

LA HEPATITIS C EN LA ACTUALIDAD

H. Armas Ramos

Pediatría. HUC. Facultad de Medicina. La Laguna

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) constituye un problema socio sanitario mundial, calculándose actualmente unos 150 millones de personas afectas, con una prevalencia zonal variable, que en España alcanza el 2-3%, pero cuyas cifras pueden oscilar entre los 200.000 y 60 millones de infectados, como ocurre en Australia y nordeste de China, respectivamente.

Los estudios epidemiológicos en países industrializados responsabilizan al VHC del 20% de las hepatitis agudas y del 70% de las crónicas, siendo el responsable del 40% de las cirrosis y del 60% de los hepatocarcinomas del adulto (1).

La prevalencia de esta infección en edad pediátrica es relativamente más baja, en orden a que las vías de transmisión viral (transfusiones de sanguíneas, hemodiálisis, drogadicción parenteral) son menos frecuentes que en el adulto, habiendo disminuido el riesgo postransfusional al 0.1%, aunque el riesgo de transmisión vertical perinatal persiste en torno al 5-6% (en el caso de madres con antiVHC únicamente), al 14-17% (en madres coinfectadas con VIH), o al 50% (si la madre presenta ARN-VHC en el momento del parto) (2).

Desde la identificación en 1988 por Houghton y cols., del virus ARN responsable se ha podido demostrar su gran heterogeneidad genética y su alta tasa mutacional, hasta el punto de que hoy en día se reconocen hasta 6 genotipos y más de 50 subtipos diferentes del VHC (3).

La historia evolutiva natural de la infección por VHC no es bien conocida. La forma de presentación puede ser aguda, subaguda o prolongada, y con importante progresión a la cronicidad (30-60%). También es posible que el huésped desarrolle un estado de portador asintomático, y es infrecuente la complicación con hepatitis fulminante. En el curso de una infección adquirida por transmisión vertical, el nivel de remisión espontánea a partir del 2º año, solo alcanza el 14-20%.

En comparación con los pacientes adultos, la hepatitis crónica por VHC en niños cursa con niveles bajos, aunque fluctuantes, tanto de transaminasas como de

ARN-VHC, y se asocia con daño histológico, e inmuoquímico, más moderado. Sin embargo, el 40% de los pacientes presentan actividad necro-inflamatoria entre leve y moderada y, aunque raramente, es posible hallar cirrosis a esta edad (2).

El diagnóstico de infección perinatal por VHC se basa en el hallazgo de niveles elevados de transaminasas y en la presencia de ARN-VHC en suero, al menos, en dos muestras tras el segundo mes de vida, ya que se han descrito viremias transitorias en los primeros meses (4). La positividad de anticuerpos frente al VHC debería investigarse a partir del primer año del lactante, para obviar así los anticuerpos maternos circulantes transferidos. La técnica comunmente empleada es el inmunoanálisis, siendo el ELISA de 3ª generación el de mayor sensibilidad y especificidad. Su positividad debiera ser confirmada mediante un test inmunoblot recombinante (RIBA-3). Cuando proceda, se determinará la presencia de de ARN del virus VHC en suero, y/o en tejido hepático, y/o leucocitos. En los candidatos a tratamiento, el diagnóstico se completa con la determinación del genotipo y la cuantificación de ARN-VHC o carga viral, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .

Después del diagnóstico virológico, dada la escasa relación clínico-analítica-histológica, es imprescindible el estudio anatomopatológico del tejido hepático obtenido por biopsia para analizar la actividad lesional, y poder hacer una evaluación pronóstica e indicación terapéutica. Son los grados de inflamación/necrosis y el estadio de fibrosis del tejido, los que pueden orientar sobre el riesgo de cirrosis. No obstante, en población adulta, parece ser que el 80% de pacientes con ARN-VHC en suero, carga viral <800.000 U.I. y transaminasas normales de forma persistente, presentarán biopsias normales o con lesiones mínimas, mientras que el 50% de los afectos con hipertransaminemia y carga viral >800.000 U.I. suelen presentar lesiones hepáticas de moderada a intensa evidentes (5).

En 1986, Hoofnagle y cols. demostraron por primera vez, en un grupo de pacientes con hepatitis crónica no-A no-B, que el interferón (IFN) era capaz de normalizar las transaminasas durante períodos prolongados. Desde entonces, han sido publicados más de un centenar de estudios confirmando la capacidad de IFN para reducir los índices de citólisis hepática y mejorando el cuadro histológico. La experiencia actual en adultos permite calcular que los beneficios obtenidos durante el período intratamiento en el 50-60% de los pacientes crónicos, se siguen manteniendo a largo plazo en el 20% de ellos, constatándose en niños hasta del 40%.

Aunque el claro objetivo terapéutico consistiría en conseguir la erradicación del virus mediante la inhibición de su replicación para descender su actividad citolítica, todavía no hay consenso en la decisión de tratar a todos los niños infectados, pero considerando la baja tasa de remisión espontánea de la enfermedad y su posible agresividad hepática, serían candidatos para terapia antiviral los niños con **replicación viral, elevación de transaminasas y hepatitis crónica activa**.

En el transcurso de la Conferencia de Consenso del National Institute of Health Americano, de 1996, se estandarizó la definición de la respuesta en la hepatitis crónica

C al IFN, sobre la base de la normalización de las transaminasas séricas, o de la negativización del ARN-VHC mediante PCR a un cut-off de sensibilidad entre 102-103 copias de genomas por ml.

Ambos parámetros combinados, definen la respuesta terapéutica una vez valorados al final del período del tratamiento (RFT), o a los 6 meses de seguimiento post-finalización de la terapia (RS o respuesta sostenida).

Los numerosos estudios publicados hasta el momento actual han intentado detectar una serie de características clínicas, histológicas y virológicas, como factores predictivos que se asocian a una mayor respuesta a la terapia con IFN:

- Farmacológicas: Dosis de IFN > 9 MU/semanales. Respuesta precoz a las 2-4 semanas del inicio (normalización de transaminasas y negativización de la viremia).
- Demográficas: Edad joven. Breve duración de la infección.
- Histológicas: Ausencia de cirrosis y bajo estadio de fibrosis hepática.
- Bioquímicas: Bajos niveles de gammaGT, sideremia y ferritina.
- Viroológicas: Baja carga viral (<800.000 MU en PCR). Genotipos 2 ó 3. Reducida heterogeneidad de la quasispecie. Múltiples mutaciones de la región ISDR del NS5A

En un meta-análisis de todos los tratamientos con INF realizados hasta 1996, Poynard y cols. (6) llegan a la conclusión de que la mejor relación coste-beneficio para un primer ciclo de tratamiento, se obtiene con una dosis de 3 MU tres veces por semana durante doce meses.

Estudios más recientes, incrementan el porcentaje de RFT (respuesta al final del tratamiento) y sobre todo de RS, (respuesta sostenida a los seis meses de seguimiento) estableciendo un acercamiento inicial en base a los factores predictivos de respuesta antes mencionados, modulándolo con posterioridad en relación con la respuesta virológica. Otros estudios investigan la eficacia del uso de altas dosis de inducción y de la terapia diaria.

Estas evidencias iniciales apuntan a que una terapia de inducción a dosis elevadas podría superar la resistencia inicial al IFN de algunos tipos virales. Se puede también suponer que, después de la inducción, la supresión inducida en la replicación del VHC podría mantenerse con bajas dosis de IFN (3 MU días alternos) durante períodos de 24-48 semanas. Hasta este momento, todavía no existen evidencias satisfactorias que aboguen, en ninguna categoría de pacientes con hepatitis por VHC, por el empleo en la práctica clínica diaria de dosis superiores a los 6 MU a días alternos.

El bajo porcentaje de RS que se obtiene con el IFN como monoterapia en los pacientes con hepatitis crónica por VHC, ha supuesto que se valoren múltiples actitudes terapéuticas, en ocasiones de forma aislada, pero fundamentalmente en asociación con

IFN. De todos ellos, la ribavirina (RIBA) es el fármaco más empleado, un nucleósido análogo purínico sintético, que tras incorporarse a la célula se fosforila, ejerciendo múltiples acciones in vitro sobre múltiples virus, sin desarrollo aparente de resistencias, probablemente por su efecto viroestático intracelular e inmunomodulador. Fue Brillanti y cols (7) los primeros que decidieron tratar a un grupo de pacientes recidivantes al IFN asociando RIBA, alcanzando RS en algunos de ellos. Posteriormente, Poynard (8), Mc Hutchison (9), y Weiland (10), entre otros, han demostrado que la terapia combinada era más efectiva que el INF solo.

La elección de los pacientes para terapia combinada ha de ser individualizada, teniendo en cuenta múltiples circunstancias como la edad, el estado general, el riesgo de progresión a cirrosis, la probabilidad de respuesta, y hasta el efecto negativo que la terapia pueda suponer en la calidad de vida, siendo fundamental dos variables a considerar: La lesión histológica y el genotipo y la carga viral.

Existen datos que permiten esclarecer una mayor eficacia terapéutica en pacientes con hepatitis crónicas moderadas y severas, y menor acción en casos con lesiones leves o con cirrosis. Los pacientes afectos de genotipo 1 y carga viral >800.000 UI ARN-VHC/ml (por PCR), tienen menos probabilidades a obtener RS.

Los efectos secundarios probables del tratamiento combinado son los siguientes: Síndrome pseudogripal, astenia-anorexia, dispepsia-náuseas, leucopenia-trombopenia, disfunción tiroidea, trastornos del carácter-insomnio (a causa del IFN); y anemia hemolítica, uremia, disnea, tos, dispepsia-epigastralgia (por la RIBA).

Las contraindicación fundamental para iniciar el tratamiento con RIBA es la de cualquier tipo de anemia por su efecto hemolítico. Su uso en menores de 18 años debe ser individualizado.

Las pautas terapéuticas más consensuadas se pueden resumir en el momento actual en:

1.- Pacientes no tratados previamente: Deben ser tratados con IFN en dosis de 3-5 MU /m² de superficie tres veces por semanas en inyecciones subcutaneas, y RIBA en dosis de 1.000 mg, por vía oral repartido en dos dosis, durante 24 semanas (para genotipos 2-3) ó 48 semanas (para genotipos 1).

Para prevenir el síndrome pseudogripal se aconseja tomar dos horas antes del INF, paracetamol, y control analítico mensual (hemograma y bioquímica hepática) y trimestral (hormonas tiroideas, PCR y carga viral del VHC).

2.- Pacientes recidivantes: IFN+RIBA durante 24 semanas más.

3.- Pacientes no respondedores al IFN: IFN+RIBA durante 48 semanas, con lo que según series en adultos se puede conseguir hasta un 16% de RS.

Alternativas venideras

La lucha por conseguir un mayor porcentaje de RS, justifica la búsqueda de alternativas terapéuticas que sean capaces de mejorar los resultados actuales, bien asociando otros antivíricos (amantadina) o bien empleando una nueva formulación de

IFN pegilado. Se trata de una molécula de polietilenglicol unida a otra de IFN en proporción 1/1, que prolonga la vida media del IFN convencional de 4 a 40 horas, lo que permite su administración una vez a la semana. Un reciente ensayo recomienda como dosis 1,5 mg/Kg semanal.

También se están ensayando agentes terapéuticos inhibidores de las enzimas víricas (antiproteasas, antihelicadas, antipolimerasas) y análogos de los nucleósidos antisentido diseñados para actuar sobre el ARN del VHC inhibiendo su replicación. Asimismo, se ha comunicado la eliminación del ARN-VHC de los hepatocitos infectados por la acción de los ribozimas, y se está evaluando el posible efecto de las citocinas (IL-1, IL-2) y sus moduladores, con resultados prometedores (1).

BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez E. *Tratamiento actual de la hepatitis crónica por virus C*. Gastroenterol Práctica 2001; 10:4-9
2. Ruiz Moreno M, Leal A, Millán A. *Hepatitis víricas*. An Esp Pediatr 2000; 52 (supl 5):245-50
3. Reherrmann B, Jeeff LB, Hoofnagle JH. *Pathogenesis, natural history, treatment and prevention of hepatitis C*. Ann Intern Med 2000; 132:296-305
4. Ohto H, Terazawa S, Sasaki N, Hino K, Ishiwata C, Kako M, et al. *Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants*. N Engl Med J 1994; 330:744-50
5. EASL International Consensus Conference on hepatitis C. Consensus Statement. J Hepatol 1999; 30:956-61
6. Poynard T, Leroy V, Cohard M, Thevenot T, Mathurin P, Opolon P, Zarsky JP. *Meta-analysis of interferon randomised trials in the treatment of viral hepatitis C: effects of dose duration*. Hepatology 1996; 24:778-89
7. Brillanti S, Garson J, Foli M, Whitbyk, Deaville R, Masci C et al. *A pilot study of combination therapy with ribavirin plus interferon alfa for interferon alfa resistant chronic hepatitis C*. Gastroenterology 1994; 107:812-7
8. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Niederau C, Minuk GS, Ideo G et al. *Randomized trial of interferon alfa-2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks, versus interferon alfa 2 plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus*. Lancet 1998; 352:1426-32
9. Hutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rutszy VK, et al. *Interferon alpha-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C*. N Engl Med J 1998; 339:1485-92.
10. Weiland O. *Treatment of naive patients with chronic hepatitis C*. J Hepatol 1999; 31 (supl 1):168-73

GENÉTICA MOLECULAR EN PEDIATRÍA

R. López Almaraz, J.P. González Díaz

*Servicio de Pediatría
Hospital Universitario de Canarias. La Laguna.*

INTRODUCCIÓN

Durante la última década, el mundo científico en general y la medicina en particular, con la aparición de la Biología Molecular, han sido testigos de los avances tecnológicos más espectaculares (1).

Las enfermedades en la edad pediátrica pueden ser de origen genético, ambiental ó ambas (2), de ahí que los avances en su investigación genética prometen grandes pasos en el diagnóstico, prevención y tratamiento de muchas de éstas enfermedades infantiles (3).

La secuencia del genoma humano se ha completado esencialmente en este último año y de forma paralela las publicaciones científicas citan los descubrimientos de nuevos genes responsables de enfermedades, nuevos métodos diagnósticos é incluso nuevas perspectivas terapéuticas (1).

Aunque los pediatras hayamos estado familiarizados con diversos estudios genéticos en indicaciones puntuales y específicas, con el advenimiento de las nuevas generaciones de tecnología genética, disponemos ya sea a nivel local ó en centros de referencia nacionales ó internacionales, de los medios para realizar estudios de cribado neonatal, tests de cribado de portadores y predictivos de enfermedades de aparición tardía (3).

Dado lo novedoso y complejo de la Genética Molecular en Pediatría, nos centraremos en conceptos generales y en posteriores artículos trataremos hechos específicos dentro de la amplia patología infantil.

CONCEPTOS GENERALES

Antes de solicitar un estudio de una enfermedad de origen genético debemos conocer si es monogénica (por ejemplo: Fibrosis quística) ó poligénica (por ej: Diabetes Méllitus tipo 1), saber si el presunto gen ó genes son conocidos (por ej: Prader-Willi) ó desconocidos, y si es así, ver si hay otros genes próximos al ignorado que se

utilizarán como marcadores próximos (por ej: HLA y Diabetes Méllitus tipo 1) ó el gen es totalmente desconocido (por ej: la mayoría de los trastornos del crecimiento) (2,3).

- 1) *Genes a estudiar:* antes de solicitar un análisis genético, habría que definir el gen que se quiere estudiar. Esto lo realizará previamente el clínico, tras un análisis cuidadoso de los síntomas, signos y exploraciones complementarias concretará el trastorno bioquímico ó la enfermedad que nos sugiere, orientando al posible gen alterado. Si ésto no es así no se sabrá lo que se quiere estudiar y se perderá en tiempo y el dinero.
- 2) *Material de estudio:* los ácidos nucleicos de la célula son el ADN genómico y el ARN formado a su vez por ARN ribosómico (ARNr), ARN de transferencia (ARNt) y ARN mensajero (ARNm). El ADN genómico está en todas las células por igual e incluye todo el ADN, con sus intrones y con sus exo-nes. El ARNr resulta de la transcripción de los exones del ADN genómico en ARN.

En el laboratorio, utilizando una reacción de retrotranscripción, se puede hacer “in vitro” ADN complementario (ADNc) a partir del ARNm de la células. Como el ADNc deriva del ARN, su estructura estará formada solamente por los exones (sin intrones).

Un estudio genético se puede realizar a partir del ADN genómico ó ARN mensajero (ó ADNc, que puede ser un parámetro indirecto de ARNm).

El ADN genómico nos dará información de las características estructurales de un gen (ej: si existe ó no una mutación); pero no nos indicará como esta mutación está implicada en el transtorno celular. Por otro lado el estudio de ARNm nos dará una información más funcional de la célula (indicará su capacidad funcional en la producción de una proteína).

El ADN genómico está en todas la células del organismo, por el contrario el ARNm se encuentra sólo en las células en las que ese gen se expresa, es decir aquellas que producen la proteína.

Hay dos tipos de mutaciones:

- Mutaciones germinales (aquellas que están en todas las células y se transmiten a la generación siguiente), y que son la mayoría; y
- Mutaciones somáticas (aquellas que aparecen de novo en un individuo y que sólo están en algún tipo celular del mismo). Las mutaciones somáticas generalmente no se transmiten salvo que la mutación haya sido en los gametos.

La mayoría de las mutaciones (ó cambios estructurales del ADN) son germinales y por lo tanto se pueden detectar en todas las células del organismo, y se pueden estudiar en cualquier tipo celular. Por este motivo se emplean células nucleadas de la sangre para extraer el ADN genómico; ya que son las células de más fácil acceso. Sólo en caso de mutaciones somáticas, en que sólo un tejido está alterado, es necesario

extraer el ADN genómico del propio tejido afectado (ej: en algunos tumores); ya que en sangre total no detectaríamos la mutación. También si queremos estudiar el ARNm de un tejido, para ver como una mutación incide en la funcionalidad de una célula tendremos que extraerlo del órgano específico (3,4).

3) *Condiciones de extracción y envío de la muestra:* Para realizar un estudio genético se debe contactar siempre y previamente con el centro de referencia que lo realizará, donde nos indicarán la información clínica necesaria, el tiempo aproximado y las condiciones para hacer el estudio. También nos indicarán el tipo de muestras, las condiciones de extracción del material para estudio y la forma de envío.

Hay que saber que el ADN es bastante estable y no es muy problemático el envío de una muestra sanguínea para su estudio, sin embargo el ARN es muy lábil y las condiciones de extracción de la muestra y del envío deben ser muy estrictas.

Normas generales:

- Se necesita sangre total sin coagular y sin separar (para extraer ADN genómico).
- Se sacarán aproximadamente 10 ml de sangre total en uno ó dos tubos con anticoagulante EDTA (tubos lila); la cantidad podría ser menor si se trata de niños pequeños (incluso con 5 ml podría ser suficiente).
- Se enviará la muestra en el día de la extracción (ó en un servicio 24 horas) al laboratorio de estudio. Se puede enviar a temperatura ambiente si no hace mucho calor y si no se enviará refrigerada.
- Si no se puede mandar en el día, mantener en nevera no más de 24-48 horas. Si no es posible en las 24-48 horas se podría en algunos casos congelar al menos a -20°C (lo mejor en nitrógeno líquido, a -170°C , ó al menos en congeladores de -80°C) y después, cuando se pueda se enviará congelada (en nieve carbónica). Si se congela la muestra, ha de tenerse la precaución de cambiar previamente la sangre del tubo de extracción (generalmente de cristal) a un tubo de plástico que aguante la congelación (el cristal puede estallar al congelarlo).

También se podría extraer el ADN en el laboratorio de Genética ó de Inmunología de nuestro centro, y mandarlo posteriormente.

- Se debe etiquetar perfectamente el tubo de sangre con el nombre y apellidos del individuo. Generalmente los estudios genéticos se realizarán a la familia completa (caso, padres, hermanos e hijos) y sí es así habría que planificar la extracción de la muestra al mayor número posible de familiares el mismo día para enviarlas juntas. Es importante disponer del material de los padres ó hermanos sanos para concluir un estudio genético.

- Si se quiere hacer estudio de ARN ó se quiere estudiar un tejido (por ej: un tumor) es importante congelar el mismo inmediatamente a la extracción; pero como indicábamos anteriormente el ARN es muy lábil, por lo que es imprescindible contactar con el laboratorio previamente para obtener las indicaciones precisas.
- Se debe enviar un resumen de los datos clínicos del niño con la sospecha del trastorno genético y algunos datos fundamentales del paciente (4).

En resumen, la indicación de un análisis genético y la aproximación al gen a estudiar debe realizarla el pediatra en función de la historia clínica y de las exploraciones complementarias realizadas previamente al niño. Los análisis genéticos son muy caros y complicados por lo que es fundamental transmitir al laboratorio de referencia una orientación adecuada del paciente, para conseguir con éxito el estudio del posible gen alterado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Castaño L, Bilbao JR. *Introducción a la Biología Molecular y aplicación a la Pediatría (1): Conceptos básicos*. An Esp Pediatr 1996; 45:315-320.
2. Del capítulo *Genética molecular en Pediatría*: Committee on Bioethics. Ethical issues with genetic testing pediatrics. Pediatrics 2002; 107:1451-1455.
3. Castaño L. *Uso de la biología molecular en Endocrinología pediátrica*. An Esp Pediatr 2000; 52 (supl 1):23-25.
4. Grupo de trabajo de Genética Molecular. S.E.E.P. *Material para estudios de Genética molecular y datos del paciente*. En: S.E.E.P. (eds). *Genética molecular en la Endocrinología Pediátrica*. 1ª ed. 2001; 55-61.