que en el grupo placebo (53%,  $p=0.01$ ). En otro estudio controlado [167], 24 pacientes fueron aleatorizados durante la segunda semana posttrasplante para recibir interferón o placebo durante 6 meses. Ni la incidencia ni la gravedad de la hepatitis recurrente ni la supervivencia del paciente o del injerto difirieron entre ambos grupos. Los pacientes tratados con interferón desarrollaron la hepatitis del injerto más tarde que los pacientes del grupo control (408 vs 139 días posttrasplante;  $p=0,05$ ).

### 2- Tratamiento con interferón en combinación con ribavirina:

Mazaferro y cols.[168] han tratado 21 trasplantados, 19 de los cuales estaban infectados por el genotipo 1b con interferón-alfa 2b y ribavirina a partir de la tercera semana post-trasplante. Cuatro pacientes (19%) desarrollaron una hepatitis aguda C, pero sólo uno de ellos progresó a la cronicidad. Tras 12 meses de tratamiento, el 43% de los pacientes tratados habían negativizado el ARN-VHC tanto en suero como en hígado, y aunque 12 pacientes aún eran virémicos, sólo uno (4.7%) desarrolló una hepatitis progresiva del injerto. Al igual que en el estudio de Bizollon, no se produjo ningún episodio de rechazo y la anemia hemolítica detectada en el 38% de pacientes tratados pudo ser controlada fácilmente con reducción de la dosis de ribavirina. Son necesarios estudios controlados que confirmen estos

resultados preliminares tan prometedores.

### **6.3. Retrasplante**

A medida que aumenta el número de casos documentados de hepatitis crónica por el VHC con progresión a cirrosis, fallo del injerto y necesidad de retrasplante, se hace mas necesario decidir la idoneidad de esta nueva indicación de trasplante. En efecto, en Estados Unidos la proporción de pacientes sometidos a retrasplante por cirrosis VHC del primer injerto ha pasado de 6.5% in 1990 a 38.4% en 1995 ( $p < 0,0001$ ) [169]. Hoy por hoy, las decisiones de retrasplantar a un paciente con cirrosis VHC del injerto se hacen de forma individualizada, y mientras en algunos centros no se aplica ningun tipo de barrera adicional, en otros centros no aceptan a ninguno de estos pacientes como candidatos a trasplante. Este problema no tiene fácil solución por varias razones: (i) datos preliminares que apuntan a una mayor mortalidad post-operatoria entre los pacientes retrasplantados por cirrosis VHC del injerto frente a aquellos retrasplantados por otras etiologías [130, 170]; (ii) datos muy escasos respecto a la incidencia de hepatitis C recurrente sobre el segundo injerto [130]; (iii) escasez de órganos donantes frente al aumento progresivo de candidatos a un primer trasplante.

Dada la escasez de órganos, el aumento de la mortalidad de candidatos, y los malos resultados descritos con el retrasplante [130, 170], algunos centros se cuestionan esta nueva indicación de trasplante. En caso de optar por el retrasplante es aconsejable incluir precozmente en la lista de espera a aquellos pacientes con mala evolución de la hepatitis C del injerto, ya que el deterioro de la función renal se ha asociado con elevada mortalidad tras el retrasplante [170, 171].

## V. CONCLUSIONES.

A partir de los datos generados en los estudios que se han presentado, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 1- La cirrosis por el VHC, sólo o en asociación con otros factores etiológicos, constituye una de las principales indicaciones de trasplante hepático.
- 2- Aunque las tasas de supervivencia a 5 años, tanto del injerto como del paciente, no parecen verse afectadas negativamente por la infección VHC, la mayoría de los pacientes desarrolla hepatitis crónica que progresa a cirrosis y fallo del injerto, hasta en un 30% de los casos en 5 años. Es probable que con seguimientos más prolongados aumente la incidencia de fallo hepático.
- 3- Las variables que mas consistentemente se han asociado con una peor evolución de la hepatitis C del injerto incluyen: (i) niveles elevados de viremia pre-trasplante; (ii) lesión histológica inicial relevante y precoz; (iii) depresión importante del sistema inmune, ya sea a partir de la inmunosupresión de inducción, ya sea a partir de la inmunosupresión de rescate en casos de rechazo.
- 4- La variable claramente no relacionada con la gravedad de la hepatitis C post-trasplante es la coinfección por el virus de la hepatitis G.
- 5- Hoy por hoy, aún existen dudas respecto al papel desempeñado por otra serie de variables sobre la evolución de la hepatitis C del injerto. Estas variables son el genotipo infectante, la edad del donante, la coinfección por el virus de la hepatitis B y la ingesta concomitante de alcohol.
- 6- Uno de los mecanismos implicados en la patogénesis de la lesión hepática inducida por el VHC es la interacción entre el sistema inmune del huésped y la heterogeneidad vírica. En este sentido, la divergencia de la región

hipervariable HVR1 es significativamente mayor en pacientes inmunodeprimidos, tales como los trasplantados hepáticos, que en inmunocompetentes, fundamentalmente en aquellos que desarrollan una hepatitis colestásica grave del injerto. Estos datos sugieren pues que la evolución de las *cuasiespecies* del virus desempeña un papel en la gravedad de la hepatitis C del injerto.

- 7- El empeoramiento de la historia natural de la hepatitis C post-trasplante observado en años recientes es un hecho inquietante que debe ser confirmado por otros centros.

## Bibliografía

1. Annual report of the U.S. Scientific Registry for Transplant Recipients and the Organ Procurement and Transplantation Network-Transplant Data: 1988-1994. Richmond VA, United Network for Organ Sharing and the Division of Organ Transplantation, Bureau of Health Resources Dev.
2. The European Liver Transplant Registry Report. Villejuif: Hôpital Paul Brousse, December 1994.
3. Wright TL, Donegan E, Hsu HH, Ferrell L, Lake JR, Kim M, et al. Recurrent and acquired hepatitis C viral infection in liver transplant recipients. *Gastroenterology* 1992; 103: 317-22.
4. Feray C, Samuel D, Thiers V, Gigou M, Pichon F, Bismuth A, et al. Reinfection of liver graft by hepatitis C virus after liver transplantation. *J Clin Invest* 1992; 89: 1361-1365.
5. Ferrell L, Wright T, Roberts J, Ascher N, Lake J. Hepatitis C viral infection in liver transplant recipients. *Hepatology* 1992; 16: 865-76.
6. Ascher NL, Lake JR, Emond J, Roberts J. Liver transplantation for hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatology* 1994;20:24S-27S .
7. Sallie R, Cohen AT, Tibbs CJ, Portmann BC, Rayner A, O'Grady JG, et al. Recurrence of hepatitis C following orthotopic liver transplantation: a polymerase chain reaction and histological study. *J Hepatol* 1994; 21:536-42.
8. Feray C, Gigou M, Samuel D, Paradis V, Wilber J, David MF, et al. The course of hepatitis C virus infection after liver transplantation. *Hepatology* 1994; 20: 1137-43.
9. Weinstein JS, Poterucha JJ, Zein N, Wiesner RH, Persing DH, Rakela J. Epidemiology and natural history of hepatitis C infections in liver transplant recipients. *J Hepatol* 1995; 22 (Suppl 1): 154-9.
10. Shuhart MC, Bronner MP, Gretch DR, Thomassen LV, Wartelle CF, Tateyama H, et al . Histological and clinical outcome after liver transplantation for hepatitis C. *Hepatology* 1997;26(6):1646-52.
11. Gane E, Portmann B, Naoumov N, Smith HM, Underhill JA, Donaldson PT, et al. Long-Term outcome of hepatitis C infection after liver transplantation. *N Engl J Med* 1996; 334: 815-20.

12. Boker KHW, Dalley G, Bahr MJ, Maschek H, Tillmann HL, Trautwein C, et al. Long-term outcome of hepatitis C virus infection after liver transplantation. *Hepatology* 1997; 25: 203-10.
13. Charlton M, Seaberg E, Wiesner R, Everhart J, Zetterman R, Lake J, et al. Predictors of patient and graft survival following liver transplantation for hepatitis C. *Hepatology* 1998; 28: 823-30.
14. Prieto M, Berenguer M, Rayón M, Córdoba J, Argüello L, Carrasco D, et al. High incidence of allograft cirrhosis in hepatitis C virus genotype 1b infection following transplantation: Relationship with rejection episodes. *Hepatology* 1999; 29: 250-6.
15. Feray C, Caccamo L, Alexander GJM, Ducot B, Gugenheim J, Casanovas T, et al. European Collaborative Study on factors influencing the outcome after liver transplantation for hepatitis C. *Gastroenterology* 1999; 117: 619-25.
16. Berenguer M, Ferrell L, Watson J, Prieto M, Kim M, Rayon M, et al. HCV-related fibrosis progression following liver transplantation: increase in recent years. *J Hepatol* 2000 ; 32: 673-684.
17. Schluger L, Sheiner P, Thung S, Lau JY, Min A, Wolf DC, et al. Severe recurrent cholestatic hepatitis C following orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1996; 23: 971-6.
18. UNOS: Reported deaths on the OPTN waiting list, 1988 to 1994. *UNOS update* 1996; 12: 25.
19. Fukumoto T, Berg T, Ku Y, Bechstein WO, Knoop M, Lemmens HP, et al. Viral dynamics of hepatitis C early after orthotopic liver transplantation: Evidence for rapid turnover of serum virions. *Hepatology* 1996; 24: 1351-4.
20. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992; 327: 1899-1905.
21. Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-362.

22. Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo QL. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 1991;14(2):381-8.
23. Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J. Virology* 1993;67:2832-2843.
24. Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:4942-4946.
25. Ogata N, Alter HJ, Miller RH, Purcell RH. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1991; 88: 3392-96.
26. Okamoto H, Kojima M, Okada S, Yoshizawa H, Izuka H, Tanaka T, Muchmore EE. Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2 year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* 1992; 190: 894-899.
27. Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992;66:3225-3229.
28. Bukh J, Miller R, Purcell R. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Sem Liver Dis* 1995;15(1):41-63.
29. Domingo E, Menendez-Arias L, Quinones-Mateu ME, Holguin A, Gutierrez-Rivas M, Martinez MA, et al. Viral quasispecies and the problem of vaccine-escape and drug-resistant mutants. *Progress in Drug Research* 1997: 48: 99-128.
30. Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, Hall JE, Mason TJ, Saracco G, et al. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:3468-3472.
31. Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, Wong DC, Engle R, Lesniewski RR, et al. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* 1992; 258:135-140.
32. Higashi Y, Kakumu S, Yoshioka K, Wakita T, Mizokami M, Ohba K, et al. Dynamic of genome change in the E2/NS1 region of hepatitis C virus in vivo. *Virology* 1993; 197:659-668.

33. Taniguchi S, Okamoto H, Sakamoto M, Kojima M, Tsuda F, Tanaka T, et al. A structurally flexible and antigenically variable N-terminal domain of the hepatitis C virus E2/NS1 protein: implication for an escape from antibody. *Virology* 1993; 195:297-301
34. Gonzalez-Peralta RP, Quian K, She JY, Davis GL, Ohno T, Mizokami L, Lau JY. Clinical implications of viral quasispecies heterogeneity in chronic hepatitis C. *J Med Virol* 1996; 49: 242-247
35. Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Kurai K, Iizuka H, Machida A, et al. Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolate for conserved and divergent regions. *J Gen Virol* 1991; 72: 2697-2704.
36. Cha T-A, Beall E, Irvine B, Kolberg J, Chien D, Kuo G, Urdea MS. At least five related, but distinct, hepatitis C viral genotypes exist. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:7144-7148.
37. Chan SW, McOmish F, Holmes EC, Dow B, Peutherer JF, Follett E, et al. Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J Gen Virol* 1992; 73:1131-1141.
38. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993;74:2391-2399.
39. Simmonds P, Alberti A, Alter H, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994;19:1321-1324.
40. Lau JYN, Davis GL, Prescott LE, Maertens G, Lindsay KL, Quian K, Mizokami M, Simmonds P and the Hepatitis Interventional Therapy Group. Distribution of hepatitis C virus genotypes determined by line probe assay in patients with chronic hepatitis C seen at tertiary referral centers in the United States. *Ann Intern Med* 1996;124:868-876.
41. Pol S, Thiers V, Noursbaum JB, Legendre C, Berthelot P, Kreis H, Bréchet C. The changing prevalence of hepatitis c virus genotypes: evidence in hemodialyzed patients and kidney recipients. *Gastroenterology* 1995;108:581-3.

42. Brechot C. Hepatitis C virus genetic variability: clinical implications. *Am J Gastroenterol* 1994; 89:S41-S47.
43. Pozzato G, Kaneko S, Moretti M, Croce LS, Franzin F, Unoura M, Bercich L et al. Different genotypes of hepatitis C virus are associated with different severity of chronic liver disease. *J Med Virol* 1994; 43: 291-296.
44. Qu D, Li J-S, Vitviski L, Mechai S, Berby F, Tong SP, Bailly F, et al. Hepatitis C virus genotypes in France: comparison of clinical features of patients infected with HCV type I and type II. *J Hepatol* 1994; 21: 70-75.
45. Sillini E, Bono F, Cividini A, Cerino A, Bruno S, Rossi S, Belloni G, et al. Differential distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with and without liver function abnormalities. *Hepatology* 1995;21:285-90.
46. Sillini E, Bottelli R, Asti M, Bruno S, Candusso ME, Brambilla S, et al. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a case-control study. *Gastroenterology* 1996; 111:199-205.
47. Bruno S, Sillini E, Crosignani A, Borzio F, Leandro G, Bono F, et al. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology* 1997; 25:754-758.
48. Mahaney K, Tedeschi V, Maertens G, Di Bisceglie AM, Vergalla J, Hoofnagle JH, Sallie R. Genotypic analysis of Hepatitis C Virus in American Patients. *Hepatology* 1994; 20:1405-11.
49. Benvegnú L, Pontisso P, Cavaletto D, Noventa F, Chemello L, Alberti A. Lack of correlation between hepatitis C virus genotypes and clinical course of hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatology* 1997;25:211-215.
50. López-Labrador FX, Forns X, Ampurdanés S, Castells A, Bruix J, Sáiz JC, et al. Hepatitis C virus (HCV) genotypes in Spanish patients with chronic HCV infection: relationship between HCV genotype 1b, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1997; 27: 959-65.
51. Nousbaum JB, Pol S, Nalpas B, Landais P, Berthelot P, Bréchet C and the Collaborative Study Group. Hepatitis C virus type 1b (II) infection in France and Italy. *Ann Intern Medicine* 1995; 122:161-8.

52. Barnes E, Webster G, Whalley S, Dusheiko G. Predictors of a favorable response to alpha interferon therapy for hepatitis C. *Clinics in Liver Disease* 1999; 3 (4): 775-91.
53. Kuo G, Choo QC, Alter GL, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244:359-361.
54. McFarlane IG, Smith HM, Johnson PJ, Bray GP, Vergani D, Williams R. Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis: pathogenetic factor or false positive result? *Lancet* 1990; 335:754-757.
55. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, Mosley JW, Peterson DA, Taylor PE, et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first-and second-generation assays. *N Engl J Med* 1991; 325:1325-1329.
56. Younossi Z, McHutchison J. Serological tests for HCV infection. *Viral hepatitis reviews* 1996; 2: 161-73
57. Pawlotski J, Lonjon I, Hezode C, Raynard B, Darthuy F, Remire J, et al. What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories? *Hepatology* 1998;27(6):1700-2.
58. Nakatsuji Y, Matsumoto A, Tanaka E, Ogata H, Kiyosawa K. Detection of chronic hepatitis C virus infection by four diagnostic systems: first-generation and second-generation enzyme-linked immunosorbent assay, second-generation recombinant immunoblot assay and nested polymerase chain reaction analysis. *Hepatology* 1992; 16:300-5.
59. Uyttendaele S, Claeys H, Mertens W, Verhaert H, Vermeylen C. Evaluation of third generation screening and confirmatory assays for HCV antibodies. *Vox Sang* 1994; 66:122-129.
60. Pawlotsky J, Bastie A, Pellet C, Remire J, Darthuy F, Wolfe L, et al. Significance of indeterminate third-generation hepatitis C virus recombinant immunoblot assay. *J Clin Microbiol* 1996; 34:80-3.
61. Berenguer M. and Wright TL. Hepatitis C virus. *Adv Gastroenterol Hepatol Clin Nutr* 1996, 1: 2-21.
62. Garson JA, Ring C, Tuke P, Tedder RS. Enhanced detection by PCR of hepatitis C virus RNA. *Lancet* 1990; 336:878-879.

63. Berenguer M, Olasso V, Córdoba J, Gobernado M, Carrasco D, Berenguer J. Genome detection in liver and in the peripheral blood mononuclear cells: predictor factors of sustained response in patients with chronic hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995, 7: 899-903.
64. Zaaijer HL, Cuypers HT, Reesink HW, Winkel IN, Gerken G, Lelie PN. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet* 1993; 341:722-4 .
65. French Study Group for the Standardization of hepatitis C virus Polymerase Chain reaction. Improvement of hepatitis C virus RNA polymerase chain reaction through a multicentre quality control study. *J Virol Methods* 1994; 49:79-88.
66. Wang J, Wang T, Sheu J, Lin S, Lin J, Chen D. Effects of anticoagulants and storage of blood samples on efficacy of the polymerase chain reaction assay for hepatitis C virus. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 750-3.
67. Busch M, Wilber J, Johnson P, Tobler L, Evans C. Impact of specimen handling and storage on detection of hepatitis C virus RNA. *Transfusion* 1992;32(5):420-25
68. Pawlotsky. Measuring hepatitis C viremia in clinical samples: can we trust the assays. *Hepatology* 1997; 26: 1-4.
69. Urdea MS. Branched DNA signal amplification. *Bio/Technology* 1994; 12:926-927.
70. Ohno T, Lau JYN. The “gold standard” accuracy, and the current concepts: hepatitis C virus genotype and viremia. *Hepatology* 1996; 24: 1312-1315
71. Gretch DR, Corazón de la Rosa MT, Carithers RL, Wilson RA, Williams B, Corey L. Assessment of hepatitis C viremia using molecular amplification technologies: correlations and clinical implications. *Ann Intern Med* 1995; 123: 321-329.
72. Gretch D, Corey L, Wilson J, dela Rosa C, Willson R, Carithers R Jr, et al. Assessment of hepatitis C virus RNA levels by quantitative competitive RNA polymerase chain reaction: high-titer viremia correlates with advanced stage of disease. *J Infect Dis* 1994;169:1219-25.
73. Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai K, Akahane Y, Sugai Y, et al. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol* 1992; 73: 673-679

74. Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, Duhamel M, Vanderborght B, Van Heuverswyn H, Maertens G. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol* 1993; 74: 1093-1102.
75. McOmish F, Yap PL, Dow BC. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 884-892.
76. Battacherjee V, Prescott LE, Pike I, Rodgers B, Bell H, El-Zayadi AR, et al. Use of type-specific peptides to identify type-specific antibodies to hepatitis C virus types 1, 2, 3, 4, 5 and 6. *J Gen Virol* 1995;76:1737-1748.
77. Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. *N Engl J Med* 1996; 334: 1685-1690.
78. Conry-Cantilena C, VanRaden M, Gibble J, Melpolder J, Shakil AO, Viladomiu L, et al. Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1996;334(26):1691-6.
79. Serfaty L, Nousbaum JB, Elghouzzi MH, Giral P, Legendre C, Poupon R. Prevalence, severity and risk factors of liver disease in blood donors positive in a second-generation anti-hepatitis C virus screening test. *Hepatology* 1995; 21: 725-9. 1995
80. Pereira BJ, Wright TL, Schmid CH, Levey AS. A controlled study of hepatitis C transmission by organ transplantation. *Lancet* 1995; 345: 484-7.
81. Esteban JI, Gomez J, Martell M, Cabot B, Quer J, Camps J, et al. Transmission of hepatitis C virus by a cardiac surgeon. *N Engl J Med* 1996;334(9):555-60
82. Bronowicki JP, Venard V, Botte C, Monhoven N, Gastin I, Chone L, et al. Patient-to-patient transmission of hepatitis C virus during colonoscopy. *N Engl J Med* 1997; 337:237-40
83. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 5: 431.
84. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JU, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994; 19:1513-20.
85. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22:696-699.

86. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 1997; 349: 825-32.
87. Berenguer M, Wright TL. Hepatitis B and C viruses: molecular identification and targeted antiviral therapies. *Proc Assoc Am Physicians* 1998;110:98-112.
88. Kiyosawa K, Sodemaya T, Tanaka E, Gibo Y, Yoshizawa K, Nakano Y, et al. Interrelationship of blood donor transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: Analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* 1990;12:671-5.
89. Di Bisceglie AM, Goodman ZD, Ishak KG, Hoofnagle JH, Melpolder JJ, Alter H. Long-term clinical and histopathological follow up of chronic post-transfusion hepatitis. *Hepatology* 1991; 14: 969-74.
90. Prieto M, Olaso V, Verdu C, Córdoba J, Gisbert C, Rayón M, et al. Does the healthy hepatitis C virus carrier state really exist? An analysis using polymerase chain reaction. *Hepatology* 1995; 22: 413-7.
91. Seef LB, Buskell-Bales Z, Wright EC, Durako SJ, Alter HJ, Iber FL, Hollinger FB, Gitnick G, Knodell RG, Perrillo RP, Stevens CE, Hollingsworth CG, and the National Heart, Lung, and Blood Institute Study Group. Long-term mortality after transfusion-associated non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1992;327:1906-11.
92. Prieto M, Berenguer M, Rimola A, Loinaz C, Barrios C, Clemente G, et al. Liver Transplantation in hepatitis C: a Spanish multicenter experience. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; 10: 771-776.
93. DiBisceglie AM. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Sem Liver Diseases* 1995;1:64-9.
94. Alter MJ . Epidemiology of hepatitis C in the West. *Sem Liver dis* 1995; 15: 5-14.
95. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PY, et al. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA* 1990; 264:2231-2235
96. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 1999; 341: 556-62.

97. Kim WR and Dickson ER. The role of prognostic models in the timing of liver transplantation In: Gitlin N, Keefe E (Eds): Clinics in Liver Disease, 1997: 263-279
98. Fattovitch G, Giustina G, Degos F, Tremolada F, Diodati G, Almasio P, et al. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. Gastroenterology 1997; 112: 463-72.
99. Hu KQ, Tong MJ. The long-term outcomes of patients with compensated hepatitis C virus-related cirrhosis and history of parenteral exposure in the United States. Hepatology 1999;29(4):1311-6
100. Serfaty L, Aumaître H, Chazouillères O, Bonnand AM, Rosmorduc O, Poupon RE, Poupon R. Determinants of outcome of compensated hepatitis C virus-related cirrhosis. Hepatology 1998; 27: 1435-40.
101. Poynard T, Moussalli J, Ratzu V, Regimbeau C, Opolon P. Effect of interferon therapy on the natural history of hepatitis C virus-related cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Clinics in Liver Disease 1999; 3 (4): 869-881.
102. Nishiguchi S, Kuroki T, Nakatani S, Morimoto H, Takeda T, Nakajima S, et al. Randomised trial of effects of interferon alfa on incidence of hepatocellular carcinoma in chronic active hepatitis with cirrhosis. Lancet 1995; 346:1051:5- 9.
103. Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K, Takayanagi M, Yoshioka K, Kakumu S, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma and its incidence after interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. Hepatology 1998; 27: 1394-1402.
104. International Interferon- $\alpha$  Hepatocellular Carcinoma Study Group. Effect of interferon- $\alpha$  on progression of cirrhosis to hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study. Lancet 1998; 351: 1535-39.
105. Reichard O, Norkrans G, Frydén A, Braconier JH, Sönnnerborg A, Weiland O for the Swedish Study Group. Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of interferon  $\alpha$ -2b with or without ribavirin for chronic hepatitis C. Lancet 1998; 351: 83-87.
106. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk G, Ideo G et al. Randomised trial of interferon  $\alpha$ 2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon  $\alpha$ 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. Lancet 1998; 352: 1426-32.

107. Davis GL, Esteban-Mur R, Rustgi V, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 1998; 339: 1493-1502.
108. McHutchinson JG, Gordon SC, Schiff ER, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 1998; 339: 1485-92.
109. Pereira B, Wright T, Schmid C, Bryan CF, Cheung RC, Cooper S, et al. Screening and confirmatory testing of cadaver organ donors for hepatitis C virus infection: a US national collaborative Study Group. *Kidney Int* 1994; 46:886-892.
110. Bouthot BA, Murthy BVR, Schmid CH, Levy AS, Pereira BJ. Long-term follow-up of hepatitis C virus infection among organ transplant recipients: implications for policies on organ transplantation. *Transplantation* 1997; 63: 849-53.
111. Laskus T, Wang LF, Rakela J, Vargas H, Pinna AD, Tsamandas AC, et al. Dynamic behavior of hepatitis C virus in chronically infected patients receiving liver graft from infected donors. *Virology* 1996; 220: 171-6.
112. Testa G, Goldstein RM, Netto G, Abbasoglu O, Brooks BK, Levy MF, et al. Long-term outcome of patients transplanted with livers from hepatitis C-positive donors. *Transplantation* 1998; 65: 925-9.
113. Vargas HE, Laskus T, Wang LF, Lee R, Radkowski M, Dodson F, et al. Outcome of liver transplantation in hepatitis C virus-infected patients who received hepatitis C virus-infected grafts. *Gastroenterology* 1999; 117: 149-53.
114. Vento S, Garofano T, Renzini C, et al. Fulminant hepatitis associated with hepatitis A virus superinfection in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 1998; 338: 286-90.
115. Berenguer M and Wright TL. Are HCV-infected individuals candidates for hepatitis A vaccine? *Lancet* 1998; 351 (9107): 924-925.
116. Gretch D, Bacchi C, Corey L, dela Rosa C, Lesniewski RR, Kowdley K, et al. Persistent hepatitis C virus infection after liver transplantation: clinical and virological features. *Hepatology* 1995; 22: 1-9.

117. Everhart JE, Wei Y, Eng H, Charlton MR, Persing DH, Wiesner RH, et al. Recurrent and new hepatitis C virus infection after liver transplantation. *Hepatology* 1999;29(4):1220-6
118. Zucker K, Cirocco R, Roth D, Olson L, Burke GW, Nery J, et al. Depletion of hepatitis C virus from procured kidneys using pulsatile perfusion preservation. *Transplantation* 1994; 57: 832-40.
119. Lock ASF, Chien D, Choo Q-L, Chan TM, Chiu EK, Cheng IK, et al . Antibody response to core, envelope and nonstructural hepatitis C virus antigens: comparison of immunocompetent and immunosuppressed patients. *Hepatology* 1993; 18: 497-502.
120. Donegan E, Wright T, Roberts J, Ascher NL, Lake JR, Neuwald P, et al. Detection of hepatitis C after liver transplantation. Four serologic tests compared. *Am J Clin Pathol* 1995; 104: 673-679.
121. Davies SE, Portmann BC, O'Grady JG, Aldis PM, Chaggar K, Alexander GJM, Williams R. Hepatic histological findings after transplantation for chronic hepatitis B virus infection, including a unique pattern of fibrosing cholestatic hepatitis. *Hepatology* 1989; 13: 150-157.
122. Samuel D, Muller R, Alexander G, Fassati L, Ducot B, Benhamou JP, Bismuth H. Liver transplantation in European patients with the hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med* 1993; 329: 1842-7.
123. Chazouilleres O, Kim M, Combs C, Ferrell L, Bacchetti P, Roberts J, et al. Quantitation of Hepatitis C Virus RNA in Liver Transplant Recipients. *Gastroenterology* 1994; 106: 994-9.
124. Gane EJ, Naoumov NV, Qian KP, Mondelli MU, Maertens G, Portmann BC, et al. A longitudinal analysis of hepatitis C virus replication following liver transplantation. *Gastroenterology* 1996; 110: 167-77.
125. Detre K. Liver transplantation for chronic viral hepatitis. AASLD Single Topic Conference, Reston, Va, 1995.
126. M Berenguer y FX Lopez-Labrador. Coinfección por el virus de la hepatitis C y el virus de la inmunodeficiencia humana: implicaciones clínicas y biológicas; *Medicina Clin* 1999; 113:28-35.

127. Pol S, Fontaine H, Carnot F, Zylberberg H, Berthelot P, Brechot C, Nalpas B. Predictive factors for development of cirrhosis in parenterally acquired chronic hepatitis C: a comparison between immunocompetent and immunocompromised patients. *J Hepatol* 1998;29:12-19.
128. Heintges T, Wands JR. Hepatitis C virus: epidemiology and transmission. *Hepatology* 1997; 26: 521-6.
129. Duvoux C, Pawlotsky JM, Cherqui D, Van Nhieu JT, Metreau JM, Fagniez PL, et al. Serial quantitative determination of hepatitis C virus RNA levels after liver transplantation: a useful test for diagnosis of hepatitis C virus reinfection. *Transplantation* 1995; 60: 457-461.
130. Rosen H, O'Reilly P, Shackleton C, McDiarmid S, Holt C, Busuttil RW, Martin P. Graft loss following liver transplantation in patients with chronic hepatitis C. *Transplantation* 1997; 62: 1773-6.
131. Feray C, Gigou M, Samuel D, Paradis V, Mishiro S, Maertens G, et al. Influence of genotypes of hepatitis C virus on the severity of recurrent liver disease after liver transplantation. *Gastroenterology* 1995; 108: 1088-96.
132. Zhou S, Terrault N, Ferrell L, Hahn JA, Lau JY, Simmonds P, et al. Severity of liver disease in liver transplantation recipients with hepatitis C virus infection: relationship to genotype and level of viremia. *Hepatology* 1996; 24: 1041-6.
133. Gayowski T, Singh N, Marino I, Vargas H, Wagener M, Wannstedt C, et al. Hepatitis C virus genotypes in liver transplant recipients: impact on posttransplant recurrence, infections, response to interferon-alpha and outcome. *Transplantation* 1997; 64: 422-426.
134. DiMartino V, Saurini F, Samuel D, Gigou M, Dussaix E, et al. Long-term longitudinal study of intrahepatic hepatitis C virus replication after liver transplantation. *Hepatology* 1997; 26: 1343-50.
135. Doughty AL, Spencer JD, Cossart YE, McCaughan GW. Cholestatic hepatitis after liver transplantation is associated with persistently high serum hepatitis C virus RNA levels. *Liver Transpl Surg* 1998; 4:15-21.
136. López-Labrador FX, Ampurdanès S, Giménez-Barcons M, Sánchez-Tapias JM, Rodés J, Sáiz JC. Relationship of the genomic complexity of hepatitis C virus with

- liver disease severity and response to interferon in patients with chronic HCV genotype 1B infection. *Hepatology* 1999; 29: 897-903.
137. Yun Z, Barkholt L, Sonnerborg A. dynamic analysis of hepatitis C virus polymorphism in patients with orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1997;64:170-172.
  138. Gretch DR, Polyak SJ, Wilson JJ, Carithers RL Jr, Perkins JD, Corey L. Tracking hepatitis C virus quasispecies major and minor variants in symptomatic and asymptomatic liver transplant recipients. *J Virol* 1996;70:7622-7631.
  139. Sullivan DG, Wilson JJ, Carithers RL Jr, Perkins JD, Gretch DR. Multigene tracking of hepatitis C virus quasispecies after liver transplantation: correlation of genetic diversification in the envelope region with asymptomatic or mild disease patterns, *J Virol* 1998;72:10036-10043.
  140. Pessoa MG, Bzowej NH, Berenguer M, Phung Y, Kim M, Ferrell L, et al. Evolution of hepatitis C (HCV) quasispecies in patients with severe cholestatic hepatitis following liver transplantation. *Hepatology* 1999; 30: 1513-20.
  141. Hassoba HM, Bzowej NH, Berenguer M, Kim M, Phung Y, Zhou S, et al. Evolution of viral quasispecies in interferon treated patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatology* (en prensa).
  142. Manez R, Mateo R, Tabasco J, Kusne S, Starzl TE, Duquesnoy RJ. The influence of HLA donor-recipient compatibility on the recurrence of HBV and HCV hepatitis after liver transplantation. *Transplantation* 1994; 59: 640-2.
  143. Vargas H, Laskus T, Wang LF, Radkowski M, Poutous A, Lee R, et al. The influence of hepatitis C virus genotypes on the outcome of liver transplantation. *Liver Transpl Surg* 1998; 4: 22-7.
  144. Rosen HR, Gretch DR, Oehlke M, Flora KD, Benner KG, Rabkin JM, Corless CL. Timing and severity of initial hepatitis C recurrence as predictors of long-term liver allograft injury. *Transplantation* 1998; 65: 1178-82.
  145. Casavilla FA, Rakela J, Kapur S, Irish W, McMichael J, Demetris AJ, et al. Clinical outcome of patients infected with hepatitis C virus infection on survival after primary liver transplantation under tacrolimus. *Liver transpl Surg* 1998; 4: 448-54.

146. Platz KP, Mueller AR, Willimski C, Mansoorian B, Berg T, Neuhaus R, et al. Indication for mycophenolate mofetil therapy in hepatitis C patients undergoing liver transplantation *Transplant Proc* 1998;30(5):2232-3.
147. Sheiner PA, Schwartz ME, Mor E, Schluger LK, Theise N, Kishikawa K, et al. Severe or multiple rejection episodes are associated with early recurrence of hepatitis C after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1995; 21: 30-4.
148. Berenguer M, Prieto M, Córdoba J, Rayon JM, Carrasco D, Olaso V, et al. Early development of chronic active hepatitis in recurrent hepatitis C virus infection after liver transplantation: association with treatment of rejection. *J Hepatol* 1998; 28: 756-63.
149. Rosen HR, Shackleton CR, Higa L, Gralnek IM, Farmer DA, McDiarmid SV, et al. Use of OKT3 is associated with early and severe recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 1453-7.
150. Fong TL, Valinluck B, Govindarajan S, Charboneau F, Adkins RH, Redeker AG. Short-term prednisone therapy affects aminotransferase activity and hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1994; 107: 196-99.
151. Vento S, Cainelli F, Mirandola F, Cosco L, Perri G, Solbiati M, et al. Fulminant hepatitis on withdrawal of chemotherapy in carriers of hepatitis C virus. *Lancet* 1996; 347: 92-93.
152. Berenguer M, Terrault NA, Piatak M, Yun A, Kim JP, Lau JY, et al. Hepatitis G virus infection in patients with hepatitis C virus infection undergoing liver transplantation. *Gastroenterology* 1996; 111: 1569-75.
153. Huang E, Wright TL, Lake J, Combs C, Ferrell LD. Hepatitis B and C coinfections and persistent hepatitis B infections: clinical outcome and liver pathology after transplantation. *Hepatology* 1996; 23: 396-404.
154. Rosen H, Chou S, Corless C, Gretch DR, Flora KD, Boudousquie A, et al. Cytomegalovirus viremia. Risk factor for allograft cirrhosis after liver transplantation for hepatitis C. *Transplantation* 1997; 64: 721-6.
155. Wright TL, Combs C, Kim M, Ferrell L, Bacchetti P, Ascher N, et al. Interferon alpha therapy for hepatitis C virus infection following liver transplantation. *Hepatology* 1994; 20: 773-9.

156. Feray C, Samuel D, Gigou M, Paradis V, David MF, Lemonnier C, et al. An open trial of interferon alfa recombinant for hepatitis C after liver transplantation: antiviral effects and risk of rejection. *Hepatology* 1995; 22: 1084-9.
157. Dousset B, Conti F, Houssin D, Calmus Y. Acute vanishing bile duct syndrome after interferon therapy of recurrent HCV infection in liver transplant recipients. *N Engl J Med* 1994; 330: 1160-1161.
158. Singh N, Gayowski T, Wannstedt CF, Marino IR, Wagener MM. Interferon-alpha therapy for hepatitis C virus recurrence after liver transplantation: long-term response with maintenance therapy. *Clin Transplantation* 1996; 10: 348-51.
159. Vargas V, Charco R, Castells L, Esteban R, Margarit C. Alpha-interferon for acute hepatitis C in liver transplant patients. *Transplant Proc* 1995; 27: 1222-3.
160. Boillot O, Berger F, Rasolofo E, Mion F, Chevallier P, Gille D, Paliard P. Effectiveness of early alpha-interferon therapy for hepatitis C virus infection recurrence after liver transplantation. *Transpl Int* 1996; 9 Suppl 1:S202-3.
161. Di Bisceglie AM, Conjeevaram HS, Fried MW, Sallie R, Park Y, Yurdaydin C, et al. Ribavirin as therapy for chronic hepatitis C. *Ann Intern Med* 123:897-903,1995.
162. Cattral MS, Hemming AW, Wanless IR, Al Ashgar H, Krajden M, Lilly L, et al. Outcome of long-term ribavirin therapy for recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Transplantation* 1999; 67: 1277-80.
163. Gane EJ, Lo SK, Riordan SM, Portmann BC, Lau JY, Naoumov NV, Williams R. A randomized study comparing ribavirin and interferon alfa monotherapy for hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Hepatology* 1998; 27: 1403-07.
164. Bizollon T, Palazzo U, Ducerf C, Chevallier M, Elliott M, Baulieux J, et al. Pilot study of the combination of interferon alfa and ribavirin as therapy of recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Hepatology* 1997; 26: 500-4.
165. Bizollon T, Ducerf C, Chevallier M, Adahm M, Baulieux J, Trepo C. Long-term efficacy of ribavirin plus IFN in the treatment of HCV recurrence after OLT. 11<sup>th</sup> Congress of the European Society for Organ Transplantation. Oslo 1999; June 19-24: Abs 20.

166. Sheiner P, Boros P, Klion FM, Thung SN, Schluger LK, Lau JYN, et al. The efficacy of prophylactic interferon alfa-2b in preventing recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Hepatology* 1998; 28: 831-8.
167. Singh N, Gayowski T, Wannstedt C, Shakil AO, Wagener MM, Fung JJ, Marino IR. Interferon- $\alpha$  for prophylaxis of recurrent viral hepatitis C in liver transplant recipients. *Transplantation* 1998; 65: 82-6.
168. Mazzaferro V, Regalia E, Pulvirenti A, Tagger A, Andreola S, Pasquali M, et al. Prophylaxis against HCV recurrence after liver transplantation. Effect of interferon and ribavirin combination. *Transpl Proc* 1997; 29: 519-21.
169. Rosen HR, Martin P. Hepatitis C infection in patients undergoing liver retransplantation. *Transplantation* 1998; 66: 1612-1616.
170. Sheiner PA, Schluger LK, Emre S, Thung SN, Lau JY, Guy SR, et al. Retransplantation for recurrent hepatitis C. *Liver Transpl Surg* 1997; 3: 130-6.
171. Rosen HR, Madden JP, Martin P. A model to predict survival following liver retransplantation. *Hepatology* 1999;29:365-70.