



Hepatitis C en Córdoba: Implicancias de la coinfección HIV/HCV y cambios locales en el perfil epidemiológico molecular

Adrián Alejandro Farías.

Tesis - Doctor en Ciencias de la Salud - Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas. Secretaría de Graduados en Ciencias de la Salud

Aprobada: Diciembre de 2013

Este documento está disponible para su consulta y descarga en RDU (Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba). El mismo almacena, organiza, preserva, provee acceso libre y da visibilidad a nivel nacional e internacional a la producción científica, académica y cultural en formato digital, generada por los miembros de la Universidad Nacional de Córdoba. Para más información, visite el sitio <https://rdu.unc.edu.ar/>

Esta iniciativa está a cargo de la OCA (Oficina de Conocimiento Abierto), conjuntamente con la colaboración de la Prosecretaría de Informática de la Universidad Nacional de Córdoba y los Nodos OCA. Para más información, visite el sitio <http://oca.unc.edu.ar/>

Esta obra se encuentra protegida por una Licencia Creative Commons 4.0 Internacional



Hepatitis C en Córdoba: Implicancias de la coinfección HIV/HCV y cambios locales en el perfil epidemiológico molecular por Adrián Alejandro Farías se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor en Ciencias
de la Salud

“Hepatitis C en Córdoba: Implicancias de la
coïnfección HIV/HCV y cambios locales en el perfil
epidemiológico molecular”



Bioq. Esp. Adrián Alejandro Farías

Laboratorio de Arbovirus, Arenavirus y Hepatitis Virales

Instituto de Virología “Dr. JM Vanella”

Facultad de Ciencias Médicas

Universidad Nacional de Córdoba



República Argentina

2013

Comisión de Seguimiento de Tesis

Director:

Prof. Dra. Viviana Elizabeth Ré

Integrantes:

Prof. Dra. Marta Silvia Contigiani

Prof. Dra. Inés Albesa

Defensa Oral y Pública

Lugar y Fecha:

Calificación:

Tribunal

Firma:.....

Aclaración:.....

Firma:.....

Aclaración:.....

Firma:.....

Aclaración:.....

Artículo 43° del Reglamento de la Carrera de Doctorado en Ciencias de la Salud: “La Facultad de Ciencias Médicas no se hace solidaria con las opiniones de estas Tesis”

Dedicatorias

*A mi familia, mi valor máspreciado. A Ella, mi cable a tierra, mi esposa,
amiga y compañera, la que sabe como apoyarme, comprenderme y
TOLERARME....*

*A Mateo y Emma, esas personitas que han crecido junto a esta tesis, que
con sonrisas y mimos han sabido entender mis ausencias y mal humor.*

A ellos mi amor y ejemplo.

*A mis padres, quienes con su trabajo y esfuerzo me permitieron tener una
formación superior.*

*A mis hermanos, que están siempre presentes apoyándome en el
cumplimiento de mis metas.*

.....no hay necesidad de desalentarse, no hay necesidad de temer. El camino que seguimos es el camino del Universo, que ninguna dificultad, podrá impedir que sigamos. Tengamos el coraje de decir: "Si tengo la conciencia tranquila y un espíritu tranquilo, me atrevo a afrontar con valentía todos los obstáculos que pueda encontrar".

(Koichi Tohei Sensei, 1920-2011)

Agradecimientos

A mi Directora Prof. Dra. Viviana Ré y a los miembros de la Comisión de Tesis Prof. Dra. Marta Contigiani (Jefa marta) y Prof. Dra. Inés Albesa, quienes me guiaron durante el desarrollo de esta tesis.

A la jefa Marta, la mamá de la Familia Feliz, que sin sus charlas, consejos, apoyo incondicional y su fuerza no hubiéramos llegado a esta etapa iniciada hace 12 años. Aún me acuerdo cuando me cruzo en el pasillo de abajo con la Lore a decirme: si les ayudaba con unas muestritas.....heme aquí.

Elizabeth que decir, gracias por siempre estar y poner paños fríos a mis ansiedades y miedos, son años de compartir momentos, charlas, consejos, muy marcados en mi memoria, peleítas en que siempre terminaba habiendo un solo culpable.... yo.

Al cumpa y brendis amigos desde el tiempo 0, siempre han estado allí para todo desde el día que ingrese al labo, hasta asaditos, trabajos, mates, sueños y mas sueños, son como la mugre en la uña siempre acompañándonos mutuamente. Cumpa las pizzas de los viernes recordas?? Y bren los mates de la mañana con la ceci como se pasaba el tiempo no??? y los termos???

A la Lore, también está desde siempre, con sus consejos, paciencia y charlas tranquilas, su bajada a tierra, muchas veces muy oportunas sus chamuyos pedagógicos!!!

Al tocayo, que decir si es un gran compañero/amigo oídos, que a pesar de sus vaivenes espirituales/energéticos solía retarme (dice él) y poner paciencia a mis inseguridades, además de ser un gran apoyo en todo mi desarrollo, siempre está allí, salvo en sus viajes!!!!

Ceci, amiga desde mis pasos por allá abajo, siempre considerada y amable, una gran amiga.

Lauris por tus charlas, historias en tus viajes y compartidas de ratos, Junto a la Eli tan tranquila y concentrada, cómo logran no impregnarse de las charlas varoniles y picarescas de la muchachada??Pobre Arjona!!!

Belén desde que llegaste al labo supiste, sumarte y ganarte a esta gran familia y has sido una gran compañía/amiga en el labo de molecular.

Marquitos, compañerito de pesares virales, además de charlas de sueños y anhelos, que gran amigo de la vida.

A los ruinas: como el ahora Dr batalla (gonza), al mauri, al docente Seba y al hace poco incorporado porteño (agus) y al adoptado Pedro Ignacio por los mates, charlas varoniles, morrones con fantola y paddle, tiempo y afecto, gracias changos.

A todos los chicos del labo, de esta gran familia feliz, gracias por hacer los momentos imperdibles, y tan, tan amenos que uno no desea irse del mismo una vez que su amor y afecto te engancha, atrapa y ya no te vas más.... Marta a esto lo generaste vos.....GRACIAS a todos.

Al resto del InVIV que de una forma u otra han aportado su cuotita en mi formación academica(Celia, Marina, Ximena, Fer V, Gonza C, Guille, Pilar, Mauro, Lula, Patty, Silvia, Gise, Patri, Laura, Miguel, Jorge, Alicia, Roxana, Stella, Gladys, Daniel, Luís, Juli, Fer, Lau, pupilas Anita y Flor).

Listado de Publicaciones derivadas de la Tesis (Anexo)

- I. *Detección del virus de la hepatitis C (HCV) en saliva de pacientes crónicamente infectados de Córdoba, Argentina. Rev. Facultad de Ciencias Médicas. 2009; 66: 15-20.*
- II. *Perfil epidemiológico molecular de la infección por el virus de la Hepatitis C. Revista de Salud Pública. 2009; 2:15-21.*
- III. *Detection of Hepatitis C Virus (HCV) in body fluids from HCV monoinfected and HCV/HIV coinfecting patients. Hepato-Gastroenterology. 2010; 57: 1-4.*
- IV. *Determinants of immunological and virological responses to antiretroviral therapy amongst HIV-infected adults in central Argentina: negative influence of hepatitis C infection. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2013; 7:432-437.*

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| Resumen | iv |
| Summary | |
| 1. INTRODUCCIÓN | |
| 1.1 El virus: clasificación y características morfológicas | 3 |
| 1.2 Organización genómica | 4 |
| 1.3 Dinámica Evolutiva del HCV | 8 |
| 1.3.1 Patogénesis y Replicación Viral | 9 |
| 1.3.2 Tropicismo celular | 10 |
| 1.4 Vías de transmisión | 11 |
| 1.5 Epidemiología | 13 |
| 1.5.1 Epidemiología Molecular: distribución mundial de los genotipos de HCV, diversificación viral. | 14 |
| 1.6 Manifestaciones Clínicas | 18 |
| 1.6.1 Período de Incubación | 18 |
| 1.6.2 Hepatitis Aguda | 18 |
| 1.6.3 Hepatitis crónica | 19 |
| 1.6.4 Manifestaciones Extrahepáticas | 20 |
| 1.7 Diagnóstico de la infección | 20 |
| 1.8 Terapia Antiviral | 22 |
| 1.9 Coinfección con HCV/HIV | 24 |
| 1.9.1 Epidemiología y vías de transmisión | 25 |
| 1.9.2 Coinfección HCV - HIV: implicancias en el diagnóstico, la clínica y el tratamiento. | 27 |
| 1.9.3 Diagnóstico de la hepatitis C en pacientes infectados con HIV | 28 |
| 1.9.4 Influencia del HCV sobre la progresión de HIV y sobre la eficacia de HAART | 28 |
| 1.9.5 Influencia de la infección por HIV sobre la hepatitis C crónica | 29 |
| 1.9.6 Tratamiento de la hepatitis crónica C en pacientes infectados por el HIV | 30 |
| 2. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS. | |
| 2.1 Objetivo general | 33 |
| 2.2 Objetivos específicos | 33 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | |

| | |
|---|----|
| 3.1 Muestras analizadas | |
| Muestras de suero o plasma provenientes de individuos atendidos en diferentes nosocomios de la ciudad de Córdoba | 36 |
| 3.1.1. Estudio de detección de HCV en Fluidos Biológicos | 37 |
| 3.1.2. Estudio de la influencia de la infección por HCV y otros factores clinico-epidemiológicos en la respuesta virológica e inmunológica al tratamiento HAART en individuos infectados con HIV. | 39 |
| 3.1.3a. Estudio del perfil epidemiológico molecular de HCV | 41 |
| 3.1.3b. Análisis de Incidencia de los genotipos. | 41 |
| 3.1.3c. Estudio de diversidad genética de los subtipos 1a y 1b: filogenia y filogeografía | 41 |
| 3.2 Métodos | |
| 3.2.1. Extracción de ARN de suero o plasma | 43 |
| 3.2.2. Preparación de fluidos biológicos | 44 |
| 3.2.3 Extracción de ARN de fluidos biológicos: plasma seminal (PS), hisopado cervical (HC) y saliva (SA) | 46 |
| 3.2.4. Síntesis de ADN complementario (ADNc). Reacción de transcripción inversa (RT) | 47 |
| 3.2.5. Reacción de PCR de la Región 5'NC | 47 |
| 3.2.6. Amplificación de la Región NS5B | 48 |
| 3.2.7. Amplificación de Región E1/E2 | 48 |
| 3.2.8. Determinación de la carga viral para HCV en plasma | 50 |
| 3.2.9. Determinación de los genotipos de HCV mediante Restricción enzimática y análisis de polimorfismo de los fragmentos largos de restricción (RFLP) de la región 5'NC. | 50 |
| 3.2.10. Caracterización genómica de los aislamientos de HCV mediante secuenciamiento directo y análisis filogenético | 52 |
| 3.2.11. Reconstrucción demográfica | 54 |
| 3.2.12. Filogeografía | 56 |
| 3.3 Análisis estadísticos | 56 |
| 3.4 Aspectos Éticos | 58 |
| 4. RESULTADOS | |
| 4.1 Estudio de prevalencia de infección de HCV en individuos HIV(+) | 60 |
| 4.2 Estudio de la influencia de la infección por HCV y otros factores | 61 |

| | |
|---|------------|
| clínico-epidemiológicos en la respuesta virológica e inmunológica al tratamiento HAART en individuos infectados con HIV. | |
| 4.3 Estudio de detección de HCV en diferentes Fluidos Biológicos saliva (SA), plasma seminal (PL), hisopado cervical (HC) y las células mononucleares de sangre periférica (CMSP). | 65 |
| 4.4 Estudio del perfil epidemiológico molecular de HCV. | 67 |
| 4.4.1 Distribución de genotipos de HCV en individuos monoinfectados y coinfectados HCV/HIV. | 69 |
| 4.4.2 Análisis de Incidencia de los genotipos. | 73 |
| 4.4.3 Estudio de diversidad genética de los subtipos 1a y 1b: filogenia y filogeografía | 75 |
| 5. DISCUSION | 92 |
| Conclusiones | 107 |
| 6. BIBLIOGRAFIA | 110 |
| 7. ANEXOS | 136 |

Resumen

El virus de la Hepatitis C es considerado una de las principales causas de hepatitis crónica, cirrosis hepática y cáncer hepático. La coinfección con HIV acelera la progresión de la enfermedad hepática, aumenta la efectividad de la transmisión de HCV por vías no parenterales y ha sido asociada a la disminución de la efectividad de la terapia HAART. A nivel mundial, la distribución y el patrón molecular de HCV son marcadamente heterogéneos y se modifican continuamente debido tanto a cambios culturales, asociados a nuevas conductas de riesgo, como a movimientos poblacionales.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la prevalencia y la diversidad genética de la infección por HCV en individuos coinfectados con HIV de Córdoba, evaluar su influencia en la terapia antiretroviral (HAART) y en la transmisión de HCV, y detectar posibles cambios en el patrón regional de distribución de genotipos en los últimos 10 años.

En este estudio se incluyeron las siguientes muestras obtenidas de pacientes de Córdoba: a) 349 muestras de suero obtenidas de individuos crónicamente infectados por HCV colectados entre 1999-2009; b) 86 sueros de pacientes coinfectados HCV/HIV obtenidos de un total de 558 pacientes HIV+, colectados en dos periodos entre 2003-2007; y c) 37 muestras de fluidos biológicos de pacientes monoinfectados (n=21) y coinfectados HCV/HIV (n=16) [hisopado cervical (n=16), saliva (n=37), plasma seminal (n=21) y células mononucleares de sangre periférica (n=37)].

Para la detección molecular de HCV se utilizó RT-nested PCR de la región 5' no codificante (5' NC), y para la caracterización genómica y posterior análisis filogenético y evolución viral, se amplificaron y secuenciaron las regiones no estructural 5B y E1/E2.

Cuatro principales hallazgos son derivados del presente estudio: 1) se obtuvieron datos actualizados de la prevalencia de HCV en individuos coinfectados con HIV, la cual fue elevada (20%) y mayor a la hallada años anteriores en la misma población, 2) la coinfección HCV/HIV interfirió negativamente en la respuesta a la terapia HAART, 3) no se pudo demostrar la influencia de la coinfección HCV/HIV en la transmisión de HCV. Si bien se halló ARN de HCV en todos los fluidos biológicos estudiados (hisopado

cervical= 31%, saliva=19%, plasma seminal= 29% y CMSP= 78%), su presencia no estuvo asociada a la coinfección HCV/HIV. Finalmente, 4) el patrón de distribución de genotipos de HCV hallado fue diferente entre individuos monoinfectados y coinfectados HCV/HIV y varió de acuerdo con la edad y el modo de transmisión. El genotipo HCV-1 fue más prevalente entre individuos jóvenes coinfectados con HIV y usuarios de drogas endovenosas, a diferencia de HCV-2, previamente reportado en adultos mayores y asociado a vías iatrogénicas de infección. Este hallazgo sugirió que la diseminación de los genotipos 1 y 2 podría deberse a eventos epidemiológicos diferentes. Además, se demostró que en pacientes monoinfectados de nuestra región el patrón de circulación de genotipos cambió en los últimos 10 años: se observó un incremento gradual del genotipo 1 en detrimento del genotipo 2. El análisis filodinámico (filogenia y filogeografía) de HCV-1 mostró presencia de subtipos 1a y 1b, presentando ambos un comportamiento heterofilético y un evento evolutivo de introducción reciente, que se hallaría para HCV-1a en la década del '70, coincidiendo con un mayor consumo de estupefacientes, y para el subtipo 1b unas décadas antes, casi en concordancia con lo hallado en el resto del país. El estilo de vida y la edad de las personas infectadas lleva a pensar que los factores que hoy predominan, como el consumo de drogas endovenosas y las relaciones sexuales promiscuas, son y serán los causantes de la actual y futura diseminación de este genotipo en nuestra región, desplazando definitivamente al HCV-2c.

Palabras clave: virus de Hepatitis C, coinfección HCV/HIV, genotipos HCV, HAART, fluidos biológicos, filogenia, filogeografía, evolución.

Summary

The hepatitis C virus (HCV) is considered one of the major causes of chronic hepatitis, cirrhosis and liver cancer. Co-infection with HIV accelerates the progression of liver disease, increases the efficiency of transmission of HCV by non-parental routes and has been associated with the decrease in the effectiveness of HAART. Worldwide, HCV distribution and its molecular pattern are markedly heterogeneous and are continuously changing, due to cultural changes, associated to new risk behaviors, as well as population movements.

The aim of this work was to study the prevalence and genetic diversity of HCV infection in HIV co-infected individuals of Córdoba, evaluate its influence on antiretroviral therapy (HAART) and in HCV transmission, and identify possible changes in HCV genotype distribution pattern of Córdoba in the last 10 years.

This study included the following samples obtained from patients of Córdoba: a) 349 serum samples from chronically infected individuals collected between 1999-2009; b) 86 serum samples from HCV/HIV co-infected patients obtained from a total of 558 HIV+ patients, collected in 2 periods between 2003-2007; and c) 37 biological fluid samples of HCV moninfected (n=21) and HCV/HIV co-infected individuals (n=16) [cervical swab (n=16), saliva (n=37), seminal plasma (n=21) and peripheral blood mononuclear cells (n=37)].

RT-nested PCR of the 5' non-coding region (5' NC) was used for HCV molecular detection. For genomic characterization and subsequent phylogenetic and viral evolution analysis, non-structural 5B and E1/E2 genomic regions were amplified and sequenced.

Four main findings derive from this study: 1) updated data on the prevalence of HCV among HIV co-infected individuals was provided, which was high (20%), and higher than that found previous years in the same population; 2) HCV/HIV co-infection affected negatively in the response to HAART; 3) the influence of HCV/HIV co-infection in HCV transmission could not be demonstrated. Although HCV RNA was found in all body fluids studied (cervical swab=31%, saliva=19%, seminal plasma=29%, peripheral blood mononuclear cells=78%), its presence was not associated to HCV/HIV co-infection. Finally, 4) the distribution pattern found for HCV genotypes, differed

between HCV monoinfected individuals and HCV/HIV co-infected patients, and varied according to the age and the mode of transmission. Genotype HCV-1 was more prevalent among young individuals co-infected with HIV and intravenous drug users, unlike genotype HCV-2, previously reported in old adults and associated with iatrogenic routes of infection. This finding suggested that the spread of genotypes 1 and 2 might be due to different epidemiological events. It also showed that in monoinfected patients of our region the circulating genotype pattern changed in the last 10 years: it was observed a gradual increase in genotype 1, and a decrease of genotype 2. Phylodinamic analysis of HCV-1 showed presence of subtypes 1a and 1b, presenting both a heterophyletic behavior and a newly introduced evolutionary event. For HCV-1a it could have been in 1970's decade, coinciding with an increased drug consume, while for subtype 1b the evolutionary event could have been a few decades before, almost according to what was found in the rest of the country. The style of life and the age of the infected persons yield to postulate that the current predominant factors, like intravenous drug use and high-risk sexual behaviour, are and will be responsible of actual and future dissemination of this genotype in our region, taking out definitely genotype HCV-2c.

Keywords: Hepatitis C virus, HCV/HIV co-infection, HCV genotypes, HAART, biological fluids, phylogeny, phylogeography, evolution.

1. Introducción

1. Introducción

El virus de la Hepatitis C (HCV) es considerado una de las principales causas de hepatitis crónica, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (HCC). Se estima que más del 3% de la población mundial se encuentra infectada por este virus (Hanafiah et al., 2012) y que en el 80% de los casos los pacientes desarrolla una enfermedad hepática silente que puede derivar a fibrosis, cirrosis y hepatocarcinoma celular en un período de 8 a 14 años (De Francesco et al., 2005; Alter, 2007; Ploss et al., 2012). Su epidemiología ha ido cambiando durante las últimas décadas, gracias a la incorporación de nuevos métodos diagnósticos para el control de transfusiones sanguíneas, lo que ha disminuido la transmisión del virus por esta vía (Ploss et al., 2012). Sin embargo, nuevos casos continúan ocurriendo principalmente como resultado del uso de drogas endovenosas y en menor grado a través de exposición percutánea o membranomucosa. La progresión a enfermedad hepática crónica ocurre en la mayoría de las personas infectadas y la infección con el virus es actualmente, la mayor causa para la indicación de trasplantes de hígado. Cabe destacar que la infección por HCV también incrementa el número de complicaciones en personas quienes están coinfectadas con HIV, en los cuales la prevalencia de infección por HCV es en general elevada (10-30%) (Soriano et al., 2011). La introducción de nuevas estrategias de tratamiento ha permitido mejorar el manejo de los pacientes infectados. Si bien, se ha avanzado en la formulación de vacunas contra este virus, aún no existe vacuna efectiva para la prevención de dicha infección.

1.1 El virus: clasificación y características morfológicas

HCV es miembro de la familia *Flaviridae*, género *Hepacivirus* (www.ictvonline.org). El virus presenta una envoltura lipoproteica que encierra la nucleocápside viral de estructura icosaédrica (30-35nm) que encapsula un ARN viral de simple cadena (polaridad positiva) de aproximadamente 9.6kb (Figura 1).

La partícula viral de HCV exhibe un amplio rango de densidades pero la fracción infectiva en su mayoría tiene una densidad de 1,15-1,17 g/ml (Sharma, 2010). Se presume que las partículas de baja densidad (las más infecciosas) se encuentran, en su mayoría, asociadas a β -lipoproteínas; y que las partículas más densas representan una población mixta, compuesta de cápsides desnudas (30 - 35 nm) y viriones con envoltura (50 - 75 g) (Ploss et al., 2012).

En base a su diversidad genética actualmente se lo ha clasificado en 7 genotipos que difieren en un 30% de su secuencia de nucleótidos (www.ictvonline.org). Además se han identificado aproximadamente, más de 70 subtipos distribuidos geográficamente y una gran diversidad de cuasiespecies para cada individuo infectado (Simmonds et al., 2004). La fuente de esta variación, como en los otros virus a ARN, es la alta tasa de mutación generada en los errores y la corrección de los mismos por la ARN-polimerasa. Estas mutaciones tienen un ritmo estimado de 1,44 a 1,92 $\times 10^{-3}$ sustituciones de bases por sitio por año. El mayor índice de estas mutaciones ocurre en la región más heterogénea, la E2/NS1, conocida como hipervariable (HVR) (Simmonds et al., 2005; Kuiken et al., 2009; Nakano et al., 2012).

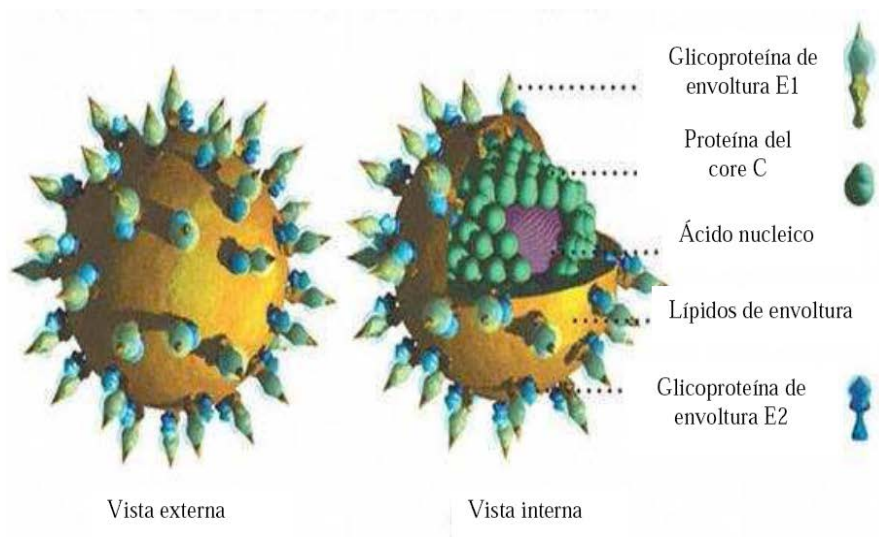


Figura 1: Virus de la Hepatitis C (Imágen de HCV obtenida de Louis E. Henderson PhD. *The PNR Notebook Online*).

1.2 Organización genómica

El virus codifica una poli proteína de aproximadamente 3000 aminoácidos en un único marco abierto de lectura, flanqueado por las regiones 5' no codificante (NC) y 3'NC. La poliproteína precursora es procesada en diversas proteínas individuales a través de proteasas virales y celulares (Figura 2). Las proteínas estructurales, están localizadas en la región amino-terminal de la proteína precursora en el siguiente orden: core, envoltura 1 (E1), E2 y la porina p7. Estas proteínas están unidas a funciones específicas como fusión con la membrana celular y escape inmune. Se encuentran seguidas en la región carboxiterminal de las proteínas no estructurales (proteínas NS), localizadas en este orden: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B, las mismas están involucradas en el ciclo de replicación viral (Ploss et al., 2012).

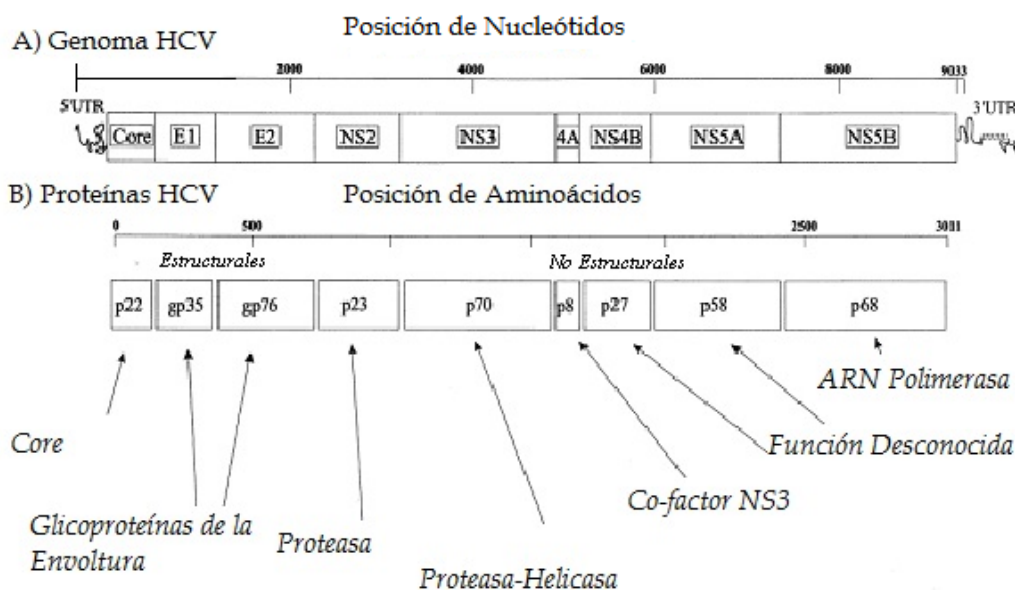


Figura 2: Representación esquemática del genoma de HCV, proteínas estructurales y no-estructurales: el ARN viral consiste en una región 5' no codificante que contiene el sitio de entrada al ribosoma (IRES) seguida de proteínas estructurales (Core, E) y no estructurales (NS) terminando en la región 3' no codificante.

La región 5'NC consiste de 341 nucleótidos (nt), con una secuencia altamente conservada entre cepas virales, lo que sugiere que juega un rol importante en el proceso de replicación viral y de traslación de las proteínas virales (Joyce et al., 2010).

La traslación del ARN viral es mediada por un sitio interno de entrada ribosomal (IRES) que está localizado en esta región y es llevado a cabo por los ribosomas celulares del huésped. Se ha reportado que la proteína del core interactúa con la región 5'NC de la cadena ARN positiva (+) (Song et al., 2006).

La región 3'NC posee aproximadamente 200 nt y está involucrada en la replicación del ARN. Se han reconocido tres dominios que estimularían al IRES en líneas celulares de Hepatoma Humano (Friebe et al., 2005; Song et al., 2006).

Las moléculas NC ARN o micro ARN (miR) son importantes en el control de la expresión y regulación de genes, mir122 es específicamente expresado en abundancia en hígado humano (Jopling et al., 2006; Jopling et al., 2008).

La proteína core multifuncional altamente conservada ha sido implicada en el desarrollo de esteatosis hepatocelular y oncogénesis (Depla et al., 2012). También se ha visto que interactúa con ambas regiones 5' y 3'NC y con la glicoproteína de envoltura E1 (Nakai et al., 2006; Yu et al., 2009).

La proteína p7 es una viroporina que posee una función similar a la proteína M2 de influenza, es dispensable para la replicación pero esencial para el ensamble y liberación de los viriones infectivos (Brohm et al., 2009).

Las proteínas E1/E2 se encuentran integradas a la envoltura viral y están involucradas en los primeros pasos del ciclo de vida del virus. Además, participan en la unión al receptor celular induciendo la fusión entre la envoltura viral y la membrana celular. Estas proteínas se ensamblan formando un heterodímero no covalente que es retenido en el retículo endoplásmico donde son glicosiladas (Op de Beeck et al., 2004). La proteína E2 se une al sitio CD81 que se halla expresado en varios tipos celulares como los hepatocitos y linfocitos B. La porción amino-terminal de la proteína E2 de HCV exhibe un alto grado de variabilidad en dos regiones, denominadas región hipervariable 1 (HVR-1) y región hipervariable 2 (HVR-2). Los determinantes antigénicos, lineales, correspondientes a la región codificante HVR-1 se expresan en la superficie viral y constituyen el principal blanco de la respuesta inmune contra HCV debido a que poseen un rol importante en la unión con los anticuerpos neutralizantes. Por ésta razón, la heterogeneidad de HVR-1 es considerada como un resultado de la evolución viral, determinada por la presión endógena ejercida por el sistema inmune, o por la presión ejercida por intervenciones exógenas, como es el tratamiento antiviral (Sharma, 2010; Ploss et al., 2012; Liang et al., 2013). Adicionalmente, se ha propuesto que la aparición temprana de anticuerpos

contra ésta región se asocia con una infección por HCV aguda autolimitada, mientras que la persistencia de anticuerpos anti-HVR-1 estaría asociada con infección crónica. Además, se ha observado que la presencia de anticuerpos anti-HVR-1 bloquean la adsorción in vitro en células susceptibles (Rodríguez et al., 2011; Ashfaq et al., 2011).

Las regiones NS2 y el dominio amino-terminal de NS3 constituyen la NS2-3 proteinasas que están involucradas en el clivaje entre NS2 y NS3. Se demostró que este clivaje es p7 independiente y necesaria para la infección en chimpanzés (Sharma, 2010). Recientemente, se demostró que la actividad de serin-proteasa se halla enteramente en la proteína NS2. Esta proteína tiene la capacidad de autoclivarse y además interactúa con otras proteínas NS (Schregel et al., 2009). Además parece estar involucrada en el ensamble de la partícula durante el acople post core, NS5A y NS3 (Yi et al., 2009). La búsqueda de moléculas inhibitoras contra esta proteína es sin dudas un avance en la terapéutica contra HCV.

La proteína NS3 es una proteína trifuncional con capacidad de helicasa, ATPasa y serin-proteasa. Es la responsable del clivaje NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A y la unión NS5A/5B. La gran cantidad de funciones que desarrolla NS3 en el ciclo de vida de HCV hacen que sea indispensable para la replicación viral y un futuro destino para la terapia anti-HCV (Sharma, 2010).

La proteína NS4A es un péptido multifuncional a pesar de su pequeño tamaño, una función es ser cofactor de la actividad serin-proteasa de la proteína NS3. Se encuentra localizada no solo en las mitocondrias sino también en el retículo endoplásmico, donde altera las funciones celulares y además tiene un rol esencial en la replicación de HCV (Beran et al., 2009). NS4B es la responsable de la generación de la red membranosa, que es el lugar de la replicación del HCV (Elazar et al., 2004).

La proteína NS5A posee múltiples roles desde estar involucrada en la replicación del ARN hasta el ensamble del virión (Diviney et al., 2008).

La proteína NS5B es la ARN polimerasa ARN dependiente, es la que inicia la síntesis de la cadena negativa de ARN complementaria usando como templado la cadena positiva del genoma de HCV. Como la polimerasa no posee la función de corregir errores (*proofreading*), en la replicación se genera una alta tasa de complejos mutantes. De todos modos al poseer algunos segmentos genómicos muy conservados y otros variables, el balance entre los diferentes segmentos es muy importante para prevenir este tipo de error (Wolk et al., 2008). Por ello, a pesar de que se generan altas tasas de variaciones genéticas para la supervivencia viral, debido a cambios hostiles del entorno celular, actualmente es un sitio de foco ante las nuevas terapias contra el HCV (Joyce et al., 2010; Sharma, 2010).

1.3 Dinámica Evolutiva del HCV

Como otros virus pequeños con genoma de ARN el HCV tiene una alta producción de partículas virales (Neumann et al., 1998), una alta tasa de recambio (Ramratnam et al., 1999) de las mismas, y una polimerasa propensa a cometer errores (Gastamiza et al., 2008). Estas tres características hacen que dentro de un individuo infectado circulen enjambres de genomas diferentes, pero muy similares entre sí denominados cuasiespecies (Kuiken et al., 2009, Nakano et al., 2012). Esta alta oferta de variantes genéticas permite una rápida evolución (Alfonso et al., 2004). A su vez esa dinámica evolutiva podría estar relacionada con el escape al sistema inmune humoral (Wölfl et al., 2008), con el mantenimiento de la cronicidad y con la aparición de resistencia a los fármacos durante el tratamiento (Veillon et al., 2007).

1.3.1 Patogénesis y Replicación Viral

Por muchos años la falla en encontrar modelos de replicación viral y obtención de virus HCV infectivo en cultivos celulares fue el mayor obstáculo en la innovación de terapias antivirales. El punto de inflexión fue cuando se pudo desarrollar un sistema *in vitro* de cultivo celular para HCV (cepa JFH1), en el año 2005 (Wakita et al., 2005). El genoma viral de la cepa JFH1 fue clonado a partir de un paciente japonés con hepatitis fulminante, y se logró la replicación viral y la recuperación de partículas virales en líneas celulares de hepatoma humanos (Huh 7). El HCVcc (cc: crecimiento en cultivo celular) obtenido ha sido el foco de los investigadores para el estudio del ciclo de vida completo de HCV (Wakita et al., 2005). Sin embargo, estos estudios se ven limitados directamente porque no se ha conseguido un huésped que permita profundizar en el estudio de replicación viral y patogénesis. Si existen modelos de ratones genéticamente humanizados pero solo permiten conocer algunos pasos en el ciclo de vida de HCV (Bukh et al., 2012).

Estudios dirigidos durante la infección natural en humanos indican que la cronicidad de HCV se debe a una rápida producción de virus y una vigorosa pérdida de la respuesta celular T contra HCV, con la emergencia de variantes que evaden el control inmune (Farci et al., 2000). La patogénesis del daño hepático se debe mayoritariamente al efecto citopático directo de las proteínas virales y por mecanismos inmunes relacionados a linfocitos T citotóxicos y citoquinas inflamatorias. Se halló que el estrés oxidativo es un importante factor patogénico en el daño hepático relacionado al HCV (Alberti et al., 2003).

En la actualidad, los sistemas de producción de partículas completas aún son limitados, lo que reduce la capacidad de comprender y entender más sobre la replicación y patogénesis de HCV.

Respecto a la entrada del virus a las células del huésped, varios estudios han postulado como candidato a receptor celular de HCV al CD81, la cual es una molécula transmembrana que se expresa en todas las células humanas excepto plaquetas y glóbulos rojos (Farquhar et al., 2012). Otro candidato propuesto como receptor es el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR). Recientemente, se ha demostrado *in vitro* la inhibición de la endocitosis con anticuerpos específicos anti-LDLR (Mazumdar et al., 2011).

1.3.2 Tropismo celular

El virus de la hepatitis C replica principalmente en el citoplasma de los hepatocitos, esto es evidenciado por los elevados niveles de ARN de HCV en tejido hepático detectados en el orden de 10^8 - 10^{11} copias por gramo de tejido (Fields, 2001). Sin embargo, sólo un pequeño porcentaje de hepatocitos (5%-19%) resultan positivos en la detección de ARN de HCV por hibridación *in situ*. Adicionalmente, la expresión de antígenos es aun más baja (1%-10%). Por otra parte, sólo de 1% a 5 % de las células mononucleares y aún una proporción menor de las células del epitelio biliar expresan antígenos de HCV (Shackel et al., 2002). Mediante la técnica de RT-PCR específicas para la detección de la cadena negativa de HCV se ha identificado ARN en nódulos linfáticos, páncreas y en menor frecuencia en glándulas adrenales, tiroideas, medula ósea y bazo (Fields, 2001; Yuki et al., 2006). También se han amplificado secuencias de HCV en células dendríticas (Eksioglu et al., 2010). Además, se ha demostrado la replicación viral en linfocitos B (Revie et al., 2011) y en Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) de pacientes infectados (Chary et al., 2012; Blackard et al., 2012).

1.4 Vías de transmisión

La principal vía de transmisión de HCV es la vía parenteral tales como la transfusión de sangre y de productos hemoderivados, hemodiálisis, uso de drogas endovenosas (UDEV), accidentes perforocortantes, y trasplante de órganos (Alter, 2006). Sin embargo, luego de la introducción de los controles pretransfusionales obligatorios a las bolsas de sangre, la mayoría de los individuos infectados en la actualidad son atribuidos al uso de drogas endovenosas (CDC, 1998). Por otra parte, 15–40% de los pacientes infectados por HCV no relatan ningún factor de riesgo parenteral (CDC, 1998). Por esto, se han propuesto otras vías posibles de transmisión, de riesgo incierto, que podrían estar relacionadas a la infección por HCV como son: el uso de tatuajes, el uso de cocaína inhalatoria, acupuntura y procedimientos médicos u odontológicos (De Nishioka et al., 2003; Mc Mahon et al., 2004). También se han incluido en este grupo las barberías comerciales, colocación de aros en el cuerpo (body piercing) (Antoszewski et al., 2006), rituales de la medicina folclórica (como la escarificación), como potencial modo de transmisión, cuando las medidas de bioseguridad son insuficientes (Ghany et al., 2009). La transmisión de HCV mediante el trasplante de órganos y la transmisión nosocomial, ha sido bien documentada, en estudios epidemiológicos clásicos y moleculares, realizados en unidades de hematología y en varios centros de hemodiálisis (Bocket et al., 2011).

Por otra parte, se ha demostrado que la vía sexual podría estar involucrada en la transmisión de este virus, aunque, los resultados son controversiales (Cadwell et al., 1996; Terrault, 2002; Workowski et al., 2006). Si bien algunos autores, reportaron asociación entre la infección con HCV y la

exposición sexual, otros publicaron bajas prevalencias de infección por HCV en parejas sexuales de individuos infectados (Terrault, 2002; Chia Wang et al., 2006). Otros estudios describen una alta prevalencia de infección en individuos con múltiples parejas sexuales y entre prostitutas (Alter et al., 2002, Workowski et al., 2006). Un estudio reciente reportó una prevalencia de infección 33% mayor en hombres UDEV que tienen sexo con hombres (MSM deriva de las siglas usadas para definir: Men Sex Men) que en heterosexuales (Marongiu et al., 2012). A esto se suma que la transmisión sexual como ruta de infección de HCV es difícil de probar entre miembros de una pareja estable, ya que pueden estar involucradas otras rutas probables de infección, como el compartir utensilios que pueden causar lesiones como razadoras, peines y/o cepillos de dientes (Ghany et al., 2009). Esta forma de transmisión, llamada intrafamiliar o intrahogar fue sugerida por varios autores, aunque, otros estudios no evidencian una prevalencia de infección más alta entre individuos que conviven sin tener sexo y la población general (Indolfi et al., 2008; Cavalhero et al., 2009).

Por otra parte, varios estudios demuestran la detección de ARN de HCV en semen (fluido seminal y células), secreciones vaginales y cepillado endocervical de individuos infectados con HCV (Leruez-Ville et al., 2000; Manavi et al., 2002; Terrault, 2002; Bourlet et al., 2002; Minose et al., 2006). Así, a pesar de las diferencias encontradas en los reportes acerca de esta ruta de transmisión, existen suficientes datos que indican que la transmisión sexual de HCV podría ocurrir, pero que éste virus no es eficientemente diseminado a través de esta vía (Leruez-Ville et al., 2000; Pasquier et al., 2003).

Algunos autores han demostrado la presencia de ARN de HCV en saliva (SA) en pacientes infectados con HCV. Estos estudios reportan resultados muy variables, con rangos de detección desde 0 a 100% (Gonsalvez et al., 2005; Wang et al., 2006; Cruz et al., 2012). Sin embargo, la baja eficiencia de transmisión de esta vía aún no es bien comprendida.

En cuanto a la transmisión vertical (de madre a hijo), se ha reportado que puede ocurrir entre 3-10% de los casos, la mayoría de ellos en etapas tardías de la vida intrauterina, en el nacimiento o en el periodo perinatal. Se han descrito muchos factores que influenciarían esta tasa de transmisión, por ejemplo la elevada carga viral de la madre, la duración del trabajo de parto, el sexo del recién nacido, la ruptura temprana de la membrana y el genotipo infectante (Murakami et al., 2012). La elección de cesárea como método para disminuir la transmisión aún es controversial y debatida (Mast et al., 2005; Aziz et al., 2011; Lauroche et al., 2012; Zaltron et al., 2012) En este sentido, la Asociación Europea para Estudios del Hígado (EASL) no recomienda la cesárea a fin de prevenir la posible transmisión vertical (EASL, 2011).

1.5 Epidemiología

Se estima que 185 millones de personas, están crónicamente infectados por este virus, es decir que aproximadamente el 3% de la población mundial está infectada por HCV. La Hepatitis C es la primera causa de trasplante hepático y responsable de la muerte de aproximadamente 350.000 individuos por año (OMS, 2009; Zaltron et al., 2012; Hanafiah et al., 2012).

El virus HCV es de distribución mundial sin embargo, la prevalencia de la infección varía en distintos países, hallándose la mayor prevalencia (~10%) en África Central y la prevalencia más baja (~0,5%) en los países del Norte de Europa (Alter, 2007; Vermehren et al., 2012). En América Latina, la prevalencia se estima en aproximadamente entre 1 y el 2,3%. Sin embargo, cabe destacar que este dato puede subestimar la prevalencia real, ya que surge de resultados estimativos, regionales, basados en trabajos aislados realizados en algunos países de dichas regiones, ya que no se cuenta con estudios de prevalencia realizados en población general (Kershenovich et al., 2010; De Almeida Neto et al., 2012). Entre los pocos estudios de este tipo, se destacan algunos realizados

en Argentina, en las Localidades de O'Brien (Buenos Aires), Wheelwright (Santa Fe) y Cruz del Eje (Córdoba), en los que se reportaron seroprevalencias del 5,7%, 4,9% y 5,8%, respectivamente (Picchio et al., 2006; Bessone et al., 2007; Mengarelli et al., 2006a). La máxima seroprevalencia (11,2%) fue reportada para Villa María (Córdoba) (Mengarelli et al., 2006b), mientras que en las grandes ciudades como Buenos Aires y Córdoba Capital, se estima ronda entre el 2% y el 3%, respectivamente (Kershenobich et al., 2010; Mengarelli et al., 2006b).

1.5.1 Epidemiología Molecular: distribución mundial de los genotipos de HCV, diversificación viral.

La distribución de los genotipos de HCV ha sido asociada con áreas geográficas y modos específicos de transmisión. Así mismo, se han descripto variaciones en el perfil epidemiológico de HCV como consecuencia de los movimientos poblacionales y diferentes estilos de vida.

Los genotipos HCV 1, 2 y 3 son de distribución mundial y sus prevalencias varían de un área geográfica a otra y en los diferentes grupos estudiados. El genotipo 1 es el más prevalente en Latinoamérica (Kershenobich et al., 2010; Zaltron et al., 2012; Hanafiah et al., 2012). Los subtipos 1a y 1b son los más comunes a nivel mundial. Un sin número de estudios hallan a los subtipos 1a y 1b como los más predominantes en Europa y América, y el subtipo 1b es el predominante en Asia. Los genotipos 2 y 3 son hallados con igual significancia en el Norte y Sudamérica, Europa y Asia. Otros estudios hallaron al genotipo 4 como el más prevalente en Asia. En África los genotipos hallados con mayor frecuencia son los genotipos 4 y 5 (Zaltron et al., 2012) (Figura 3).

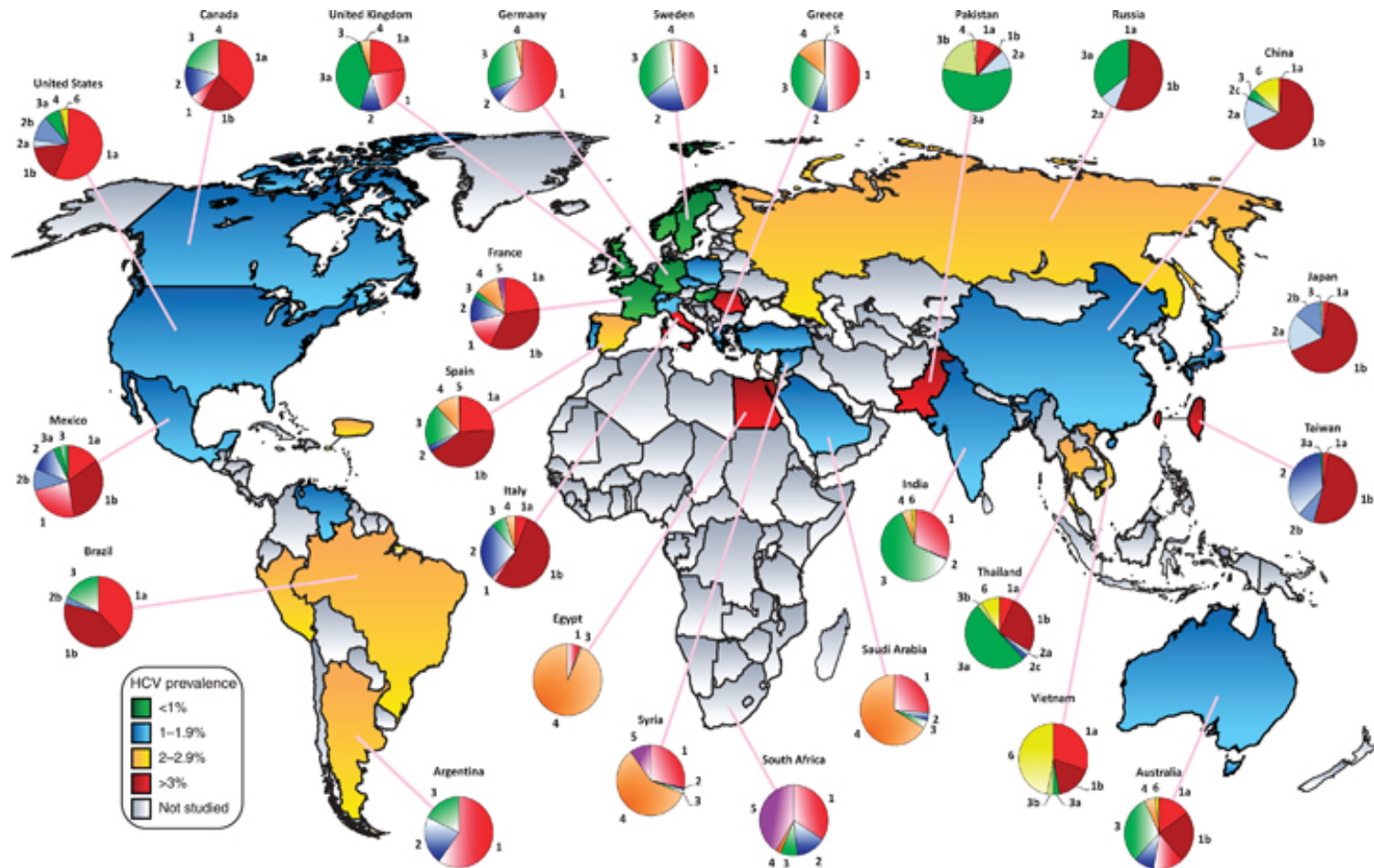


Figura 3: Distribución mundial de genotipos HCV (Imagen obtenida de Negro & Alberti; Liver International.2011.<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1478-3231.2011.02537.x/full#f1>).

Se ha demostrado, que los genotipos 1a y 3a son particularmente prevalentes entre UDEV. Debido a que el HIV posee las mismas vías de transmisión, usualmente HCV es detectado en coinfección con HIV, por tanto los genotipos/subtipos de HCV en pacientes coinfectados varían entre diferentes localizaciones y puede ser diferente a la población general de una misma área. Así en Argentina en este grupo de pacientes se halló mayor prevalencia de genotipo 1 en todas las áreas geográficas estudiadas (Quarleri et al., 2007; Tan et al., 2008). Específicamente en Córdoba, se halló mayor prevalencia de genotipo 1 en población coinfectada y de genotipo 2 en población general (Ré et al., 2007). Por otra parte, se ha demostrado que la distribución de los genotipos HCV varía con el grupo etario estudiado, esto probablemente indicaría la más reciente introducción de un tipo u otro en una determinada región (Panduro et al., 2010; Culasso et al., 2012). Hallazgos similares se encontraron en Córdoba en los que el genotipo HCV- 2c, se halló en mayor prevalencia en adultos mayores de 50 años (Mengarelli et al., 2006b; Ré et al., 2011). Por otra parte, se demostraron desplazamientos de un genotipo por otro generalmente relacionados a vías de transmisión, conductas sociales o movimientos poblacionales. Recientemente, se reportó que durante los últimos 10 años en Venezuela el genotipo 1b ha sido reemplazado por el 2 (Pujol et al., 2007).

En Argentina se detectaron los genotipos más distribuidos en los países occidentales: 1a, 1b, 2a, 3a (Picchio et al., 2006; Bessone et al., 2007; Ré et al., 2007). Sin embargo, en la Provincia de Córdoba, sorprende la elevada prevalencia de un genotipo más raro, el 2c (Ré et al., 2007), que curiosamente también fue detectado en Francia, Italia y África Oriental (Culasso et al., 2012).

Por otra parte, cambios dinámicos en la distribución de genotipos a lo largo del tiempo, en una misma región, son reportados. Considerando que estos cambios poseen implicancias en Salud pública y en el manejo clínico del

paciente, explorar estos eventuales cambios es importante para la mayor comprensión de la epidemiología de HCV y los posibles factores que influyen en el tratamiento. Actualmente, la predicción de la respuesta virológica sostenida, post-tratamiento y la elección de la duración del tratamiento dependen del genotipo (Ghany et al., 2009; Ghany et al., 2011; EASL, 2011). Además, la determinación de genotipos, subtipos y aislamientos contribuye a comprender la evolución y la epidemiología del virus. La heterogeneidad genética de HCV y la forma de diseminación del virus entre los pacientes infectados puede ser examinada con exactitud mediante secuenciación de diferentes regiones genómicas, principalmente las regiones NS5B y de envoltura (Njouom et al., 2007; Thomas et al., 2007; Abergel et al., 2007; Spada et al., 2008; DiLello et al., 2008; Golemba et al., 2010). Así, un estudio realizado en la región central de Francia demostró que el HCV- 5 se halló en alta prevalencia y que pudo haberse introducido primero en un área rural pequeña, se diseminó en ésta área mediante tratamientos con inyecciones, antes de 1972 y luego se expandió a otros distritos por vía transfusional (Abergel et al., 2007). Muchos trabajos, utilizando esta estrategia experimental, han sido publicados a nivel mundial para dilucidar brotes o establecer origen y vías de diseminación de este virus en diferentes regiones y a través del tiempo. En Córdoba mediante esta metodología, se pudo dilucidar y predecir el origen del subtipo HCV-2c circulante. Donde el valor del ACMR (Ancestro Común Mas Reciente) y la historia previa de inmigración sugirieron que la introducción de HCV-2c en Córdoba pudo haber ocurrido en múltiples introducciones, en la primera mitad del siglo XX, coincidiendo con el crecimiento poblacional producido por la inmigración Europea a nuestra región (Ré et al., 2011).

Sin embargo, basándonos en el diagnóstico de rutina de los últimos años en nuestro laboratorio percibimos un cambio en la epidemiología de HCV con un aumento del HCV-1, en detrimento del HCV-2. Asimismo, datos

preliminares demuestran que en Córdoba el virus de la hepatitis C HCV-2c se encuentra en mayor prevalencia entre individuos adultos mayores y los estudios de evolución demuestran que este virus se diversificó hace 140 años atrás. Algunos estudios realizados en Argentina muestran que el proceso de diversificación y expansión viral de HCV-1 es un evento más moderno (entre 20 y 50 años atrás) (Golemba et al., 2010; Culasso et al., 2012). Sin embargo, en nuestra región aún no existe información acerca de la historia demográfica de este genotipo (HCV-1a y 1b).

1.6 Manifestaciones Clínicas

1.6.1 Período de Incubación

El período de incubación es de un promedio de seis o siete semanas con un rango que va desde las dos semanas a seis meses después de la exposición. A pesar de esto la replicación viral se puede evidenciar ya en la primera semana (Fields, 2001).

1.6.2 Hepatitis Aguda

Las formas agudas son poco comunes y el inicio suele ser leve e insidioso. Estudios prospectivos demostraron que la ictericia está presente en el 10%-25% de los casos agudos, el resto cursan anictéricos, oligosintomáticos o asintomáticos (Zaltron et al., 2012). En esta fase los niveles de la enzima alanina aminotransferasa sérica (ALT) no supera 800UI/ml (Massard et al., 2006; Kumada et al., 2012). Esta elevación de las enzimas generalmente coincide con los síntomas y tienden a resolver dentro de las 2 o 12 semanas. HCV raramente se ha asociado a hepatitis fulminante pero ha sido reportado (Fields, 2001). Una condición clínica importante a tener en cuenta es la referida comúnmente como "HCV oculta" donde a pesar de que el virus replica en hígado el virus no es

detectado en suero, lo que conlleva a una baja progresión de la enfermedad hepática (Carreño et al., 2012).

No se han reconocido secuelas en pacientes que hayan resuelto infección con HCV, y aunque durante mucho tiempo se pensó que las reinfecciones eran raras, actualmente se han reportado (Page et al., 2013).

1.6.3 Hepatitis crónica

Es la consecuencia más grave de la persistencia de la infección por el virus HCV, generalmente, se presentan en más del 80% de los casos, como hepatitis crónica persistente, caracterizada por la detección constante de ARN de HCV seis o más meses de producida la infección en la cual, además de la detección de ARN de HCV se encuentra injuria hepática, desde cuadros necroinflamatorios hasta cirrosis y hepatocarcinoma, con alteraciones en los niveles de enzimas hepáticas (Fields, 2001; Puoti et al., 2012).

En general, el curso clínico de la infección crónica por el virus HCV es usualmente insidioso, progresivo y con escasa sintomatología. El aumento de los niveles de ALT posee en esta fase un patrón característico en forma fluctuante o multifásica (Massard et al., 2006).

La inmunopatogénesis del HCV es poco conocida, se cree que el daño hepático es mediado por la respuesta inmune del huésped; ya que no hay evidencias de que HCV sea citopatogénico per se. La influencia de factores inmunogenéticos del huésped y de factores virológicos, como el genotipo infectante o la coinfección con otros agentes (HBV, HIV), en la actualidad han sido totalmente esclarecidos.

Por otra parte, se han descrito algunos factores predictivos de evolución a enfermedad hepática grave como: la edad superior a 40 años y el consumo de alcohol, aún en forma moderada (Robinson et al., 2012). El alcohol parece influir

en el aumento de la replicación viral incrementando la susceptibilidad de la célula a la injuria viral (Hou et al., 2013).

1.6.4 Manifestaciones Extrahepáticas

Una variedad de síndromes clínicos que pueden ser autoinmunes o mediados por complejos inmunes se han asociado con infecciones crónicas por HCV, además de las manifestaciones clásicas de insuficiencia hepatocelular e hipertensión portal. Estas manifestaciones están presentes con gran frecuencia en individuos crónicamente infectados por HCV e incluyen: crioglobulinemia, glomerulonefritis membranoproliferativa, porfiria cutánea tardía, síndrome de Sjögren, liquen plano y diabetes mellitus (Fields, 2001).

1.7 Diagnóstico de la infección

El diagnóstico de la infección por HCV se basa en la detección de anticuerpos, por ensayos serológicos, y en la detección de ácidos nucleicos utilizando métodos de biología molecular.

Los métodos de screening serológico no son lo más efectivos para el diagnóstico de la infección aguda de HCV, debido a que solo son detectados en un poco más del 30% de los pacientes con síntomas (Ozaras et al., 2009). Más aún el periodo ventana puede prolongarse en pacientes inmunocomprometidos a quienes las guías recomiendan tener un screening rutinario de HCV (Ghany et al., 2009; Yan et al., 2011).

Los métodos de detección de ácidos nucleicos son los de elección para confirmar la infección por HCV. Existen una variedad de ensayos moleculares cualitativos y cuantitativos diseñados y usados mundialmente para la detección de ARN de HCV, como: el ensayo de retrotranscripción seguida de

amplificación por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), amplificación de secuencia basadas en ácidos nucleicos (NASBA), transcripción mediada por amplificación (TMA), ensayo de Branch DNA basado en la amplificación de señal y PCR en tiempo Real (Gonzales et al., 2003; Guichon et al., 2004; Daniel et al., 2008). Con fines diagnósticos, e independientemente de la técnica utilizada la secuencia nucleotídica de elección para la amplificación del ARN es la región 5'NC ya que es la más conservada del genoma de este virus.

El ARN se puede detectar en suero o plasma entre la primera y segunda semana después de la exposición al virus, semanas antes de la elevación de las transaminasas y de la aparición de anticuerpos anti-HCV.

La detección de ARN en personas anti-HCV positivas indica infección en curso, sin embargo, la ausencia de ARN de HCV en personas con anticuerpos anti-HCV positivos detectados sólo por ELISA no diferencia entre resolución de la infección y un resultado falso positivo del ensayo de ELISA.

Por otra parte, debido a que algunas personas presentan viremias intermitentes el significado de un simple resultado negativo de ARN de HCV es difícil de interpretar, particularmente en ausencia de información clínica adicional. En estos casos siempre es conveniente (sobre todo en pacientes con epidemiología sospechosa de la infección por HCV) repetir la determinación unos meses después (las guías recomiendan alrededor de 6 meses) (EASL 2011).

La biopsia hepática es muy útil para conocer el grado de progresión de la enfermedad y su estadio evolutivo. Esta información contiene importantes connotaciones clínicas respecto al pronóstico, a la necesidad de tratamiento y a la posible efectividad del mismo. Para la evaluación del paciente con hepatitis C crónica también son útiles análisis bioquímicos como: hemograma, estudio de la coagulación, presencia de autoanticuerpos no órgano específico (incluyendo los anti-tiroideos), proteinograma y ferritina. Asimismo, es importante descartar la

presencia de otras causas de enfermedad hepática que coexistan con una infección crónica por el HCV.

La detección de los genotipos de HCV puede realizarse mediante el uso de técnicas moleculares.

La técnica de secuenciamiento y análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas es el método patrón para la identificación de genotipos, sin embargo, presenta menor practicidad y mayor costo, por lo que no es utilizado en el diagnóstico clínico de rutina. Para un óptimo análisis genómico es crucial la elección de la región nucleotídica a secuenciar. Ésta debe contener fragmentos genotipo/subtipo específicos los cuales reflejen la diversidad del genoma completo. Así, la región 5'NC es la más conservada y por tanto preferida para el diagnóstico de la infección por HCV y asegura la tipificación a nivel genotipo viral. En cambio, las regiones del core, envoltura y NS5B son menos conservadas y por tanto, posibilitan una mayor discriminación y más exacta subtipificación (Ghany et al., 2009; EASL, 2011).

1.8 Terapia Antiviral

El objetivo de la terapia de la hepatitis crónica C es erradicar o disminuir en forma significativa y sostenida la replicación viral. De esta manera se puede lograr una mejoría de la lesión hepática y prevenir la evolución a formas más severas de la enfermedad. Por otra parte, la curación de la infección implica la eliminación del riesgo de contagio a otras personas. A pesar de los significativos logros alcanzados recientemente, el tratamiento de la hepatitis C crónica aún presenta numerosos inconvenientes en cuanto a su efectividad, contraindicaciones y efectos colaterales.

El tratamiento es recomendado a pacientes que poseen un riesgo incrementado de progresión de la enfermedad hepática crónica, tales como

niveles elevados de transaminasas séricas, viremia de HCV y al menos fibrosis portal o moderada inflamación hepática, observado en la biopsia. Sin embargo, existen muchos pacientes infectados con HCV que no poseen estos hallazgos clínicos y en ellos la implementación de la terapia es controvertida. El tratamiento en estos pacientes debe ser considerado de manera individual.

En la actualidad, el tratamiento se basa en la combinación de interferón alfa pegilado (PEG-IFN) y ribavirina (RBV) (Hoofnagle et al., 2006). Los genotipos de HCV deben ser sistemáticamente determinados antes de iniciar la terapia, ya que de ello depende la indicación, duración de la misma y la dosis de RBV que se administra (Reddy et al., 2009). Esta combinación de fármacos debe ser indicada durante 24 semanas en los genotipos 2 y 3 y durante 48 semanas en genotipos 1 y 4. Dicha combinación es sumamente exitosa con los genotipos 2 y 3, obteniendo una respuesta virológica sostenida (RVS: definida como la ausencia de ARN de HCV en suero por un método cuantitativo después de las 24 semanas del tratamiento) entre el 76% y el 82% de los pacientes (Hadziyannis et al., 2004). Existe una marcada evidencia de que un tratamiento de 24 semanas produce iguales tasas de RVS que uno de 48 semanas (Jacobson et al., 2007). De todos modos estas tasas de RVS en los pacientes infectados con genotipo 1, son menores, donde solo entre el 42% al 46% de los pacientes obtiene SVR al cabo de las 48 semanas de terapia combinada (Abenavoli et al., 2011).

Los tiempos de tratamiento pueden acortarse o prolongarse de acuerdo a lo observado en los resultados de la cinética viral rápida (RVR) del HCV (definida por la ausencia de detección del ARN de HCV en la semana 4 de tratamiento) (Reddy et al., 2009). Así, actualmente se está considerando como el mejor predictor de RVS a alcanzar la RVR. Se ha demostrado que en personas que presentan RVR, el porcentaje de RVS es de aproximadamente 90%, independientemente del genotipo infectante. Por lo tanto, en las últimas recomendaciones para el tratamiento de personas con Hepatitis C, de la

dirección de SIDA y ETS del Ministerio de salud de la Nación (Ministerio de Salud de la Nación, 2011) se confirma que la presencia de una RVR permite considerar el acortamiento de la terapia (a 24 semanas en determinadas personas con genotipos 1 y 4; a 16 semanas en determinadas personas con genotipos 2 y 3). En contraste, ante la ausencia de RVR se debe considerar la prolongación de la terapia (a 48 semanas en personas con genotipos 2 y 3; a 72 semanas en personas con genotipos 1 y 4) de acuerdo a ulteriores resultados en los estudios de ARN de HCV en semanas 12 y 24.

Actualmente, el desarrollo de nuevos agentes antivirales esta focalizado hacia la partícula viral o hacia las proteínas involucradas en la replicación. Es así, que las recientemente aprobadas drogas de acción directa (telaprevir y boceprevir) son dos agentes inhibidores de la NS3/4A serin-proteasa (Ghany et al., 2011). Aún quedan más por aprobar, y otras que están en desarrollo. Ninguna de estas drogas debe utilizarse de manera individual si en forma de triple terapia, las tasas de respuesta para los HCV-1 son similares a la doble terapia (PEG-IFN / RVB) aunque se reducen considerablemente los tiempos de administración (Liang et al., 2013).

Recientemente, la Administración Nacional de Alimentos, Medicamentos y Tecnología Médica (A.N.M.A.T) aprobó la introducción de dos nuevos antivirales (telaprevir o boceprevir) para el tratamiento de HCV genotipo 1. Por tanto se implementará una terapia triple en portadores de genotipo 1, agregando a la combinación actual alguno de ellos (Abenavoli et al., 2011; Ploss et al., 2012; Liang et al., 2013).

1.9 Coinfección con HCV/HIV

La hepatitis C crónica es actualmente una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los individuos infectados por el HIV, especialmente

en áreas donde la prevalencia de UDEV es elevada, como es el sur de Europa y algunas ciudades de la costa este de Estados Unidos (Weber et al., 2006; Núñez et al., 2010). La coinfección con HIV se asocia a un incremento en la viremia del HCV entre 2 y 8 veces mayor a la existente en individuos infectados sólo con HCV. Esto conlleva a la disminución de la tasa de eliminación del virus, a una progresión más rápida de la enfermedad hepática y a una mayor incidencia de cirrosis (Laufer et al., 2007; Soriano et al., 2008a; Soriano et al., 2008b; Soriano et al., 2011; Barreiro et al., 2012).

1.9.1 Epidemiología y vías de transmisión

Se estima que a nivel mundial 20-25% de los individuos infectados con HIV presentan coinfección con HCV (Rockstroh et al., 2004; Soriano et al., 2011). Es decir que existen en el mundo aproximadamente 10 millones de individuos infectados con ambos virus (Lacombe et al., 2012).

Como HCV es transmitido con alta eficacia por vía parenteral (directamente por el contacto de sangre infectada a sangre del receptor), la prevalencia de coinfección con HCV en diferentes países, regiones y poblaciones está estrechamente relacionada a la prevalencia de infección en población de HIV que usualmente es UDEV.

Estudios realizados entre pacientes infectados con HIV de Europa, Australia y USA, mostraron que al menos uno de cuatro individuos estaba coinfectado con HCV (Lacombe et al., 2012). De la misma forma, Operanski et al., (2011) reportaron que en población infectada con HIV, UDVE de Estados Unidos y Europa del Este la prevalencia de HCV fue entre 72% - 95%, entre hombres que tienen sexo con hombres (MSM) fue de 1% a 12% y de 9% a 27% en heterosexuales. Evidencia reciente indica que probablemente este tipo de transmisión se deba a traumatismos de la mucosa rectal, especialmente cuando

están coinfectados con HIV. Paradójicamente se ha notado el incremento de la transmisión sexual de HCV en paralelo al aumento de disponibilidad de la terapia HAART, sugiriendo una probable falsa sensación de seguridad por parte de estos pacientes (Zaltron et al., 2012; Marongiu et al., 2012). Recientemente, un estudio español reportó que en población infectada con HIV la seroprevalencia de HCV fue del 21,8%. De la población total estudiada la mayor prevalencia era de inmigrantes de Europa del Este (45,9%) seguido de inmigrantes de SubSahara Africano (10,1%), América del Norte (16,4%) y Sudamérica (4,9%) (Perez Cachafeiro et al., 2011). Estudios desarrollados en Buenos Aires, Argentina presentan prevalencias de coinfección HCV/HIV en UDEV muy diversas que van del 32% al 58%, de 28% en heterosexuales y 11,2% entre hombres que tienen sexo con hombres (Laufer et al., 2007; Quarleri et al., 2007).

A pesar de las diferencias encontradas en la literatura, hay suficientes datos que sugieren que la vía de transmisión sexual de HCV puede ocurrir, pero que el virus no es eficientemente diseminado por esta vía (Pasquier et al., 2006). Sin embargo, entre individuos infectados con HIV la transmisión sexual de HCV parece ser más eficiente, y esto se debería a que la presencia de HIV y la concomitante inmunosupresión, incrementaría la replicación de HCV (Bonancini et al., 2000; Pasquier et al., 2003; Pando et al., 2004; Alter, 2006). En general, sujetos coinfectados HCV/HIV demuestran mayores niveles de cargas virales para HCV en suero e hígado (CDC, 1998; Eirea et al., 2005). Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual el HIV incrementa el riesgo de transmisión por estas vías no es completamente conocido. Asimismo, se sugiere que en pacientes coinfectados con alta carga viral para HCV, el riesgo de transmisión por vías alternativas a la parenteral podría incrementar.

Estudios recientes han demostrado la presencia de ARN de HCV en saliva de individuos mono infectados (HCV) o coinfectados (HCV/HIV), la cual

ha sido sugerida como otra posible vía de infección por HCV (Eirea et al., 2005; Gonsalvez et al., 2005; Lopez Menezes et al., 2012; Cruz et al., 2012).

1.9.2 Coinfección HCV - HIV: implicancias en el diagnóstico, la clínica y el tratamiento.

La coinfección HCV/HIV constituye un tópico sustancial para la salud pública mundial ya que HCV incrementa su prevalencia en este grupo. Además el manejo de los pacientes infectados con ambos virus es muy complejo y la eficacia del tratamiento es limitada. El gran número de efectos adversos que posee la terapia anti-HCV sumado a la potencial hepatotoxicidad de la terapia antiretroviral altamente activa (HAART), y a la falta de claridad en el conocimiento de los efectos que la infección por HCV posee sobre la progresión de la enfermedad y el tratamiento de HIV, dificultan aún más el seguimiento de este grupo de pacientes (Torriani et al., 2004; Operalski et al., 2011).

La introducción de la terapia HAART a fines de los '90 condujo al mejoramiento de la función inmune de los pacientes infectados con HIV y por tanto, a la disminución de las tasas de mortalidad por SIDA y enfermedades relacionadas con infecciones oportunistas, lo que llevó a un incremento de la expectativa de vida en estos pacientes. Desde ese momento otras causas de morbilidad y mortalidad, como la enfermedad hepática debido a HCV, han emergido como causa importante de muerte en individuos coinfectados HCV/HIV. Así, se estima que más del 60% de los individuos infectados con HIV que deben recibir trasplante hepático poseen HCV como la principal causa de falla hepática (Sherman, 2004).

1.9.3 Diagnóstico de la hepatitis C en pacientes infectados con HIV

En el algoritmo general de diagnóstico de HCV se recomienda realizar screening o tamizaje de anticuerpos anti-HCV como primer ensayo de detección viral (EASL 2011). Sin embargo, en este grupo de pacientes es frecuente obtener resultados falsos negativos debido a la presencia de seroconversión tardía (período ventana). En este período los anticuerpos específicos no son detectados a pesar de que el virus está presente en la sangre. El estado previo a la seroconversión puede ser tan extenso como de 6 a 12 meses en pacientes inmunosuprimidos (Ghany et al., 2009; Soriano et al., 2011). Por tanto, a pesar de la recomendación de realizar el screening serológico anti-HCV en los pacientes infectados con HIV, la detección de ARN puede ser requerida. Cabe destacar, que aproximadamente el 80% de los pacientes infectados con HIV presentan ARN- HCV detectable en suero por lo que actualmente en individuos inmunosuprimidos, las guías recomiendan la detección de ARN - HCV aún con test anti-HCV negativos (Soriano et al., 2008b; Ghany et al., 2009; EASL 2011).

1.9.4 Influencia del HCV sobre la progresión de HIV y sobre la eficacia de HAART

Existen resultados discordantes en los estudios que han reportado la influencia del HCV sobre la progresión de la infección por HIV (Sulkowsky et al., 2002; Operalsky et al., 2011). La activación inmunitaria persistente que ocasiona la infección crónica por HCV podría facilitar la transcripción del HIV en los linfocitos T infectados, provocando una destrucción más rápida de los mismos. Además, se ha demostrado que el HCV es capaz de infectar los linfocitos T, acelerando su muerte. Existe disparidad de resultados acerca de la posible influencia negativa de la infección por HCV sobre la reconstitución

inmunitaria de los pacientes que inician HAART. El inicio de la terapia HAART generalmente produce una rápida reducción de los niveles de ARN de HIV e incrementa la cantidad de células CD4 reconstituyendo la respuesta inmunológica (Rallon et al., 2011). Existen reportes que muestran la influencia negativa ejercida por HCV en la eficacia de la respuesta HAART en pacientes coinfectados. (Greub et al., 2000; Soriano et al., 2011; Rallón et al., 2011). En contraste, otro estudio no reconoce la influencia de HCV sobre la terapia anti-HIV (Fuping et al., 2010).

Por otra parte, se ha postulado que HCV influye en forma negativa sobre la infección con HIV, aumentando la frecuencia de abandonos de la terapia HAART e incrementando la toxicidad hepática (Mocroft et al., 2005; Thein et al., 2008). Se estima que alrededor del 10% de los pacientes coinfectados que inician HAART deben suspender el tratamiento por la toxicidad hepática generada de la suma de la hepatotoxicidad inherente al antirretroviral y la producida por HCV (Soriano et al., 2011). Sin embargo, ciertos antirretrovirales introducidos a la terapia, como raltegravir o maraviroc, producen daño hepático leve, de modo que la hepatotoxicidad utilizando estos fármacos, es actualmente excepcional (Vispo et al., 2010).

1.9.5 Influencia de la infección por HIV sobre la hepatitis C crónica

La hepatitis aguda por HCV evoluciona a la cronicidad con más probabilidad en pacientes infectados con HIV, tanto más cuanto más avanzada es la inmunosupresión (Sherman, 2004). Una vez establecida la infección crónica por HCV, los niveles de ARN-HCV son más altos en pacientes coinfectados HCV/HIV, tanto en hígado como en plasma (Operalsky et al., 2011). Esto llevaría a que la progresión de la fibrosis hepática se acelere en los pacientes

coinfectados HCV/HIV cuando la inmunosupresión es más profunda. Es decir la enfermedad hepática terminal y el posible desarrollo de hepatocarcinoma ocurre antes en estos pacientes que en lo mono infectados con HCV (Martin carbonero et al., 2004; Puoti et al., 2004; Núñez 2010; Operalsky et al., 2011).

1.9.6 Tratamiento de la hepatitis crónica C en pacientes infectados por el HIV

El tratamiento de la hepatitis crónica C en los pacientes infectados por el HIV es una prioridad por 3 motivos fundamentales. Primero, por la más rápida progresión a cirrosis; segundo, por la peor tolerancia y mayor probabilidad de riesgo de hepatotoxicidad o supresión del tratamiento en presencia de hepatitis crónica C. Por último, por el efecto deletéreo de la estimulación inmunológica persistente que supone la replicación incontrolada del virus C sobreañadida a la enfermedad por HIV (Alter 2006; Soriano et al., 2011).

En la última década han aparecido varios estudios que han demostrado la seguridad y eficacia del tratamiento con Interferón pegilado (pegIFN) y ribavirina (RBV) en los pacientes coinfectados. Muchos de esos trabajos recomiendan el tratamiento durante 12 meses en todos los pacientes con altas dosis de RBV, independientemente del genotipo del HCV (Abenavoli et al., 2011; Ploss et al., 2012).

Por otro lado, debido a que el peg IFN + RBV tiene un porcentaje de éxito de solo el 40-50% en lo pacientes mono infectados y cerca del 30% en los coinfectados varias drogas más efectivas se están desarrollando. Los más promisorios son los inhibidores de proteasas telaprevir y boceprevir, los cuales han sido aprobados durante el 2012 para su práctica clínica (Rodriguez et al., 2010; Operansky et al., 2011; Ploss et al., 2012).

Los nuevos antivirales son particularmente esperados para los pacientes difíciles de tratar y, sin duda, en este grupo figuran en primera línea los pacientes coinfectados por HIV. De algún modo, el año 2011, para HCV, recuerda al año 1996, cuando irrumpió la terapia triple antirretroviral en el manejo del HIV. No hay duda de que, de modo parecido, estamos ante un antes y un después en el tratamiento de la hepatitis C. Sin embargo, los nuevos antivirales de acción directa presentan enormes desafíos en la población coinfectada, que deben resolverse de modo adecuado antes de que se produzca un uso indiscriminado de éstos. Las interacciones medicamentosas figuran entre los riesgos potenciales más importantes, dado que pueden conducir a infra o supraexposición a estos fármacos, con el riesgo consiguiente de toxicidad o falta de eficacia, respectivamente.

2. Objetivos

2. Objetivos Generales y Específicos.

2.1 Objetivo general

- ✓ *Estudiar la prevalencia y la diversidad genética de la infección por HCV en individuos coinfectados con HIV de Córdoba, evaluar su influencia en la terapia antiretroviral (HAART) y en la transmisión de HCV; y detectar los posibles cambios locales en el patrón molecular de HCV en los últimos 10 años.*

2.2 Objetivos específicos

- ✓ *Estudiar la prevalencia de HCV en individuos coinfectados HCV/HIV de Córdoba.*
- ✓ *Identificar los factores de riesgo asociados a la infección por HCV en las dos poblaciones estudiadas.*
- ✓ *Evaluar la influencia de la infección por HCV y de otros factores clínicos-epidemiológicos en la respuesta inmunológica y virológica a HAART en individuos infectados con HIV.*
- ✓ *Detectar ARN HCV en diferentes fluidos biológicos (saliva, hisopado endocervical, semen y CMSP) y establecer asociaciones entre la detección de HCV y los factores virales y del huésped, en individuos infectados con HCV o coinfectados HCV/HIV.*
- ✓ *Establecer el patrón genotípico de la infección por HCV en individuos coinfectados de Córdoba y compararlos con el hallado en individuos mono infectados.*
- ✓ *Identificar los eventos epidemiológicos involucrados en su transmisión y los posibles cambios en la epidemiología molecular en los últimos 10 años.*
- ✓ *Profundizar en la epidemiología molecular del virus HCV genotipo 1 (HCV-1).*
- ✓ *Aplicar la técnica de secuenciamiento directo para genotipificar con exactitud y subtipificar los aislamientos de HCV.*

- ✓ *Analizar la diversidad genética del genotipo HCV-1, subtipos 1a y 1b en aislamientos de Córdoba.*
- ✓ *Establecer el origen y dinámica del proceso de infección en la población estudiada.*

3. Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestras analizadas

Muestras de suero o plasma provenientes de individuos atendidos en diferentes nosocomios de la ciudad de Córdoba

Pacientes infectados con HCV

En el período de septiembre de 1999 a agosto de 2009 fueron procesadas en el Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella” de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba (InViV) 349 muestras de suero o plasma con serología positiva para HCV. Las muestras pertenecían a individuos con cuadro clínico y/o bioquímico sugestivo de hepatitis viral aguda o crónica no A, no B. Dichas muestras fueron remitidas al InViV para la confirmación diagnóstica de infección por HCV mediante métodos de biología molecular como lo recomienda el último consenso nacional de hepatitis.

Pacientes infectados con HIV

Se partió de un total de 558 de individuos HIV positivos atendidos en el Hospital de Nacional de Clínicas. Todas las muestras y registros de datos fueron provenientes de pacientes habitantes de Córdoba (2003- 2007). Para el estudio de prevalencia y genotipificación se dividió el estudio en dos periodos según año de recolección:

a) Entre febrero 2003- febrero 2004 se estudiaron 320 individuos infectados con HIV (275 hombres; edad media 35,2 años, (r= 15-68) y 45 mujeres; 35,3 años, (r= 13-61).

b) Entre diciembre 2004- julio 2007 se partió de un registro total de 238 individuos: doscientos hombres promedio de edad 39,2 años, (r = 21-70 años) y treinta y ocho mujeres (promedio de edad 38,8 años, r = 23-67años).

3.1.1. Estudio de la influencia de la infección por HCV y otros factores clínico-epidemiológicos en la respuesta virológica e inmunológica al tratamiento HAART en individuos infectados con HIV.

Para evaluar la influencia de HCV y la asociación independiente de factores clínicos y epidemiológicos a la respuesta virológica e inmunológica a HAART, se realizó un estudio retrospectivo, observacional en una cohorte de individuos adultos infectados con HIV atendidos en el consultorio de infectología del Hospital Nacional de Clínicas de la Ciudad de Córdoba (2004-2007). Para su ejecución, se recurrió a los registros médicos proporcionados por el responsable del servicio hospitalario y se tomaron datos epidemiológicos y clínicos, los cuales, fueron recolectados al inicio y al menos 2 o 3 medidas al año durante 48 meses. Los individuos participantes del estudio debían ser mayores de 18 años y también contar con el dato cuantitativo de células CD4 y la carga viral de HIV antes del comienzo de la terapia HAART (definida como un régimen que consistió en al menos 3 drogas antirretrovirales, incluyendo algún inhibidor nucleosídico de la transcriptasa reversa, o un inhibidor no nucleosídico de la transcriptasa reversa, y/o un inhibidor de proteasas). Los pacientes fueron considerados candidatos para HAART: 1) si tenían síntomas compatibles con las categorías B o C de la clasificación CDC (o marcadores o

enfermedades oportunistas no contempladas en este criterio de clasificación), o con el estadio 3 y 4 del sistema de clasificación de OMS, 2) los pacientes asintomáticos con recuentos de CD4, menor a 200 células/ml o entre 200-350 células/ml, 3) los pacientes asintomáticos, con elevados niveles de ARN del HIV (>100 000 copias / ml).

Se excluyeron del estudio pacientes con un consumo de etanol 0,50g/día, coinfección con hepatitis B, con enfermedades hepáticas de causa no infecciosa o una adherencia al HAART < 95%. Las tasas de adherencia a HAART se reportaron por el médico participante del estudio y se basó en la proporción de veces en que fueron retiradas las drogas antiretrovirales sobre el total de tiempo en la que se dispensaron las mismas. Ningún paciente recibió tratamiento antiviral para HCV.

Variables analizadas. Datos clínico - epidemiológicos

Se consideraron para la inclusión en el modelo multivariado las siguientes covariables: sexo, edad al momento del diagnóstico de HIV (≥ 40 años vs. <40 años), estadio clínico de la enfermedad acorde a la OMS, régimen HAART utilizado e infección por HCV.

Los siguientes datos y resultados clínicos se usaron en el análisis de la respuesta a la terapia: a) respuesta inmunológica al tratamiento: definido como un incremento sostenido en la cantidad de células CD4+ (>350 cel/mL desde el inicio al término del seguimiento); b) respuesta virológica: definida como la disminución sostenida de la carga viral /ARN de HIV (<50 copias/mL desde el inicio al término del seguimiento).

3.1.2. Estudio de detección de HCV en Fluidos Biológicos:

Para el estudio de detección de HCV en fluidos biológicos (semen, hisopado cervical, saliva y CMSP) se invitó a participar voluntariamente (previo consentimiento informado) a todos los pacientes que resultaron crónicamente infectados con HCV para la extracción de una nueva muestra de sangre y para la obtención de fluidos biológicos. En todos los casos, se les dieron respectivamente a los participantes del estudio las indicaciones correspondientes para la toma de las muestras. Del total acudieron a la nueva cita 37 pacientes. Dieciséis de ellos estaban coinfectados con HIV (21 hombres; edad promedio 41,8 años, rango: 23-59 y 16 mujeres edad promedio 42,5 años, rango: 23-61). Todos los sujetos tenían ARN de HCV detectable en suero por RT-Nested PCR y no estaban bajo ningún tipo de tratamiento antiviral (Tabla 1).

Las muestras de suero fueron nuevamente analizadas a fin de confirmar la viremia en el mismo momento en que se tomó la muestra de fluido biológico. La muestra de fluido biológico fue procesada (según el tipo de fluido Ver 3.2.2) y almacenada en un freezer a -70°C hasta la detección del ARN viral.

Tabla 1: Características de la población de estudio y determinación del genotipo de 37 pacientes infectados con HCV (ARN+) de Córdoba, Argentina.

| Variables | HCV | HCV/HIV |
|-------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| | mono infectados (n=21) | co-infectados (n=16) |
| Edad (promedio) | 45 | 38 |
| Sexo | | |
| Masculino | 10 | 11 |
| Femenino | 11 | 5 |
| Riesgo Parental | | |
| Transfusión | 6 | 2 |
| UDEV | 3 | 13 |
| Cirugía | 13 | 5 |
| Riesgo Incierto* | 6 | 2 |
| HCV Genotipos | | |
| Genotipo 1 | 10 | 13 |
| Genotipo 2 | 9 | 1 |
| Genotipo 3 | 2 | 2 |
| Carga viral HCV(promedio) log | 4,6 | 5,6 |

* Historia de atención dental, inyecciones no seguras, transmisión familiar (compartir hojas de afeitar, cepillos de dientes y peines), tatuaje, múltiples parejas sexuales, Hombres que tienen sexo con Hombres (HSH). UVDE, Usuario de Drogas endovenosas.

3.1.3a. Estudio del perfil epidemiológico molecular de HCV

Para evaluar el perfil epidemiológico molecular de los genotipos de HCV en Córdoba y determinar los posibles cambios en la distribución de genotipos y sus determinantes en la región central de Argentina se partió de 311 individuos (273 mono infectados y 38 coinfectados HCV/HIV) que fueron confirmados positivos para HCV en el Instituto de Virología de la Universidad de Córdoba, Argentina (1999-2009).

3.1.3b. Análisis de Incidencia de los genotipos.

El total de muestras HCV positivas analizadas fue 318 de las cuales 147 fueron HCV-1, 132 HCV-2 y 18 HCV-3, respectivamente. En el resto no se pudo identificar el genotipo.

Se estudió la incidencia de los genotipos HCV-1, HCV-2 y HCV- 3 por año, y luego se correlacionó dicha distribución con los diferentes factores de riesgo relacionados a la infección con HCV en cada caso (métodos 3.2).

3.1.3c. Estudio de diversidad genética de los subtipos 1a y 1b: filogenia y filogeografía.

Del total de muestras genotificadas se seleccionaron aquellas que resultaron ser HCV-1 por restricción enzimática de dicha región (RFLP). Luego de confirmar los diferentes genotipos y subtipos por secuenciamiento, se incluyeron para los análisis de filogenia, filogeografía, coalescencia y reloj molecular 21 secuencias HCV-1a de la región NS5B y 39 de HCV-1b. De la región E2 se utilizaron para los análisis 9 secuencias HCV-1a y 12 HCV-1b.

Para el análisis de filogeografía, las secuencias se agruparon según su ubicación geográfica en: secuencias de Córdoba Capital y Gran Córdoba (CBA)

y secuencias de otras localidades como Cruz del Eje, Villa María, Río IV, etc. (OLC).

3.2 MÉTODOS

3.2.1. Extracción de ARN de suero o plasma

La extracción de ARN se realizó utilizando el reactivo comercial Trizol® (Invitrogen BRL) de acuerdo al siguiente protocolo:

1. A cada tubo de reacción de 1,5 ml se adicionó 10 µg (1 µl de tRNA a 10 µg/mL), 0,75 ml de la solución de Trizol (a temperatura ambiente) y 200 µl de cloroformo. Posteriormente, se agregaron 150 µl de la muestra (suero o plasma).
2. Las muestras fueron homogeneizadas, una a una, mediante el uso de un vortex durante 1-2 minutos.
3. Luego de una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente las muestras fueron sometidas a una centrifugación a 14.000 rpm durante 15-20 minutos, a 4°C.
4. La fase acuosa obtenida en la fase superior se transfirió a nuevos tubos que contenían igual volumen de isopropanol, a 10°C. Después de una rápida y suave homogeneización (por inversión de los tubos), la solución fue incubada a - 20°C, toda la noche o, alternativamente, a temperatura ambiente durante 2 hs.
5. El ARN precipitado fue centrifugado a 14.000 rpm por 15-20 minutos, a 4°C, luego se descartó el sobrenadante y se obtuvo un sedimento de ARN.
6. El sedimento fue lavado con 600 µl de etanol al 75% (a 10°C) y centrifugado nuevamente a 14.000 rpm por 5-15 minutos, a 4°C.
7. Los tubos que contenían el ARN se mantuvieron abiertos a temperatura ambiente durante 10-20 minutos para permitir que se seque.
8. El sedimento de ARN se resuspendió en 20 µl de agua libre de RNAsas estéril (mili Q, tratada con DEPC).

Observación: La técnica de extracción de ARN se realizó bajo campana de seguridad biológica, decontaminando previa y posteriormente la superficie de trabajo con luz ultravioleta. Durante todas las etapas de lavado e hidratación del ARN, las muestras fueron mantenidas en baño de hielo. Las muestras de ARN fueron sometidas, inmediatamente a transcripción inversa para la síntesis de ADNc o almacenadas a -70 °C hasta su procesamiento.

3.2.2. Preparación de fluidos biológicos:

Método de obtención y preparación del Semen, plasma seminal (PS) y Células

La muestra se obtuvo por masturbación con 2/3 días de abstinencia sexual. Posteriormente, dentro de las 3hs de obtenida, se remitió refrigerada (4°C) al InViV, donde se colocó en un tubo eppendorf de 1,5ml. Se centrifugó a 1.500 r.p.m durante 10 min., se tomó el sobrenadante, se lo alicuotó y almacenó a -70 °C. Las células seminales se obtuvieron a partir del pellet al que se le agregó 1ml de medio esencial mínimo (MEM).

Método de preparación de la saliva (SA)

Se colectó una salivación en un recipiente libre de restos de alimentos, y sin secreción nasal. Se observó la ausencia de sangre macroscópica. La muestra de saliva se diluyó en PBS estéril en una dilución factor 2 en el mismo frasco estéril. Luego, se trasvasó el material a un eppendorf de 1,5ml y se centrifugó durante 10min. a 1.200 r.p.m. Finalmente, se almacenó a -70 °C hasta su procesamiento.

Método de preparación del Hisopado Cervical (HC)

Se obtuvo la muestra mediante un hisopado cervical del canal vaginal con hisopo de dracón estéril (Baxter Scientific, McGaw Park, IL). En todos los

casos se indicó una abstinencia sexual de 2/3 días. La muestra se procesó dentro de las 3 hs de obtenida de la siguiente forma:

1. El hisopo se sumergió en una solución de 3ml de PBS estéril (pH 7,5) y se mantuvo refrigerada (4 °C) hasta su llegada al laboratorio.
2. Luego se trasvasó a tubos eppendorf y se vortereó durante 20 seg., luego se procedió a centrifugación durante 15 min a 1800 r.p.m. Finalmente se recogió el sobrenadante y se almacenó a -70 °C hasta su procesamiento.

Método de Ficoll-hypaque para la separación de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

La separación de CMSP se realizó de acuerdo al siguiente procedimiento:

3. Se realizó una dilución factor 2 de la sangre anticoagulada en PBS estéril.
4. Luego se agregó la sangre diluida a 3 ml de ficoll por las paredes del tubo tratando de no romper el gradiente.
5. Posteriormente, se procedió a centrifugación durante 30 min. a 2.000 r.p.m. Luego se tomó la nube de glóbulos blancos.
6. Se lavaron las células 3 veces con PBS estéril, en las condiciones del paso anterior.
7. Finalmente, después de contar las células y estimar una cantidad aproximada de 10^6 células por mililitro, se tomaron dos alícuotas: una se reconstituyó con 1ml de medio RPMI y almacenó a -70 °C hasta su procesamiento y la otra se la almacenó en condiciones óptimas para su posterior cultivo celular, en tanque de nitrógeno líquido.

3.2.3 Extracción de ARN de fluidos biológicos: plasma seminal (PS), hisopado cervical (HC), saliva (SA) y células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

Para la extracción de ARN se utilizó el método comercial QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN; Tecnolab, Argentina) de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Se colocaron 560 μ l de buffer AVL+ carrier en un tubo eppendorf de 1,5 ml.
2. Al tubo anterior se agregaron 140 μ l de fluido biológico (PS, HC, SA), y se mezcló con vortex 15 seg.
3. Se incubó a temperatura ambiente (15-25°C) durante 10 min. Y luego se centrifugó brevemente, para remover las gotitas en al tapa del tubo.
4. A la muestra se le agregó 560 μ l de etanol (96-100%), se mezcló con vortex durante 15 seg. Y luego se procedió a una centrifugación breve, para remover las gotitas en al tapa del tubo.
5. Luego se transfirió 630 μ l de la solución del paso 4 en la columna Qiam Mini Spin para luego centrifugar durante 1 min. a 6.000 r.p.m. Se colocó la columna en un tubo nuevo de 2ml y se descartó el tubo con su filtrado.
6. Después de repetir el paso 5 se agregó 500 μ l del buffer AW1, se centrifugó durante 1 min. a 6.000 r.p.m. y posteriormente, se colocó la columna en un tubo nuevo de 2ml descartando el tubo con su filtrado.
7. Se repitió el paso 6 pero con el agregado de 500 μ l del buffer AW2. Luego, se centrifugó el tubo durante 3 min. a máxima velocidad (14.000 r.p.m.). Al finalizar, se colocó la columna en un tubo nuevo para eliminar la posibilidad de arrastrar buffer AW2.

8. Se colocó la columna en un tubo eppendorf nuevo de 1,5ml y se agregó 60 µl de buffer AVE (equilibrado a temperatura ambiente), se incubó a temperatura ambiente 1 min. y centrifugó a 6.000 r.p.m. durante 1 min.
9. Finalmente, se descartó la columna, y almacenó el ARN viral (eluido) a -20 o -70°C hasta su procesamiento.

3.2.4. Síntesis de ADN complementario (ADNc). Reacción de transcripción inversa (RT):

Los fragmentos de ADNc de HCV se sintetizaron a partir de 10 µl de ARN, en presencia de 200U de la enzima transcriptasa inversa MMLV (Moloney Murine Leucemia Virus; Promega, Madison, WI), 0,2mM de dNTPs, 10U/ul de Inhibidor de RNAsas (RNase OUT; Invitrogen, Carlsbad, CA) y 10 pmol de “*random hexámeros primers*” (oligonucleótidos hexaméricos que hibridan al azar) o del oligonucleótido externo de polaridad negativa -K11as- en un volumen final de 20 µl. Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 60 minutos y posteriormente colocadas en un baño a 65°C, durante 5 min (Ré et al., 2003).

3.2.5. Reacción de PCR de la Región 5'NC:

Los fragmentos de ADN (5 µl) fueron amplificados en presencia de 0,2 mM de cada uno de los respectivos oligonucleótidos externos S1K10 y A1K11 (Tabla 3) de 0,8 mM de dNTPs, 3 mM de MgCl₂ y 1 unidad de enzima Taq polimerasa (Invitrogen, Life Technologies, Carisbad, CA) en volumen final de 50 µL. Luego de una etapa inicial de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos, el ADN fue sometido a 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 50°C

durante 45 - 90 segundos y 72°C durante 2 minutos, seguidos por una etapa de extensión final a 72°C por 7 minutos.

Reacción de Nested -PCR: La segunda etapa de amplificación (Nested - PCR) se realizó a partir de 1 µL del producto de la PCR I, en presencia de los oligonucleótidos internos (S2K15 y A2K16) en las mismas condiciones de la primera amplificación (Tabla 3).

La detección de los productos de Nested - PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% conteniendo 0,5 µL/mL de bromuro de etideo. La visualización de los productos de 280 pb amplificados se examinaron mediante el uso de un transiluminador ultravioleta (Sigma).

3.2.6. Amplificación de la Región NS5B

Se amplificó la región no estructural 5B (NS5B) mediante una Nested-PCR descrito por Chen y Weck, 2002 (Tabla 3), para subtipificar las muestras que habían sido genotipificadas previamente. Para tal fin, se partió del ADNc previamente sintetizado con random hexámeros primers (ver 3.2.4) o del material original siguiendo los pasos de extracción y síntesis de ADNc según lo descrito en las secciones 3.2.1-4 Los productos obtenidos se sometieron a secuenciación y posterior análisis filogenético.

3.2.7. Amplificación de Región E1/E2

Se sometió a la amplificación de esta región a todas las muestras que pudieron ser amplificadas para la región NS5B. Bajo las condiciones de reacción descritas por Golemba et al., 2010, la secuencias de primers utilizados esta descrita en la Tabla 2.

Para tal fin, se partió del ADNc previamente sintetizado con random hexámeros primers (ver 3.2.4) o del material original siguiendo los pasos de extracción y síntesis de ADNc según lo descrito en las secciones 3.2.1/3.2.4. Los productos obtenidos se sometieron a secuenciación y posterior análisis filogenético.

Tabla 2. Secuencia de nucleótidos de los *primers* utilizados en la amplificación de un fragmento de 280 pb de la región 5'NC, de 380pb de la región NS5B y de 610pb de la región E1/E2 del genoma de HCV.

| Oligonucleótido | Región | Secuencia (5'→3') | Posición | Round |
|-----------------|--------|-----------------------|-------------|-------|
| ES K10 | 5'NC | GGCGACACTCCACCATRR AT | 6 a 25 | I |
| EA K11 | 5'NC | GGTGCACGGTCTACGAGACC | 329 a 310 | I |
| IS K15 | 5'NC | ACCATRRATCACTCCCCT GT | 17 a 36 | II |
| IA K16 | 5'NC | CAAGCACCTATCAGGCAGT | 295 a 276 | II |
| ES NS5B | NS5B | TGGGGTTCTCGTATGATACCC | 7904 a 7922 | I |
| EA NS5B | NS5B | CCTGGTCATAGCCTCCGTGAA | 8295 a 8275 | I |
| IS NS5B | NS5B | GATACCCGCTGCTTTGACTC | 7916 a 7935 | II |
| IA NS5B | NS5B | CCTCCGTGAAGGCTCTCAG | 8284 a 8266 | II |
| ES E2-1a | E1/E2 | GGATATGATGATGAACTGGTC | 1301 a 1321 | I |
| EA E2-1a | E1/E2 | ATGTACAGCCGAACCAGTTG | 1982 a 2001 | I |
| IS E2-1a | E1/E2 | GGACATGATCGCTGGTGCTCA | 1376 a 1396 | II |
| IA E2-1a | E1/E2 | TCCGCACACTTTGGTGAATCC | 2016 a 2036 | II |
| ES -1b | E1/E2 | GGATATGATGATGAACTGGTC | 1301 a 1321 | I |
| EA-1b | E1/E2 | GTGTAAGTGGCCTCRGGRTG | 2125 a 2106 | I |
| IS N 1b | E1/E2 | TGGGCTAAGGTYTTGRTTGT | 1443 a 1462 | II |
| IA N 1b | E1/E2 | GGCAGATCAAGGTGTRTT | 2086 a 2067 | II |
| IS 1b | E1/E2 | TCCATGGTGGGGAAGTGGGC | 1428 a 1447 | II |
| IA 1b | E1/E2 | GAAGCAGTCCGTRGGRCA | 2099 a 2082 | II |

Código de oligonucleótido, la primera letra indica la posición en la secuencia blanco (E, externa; I, interna) y la segunda indica la polaridad (S, "sentido"; A, "antisentido"). Además se agrega el subtipo de HCV (1 a o 1 b). Secuencia patrón de HCV-1: AF009606.

3.2.8. Determinación de la carga viral para HCV en plasma

Se determinó la cantidad de ARN HCV usando el método comercial NASBA HCV QT (Organon Teknika, Boxtel, The Netherlands) según las indicaciones del fabricante.

3.2.9. Determinación de los genotipos de HCV mediante Restricción enzimática y análisis de polimorfismo de los fragmentos largos de restricción (RFLP) de la región 5'NC.

Este ensayo fue aplicado a las muestras que resultaron ARN HCV positivas por la técnica de RT- Nested PCR de la región 5'NC.

Las reacciones de transcripción reversa y RT-Nested PCR se realizaron de acuerdo a lo descrito anteriormente.

Los productos de PCR II de la región 5'NC obtenidos fueron sometidos a dos digestiones simultáneas, utilizando las enzimas Ava II y RsaI (Invitrogen, Life Technologies, Carisbad, CA). Cada muestra de ADN (10µl) fue digerida con 5 unidades de cada enzima de restricción adicionando 1µL de los respectivos buffer de cada enzima en volumen final de 20 µl. Luego de una incubación a 37°C durante 60 - 90 minutos, los fragmentos de restricción fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 3% en buffer TBE 1X adicionando 0,5 µL/mL de bromuro de etidio. La visualización de los fragmentos de restricción se realizó mediante el uso de un transiluminador ultravioleta (Sigma). Los tamaños de los fragmentos obtenidos se compararon con un patrón de peso molecular, ladder DNA de 25 pb (Invitrogen. Life Technologies, Carisbad, CA). La identificación de los genotipos 1, 2, 3a y 3b de HCV se logró evaluando el perfil electroforético obtenido para cada muestra de acuerdo a los patrones descriptos en la Tabla 3.

Tabla 3: Tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos luego de la digestión enzimática de una fragmento de 280 pb de la región 5'NC de HCV. Interpretación de los resultados.

| <i>Enzima RSA I: (GTAC)</i> | | | | |
|-----------------------------|-------|-------|--------|--|
| Genotipo | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | |
| Tamaño | 135bp | 77bp | 66bp | |
| | 120bp | 58 bp | 68 bp | |
| | 20bp | 120bp | 120 bp | |
| | | 20bp | 20bp | |

| <i>Enzima AVA II: GG (A/T)CC</i> | | | | |
|----------------------------------|-------|-------|--------|-------|
| Genotipo | | | | |
| | 1 | 2 | 3a | 3b |
| Tamaño | 90bp | 162bp | 90bp | 162bp |
| | 72bp | 113bp | 72bp | 113bp |
| | 113bp | | 113 bp | |

3.2.10. Caracterización genómica de los aislamientos de HCV mediante secuenciamiento directo y análisis filogenético

El ARN viral fue sometido a una transcripción inversa y posteriormente amplificado mediante Nested-PCR con primers correspondientes al fragmento genómico NS5B (380pb) y E1/E2 (610pb.).

Los productos obtenidos (95µl) fueron sometidos a una corrida electroforética en gel de agarosa Low Melting (Sigma) al 1% teñido con bromuro de etideo.

Los productos de la Nested PCR fueron extraídos y purificados a partir de la banda de tamaño molecular esperado extraída del gel, utilizando el equipo comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Posteriormente, el ADN (4 µl) purificado fue sometido a una nueva corrida electroforética conjuntamente con un marcador de peso molecular - Low DNA MASS™ ladder (Life- Technologies, USA) - que permite establecer la cantidad (ng/µl) aproximada de ADN presente en la muestra pre-secuenciamiento.

El ADN purificado (150 ng/µl) fue sometido a la reacción de secuenciamiento directo con 5 pmol/ul de ambos primers, interno y externo. Los productos de PCR fueron secuenciados en el laboratorio de servicios Macrogen -Corea (www.macrogen.com).

Secuencias génicas

Para los análisis filogenéticos las secuencias fueron agrupadas por región genómica (NS5B y E2) y por grupos de relevancia biológica.

Además de las secuencias propias del trabajo se utilizaron secuencias obtenidas del GenBank para permitir el análisis de nuestras secuencias en distintos contextos.

Para estudiar el genotipo de las secuencias analizadas se utilizaron 34 secuencias de genomas completos de HCV, que forman el grupo de secuencias de referencia que posee el sistema de genotipificación viral del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping>).

Las secuencias fueron visualizadas y editadas utilizando el programa BioEdit v 7.0.9.0 (Hall, 1999).

La lista de secuencias de referencia usada y su código de referencia son: Subtipo 1a: AF009606, AF011751, AF271632; Subtipo 1b: D90208, AB049088, AF356827, AF139594; Subtipo 1c: D14853, AY051292; Subtipo 2a: D00944, AF169004, AB047639, AB047641; Subtipo 2b: D10988, AF238486, AB030907, AY232730; Subtipo 2c: D50409; Subtipo 2i: DQ155561, D86530, L48499; Subtipo 2k: AB031663; Subtipo 3a: D17763, D28917, AF046866; Subtipo 3b: D49374; Subtipo 3k: D63821; Subtipo 4a: Y11604; Subtipo 5a: Y13184, AF064490; Subtipo 6a: Y12083; Subtipo 6b: D84262; Subtipo 6d: D84263; Subtipo 6g: D63822; Subtipo 6h: D84265; Subtipo 6k: D84264.

Filogenia

Para los siguientes análisis se construyeron árboles filogenéticos por dos métodos descriptos a continuación.

Verosimilitud: Se seleccionó el modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajustaba al alineamiento mediante el programa ModelTest 3.07 (Posada y Crandall, 1998). Además del modelo que mejor se ajusta, este programa informa de los valores más verosímiles para cada uno de los parámetros que deban ajustarse en dicho modelo. Utilizando esta información se realizó una

búsqueda heurística del árbol más verosímil mediante rearrreglos del tipo NNI (Nearest Neighbor Interchange) y SPR (Section Pruning and Reconnection) con el programa PhyML versión 3.0 para Linux (Guindon y Gascuel, 2003) y se evaluó la medida del soporte de ramas por remuestreo (100 pseudoreplicas).

Distancia: Utilizando el programa MEGA 4 (Tamura et al., 2007) se reconstruyó la filogenia empleando métodos de distancia y neighbor joining teniendo en cuenta el modelo de sustitución de nucleótidos y los parámetros sugeridos por el programa ModelTest. Para evaluar el soporte de rama se utilizaron 1000 pseudoreplicas de remuestreo.

3.2.11. Reconstrucción demográfica

Los análisis de coalescencia se realizaron con el programa BEAST 1.7.4 (Drummond y Rambaut, 2007), el cual utiliza una metodología bayesiana para estimar simultáneamente la filogenia, los parámetros del modelo de sustitución de nucleótidos y la dinámica de la población en evolución bajo los modelos de reloj molecular estricto o relajado a partir de las secuencias y de información a priori o "*priors*". Para deducir la dinámica poblacional a partir de las secuencias es indispensable realizar una calibración temporal, ya sea con una tasa de sustitución de nucleótidos o con una estimación de la fecha del ancestro común más reciente. Para realizar este tipo de análisis es necesario contar con alguna estimación para la tasa de sustitución de nucleótidos que opera en dicha región y genotipo. Para tal fin, se descargaron secuencias completas de HCV 1a y 1b del Genbank con fecha de muestreo y lugar conocidos y se realizaron análisis de calibración de dicha tasa en función de las fechas de muestreo (Tabla 4).

Tabla 4: Resultados de la calibración de las tasas de sustitución utilizando un dataset externo.

| Genotipo | Región | Media | Desvío Estándar | Distribución |
|----------|--------|-----------------------|-----------------------|--------------|
| 1a | NS5B | 9×10^{-4} | $1,70 \times 10^{-4}$ | Lognormal |
| | E2 | $3,41 \times 10^{-3}$ | $4,53 \times 10^{-4}$ | Normal |
| 1b | NS5B | $4,2 \times 10^{-4}$ | $4,10 \times 10^{-4}$ | Normal |
| | E2 | $3,42 \times 10^{-3}$ | $6,07 \times 10^{-4}$ | Normal |

Utilizando estas distribuciones como *prior* para el reloj molecular, se obtendrán los perfiles demográficos para las distintas regiones.

Las MCMC (Monte Carlo Markov Chains) fueron corridas bajo las distintas alternativas de dinámica poblacional y relojes moleculares por 5×10^7 generaciones y luego analizadas con el programa TRACER 1.5 (disponible desde el sitio: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>). Los análisis que no llegaron a convergencia con la longitud inicial de cadena, fueron corridos por 1×10^8 generaciones y analizados nuevamente. Aquellos análisis que no convergieron en la segunda corrida, fueron descartados del análisis posterior debido a que se decidió que prolongar los análisis más allá de este número de generaciones resultaría prohibitivo desde el punto de vista informático. Finalmente, para cada grupo de secuencias, se calcularon los factores de Bayes (Kass y Raftery, 1995) para seleccionar el modelo de población y de reloj que mejor se representó a los datos. En el caso de que dos modelos no pudieran diferenciarse por este factor, se definió como “mejor” al más sencillo. Finalmente los resultados presentados corresponden a los parámetros relevantes estimados para el mejor modelo.

3.2.12. Filogeografía

Se examinó la correlación entre la información de secuencia y la ubicación geográfica de las muestras teniendo en cuenta el nivel de incertidumbre de la filogenia con el programa BaTS (Parker y col., 2008). Las muestras de árboles obtenidas por métodos bayesianos (producto de la MCMC corrida con el programa BEAST 1.7.4; ver sección anterior) fueron utilizadas para calcular los valores observados y esperados (bajo una hipótesis nula de no asociación geográfica) de tres medidas de asociación: dos globales AI (Association Index); PS (Parsimony Score); y una específica de cada carácter (ubicación geográfica) MC (Maximum monophyletic Clade). Por último se realizó una prueba de hipótesis para comprobar si existen diferencias entre el valor del índice esperado y observado.

Utilizando el paquete bioinformático Mesquite (Maddison y Maddison, 2011), se realizó la reconstrucción por parsimonia del posible sitio de origen para las muestras sobre el árbol de máxima credibilidad de los clados (MCC tree) obtenido a partir del resumen de las topologías obtenidas durante la MCMC que se utilizó para el análisis filogeográfico con el programa BaTS.

3.3 Análisis estadísticos

Para el estudio del perfil epidemiológico molecular los promedios y tasas de infección fueron calculados con intervalos de confianza exacto binomial (IC) de 95%. Las tasas fueron comparadas utilizando el test de Pearson's χ^2 o el test exacto de Fisher's mediante el uso del programa STATA 6 (Stata Corporation, College Station, Texas). A modo inferencial, se realizó el análisis de enfoque de riesgo univariado y multivariado para identificar los factores asociados con la

infección por HCV y para estimar coeficientes de riesgo, por medio de la estimación de modelos de regresión logística múltiple. A través de este modelo se estimaron, con sus respectivos *intervalos de confianza (IC)*, los *odds ratio (OR)* como medidas de asociación entre la presencia de HCV+ y el factor de interés. La misma metodología se utilizó para el análisis de la respuesta al tratamiento HAART en los pacientes coinfectados HCV/HIV. En todos los casos la significancia estadística se estableció a un $p < 0,05$.

Para el estudio de las incidencias de genotipo por año, fueron estimados modelos generalizados de Poisson de efectos aleatorios (modelos mixtos), definiendo como cluster o agrupamiento al año. Luego en una segunda parte del análisis en función a los resultados del estudio de incidencia (genotipos x año), se intentó indagar acerca de los efectos de las covariables desagregando el tiempo en aquellas categorías en donde se observó mayor incidencia. Se ajustaron modelos lineales generalizados con variable respuesta el genotipo (Subtipo de HCV 1a y 1b) con componente aleatorio binomial), empleando las covariables sexo, cirugía, edad, UDEV, transfusiones, riesgo incierto, sexual y hemofílicos. En el predictor lineal y función de enlace canónica (logaritmica) (Mc Cullagh y Nelder, 1989). Se usó el campo de los modelos lineales mixtos generalizados, empleando una regresión poisson.

Para ello se testearon modelos logísticos para la respuesta incidencia (0, 1), considerando el efecto del tiempo como un nivel para fuente de variabilidad (two-level) (Rabe-Hesketh y Skrondal, 2008).

Fueron estimados modelos de regresión logística múltiple multilevel considerando las covariables: edad, sexo, cirugía, etc. A partir de estos modelos se estimaron las medidas de asociación, OR, para interpretación de cocientes de chances.

3.4 Aspectos Éticos

Todos los individuos estudiados en la tesis presentada dieron su consentimiento informado, los cuales fueron presentados en el marco de un proyecto y aprobados por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Medicas, de la UNC y por el Comité Institucional de Ética de Investigación en Salud (C.I.E.I.S) del Ministerio de Salud de la provincia de Córdoba Oulton Romagosa (Reg. 1503/10), según corresponda.

4. Resultados

4. RESULTADOS

En esta sección se detallan los resultados obtenidos de cada uno de los objetivos planteados en esta tesis.

4.1 Estudio de prevalencia de infección de HCV en individuos HIV(+)

- a) De los 320 individuos infectados con HIV estudiados en el periodo 2003-2004, 39 (12,2%) resultaron serológicamente positivos para HCV. El RNA de HCV se detectó en 97% (n=38) de las muestras positivas mostrando una prevalencia de infección activa de 11,8%.

El análisis de regresión logística multivariado mostró que el **sexo** (OR ajustado=1,326; 95% IC: [1,086-2,609]), **edad** (OR=2,562; 95% IC: [2,445-2,691]) y **UDEV** (OR=25,0; 95% IC: [6,2-100,1]) fueron factores de riesgo asociados a la infección por HCV en los pacientes infectados con HIV.

- b) Del total de paciente estudiados (N=238) en el periodo 2004 - 2007, 62 (26%) tuvieron serología positiva para HCV y de ellos 20,2% (48/238) presentó una infección activa por HCV (nested-PCR resultados positivos). A pesar de que no se contó con datos epidemiológicos suficientes se observó que el uso de DEV fue el factor de riesgo preponderantemente asociado a la infección por HCV.

4.2 Estudio de la influencia de la infección por HCV y otros factores clínico-epidemiológicos en la respuesta virológica e inmunológica al tratamiento HAART en individuos infectados con HIV.

Durante el periodo analizado (48 meses) se observó una respuesta sostenida a la terapia HAART del 81% del total de pacientes (193/238). Debido a la dependencia de la estructura entre las covariables, se corrieron varios modelos de regresión logística con el fin de obtener las estimaciones de riesgo ajustados. Las variables asociadas ($p < 0,05$) con la respuesta inmunológica y virológica se muestran en la tabla 6. No se observó asociación estadísticamente significativa entre la respuesta inmunológica o virológica con el sexo o el esquema de HAART utilizado. El análisis muestra que la serología positiva de HCV, la edad al momento del diagnóstico de HIV (>40 años vs. <40 años), la duración del tratamiento y el estadio clínico de SIDA (según categorías de la OMS, asociado a < 200 CD4 cel. /ml independientemente de la carga viral < o > a 100.000 copias/ml), tuvieron una asociación significativa con la respuesta inmunológica y virológica al tratamiento HAART. En todos los casos no hubo discrepancias entre individuos que fueron respondedores tanto inmunológicos como virológicos. Así, individuos con un promedio de carga viral basal de < 100.000 copias / mL y una cantidad basal de CD4 de > a 200-350 cel. / μ L (31,5%, 75/238), respondieron en el 90,6% (68/75) de los casos. Mientras que aquellos (42,8%, 102/238) tenían un nivel inicial de ARN HIV >100.000 copias/mL y un conteo inicial de CD4 200-350 cel. / μ L solo respondieron en el 84,3% (86/102) de los casos. En tanto de los pacientes que tenían un nivel pre HAART de >100.000 copias/mL y un nivel basal de CD4 <200 cel. / μ L (24,1%, 57/238) tuvieron respuesta exitosa en un 64,9% (37/57). Mientras que aquellos que tenían el pre-HAART con un promedio valor de < 100000

copias/mL y conteo de CD4 < 200 cel/ μ L (1,7%, 4/238) tuvieron respuesta existosa en un 50% (2/4), ($p=0,02$) (tabla 5).

Tabla 5: Características de los 238 individuos HIV positivos pertenecientes al Consultorio de infectología del Hospital Nacional de Clínicas, de la Provincia de Córdoba, Argentina.

| Variables | Pacientes HIV estudiados, (n = 238) |
|--|--|
| Edad, promedio años, (rango) | 39, 2 (21,0-70,0) |
| Sexo, no. (%) masculinos | 200 (84) |
| Valor promedio pre-HAART de ARN HIV [<100 000 copias/mL (SD)] y cantidad de CD4 <200 cel./ μ L, no. % | 57 (23,9) |
| Valor promedio pre-HAART de ARN HIV [<100 000 copias/mL (SD)] y cantidad de CD4 200-349 cel./ μ L, no. % | 75 (31,5) |
| Valor promedio pre-HAART de ARN HIV [>100 000 copias/mL (SD)] y cantidad de CD4 200-349 cel./ μ L, no. % | 102 (42,8) |
| Valor promedio pre-HAART de ARN HIV [<100 000 copias/mL (SD)] y cantidad de CD4 <200 cel./ μ L, no. % | 4 (1,7) |
| Edad al diagnóstico de HIV (\geq 40 años), no (%) | 35 (14,7) |
| Estadio Clínico OMS, no. (%) | |
| 1 y 2 | 174 (73) |
| 3 | 2 (0,8) |
| 4 | 62 (26) |
| Régimen HAART | |
| NRTI ¹ | 228 (96) |
| NNRTI ² | 154 (64,7) |
| PI ³ | 74 (31) |
| Infección HCV (estado serológico), no (%) | 62 (26,0) |
| Infección HCV (RNA HCV), no (%) | 48 (20,2) |
| HCV Genotipos ⁴ | |
| HCV-1, no | 30 (62,5) |
| HCV-2, no | 2 (4,2) |
| HCV-3, no | 7 (14,6) |

¹NRTI, Inhibidor nucleosídico de transcriptasa reversa; ²NNRTI, Inhibidor no nucleosídico de transcriptasa reversa; ³ IP, Inhibidor proteasa. ⁴ Nueve muestras ARN HCV+ resultaron genotipo indeterminado.

Tabla 6: Análisis de regresión logística múltiple asociada a la respuesta post HAART.

| Variable | Respuesta Inmunologica (CD4 > o = 350 cel/ml) | | | Respuesta Viroológica (HIV CV < 50copias/ml) | | |
|--|--|-------------|----------|--|--------------|----------|
| | OR | (95%IC) | <i>p</i> | OR | (95%IC) | <i>p</i> |
| Infección HCV (Anti HCV)* | 0,34 | (0,15-0,82) | 0,016 | 0,33 | (0,14- 0,77) | 0,011 |
| Hombre vs. Mujer | 0,62 | (0,27-1,43) | NS | 0,87 | (0,36 -2,07) | NS |
| Edad al momento del diagnóstico de HIV (<40 años vs. ≥40 años)* | 1,04 | (1-1,09) | 0,030 | 1,03 | (0,99- 1,07) | 0,041 |
| Estadio Clínico (OMS) | | | | | | |
| 3 | 0,77 | (0,37-1,6) | NS | 0,24 | (0,02-2,85) | NS |
| 4 (<200 CD4 cel. /ml)# | 0,42 | (0,21-0,85) | 0,016 | 0,45 | (0,22-0,90) | 0,024 |
| Esquema HAART | | | | | | |
| NNRTI(No N) | 0,72 | (0,35-1,5) | NS | 0,63 | (0,3-1,32) | NS |
| IP | 1,13 | (0,53-2,40) | NS | 1,32 | (0,61-2,84) | NS |

* Factor de asociación: P valor < 0,05. # Carga Viral no fue asociada con la respuesta.

4.3 Estudio de detección de HCV en diferentes fluidos biológicos saliva (SA), plasma seminal (PL), hisopado cervical (HC) y las células mononucleares de sangre periférica (CMSP).

Del total de pacientes estudiados (sección 3.1.2 de materiales y métodos) se detectó ARN de HCV en: 31% (5/16) de los hisopados cervicales, en 18.7% (8/37) de las salivas, en 29% (6/21) del plasma seminal, y 78% (29/37) de CMSP. Los genotipos hallados en los diferentes fluidos coincidieron con los hallados en su correspondiente suero.

A fin de descartar una probable contaminación de las CMSP que pudiera ocurrir por arrastre a partir del plasma, se analizaron por PCR todos los líquidos de lavado de cada fluido biológico, de cada paciente. Dichos los líquidos resultaron todos ARN de HCV negativos.

Cuando se analizaron los resultados de la detección molecular de HCV en los diferentes fluidos biológicos *vs* la carga viral, genotipo, coinfección HCV/HIV y factores epidemiológicos de cada sujeto no se halló asociación estadísticamente significativa (tabla 7). A pesar de esto se observó que el mayor porcentaje de detección se encontró cuando la carga viral era mayor a 5 log ($p > 0,05$).

Tabla 7: Detección de ARN de HCV en diferentes fluidos biológicos de 37 pacientes HCV positivos en Córdoba, Argentina

| Variables (*) | Saliva | | | Plasma Seminal | | | Hisopado Cervical | | | CMSP | | |
|-------------------------|--------|----|----------|----------------|-----|----------|-------------------|-----|----------|------|----|----------|
| | n | % | <i>p</i> | n | % | <i>p</i> | n | % | <i>p</i> | n | % | <i>p</i> |
| Genotipos | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 5 | 63 | NS | 4 | 67 | NS | 2 | 40 | NS | 18 | 62 | NS |
| 2 | 2 | 25 | NS | 0 | -- | NS | 2 | 40 | NS | 7 | 24 | NS |
| 3 | 1 | 12 | NS | 2 | 33 | NS | 1 | 20 | NS | 4 | 14 | NS |
| Edad | | | | | | | | | | | | |
| > 40 | 5 | 63 | NS | 2 | 33 | NS | 3 | 60 | NS | 16 | 55 | NS |
| < 40 | 3 | 37 | NS | 4 | 67 | NS | 2 | 40 | NS | 13 | 45 | NS |
| UDEV | | | | | | | | | | | | |
| Si | 5 | 63 | NS | 4 | 67 | NS | 2 | 40 | NS | 13 | 45 | NS |
| No | 3 | 37 | NS | 2 | 33 | NS | 3 | 60 | NS | 16 | 55 | NS |
| HCV Carga Viral | | | | | | | | | | | | |
| > 5 log | 7 | 88 | NS | 6 | 100 | NS | 5 | 100 | NS | 19 | 66 | NS |
| < 5 log | 1 | 12 | NS | 0 | -- | NS | 0 | -- | -- | 10 | 34 | NS |
| Co-infección HIV | | | | | | | | | | | | |
| Si | 5 | 63 | NS | 4 | 67 | NS | 2 | 40 | NS | 12 | 41 | NS |
| No | 3 | 37 | NS | 2 | 33 | NS | 3 | 60 | NS | 17 | 59 | NS |
| Cirugía | | | | | | | | | | | | |
| Si | 3 | 37 | NS | 2 | 33 | NS | 3 | 60 | NS | 13 | 45 | NS |
| No | 5 | 63 | NS | 4 | 67 | NS | 2 | 40 | NS | 16 | 55 | NS |
| Transfusión | | | | | | | | | | | | |
| Si | 3 | 37 | NS | 0 | -- | -- | 3 | 60 | NS | 8 | 28 | NS |
| No | 5 | 63 | NS | 0 | -- | -- | 2 | 40 | NS | 21 | 72 | NS |
| Riesgo Incierto | | | | | | | | | | | | |
| Si | 2 | 25 | NS | 1 | 17 | NS | 0 | -- | -- | 6 | 21 | NS |
| No | 6 | 75 | NS | 5 | 83 | NS | 0 | -- | -- | 23 | 79 | NS |

*No significativo (NS), $p > 0.05$

4.4 Estudio del perfil epidemiológico molecular de HCV

Las características de la población estudiada se detallan en la sección materiales y métodos 3.1.3a.

Las características epidemiológicas de la población total, que resultó HCV positiva (n=311), 273 mono infectados y 38 coinfectados HIV/HCV) se muestran en la tabla 8. La genotipificación se pudo realizar en 310 muestras ARN positivas.

Tabla 8: Población de estudio con infección por HCV.

| Edad(años) | N° | Vías de transmisión | | | | | Adquirido de la comunidad o desconocido |
|------------|----|---------------------|----------|------|------------------------|------------------------|---|
| | | Transfusión | Diálisis | UDEV | Exposición ocupacional | Intrafamiliar o sexual | |
| 0-29 | 29 | 2,7 | 0 | 37,9 | 3,4 | 13,7 | 17,2 |
| 30-39 | 67 | 1,2 | 0 | 37,3 | 0 | 5,9 | 44,8 |
| 40-49 | 69 | 23,2 | 2,9 | 21,7 | 2,9 | 5,8 | 43,5 |
| 50-59 | 87 | 24,1 | 4,6 | 3,4 | 4,6 | 3,4 | 59,8 |
| >59 | 59 | 22 | 3,4 | 1,7 | 3,4 | 0 | 69,5 |

Tabla 9: Distribución de genotipos de 310 pacientes infectados con HCV mono y coinfectados con HIV.

| Genotipo | HCV, n (%) | HCV+HIV, n (%) | Total, n (%) |
|-----------------|------------|----------------|--------------|
| 1 | 135 (49,4) | 27 (72,9) | 162 (52,2) |
| 2 | 120 (43,9) | 1 (2,7) | 121 (39,0) |
| 3 | 18 (6,6) | 5 (13,5) | 23 (7,4) |
| coinfección 1-2 | 0 | 1 (2,7) | 1 (0,3) |
| indeterminado | 0 | 3 (8,1) | 3 (0,9) |

4.4.1 Distribución de genotipos de HCV en individuos mono infectados y coinfectados HCV/HIV.

La distribución de genotipos hallada en la población de estudio (mono infectados HCV y coinfectados HCV/HIV) se muestran en la tabla 9. La distribución de genotipos según las diferentes rutas de transmisión se muestra en la tabla 10. En 153 de 311 pacientes (49,2%), la ruta de transmisión pudo ser identificada, siendo la más común la vía transfusional y el UDEV. Tanto el modelo multinomial lineal como el análisis de regresión logística multivariado mostraron que en la población de estudio la edad condiciona la distribución de genotipos (OR= 3,260, $p < 0,05$) (Figura 4). Específicamente, usando al genotipo 2 como referencia (tabla 11), el grupo etario de 30-39 años tuvo mayor chance (4 veces) de infección con genotipos 1 (OR= 4,524, 95% IC: [1,324-15,385], $p = 0,016$) y 9 veces más con el genotipo 3 (OR= 9,408, 95% IC: [1,923-46,022], $p = 0,005$). En individuos de 40-49 años, el riesgo de estar infectados con el genotipo 3 fue significativamente mayor que por la infección por genotipo 2 (OR= 3,752, 95% IC: [1,071-11,912], $p = 0,038$). En los grupos de 50-59 años y mayores de 59, la prevalencia de genotipo 2 se incrementó abruptamente (OR=2,866, 95% IC: [1,141-7,1999], $p = 0,025$); (OR= 4,586, 95% IC: [1,729-12,164], $p = 0,002$) respectivamente, mientras que en los genotipos 1 y 3 disminuyó (Figura 4). En pacientes UDEV, el riesgo de infección por genotipo 1 fue 11 veces mayor que con el genotipo 2 (OR= 11,627, 95% IC: [1,484-90,909], $p = 0,019$), mientras que las infecciones adquiridas en la comunidad o de riesgo desconocido y en pacientes con historia de transfusión ambos genotipos 1 y 2 se distribuyeron homogéneamente en ambos grupos (45% y 52%; 44% y 38%, respectivamente). Cabe destacar que no se logró identificar las probables rutas de transmisión en el 51% de los pacientes.

Tabla 10: Distribución de genotipos según las diferentes rutas de transmisión.

| Vías de transmisión | Genotipos (n°) | | | |
|---|----------------|----|----------------|----------------|
| | 1 | 2 | 3 | otros |
| Transfusión | 29 | 25 | 9 | 1 ^b |
| Diálisis | 3 | 4 | 1 | 0 |
| UDEV | 18 | 3 | 1 | 0 |
| UDEV-HIV | 27 | 1 | 3 | 3 ^c |
| Exposición Ocupacional | 5 | 3 | 1 | 0 |
| Intrafamiliar o sexual | 9 | 2 | 4 ^a | 0 |
| Adquirido de la comunidad o desconocido | 71 | 83 | 4 | 0 |

^a pacientes HIV (+), n=2; ^b coinfección genotipos 1 y 2; ^c patrón RFLP indeterminado, paciente HIV (+), n=1.

Tabla 11: Análisis multivariado de la edad y los potenciales factores de riesgo asociados con la distribución de genotipos usando como referencia al genotipo 2.

| | | OR | IC95% | <i>p</i> |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------|--------------|----------|
| Genotipo 1 | Grupo etario | | | |
| | 30-39 | 4,524 | 1,324-15,385 | 0,01 |
| | 40-49 | 1,414 | 0,471-4,237 | NS |
| | 50-59 | 0,845 | 0,291-2,457 | NS |
| | >59 | 0,529 | 0,176-1,636 | NS |
| | Sexo Femenino | 1,557 | 0,909-2,666 | NS |
| | UDEV | 11,627 | 1,484-90,909 | 0,01 |
| Genotipo 3 | Historia de transfusión | 1,828 | 0,296-11,236 | NS |
| | Grupo etario | | | |
| | 30-39 | 9,408 | 1,923-46,022 | <0,01 |
| | 40-49 | 3,572 | 1,071-11,912 | 0,01 |
| | 50-59 | 1,064 | 0,128-8,807 | NS |
| | >59 | 1,093 | 0,098-12,172 | NS |
| | Sexo Femenino | 1,264 | 0,403-3,960 | NS |
| UDEV | 2,532 | 0,275-23,291 | NS | |
| Historia de transfusión | 1,047 | 0,167-6,580 | NS | |

NS, no significativo

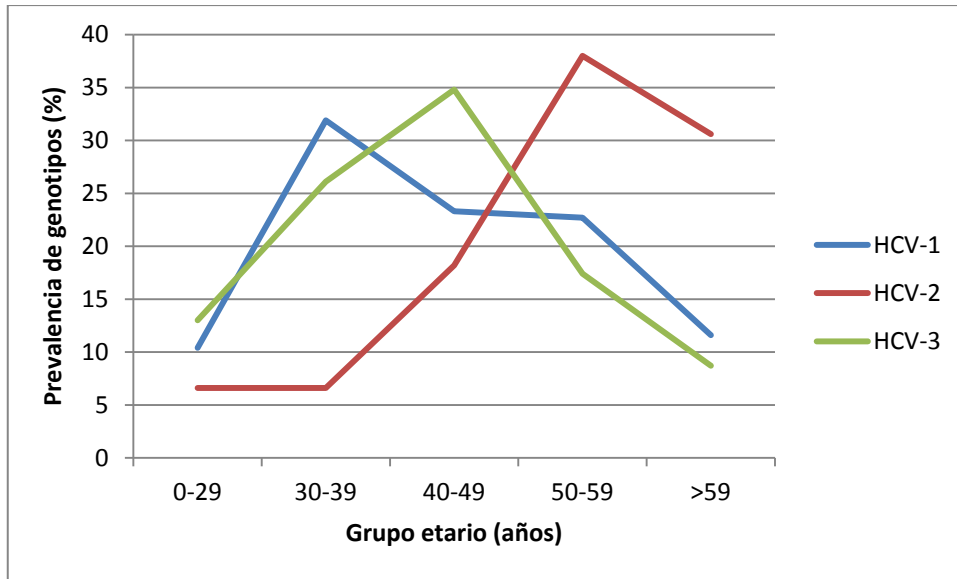


Figura 4. Distribución de los genotipos de HCV en los diferentes grupos etáreos. Modelo multinomial lineal (OR=3,260, IC [95%]: $p < 0,05$).

4.4.2 Análisis de Incidencia de los genotipos.

Valiéndonos de los hallazgos obtenidos en el ítem anterior y de los resultados logrados en el diagnóstico de rutina del laboratorio, en el que hallábamos mayor prevalencia de genotipo HCV-1 en detrimento del HCV-2, decimos profundizar los estudios a fin de confirmar la sospecha de un posible cambio en el patrón epidemiológico de los genotipos de HCV en Córdoba en los últimos 10 años. En primera instancia mediante modelos generalizados Poisson (sección 3.3), se indagaron los comportamientos de los genotipos a lo largo del tiempo incorporando la correlación de cada genotipo en el tiempo. Se observó una dependencia del comportamiento de los genotipos respecto al tiempo ($p < 0,01$), destacando al año 2003 como punto de inflexión (Figura 5). A partir de ese punto se observó que la distribución del genotipo HCV-1 fue diferente al del resto de los genotipos (tabla 12). Este genotipo tuvo más chances de ocurrir que el resto de los genotipos. Con un riesgo relativo para HCV-2 de 0,816.

Además, se observó que la correlación de los conteos (incidencia) en función del tiempo fue estadísticamente significativa, $\rho: 0,39$ (coeficiente de correlación).

Cuando se repitió el análisis de la distribución de genotipos, solo con aquellos de mayor prevalencia (HCV-1 y HCV-2) se obtuvieron resultados similares.

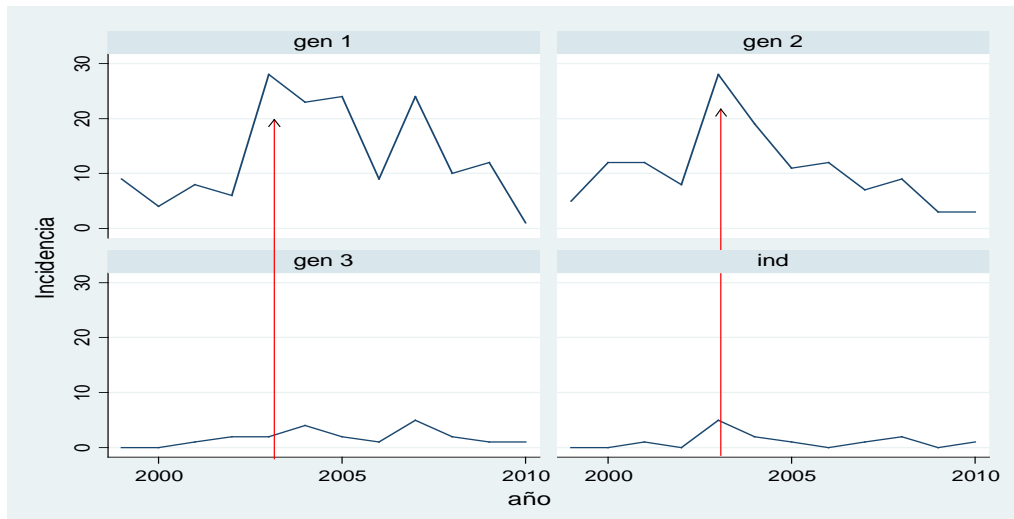


Figura 5. Distribución de los genotipos de HCV en los diferentes años (1999-2009).

Tabla 12: Dependencia de los factores estimados (genotipos vs. años) por los modelos mixtos de Poisson.

| Genotipo | IRR | IC (95%) | p |
|----------|--------|---------------|-------|
| 2 | 0,8164 | 0,6470-1,0302 | 0,047 |
| 3 | 0,1329 | 0,0843-0,2095 | 0,000 |

Cuando se profundizó sobre las posibles causas del cambio del patrón epidemiológico y discriminó al genotipo HCV-1 en subtipos 1a y 1b se obtuvo una dependencia de la distribución de subtipos respecto al sexo mostrando que el sexo masculino tuvo 77% más de chance de ser del subtipo 1a respecto de subtipo 1b (OR=1,77, 95% IC: [0,9642-3,2484], p=0,0489) (tabla 13).

Respecto a la edad, se observó que a medida que aumentó la edad disminuyeron las chances de infección con el subtipo 1a, respecto del subtipo 1b (OR=0,913, 95% IC: [0,1266-1.9466], p=0,0096). No se apreció dependencia

estadísticamente significativa entre la distribución de subtipos y las covariables factores de riesgo ($p > 0,05$) (tabla 13).

Tabla 13: Dependencia de las covariables que ejercen efecto sobre los subtipos 1a y 1b.

| Covariables | OR | IC (95%) | <i>p</i> |
|------------------------|------|---------------|----------|
| Sexo | 1,77 | 0,9642-3,2484 | 0,0489 |
| Edad | 0,91 | 0,1266-1.9466 | 0,0096 |
| UDEV | 0,81 | 0,2819-2,3736 | NS |
| Cirugías | 0,99 | 0,4866-2,0286 | NS |
| Transfusiones | 0,01 | NS | NS |
| Riesgo Incierto | NS | NS | NS |
| Riesgo sexual | NS | NS | NS |

NS: No Significativo

4.4.3 Estudio de diversidad genética de los subtipos 1a y 1b: filogenia y filogeografía.

Los resultados obtenidos a partir de los árboles filogenéticos de ambas regiones genómicas del subtipo 1a (NS5B y E2) (Figura 6 y 7) muestran que la mayor parte de las secuencias caracterizadas en nuestro estudio no se agruparon entre sí, sino que se hallan en la rama principal del árbol, intercaladas entre otras cepas de diferentes orígenes geográficos.

Cuando se analizaron las secuencias HCV-1b en la región NS5B los árboles mostraron una segregación en la mayoría de las secuencias locales formando un grupo filogenético relacionado. Sin embargo, este resultado no fue similar cuando se analizó la región variable E2, observándose sólo un grupo de siete secuencias con buen soporte de rama (99%) (Figura 8 y 9).

En todos los casos el resultado fue independiente del método empleado ya que la topología de los árboles fue similar cuando se obtuvieron por, máxima verosimilitud o distancia.

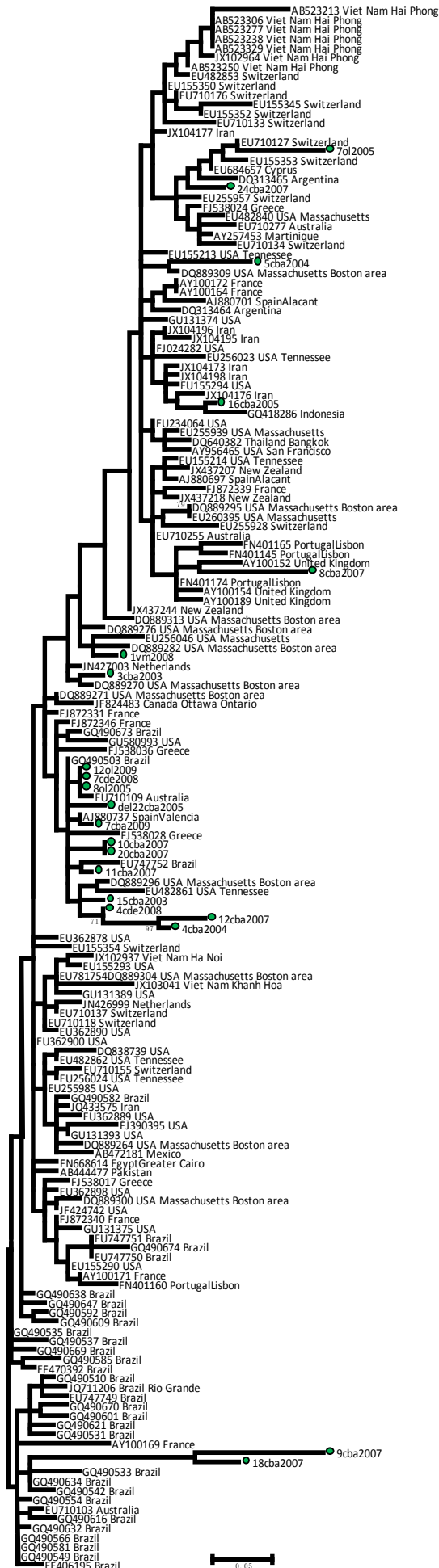


Figura 6: HCV-1a. Región NS5B. Árbol de Máxima Verosimilitud. Modelo de sustitución TVM2ef+Γ+I. Soporte de rama por Bootstrap (100 pseudoréplicas).

● Secuencias Locales

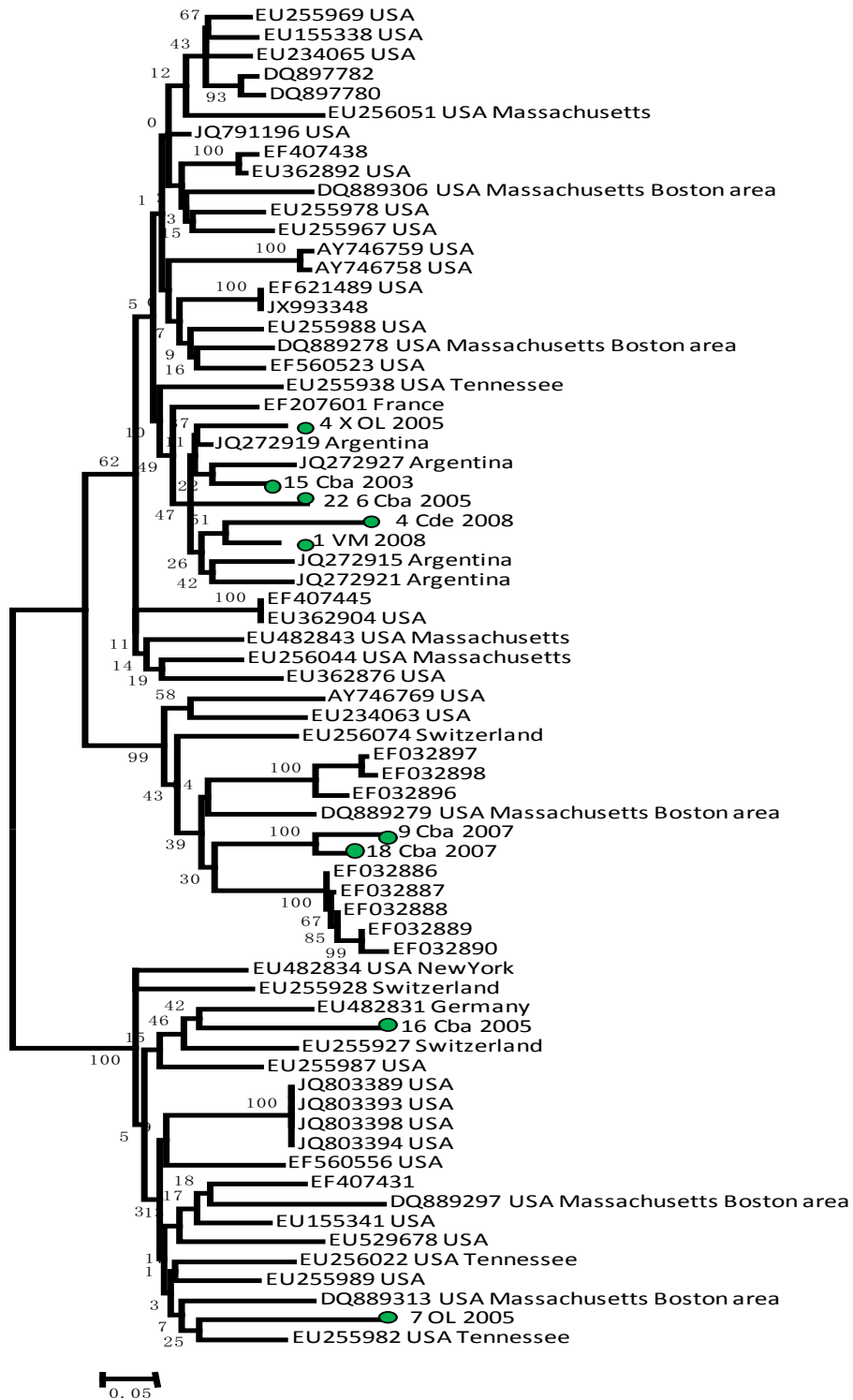


Figura 7: HCV-1a. Región E2. Árbol de Máxima Verosimilitud. Modelo de sustitución TVM+ Γ +I. Soporte de rama por Bootstrap (100 pseudoréplicas).

● Secuencias Locales

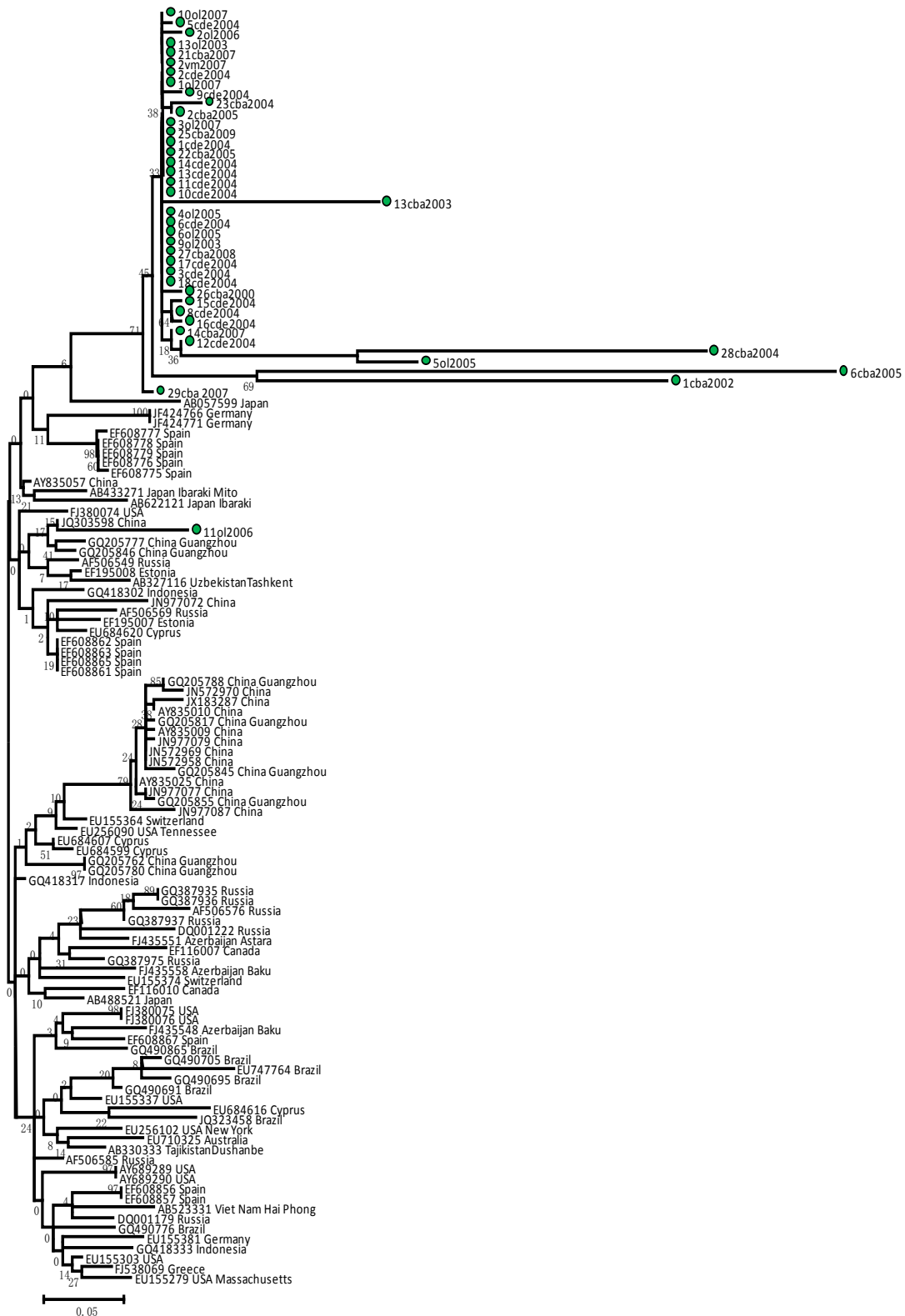


Figura 8: HCV-1b. Región NS5B. Árbol de Máxima Verosimilitud. Modelo de sustitución GTR+R+I. Soporte de rama por Bootstrap (100 pseudoréplicas).

● Secuencias Locales

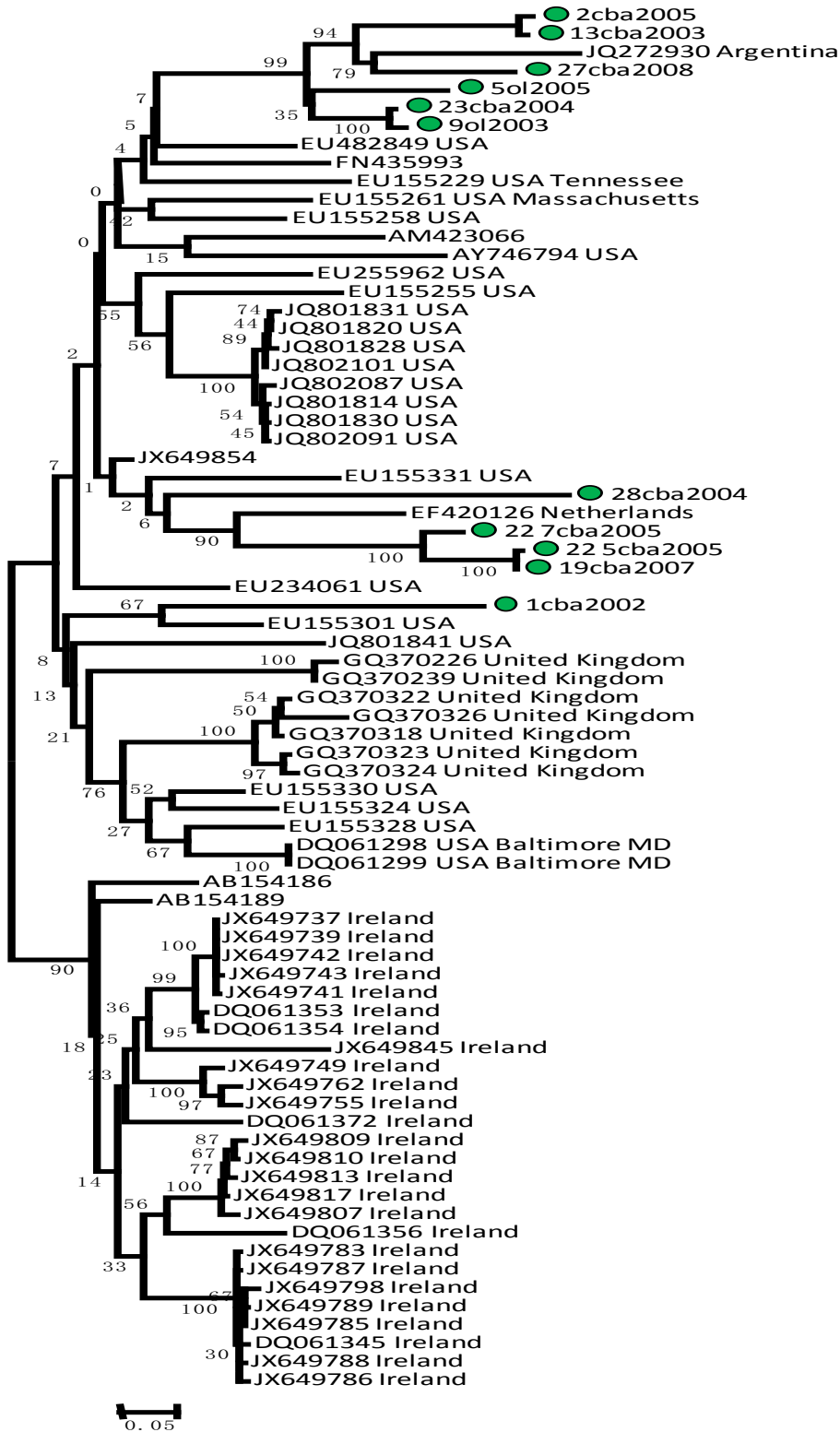
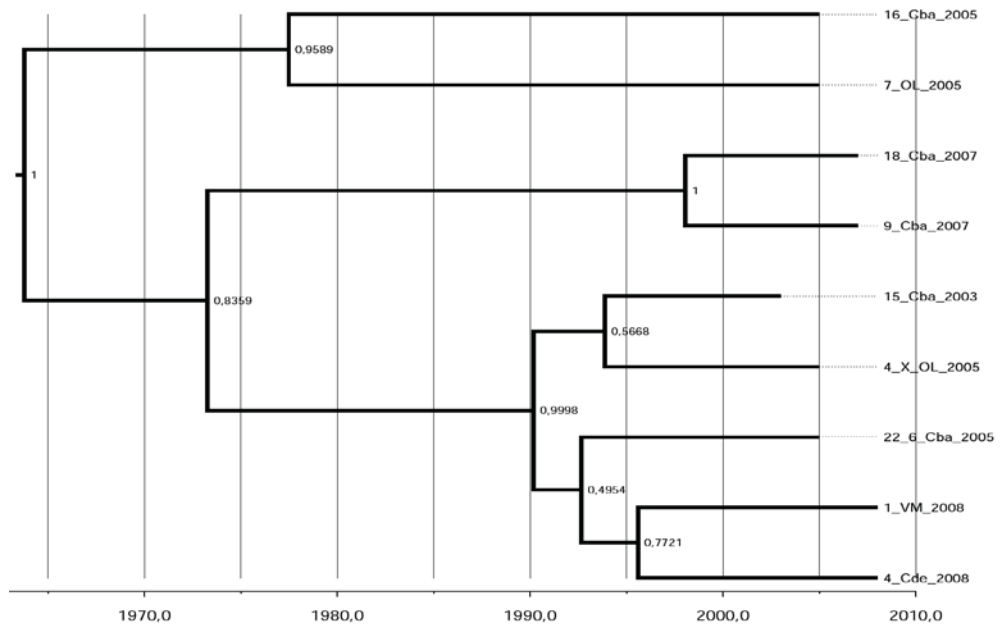


Figura 9: HCV-1b. Región E2. Árbol de Máxima Verosimilitud. Modelo de sustitución TVM2ef+Γ+I. Soporte de rama por Bootstrap (100 pseudoréplicas).

● Secuencias Locales

El análisis de coalescencia permitió indagar sobre el posible origen de las secuencias de un virus y obtener información sobre la dinámica poblacional pasada de dicho virus. Inicialmente, se compararon los distintos modelos de reloj molecular por medio de los factores de Bayes. En todos los casos el reloj molecular relajado representó a los datos más de 10 veces mejor que cuando se usó reloj molecular estricto (una diferencia de más de 10 en el factor de Bayes se toma como evidencia decisiva a favor del modelo). En consecuencia todos los resultados aquí presentados corresponden a los análisis realizados con el reloj molecular relajado no correlacionado de distribución log-normal. Para situar en un marco temporal el origen de las cepas de HCV-1a y 1b circulantes actualmente en Córdoba, se calibró el reloj molecular como se explica en materiales y métodos (sección 3.2.11). Debido a que las secuencias de la región NS5B resultaron más cortas, a pesar de tener mayor número de ellas, el análisis registró un perfil chato y una edad del ancestro común más reciente con un amplio rango (que va desde una década hasta varias centurias, dato no mostrado). Por ello se discutirán los resultados obtenidos para las secuencias de la región E2. En este caso, la edad estimada para el subtipo HCV- 1a y para el HCV-1b, fue de 43 años ($r= 28$ a 63 años) y 69 años ($r=38$ a 113 años), respectivamente. Los resultados obtenidos para la región E2 muestran un período de crecimiento poblacional desde ~ 1970 para 1a y desde ~ 1940 para el subtipo 1b (Figura 10a y 11a). Ambos crecimientos son seguidos de una fase estacionaria que llega hasta nuestros días (Figura 10b y 11b). Los resultados de los skyline también se pueden observar en forma de árboles.

A



B

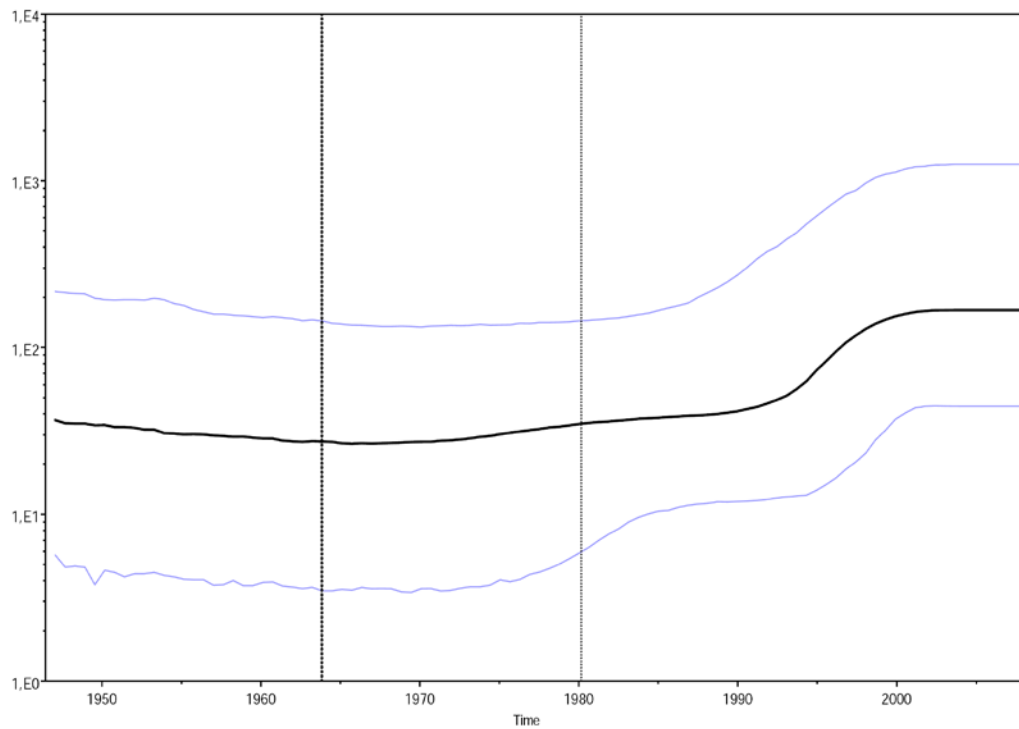
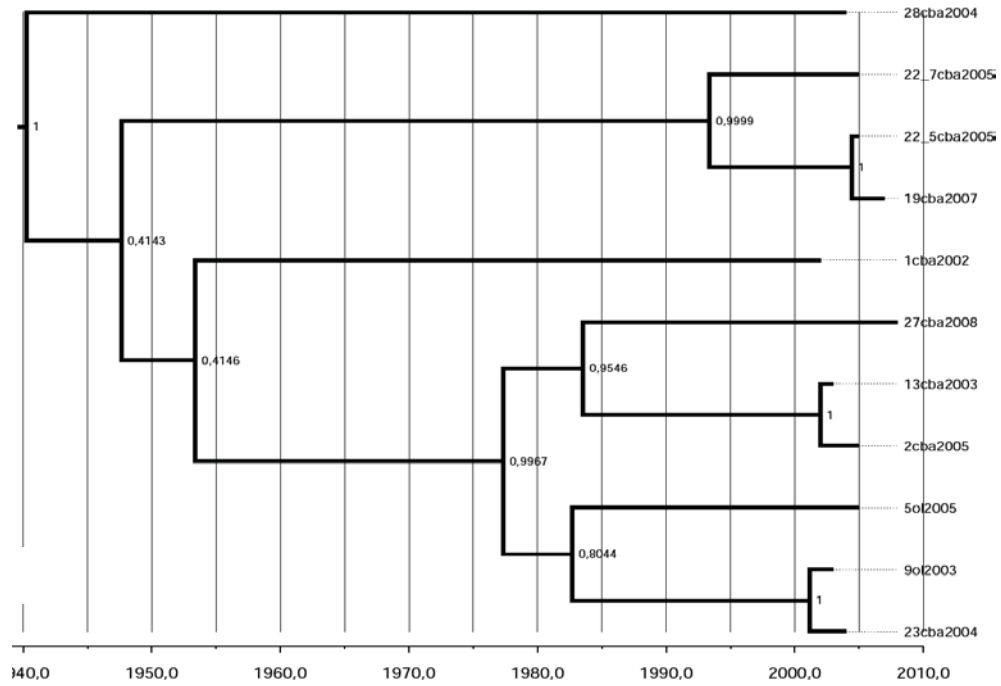


Figura 10: (A) Árboles de Coalescencia para las muestras de HCV- 1a y (B) Perfiles demográficos bayesianos obtenido para la región E2 del genoma. Representan las relaciones de descendencia entre las muestras y la dinámica de la población de HCV-1a respectivamente.

A



B

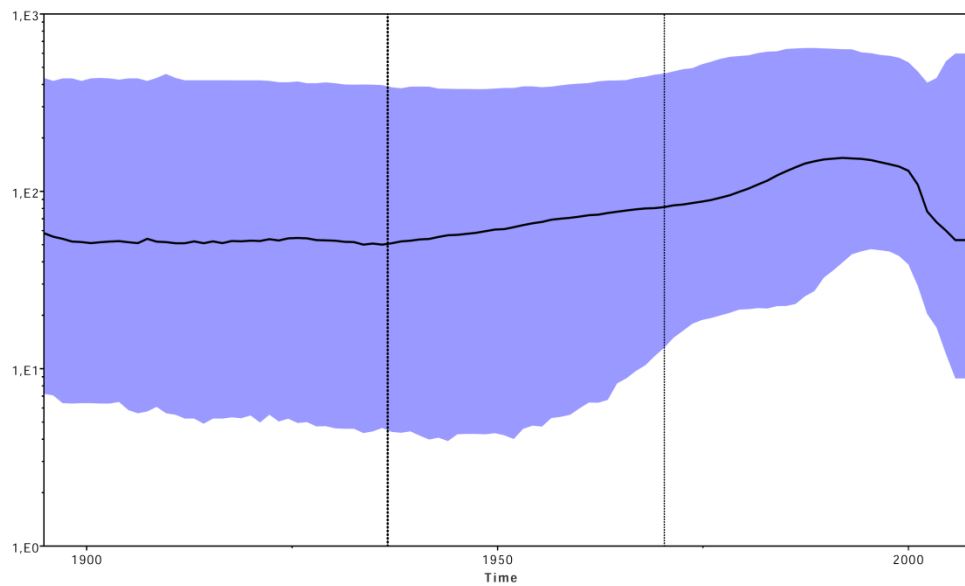


Figura 11: (A) Árboles de Coalescencia para las muestras de HCV- 1b y (B) Perfiles demográficos bayesianos obtenido para la región E2 del genoma. Representan las relaciones de descendencia entre las muestras y la dinámica de la población de HCV-1b respectivamente.

Para evaluar el grado de diversificación geográfica alcanzado por ambos subtipos de HCV se constató de manera estadística el grado de asociación entre el análisis filogenético y el lugar de recolección de las muestras. Aunque no hay grupo monofilético de HCV-1a para la región NS5B, algunas de las secuencias obtenidas de la provincia de Córdoba estaban relacionadas.

Los índices de asociación global (PS y AI) resultaron significativamente diferentes a los de la distribución nula (árbol sin asociación geográfica) con un valor $p < 0,001$. Además los índices de asociación por ubicación (MCs) resultaron estadísticamente diferentes a lo esperado en la hipótesis nula de no asociación ($\alpha = 0,05$) para las muestras de CBA, OLC, USA, en el subtipo HCV-1a. En el caso del subtipo HCV-1b los índices dieron asociación para las muestras de CBA, OLC, Rusia, Brasil, China, USA, Alemania, Chipre, España.

Si bien el resultado de los índices es el que le da rigurosidad estadística al análisis filogeográfico, a fines de visualización del grado de dependencia entre la filogenia y la geografía se realizó la optimización (o mapeo) por parsimonia de la información geográfica sobre un árbol que resume la información utilizada con fines estadísticos (árbol MCC de la corrida de BEAST utilizada en el punto anterior). En estos árboles se pueden observar pequeños clados o grupos de secuencias que tienen la misma ubicación geográfica. Sin embargo si la asociación fuera completa, como la esperada en caso de un brote a partir de la introducción de un único virus en la comunidad, se observarían grandes clados monofiléticos asociados a cada región geográfica. El hecho de observar una tendencia y no una absoluta asociación subrayó la necesidad del uso de una metodología estadística (BaTS) para evaluar hasta qué punto esta asociación es significativa (Tablas 14-17 y Figuras 12,13, 14 y15).

Tabla 14. Índices de asociación entre características y filogenia. Región NS5B de HCV- 1a.

| Índice | Media observada | IC95% (inferior) | IC95% (superior) | Media nula | IC95% (inferior) | IC95% (superior) | Valor p | |
|---------|-----------------|------------------|------------------|------------|------------------|------------------|---------------|---------------|
| AI | 1,6232 | 1,2303 | 1,9649 | 3,1859 | 2,7163 | 3,7090 | 0,0000 | |
| PS | 12,9669 | 13,0000 | 13,0000 | 17,4360 | 16,4201 | 17,9994 | 0,0000 | |
| MC | CBA | 1,9982 | 2,0000 | 2,0000 | 1,0814 | 1,0000 | 1,4620 | 0,0100 |
| | OLC | 1,9034 | 1,0000 | 2,0000 | 1,0725 | 1,0000 | 1,4910 | 0,0200 |
| | USA | 13,1119 | 11,0000 | 19,0000 | 6,4809 | 4,1910 | 11,9960 | 0,0200 |
| | Suiza | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0194 | 1,0000 | 1,0979 | 1,0000 |
| | Alemania | 1,1094 | 1,0000 | 2,0000 | 1,0460 | 1,0000 | 1,2988 | 1,0000 |
| Francia | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0098 | 1,0000 | 1,0024 | 1,0000 | |

Tabla 15. Índices de asociación entre características y filogenia. Región NS5B de HCV- 1b.

| Índice | Media observada | IC95% (inferior) | IC95% (superior) | Media nula | IC95% (inferior) | IC95% (superior) | Valor p |
|------------|-----------------|---------------------|---------------------|------------|---------------------|---------------------|---------------|
| AI | 5,3679 | 4,3348 | 6,3905 | 11,6486 | 11,0748 | 12,0939 | 0,0000 |
| PS | 52,5256 | 50,0000 | 55,0000 | 90,3370 | 88,0296 | 92,3601 | 0,0000 |
| MC CBA | 1,9096 | 1,0000 | 3,0000 | 1,3012 | 1,0272 | 1,9911 | 0,0500 |
| OLC | 4,6739 | 3,0000 | 8,0000 | 1,9547 | 1,5566 | 2,3043 | 0,0100 |
| Japón | 1,3084 | 1,0000 | 2,0000 | 1,0470 | 1,0000 | 1,1340 | 1,0000 |
| Rusia | 4,4027 | 4,0000 | 5,0000 | 1,1960 | 1,0169 | 1,9868 | 0,0100 |
| Azerbaiyán | 1,0010 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0189 | 1,0000 | 1,0187 | 1,0000 |
| Brasil | 3,9072 | 3,0000 | 4,0000 | 1,0752 | 1,0002 | 1,3298 | 0,0100 |
| China | 14,0087 | 14,0000 | 14,0000 | 1,6761 | 1,2250 | 2,2189 | 0,0100 |
| USA | 2,2437 | 2,0000 | 4,0000 | 1,1869 | 1,0127 | 1,7521 | 0,0200 |
| Alemania | 1,9971 | 2,0000 | 2,0000 | 1,0077 | 1,0000 | 1,0222 | 0,0100 |
| Suiza | 1,0007 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0042 | 1,0000 | 1,0067 | 1,0000 |
| Chipre | 1,7462 | 1,0000 | 2,0000 | 1,0404 | 1,0000 | 1,1900 | 0,0100 |
| Canadá | 1,0050 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0005 | 1,0000 | 1,0008 | 1,0000 |
| Vietnam | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 |
| Australia | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 |
| España | 4,9941 | 5,0000 | 5,0000 | 1,2683 | 1,0320 | 2,0282 | 0,0100 |
| Indonesia | 1,0008 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0255 | 1,0000 | 1,1180 | 1,0000 |
| Grecia | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 |
| Tayikistán | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 |
| Estonia | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0050 | 1,0000 | 1,0068 | 1,0000 |
| Uzbekistán | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 |

Tabla 16. Índices de asociación entre características y filogenia. Región E2 de HCV- 1a.

| Índice | Media observada | IC95% (inferior) | IC95% (superior) | Media nula | IC95% (inferior) | IC95% (superior) | Valor p |
|--------|-----------------|------------------|------------------|------------|------------------|------------------|---------------|
| AI | 1,6221 | 1,2177 | 1,9978 | 3,1970 | 2,6161 | 3,7842 | 0,0000 |
| PS | 12,9689 | 13,0000 | 13,0000 | 17,5589 | 16,4006 | 17,9986 | 0,0000 |
| MC | CBA | 1,9991 | 2,0000 | 2,0000 | 1,0808 | 1,0000 | 0,0100 |
| | OLC* | 1,8967 | 1,0000 | 2,0000 | 1,0331 | 1,0000 | 0,0100 |
| | USA | 13,1957 | 11,0000 | 19,0000 | 6,4755 | 4,3463 | 0,0400 |
| | Suiza | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0061 | 1,0000 | 1,0000 |
| | Alemania | 1,1148 | 1,0000 | 2,0000 | 1,0486 | 1,0000 | 1,0000 |
| | Francia | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0035 | 1,0000 | 1,0000 |

Tabla 17. Índices de asociación entre características y filogenia. Región E2 de HCV- 1b.

| Índice | Media observada | IC95% (inferior) | IC95% (superior) | Media nula | IC95% (inferior) | IC95% (superior) | Valor p |
|--------|-----------------|------------------|------------------|------------|------------------|------------------|---------------|
| AI | 1,1981 | 0,8500 | 1,5642 | 2,5025 | 2,0515 | 3,0480 | 0,0000 |
| PS | 10,8737 | 10,0000 | 11,0000 | 15,6143 | 14,1316 | 16,7994 | 0,0000 |
| MC | CBA | 2,9978 | 3,0000 | 3,0000 | 1,4605 | 1,0010 | 0,0100 |
| | OLC* | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0107 | 1,0000 | 1,0000 |
| | Irlanda | 4,0415 | 3,0000 | 5,0000 | 3,1669 | 2,1735 | 0,2000 |
| | Holanda | 1,9999 | 2,0000 | 2,0000 | 1,0247 | 1,0000 | 0,0200 |
| | Azerbaiyán | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 |
| | UK | 1,0144 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0145 | 1,0000 | 1,0000 |
| | China | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 |

*OLC: se juntaron con secuencias de CdE y VM.

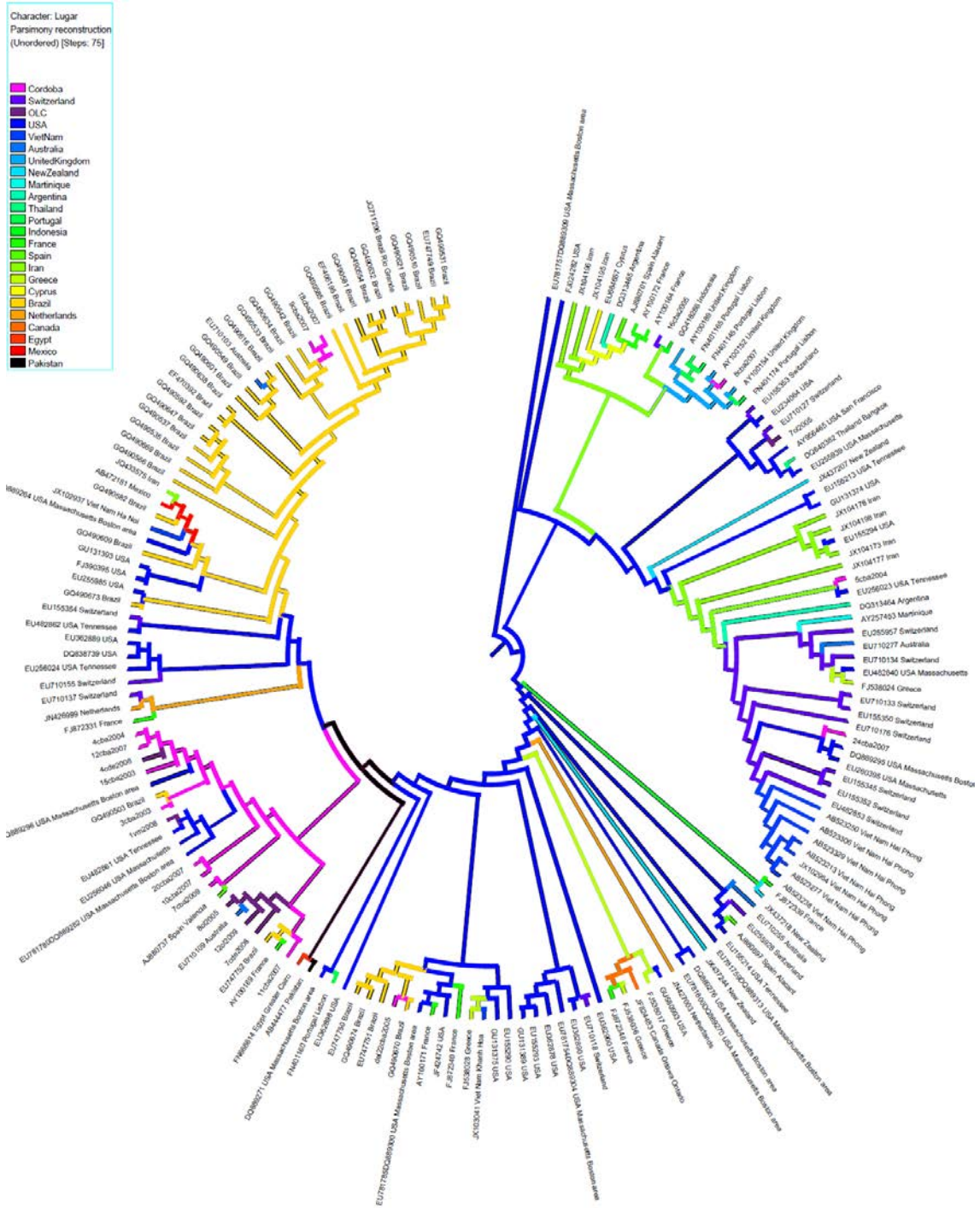


Figura 12: Optimización por parsimonia de la posible ubicación geográfica de los ancestros obtenidos por la reconstrucción filodinámica de HCV-1a. Región NS5B.

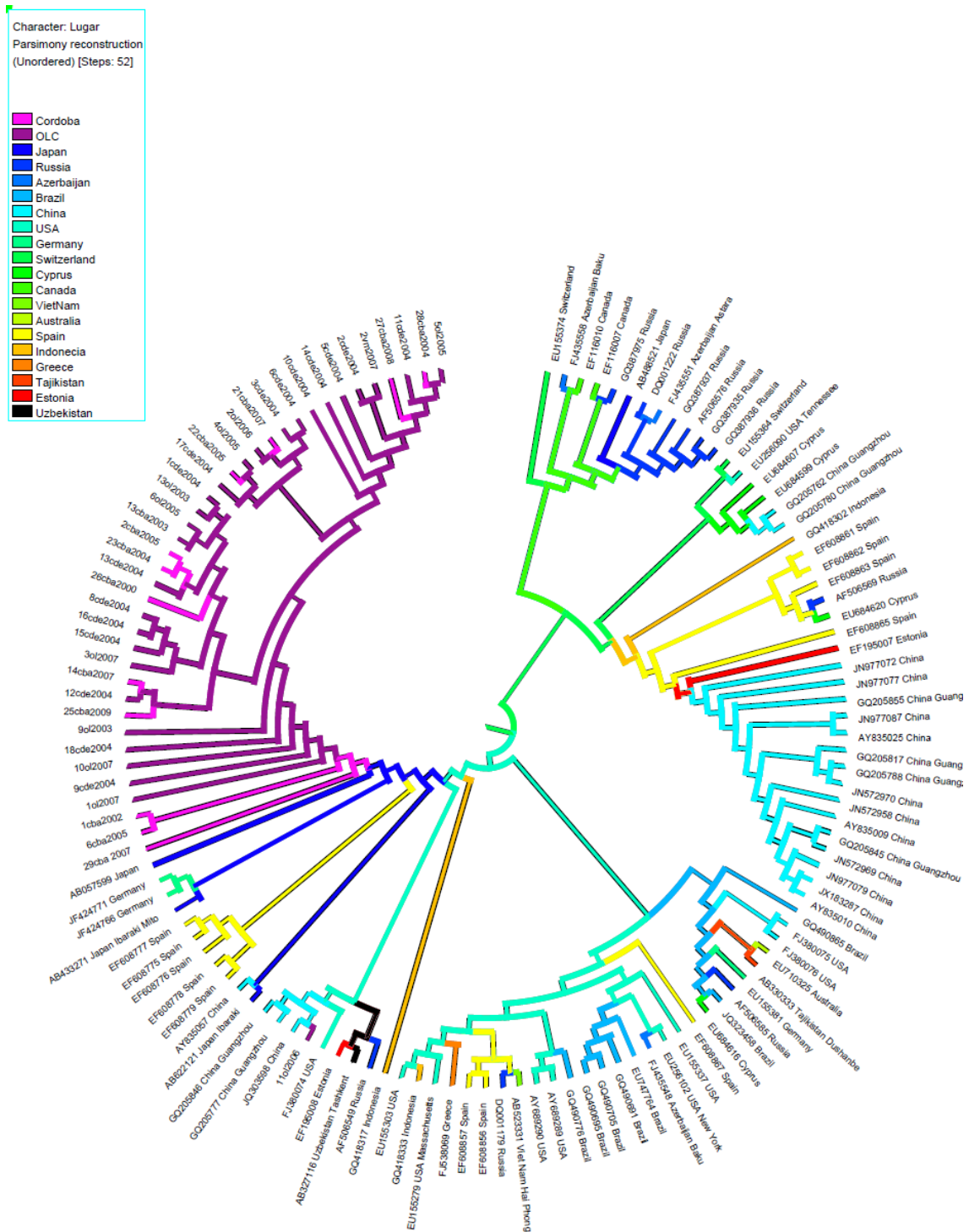


Figura 13: Optimización por parsimonia de la posible ubicación geográfica de los ancestros obtenidos por la reconstrucción filodinámica de HCV-1b. Región NS5B.

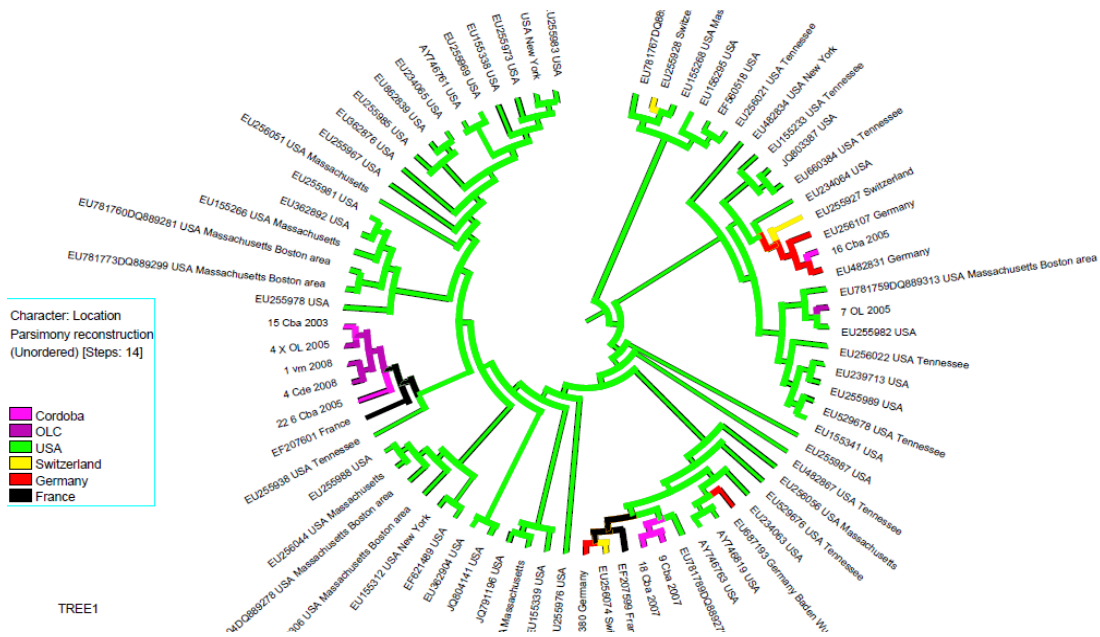


Figura 14: Optimización por parsimonia de la posible ubicación geográfica de los ancestros obtenidos por la reconstrucción filodinámica de HCV-1a. Región E2.

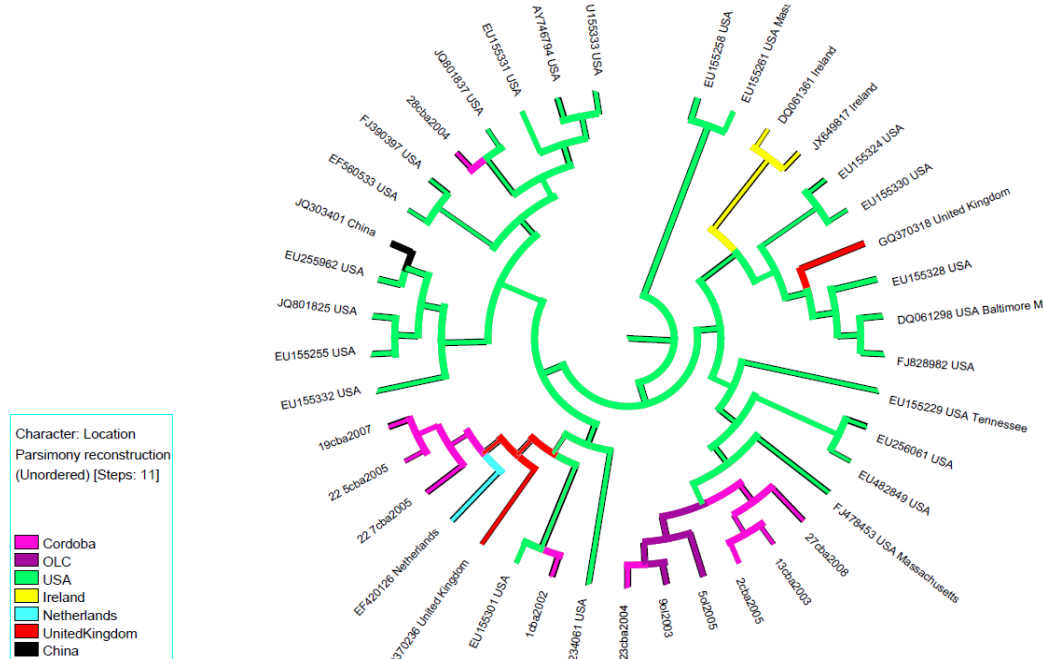


Figura 15: Optimización por parsimonia de la posible ubicación geográfica de los ancestros obtenidos por la reconstrucción filodinámica de HCV-1b. Región E2.

5. Discusión

5. DISCUSION

Cuatro principales hallazgos son derivados del presente estudio: 1) Se obtuvieron datos actualizados de la prevalencia de HCV en individuos coinfectados con HIV, la cual fue elevada (20%) y mayor a la hallada en el estudio (~12%) realizado en la misma población en 2003-2004, 2) la coinfección HCV/HIV interfirió negativamente en la respuesta a la terapia HAART, 3) por otra parte, no se pudo demostrar la influencia de dicha coinfección HCV/HIV en la transmisión de HCV y finalmente, 4) el patrón molecular de HCV hallado varió según la coinfección con HIV, las vías de transmisión y los grupos etarios. Además se demostró que en pacientes mono infectados de nuestra región el patrón de circulación de genotipos cambió en los últimos 10 años. Hubo un incremento gradual del genotipo 1 en detrimento del genotipo 2, lo que fue corroborado por análisis epidemiológicos y filodinámicos.

El incremento en la prevalencia hallada en el presente estudio en individuos infectados con HIV (2004-2007) respecto al estudio realizado en los mismos nosocomios en años anteriores (2003-2004) es probablemente debida al mejoramiento diagnóstico y en la políticas de control de esta infección, por lo que los pacientes infectados con HIV quizás fueron testeados para anti-HCV con mayor frecuencia que en 2003.

En ambos periodos demostramos que en población HIV (+) de Córdoba, la infección activa [ARN (+)] se halló en aproximadamente 80% de los pacientes con serología positiva, lo que indicaría que el *clearence* viral o tasa de resolución de la infección podría ser muy baja. Esta situación posee consecuencias clínico-epidemiológicas, ya que el virus continúa su diseminación, y, genera persistencia, llevando así a casos más severos (fibrosis más avanzadas) y de un manejo clínico cada vez más difícil.

El HIV presenta similares vías de contagio que HCV y esto condiciona que exista una alta tasa de prevalencia de coinfección HCV/HIV, que en nuestro país oscilan entre el 15 y el 40% de acuerdo a la zona geográfica y hasta el 70% en subgrupos de pacientes con antecedentes de UDEV (Quarleri et al., 2007; Bolcic et al., 2012). En nuestro estudio se halló una prevalencia de infección activa de virus entre 12 - 20 % en la población coinfectada con HIV. Además, en concordancia con otros reportes (Alter et al., 2006), un alto porcentaje de los pacientes coinfectados HCV/HIV, fueron UDEV.

En este sentido, la coinfección del virus de la hepatitis C en individuos HIV se la ha asociado con una alta incidencia de injuria y descompensación hepática y con la disminución del tiempo de vida, en comparación con los individuos sólo infectados con HCV (Chen et al., 2007). Además, la coinfección HCV/HIV puede afectar la efectividad de la terapia antirretroviral (HAART) (Braitstein et al., 2006a; Chen et al., 2007). Existen evidencias de la asociación entre la interrupción de HAART y la coinfección con HCV, especialmente debidas al incremento de la toxicidad y la comorbilidad, lo que dificulta aún más el manejo del paciente (Braitstein et al., 2006a; Braitstein et al., 2006b).

En la actualidad, en Argentina y específicamente en Córdoba, los pacientes infectados con HCV (coinfectados o no con HIV), tienen acceso a un programa público para el diagnóstico confirmatorio de la infección por HCV y para la determinación de los parámetros virológicos e histológicos exigidos pre-tratamiento. Aunque en forma muy lenta, el programa nacional se está aplicando en nuestra provincia de manera efectiva. En ciertos casos y generalmente debido a la burocracia del sistema, algunos pacientes quedan sin diagnóstico confirmatorio, y sin un conocimiento acabado del estadio de la infección por HCV y por tanto sin la posibilidad de acceder al tratamiento. Si a esto le sumamos, la falta de acceso de algunos individuos infectados a centros

médicos especializados en el tratamiento de esta virosis nos encontramos con un número importante de personas infectadas por HCV no tratadas a las cuales (si son HIV+) se les realizará tratamiento antirretroviral sin tener en cuenta las consecuencias de las interferencias debidas a la confección.

Parte de nuestro estudio tuvo como objetivo identificar si factores clínicos (incluyendo infección con HCV) y epidemiológicos influenciaban la respuesta a la terapia antirretroviral (HAART). Los resultados confirmaron que la infección por HCV tendría un impacto negativo en la respuesta inmunológica/virológica frente al HAART en los individuos infectados con HIV (ver tabla 6, sección 4.2). Estos datos refuerzan la evidencia sobre la influencia de HCV en la terapia HAART y es concordante con estudios previos en pacientes coinfectados (Greub et al., 2000; Weis et al., 2006, Thein et al., 2008, Soriano et al., 2011; Rallon et al., 2011, Hernández et al., 2011). En contraste, un estudio reportado por Fuping et al., (2010) no reconoció dicha influencia de HCV en la respuesta antiviral de HIV. Recientemente, un metaanálisis sugiere que los pacientes coinfectados HCV/HIV no estarían bien representados en la mayoría de los ensayos clínicos, lo que no permitiría evaluar correctamente la eficacia del tratamiento en estos pacientes (Pulido et al., 2012).

Previsiblemente, el estadio clínico de la infección por HIV y la edad al momento del diagnóstico de HIV fueron factores asociados a una pobre respuesta al tratamiento. Pacientes considerados en la categoría C (CDC) o 4 (OMS) tuvieron menos chances de responder virológica e inmunológicamente al HAART, que los pacientes en estadio A o 1 (según CDC u OMS, respectivamente). Sumado a esto, el nivel basal promedio de CD4 (<200 CD4 cel/ml) fue un marcador asociado a la mejor respuesta virológica e inmunológica pos-tratamiento, independientemente del valor de carga viral. Respecto a la edad, tener más de 40 años al momento del diagnóstico de HIV fue asociado a menor respuesta a HAART, probablemente, por la menor capacidad

de las personas mayores para responder a la terapia, si tenemos en cuenta el deterioro del sistema inmune. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de implementar el diagnóstico precoz de HIV y del inicio de tratamiento temprano.

Existen reportes, en los que se considera que el género también puede influir en la progresión del HIV y la respuesta al tratamiento (Cuninham et al., 2000; Gebo et al., 2005; Furler et al., 2006). Cuando se comenzó a aplicar HAART, se observó que las mujeres eran menos propensas a iniciar el tratamiento y las que lo iniciaban, obtenían menores respuesta (Bacon et al., 2005). En nuestro estudio y en concordancia con algunos estudios previos no se halló asociación entre la respuesta a HAART y el género de los individuos estudiados (Emery et al., 2010; Hodder et al., 2012).

Algunas limitaciones de nuestro estudio deben ser consideradas: en el análisis multivariado se consideró la infección de HCV en base a la serología positiva (anti-HCV) en lugar de la presencia de ARN-HCV, debido a que el menor número de resultados moleculares dificultó los análisis estadísticos. Sin embargo, varios estudios fueron analizados únicamente en base al perfil serológico de los pacientes (Greub et al., 2000; Bratstein et al., 2006b). En cuanto a los factores de riesgo de la población estudiada, debido a que en general las historias clínicas resultaron incompletas, estos datos no se incluyeron en el análisis. Es común que en los centros asistenciales de nuestro medio los datos epidemiológicos de los pacientes resulten incompletos, en general se prioriza la asistencia médica por sobre la investigación. Sin embargo, según datos parciales obtenidos la principal vía de transmisión de individuos coinfectados HCV/HIV fue el uso de drogas endovenosas, por lo que el impacto de la infección por el HCV en la eficacia de la terapia HAART podría ser difícil de diferenciar del efecto del uso de drogas inyectables.

Finalmente, nuestros resultados enfatizan la necesidad de prestar especial atención a la infección con HCV para mejorar el pronóstico de los pacientes tratados por el HIV. Si bien en la mayoría de los pacientes coinfectados, HAART debe iniciarse antes que el tratamiento para HCV, para frenar la progresión de la enfermedad hepática y aumentar el número de CD4 (Operskalski et al., 2011). Si se inicia el tratamiento anti-HCV deben tenerse en cuenta varios puntos: a) las interacciones medicamentosas que pueden disminuir los niveles de fármacos antirretrovirales, elevando así las probabilidades de reducción de la eficacia; b) las interacciones medicamentosas que pueden aumentar los niveles de fármacos antirretrovirales, con un riesgo de aumento de la toxicidad; c) la superposición de perfiles de toxicidad lo que puede causar un aumento de la morbilidad / mortalidad y finalización abrupta de tratamiento. Estudios recientes han demostrado los beneficios del tratamiento del HCV en pacientes HIV en relación a la morbilidad y la mortalidad, así como también el aumento de las complicaciones extrahepáticas (GESIDA, 2009; SADI, 2012; Ministerio de Salud, 2012).

Nuestros resultados son de utilidad para los profesionales médicos a la hora de identificar factores relacionados a la pobre respuesta al tratamiento antiviral.

HCV y HIV comparten las mismas vías de transmisión, sin embargo, los mecanismos de interacción entre ambos aún son poco claros. Ha sido previamente reportado que entre individuos infectados con HIV la transmisión sexual de HCV parece ser más eficiente y contribuye significativamente a la incidencia de la infección por este virus (Terrault et al., 2013). Esto probablemente puede ser debido a que la presencia de HIV y concomitante inmunosupresión, incrementa la replicación de HCV (Bonancini et al., 2000; Pasquier et al., 2003). Por otra parte, se ha reportado que la frecuencia de transmisión entre parejas sexuales es cinco veces mayor cuando HIV es

transmitido conjuntamente, lo que sugiere que HIV podría ser un cofactor involucrado en la transmisión sexual de HCV (Orsetti et al., 2013).

La transmisión no parenteral del HCV como la sexual y vertical (de madre a hijo) puede ocurrir a través de los fluidos corporales, aunque con poca frecuencia (Cadwell et al., 1996; Wejstal et al., 1999, Halfon et al., 2001; Murakami et al., 2012). Sin embargo, la eficiencia de las rutas no parenterales de transmisión del HCV es aún poco conocida.

A pesar de que el HCV es un virus prevalentemente hepatotrópico, se han demostrado pruebas convincentes de reservorios extrahepáticos del HCV como glándulas salivales, nódulos linfáticos perihepáticos, células de la mucosa oral, glándulas adrenales, páncreas, tiroides y cerebro (Arrieta et al., 2001, Radkowski et al., 2005; Roque-Afonso et al., 2005; Blackard et al., 2005; Revie et al., 2011).

En el presente estudio demostramos la presencia de ARN HCV en todos los fluidos corporales estudiados y en algunos casos simultáneamente en el mismo paciente. En todos los casos los genotipos de HCV encontrados en suero y fluidos biológicos fue el mismo. Por otra parte, la detección del virus fue independiente de la carga viral de HCV, genotipo, coinfección HCV/HIV, factores de riesgo, edad y sexo.

La frecuencia de ARN del HCV en muestras de saliva detectadas en este estudio fue del 29%. Investigaciones previas han demostrado la presencia de ARN HCV en saliva de pacientes crónicamente infectados con el virus, sin embargo, los resultados son ampliamente discordantes, con tasas de detección que van de 0-100%. Si bien, algunos autores han publicado la asociación entre la alta carga viral y la detección de HCV en saliva (Eirea et al., 2005; Pastore et al., 2006; Wang et al., 2006), otros no han podido demostrarlo (Lins et al., 2005; Susuki et al., 2005). Por otra parte, Menezes y col. (2012) reportaron la existencia de pacientes con ARN-HCV negativo en suero y positivo en saliva.

Otros autores plantean que la detección de HCV en saliva puede deberse a la presencia de células epiteliales orales o leucocitos en las muestras (Arrieta et al., 2001). En este sentido, las muestras analizadas en este estudio estaban libres de tales células. Respecto a la presencia de sangre oculta, no se realizaron pruebas específicas para evidenciar sangre oculta en las muestras ya que algunos autores (Liou et al., 1992; Suzuki et al., 2005; Gonsalves et al., 2005) han demostrado que entre las personas infectadas con HCV, la presencia de sangre en muestras de saliva no se correlaciona con la presencia de ARN del HCV en la misma muestra. Una posible explicación para este hallazgo es que el HCV podría replicarse en las células epiteliales orales en pacientes sin HCV en la sangre tal como lo reportó Arrieta et al., (2001). También es posible que un mecanismo de defensa en la saliva pueda atenuar o invalidar el potencial infectivo del ARN de HCV. En este sentido, Belec et al., (2003) observaron que la saliva de individuos infectados por HCV contiene anticuerpos del tipo IgG e IgA específico que se dirigen contra las glicoproteínas E1 y E2 de superficie y podrían bloquear la adhesión viral a la célula huésped. Esto probaría que a pesar de que se encuentre ARN de HCV en saliva ésta no resulta ser eficiente para su transmisión. Sin embargo, este hallazgo debe ser considerado en la bioseguridad de las prácticas médicas y odontológicas.

En concordancia con varios estudios, (Roque-Afonso et al., 2005; Blackard et al., 2006; Vera-Otarola et al., 2009) detectamos ARN del HCV en células mononucleares de sangre periférica en una elevada prevalencia (78%). Este hecho posee importantes implicancias en la progresión de la enfermedad, en la transmisión, y en el tratamiento antiviral ya que el hallazgo de HCV en las células podría llegar a ser la causa de una futura reactivación, particularmente en condiciones de inmunosupresión como en los tratamientos largos con corticoides, transplante de órgano o la coinfección con HIV.

También jugarían un rol en la recaída de la enfermedad después del trasplante hepático (Briat et al., 2005) o luego de la suspensión de la terapia antiviral. La detección de HCV en CMSP podría considerarse como un sitio extrahepático de replicación (Revie et al., 2011).

La transmisión sexual de HCV es un tema muy controversial. La mayoría de los datos indican que el riesgo de transmisión heterosexual es muy bajo pero puede ocurrir, excepcionalmente (Savasi et al., 2013) aún sin exposiciones prolongadas, laceraciones o sangrado y en las distintas prácticas sexuales (Nguyen et al., 2010). Datos de vigilancia epidemiológica aportados por el CDC indican que sólo el 10% de los pacientes infectados reportan como único riesgo, tener pareja sexual infectada con HCV (www.cdc.gov). En un estudio realizado por Terrault et al., (2013) se estimó que la incidencia de transmisión por esta vía es de 1 por 190.000 contactos sexuales (en parejas monógamas heterosexuales). Por su parte Savasi et al., (2013) reportaron una tasa de seroconversión de sólo 2,5% en parejas heterosexuales serodiscordantes, monógamas, luego de 10 años de práctica sexual sin protección, en el que el riesgo de infección fue asociado a la frecuencia de las relaciones sexuales. Datos recientes indican un incremento en la incidencia de infección aguda de HCV en hombres infectados con HIV que tienen sexo con hombres (HSH) (Sánchez et al., 2013).

En este sentido la presencia de ARN de HCV en el semen e hisopado cervical constituyen un fuerte argumento a favor de la transmisión sexual del HCV. La detección de HCV en esperma ha sido ampliamente demostrada en la literatura con una gran frecuencia de detección que varía del 0 al 30% dependiendo de la técnica de PCR usada. A pesar de ello, no existen técnicas estandarizadas y globalmente aprobadas para la detección molecular HCV en fluidos biológicos por lo que resulta difícil comparar los resultados de los diferentes reportes. Algunos de los indicadores de esta variación pueden ser la sensibilidad de las técnicas empleadas, diferencias en la formas de recolección y

almacenamiento de las muestras (Bourlet et al., 2002; Savasi et al., 2010). En el presente estudio, hemos detectado una prevalencia considerable de ARN del HCV en fluido seminal e hisopado cervical (29% y 31%, respectivamente). A pesar de que la transmisión sexual de HCV parece ser muy baja nuestros resultados sugieren que se deben reforzar las recomendaciones de la práctica sexual segura usando preservativo en todos los tipos de prácticas sexuales y en todas las edades.

A pesar de que la detección del ARN del HCV en fracciones de semen no implica necesariamente la presencia de virus con capacidad replicativa, algunos estudios demuestran la influencia de la infección por HCV en los parámetros seminales (número, motilidad, morfología) de los pacientes infectados (Savasi et al., 2013). En este sentido la infección con HCV debería ser estudiada en los centros de reproducción asistida, tanto por la posible transmisión, bioseguridad y potencial infertilidad. En varios países europeos, la reproducción asistida se encuentra bajo control legal estricto, en el caso de los pacientes con HIV y HCV en mono o coinfección (Cassuto et al., 2002 ; Bourlet et al., 2003; Garrido et al., 2004 ; Pasquier et al., 2006 ; Canto et al., 2006 ; Marcelin et al., 2008). Hasta el momento, en Argentina no existe reglamentación que indique la obligatoriedad del tamizaje de rutina para la detección de HIV, HBV y HCV en dichos centros (SAMER, 2013).

Sin embargo, a nivel mundial en reproducción asistida y transmisión de HCV se plantean algunas preguntas. Una de ellas es que en general no se han establecido todavía las pautas específicas que establezcan el comportamiento de los médicos en la asistencia reproductiva: ¿Se debe o no tratar parejas discordantes HCV (+) que requieran asistencia reproductiva? La mayoría de los investigadores consideran que la preparación secuencial con gradiente de densidad, lavado y centrifugación del espermatozoides es la metodología recomendada para los hombres HCV positivos (Bourlet et al., 2009; Savasi et al., 2010). La

legislación francesa plantea que además de testear el esperma inicial es necesario analizar por PCR la presencia de HCV en el pellet final (semen tratado) antes de la reproducción asistida (Bourlet et al., 2009). Otros autores no consideran a HCV como una enfermedad de transmisión sexual y por esa razón creen innecesario el lavado de esperma (Savasi et al., 2013). La segunda pregunta sería: ¿deberían las parejas discordantes fértiles ser tratadas? Savasi et al., (2013) consideran innecesaria dicha práctica si la pareja no necesita reproducción asistida, debido a que no hay suficiente evidencia de transmisión sexual de HCV en parejas estables serodiscordantes (Savasi et al., 2013, Terrault et al., 2013).

Por otra parte, la presencia de HCV en semen implicaría un posible riesgo de contaminación nosocomial, por lo que en los laboratorios de reproducción asistida deberían ser aplicadas medidas de seguridad y estrictas regulaciones para evitarlo.

Respecto al perfil molecular de HCV, estudios previos han demostrado que la distribución de genotipos de HCV en la población general, se modifica continuamente debido tanto a cambios culturales que se asocian con nuevas conductas de riesgo como a movimientos poblacionales. Son ejemplos de tales modificaciones distintos eventos socio-sanitarios ocurridos en décadas pasadas, tales como la desaparición de la hepatitis C post-transfusional y el mejoramiento de las políticas sanitarias tendientes a reducir el riesgo de las hepatitis adquiridas en la comunidad. Asimismo, la diversidad de las secuencias de HCV continúa siendo el mayor obstáculo para el desarrollo de vacunas y terapias efectivas.

Nuestros resultados muestran que la caracterización molecular de HCV en pacientes monoinfectados y coinfectados HCV/HIV fue diferente y estuvo asociada a vías específicas de transmisión y grupos etarios. Además se observó

que el patrón genético varió considerablemente en los últimos 10 años en los pacientes monoinfectados.

Sin bien, coincidentemente con estudios previos realizados en nuestra región se halló alta prevalencia de genotipo 2, el porcentaje encontrado en este estudio fue sensiblemente menor a los obtenidos previamente (Ré et al., 2003; Ré et al., 2007; Mengarelli et al., 2006a; Mengarelli et al., 2006b), observando mayores porcentajes de prevalencia entre adultos mayores de 50 años. El genotipo 1 fue hallado en todos los grupos etarios pero con mayor prevalencia entre adultos jóvenes (30-39 años). El análisis de regresión logística multivariado mostró que tanto la edad como el UDEV y la infección con HIV fueron determinantes independientes en la distribución de genotipos. El HCV-1 fue asociado al UDVE y en concordancia con lo observado en el resto del país la infección con este genotipo fue predominante, entre los sujetos coinfectados con HIV (Quarleri et al., 2000; Bolcic et al., 2012). Este hallazgo sugirió que la diseminación de los genotipos 1 y 2 podría deberse a eventos epidemiológicos diferentes, lo que posteriormente intentamos comprobar por análisis filogenéticos y de coalescencia.

Reportes previos indican una predominancia del genotipo 3 entre UDEV (Ross et al., 2000; Chlabicz et al., 2008), en nuestro caso, llamativamente hallamos una baja prevalencia de genotipo 3 entre individuos UDEV y las mayores prevalencias se hallaron entre individuos adultos (40-49 años).

La relación entre los genotipos de HCV y SIDA no ha sido bien establecida, sin embargo, algunos estudios muestran que pacientes infectados con el genotipo 1 incrementan el riesgo de mortalidad, principalmente relacionado a SIDA, comparado con aquellos infectados con otro genotipo (van Asten et al., 2004; Yoo et al., 2005; Sulkowsky, 2013a; Sulkowsky, 2013b).

Cuando analizamos los resultados obtenidos en el transcurso de los 10 años de estudio corroboramos estadísticamente el aumento de incidencia de

genotipo HCV-1. Sin embargo, no se halló asociación significativa respecto a los subtipos HCV1a y 1b y a las vías de transmisión.

Con el fin de corroborar este nuevo comportamiento en el patrón genotípico examinamos la historia local de introducción y diseminación del HCV-1 a lo largo del tiempo usando análisis moleculares (secuencia de nucleótidos) y bioinformáticos (análisis filogenético y de coalescencia). Los análisis de reconstrucción filogenética y filogeográfica complementan la reconstrucción de la dinámica poblacional de un determinado genotipo/subtipo. Esta estrategia experimental es considerada una moderna herramienta para entender por qué algunas infecciones de HCV ocurren o se expanden en ciertas áreas y para relacionar movimientos poblacionales con los eventos de introducción local de HCV (Tanaka et al., 2002; Nakano et al., 2004; Culasso et al., 2012).

Los subtipos epidémicos (1a, 1b, 2a, 2b, 2c, y 3a), son caracterizados por su alta prevalencia, baja diversidad genética, y una distribución global que se diseminó rápidamente durante el último milenio gracias a sus efectivos modos de transmisión como UDEV, transfusiones, etc. Por el contrario los subtipos considerados endémicos demuestran una alta diversidad genética local debido a su baja tasa de transmisión y a su persistencia en la población, durante centurias en áreas geográficas restringidas o circunscriptas. Basados en la diversidad genética de HCV, en la actualidad, varios trabajos han reconstruido la historia evolutiva de ambos linajes (epidémicos y endémicos) de HCV, donde se ha asociado una escala temporal a datos de factores de riesgo, diversas rutas de transmisión y prevalencias (Pybus et al., 2009; Magiorkinis G, et al., 2009; Markov et al., 2009; Markov et al., 2012). Un ejemplo es el ocurrido en el sur de China donde los subtipos 3a y 6a han incrementado sustantivamente su presencia en jóvenes adultos desplazando al anteriormente anclado subtipo 1b

(Yan et al., 2012). Otro el ocurrido en Venezuela en un período de 10 años con el reemplazo de HCV-1b por el HCV-2 (Pujol et al., 2007).

Recientemente, se realizó en Córdoba un estudio tendiente a dilucidar y profundizar en el proceso de diversificación del genotipo 2, subtipo 2c. En el mismo se reportó, por primera vez en la región, un origen histórico de este subtipo asociado al proceso de inmigración europea (principalmente de Italia), lo cual es compatible con la historia de Argentina a principios del siglo 20 (particularmente entre 1880 y 1920). Asimismo, en este trabajo se sugiere que la diseminación de HCV-2c fue multicausal y se produjo casi simultáneamente en Europa y Sud América, posiblemente como resultado de los avances médico tecnológicos de la primera mitad de siglo 20 (Ré et al., 2011).

Utilizando la misma estrategia usada para HCV-2 se intentó reconstruir la historia demográfica del genotipo HCV-1, subtipo 1a y 1b en nuestro medio. Es por ello que se analizaron los árboles obtenidos como resultado de la reconstrucción filogenética a partir de las secuencias de la región NS5B y E2 provenientes de Córdoba, Villa María, Cruz del Eje y de otras localidades del interior provincial (Figuras 6 a 9, en sección 4.4.3) junto a secuencias del GenBank y de secuencias de genomas de referencia para HCV. Siendo la topología de los mismos independientes del método empleado, podemos decir que ambos subtipos en ambas regiones analizadas (NS5B y E2) se comportaron de manera similar. No se halló un comportamiento monofilético en las secuencias analizadas. En general las secuencias de ambos subtipos se entremezclaron sin evidencias de asociación geográfica (Cba, OLC) ni origen común. Sin embargo, algunas secuencias genotipo 1b formaron pequeños agrupamiento con un buen valor de soporte (bootstrap 71%, por ejemplo en Figura 8). Para intentar comprender si la expansión de HCV se dió como un proceso global único o fue la expansión simultánea de un juego de ancestros muy similares presentes en distintas regiones geográficas se realizó un análisis

filogeográfico. Este análisis demostró un grado medio de diversificación geográfica, suficiente para producir asociaciones e insuficiente para formar grupos filogenéticos soportados (por bootstrap, por ejemplo), sustentando la hipótesis de la expansión simultánea de ancestros relacionados presentes en varias regiones. El hecho de tener una introducción más reciente o múltiples introducciones de ambos subtipos, sumado la asociación geográfica, nos marca una tendencia de una probable ruta de contagio o transmisión local, sobre todo si tenemos en cuenta la presencia de UDEV y de coinfección con HIV en nuestra población de estudio.

Cuando realizamos el análisis de coalescencia, a fin de obtener la dinámica poblacional del virus y un marco temporal de ambos subtipos, obtuvimos que la edad del ancestro común más reciente para el subtipo 1a, fue estimada en 43 años con un período de crecimiento poblacional desde ~ 1970. Para el subtipo 1b éste se estimó de 69 años con un crecimiento poblacional desde ~1940. Ambos crecimientos son seguidos de una fase estacionaria que llega hasta nuestros días. Dicho hallazgo demuestra un evento “moderno” de introducción del genotipo 1 en la provincia de Córdoba. En conclusión en el caso del subtipo 1a el evento evolutivo de introducción se hallaría en la década del '70 coincidiendo con un mayor consumo de estupefacientes y para el subtipo 1b dicho evento, habría ocurrido unas décadas antes, casi en concordancia con lo hallado en el resto del país (Culasso et al., 2011; Golemba et al., 2010).

Finalmente, este incremento gradual de la prevalencia de genotipo 1, homogéneamente distribuido en todas las edades, con altas prevalencias en adultos jóvenes y en ambos grupos (mono infectado - coinfectados) no resulta, un dato alentador, considerando que esta variante viral está relacionada a baja respuesta a la terapia antiviral. Por otra parte, el estilo de vida y la edad de las personas infectadas lleva a pensar que los factores que hoy predominan, como el

consumo de drogas endovenosas y las relaciones sexuales promiscuas serán los causantes de la actual y futura diseminación de este genotipo en nuestra región, desplazando definitivamente al HCV-2c.

Conclusiones:

- ✓ Se detectó una prevalencia elevada (12-20%) de HCV entre individuos coinfectados con HIV.
- ✓ La infección con HCV en individuos infectados con HIV interfirió negativamente en la respuesta a la terapia HAART.
- ✓ Fue posible detectar el virus de HCV en células mononucleares de sangre periférica y fluidos biológicos (saliva, cepillado endocervical y semen) de pacientes infectados por HCV. Sin embargo, ésta detección fue independiente de la coinfección con HIV, la carga viral y genotipo HCV circulante.
- ✓ En Córdoba, la distribución de genotipos HCV fue diferente entre individuos monoinfectados y coinfectados HCV/HIV y varió de acuerdo con la edad y el modo de transmisión. Este hallazgo sugiere que la diseminación de los genotipos 1 y 2 podría deberse a eventos epidemiológicos diferentes.
- ✓ En los últimos 10 años se observó un incremento gradual de la prevalencia de genotipo 1, respecto del genotipo 2 con un cambio estadísticamente significativo en el perfil epidemiológico a partir del año 2003.
- ✓ El incremento gradual de la prevalencia de genotipo 1, homogéneamente distribuido en todas las edades y en ambos grupos (monoinfectado - coinfectados) posee importantes implicancias en las decisiones terapéuticas, considerando que éste posee baja respuesta a la terapia antiviral.
- ✓ La distribución de los subtipos HCV1a y 1b fue homogénea en ambas poblaciones estudiadas (HCV- HCV/HIV).

- ✓ El análisis filogenético y el estudio de evolución de los subtipos HCV 1a y 1b muestran el carácter heterofilético de la población y un evento de introducción mucho más reciente o “moderno” que para el ya conocido 2c en la provincia de Córdoba.
- ✓ En el caso del subtipo 1a el evento evolutivo de introducción se hallaría en la década del '70 coincidiendo con un mayor consumo de estupefacientes.
- ✓ Para el subtipo 1b el evento de introducción a la provincia de Córdoba posiblemente ocurrió unas décadas anteriores, casi en concordancia con lo hallado en el resto del país.
- ✓ Los resultados hallados refuerzan la hipótesis de que la evolución del Virus de la Hepatitis C local es modelada por la multicausalidad.

6. Referencias

Referencias

- Abenavoli L, Mazza M, Almasio PL.** The optimal dose of ribavirin for chronic hepatitis C: From literature evidence to clinical practice. *Hepat Mon.* 2011; 11: 240-246.
- Abergel A, Ughetto S, Dubost C, Bonny C, Aublet-Cuvelier B, Delarocque-Astagneau E, et al.** The epidemiology and virology of hepatitis C virus genotype 5 in central France *Aliment Pharmacol and Ther.* 2007; 26: 1437-1446.
- Alberti A, Benvegna L** Management of hepatitis C. *Journal of Hepatology.* 2003; 38:104-118.
- Alter MJ.** Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterology* 2007; 13:2436-2441.
- Alter MJ.** Epidemiology of viral hepatitis and HIV coinfection. *J Hepatol* 2006, 44(1 Suppl):S6-9.
- Alfonso V, Flichman DM, Sookoian S, Mbayed VA, Campos RH.** Evolutionary study of HVR1 of E2 in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of General Virology.*2004;85: 39-46.
- Antoszewski B, Sitek A, Jedrzejczak M, Kasielska A, Kruk-Jeromin J.** Are body piercing and tattooing safe fashions? *Eur J Dermatol.* 2006; 16:572-575.
- Arrieta JJ, Rodríguez-Iñigo E, Ortiz-Movilla N, Bartolomé J, Pardo M, Manzarbeitia F, et al.** In situ detection of hepatitis C virus RNA in salivary glands. *Am J Pathol.* 2001; 158:259- 264.
- Ashfaq UA, Qasim M, Yousaf MZ, Awan MT, Jahan S.** Inhibition of HCV 3a genotype entry through host CD81 and HCV E2 antibodies. *J Transl Med.* 2011; 9:194.

- Aziz** S, Hossain N, Karim SA, Rajper J, Soomro N, Noorulain W, et al. Vertical transmission of hepatitis C virus in low to middle socio-economic pregnant population of Karachi. *Hepatol Int.* 2011; 5:677-680.
- Bacon** MC, von Wyl V, Alden C, Sharp G, Robison E, Hessol N et al. The Women's Interagency HIV Study: an observational cohort brings clinical sciences to the bench. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005, 12: 1013-1019.
- Barreiro** P, Vispo E, Labarga P, Soriano V. Management and Treatment of Chronic Hepatitis C in HIV Patients. *Semin Liver Dis.* 2012; 32:138-146.
- Belec** L, Legoff J, Si-Mohamed A, Bloch F, Mbopi Keou FX, Becquart P, et al. Mucosal humoral immune response to hepatitis C virus E1/E2 surface glycoproteins and HCV shedding in saliva and cervicovaginal fluids from chronically HCV-infected patients. *J Hepatol.* 2003; 38: 833-842.
- Beran** RK, Lindenbach BD, Pyle AM, The NS4A protein of hepatitis C virus promotes RNA-coupled ATP hydrolysis by the NS3 helicase. *J Virol.* 2009; 83: 3268-3275.
- Bessone** F, Campodonico M, Fay F, Guerrina C, Cortazar F, Reggiardo V, et al. Unusually high prevalence of HCV infection among people older than 60 years in an Argentinean town. *Hepatology International.* 2007; 1: 1-242.
- Blackard** JT, Kemmer N, Sherman KE. Extrahepatic replication of HCV: insights into clinical manifestations and biological consequences. *Hepatology.* 2006; 44:15-22.
- Blackard** JT, Smeaton L, Hiasa Y, Horiike N, Onji M, Jamieson DJ, et al. Detection of hepatitis C virus (HCV) in serum and peripheral-blood mononuclear cells from HCV-monoinfected and HIV/HCV-coinfected persons. *J Infect Dis.* 2005; 15:258-265.
- Blackard** JT, Ma G, Welge JA, Martin CM, Sherman KE, Taylor LE, et al. Analysis of a non-structural gene reveals evidence of possible hepatitis C virus (HCV) compartmentalization. *J Med Virol.* 2012; 84:242-252.

- Bocket L**, Chevaliez S, Talbodec N, Sobaszek A, Pawlotsky JM, Yazdanpanah Y. Occupational transmission of hepatitis C virus resulting from use of the same supermarket meat slicer. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17: 238-241.
- Bolcic F**, Laufer N, Trincherro J, Jones LR, Quarleri J. A clustering phenomenon among HCV-1a strains among patients coinfecting with HIV from Buenos Aires, Argentina. *J Med Virol.* 2012;84:570-581.
- Bonacini M**, Puoti M. Hepatitis C in patients with human immunodeficiency virus infection: diagnosis, natural history, meta analysis of sexual and vertical transmission, and therapeutic issues. *Arch Intern Med.* 2000; 160: 3365-3372.
- Bourlet T**, Lornage J, Maertens A, Garret AS, Saoudin H, Tardy JC, et al. Prospective evaluation of the threat related to the use of seminal fractions from hepatitis C virus-infected men in assisted reproductive techniques. *Human Reproduction.* 2009; 24:530-535.
- Bourlet T**, Levy R, Laporte S, Blachier S, Bocket L, Cassuto G, et al. Multicenter quality control for the detection of hepatitis C virus RNA in seminal plasma specimens. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:789-793.
- Bourlet T**, Levy R, Maertens A, Tardy JC, Grattard F, Cordonier H, et al. Detection and characterization of hepatitis C virus RNA in seminal plasma and spermatozoon fractions of semen from patients attempting medically assisted conception. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 3252-3255.
- Braitstein P**, Justice A, Bangsberg DR, Yip B, Alfonso V, Schechter MT, et al. Hepatitis C coinfection is independently associated with decreased adherence to antiretroviral therapy in a population-based HIV cohort. *AIDS.* 2006(a); 20:323-331.
- Braitstein P**, Zala C, Yip B, Brinkhof MW, Moore D, Hogg RS, et al. Immunologic response to antiretroviral therapy in hepatitis C virus-coinfecting adults in a population-based HIV/AIDS treatment program. *J*

- Infect Dis. 2006(b); 193: 259-268.
- Briat A**, Dulioust E, Galimand J, Fontaine H, Chaix ML, Letur-Könirsch H, et al. Hepatitis C virus in the semen of men coinfectd with HIV-1: prevalence and origin. *AIDS*. 2005; 19:1827-1835.
- Brohm C**, Steinmann E, Friesland M, Lorenz IC, Patel A, Penin F, et al. Characterization of determinants important for hepatitis C virus p7 function in morphogenesis using transcomplementation. *J Virol*. 2009; 83: 11682-11693.
- Bukh J**. Animal models for the study of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Gastroenterology*. 2012; 142: 1279-1287.
- Cadwell SH**, Sue M, Bowden JH, Dickson RC, Driscoll CJ, Yeaton P, et al. Hepatitis C virus in body fluids after liver transplantation. *Liver Transpl Surg*. 1996; 2: 124-129.
- Canto CL**, Segurado AC, Pannuti C, Cedenho A, Srougi M, Spaine D, et al. Detection of HIV and HCV RNA in semen from Brazilian coinfectd men using multiplex PCR before and after semen washing. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2006; 48: 201-206.
- Carreño V**, Bartolomé J, Castillo I, Quiroga JA. New perspectives in occult hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2012; 18: 2887-2894.
- Cassuto NG**, Sifer C, Feldmann G, Bouret D, Moret F, Benifla JL, et al. A modified RT-PCR technique to screen for viral RNA in the semen of hepatitis C virus-positive men. *Hum Reprod*. 2002; 17: 3153-3156.
- Cavalheiro Nde P**, De La Rosa A, Elagin S, Tengan FM, Araújo ES, Barone AA. Hepatitis C: sexual or intrafamilial transmission? Epidemiological and phylogenetic analysis of hepatitis C virus in 24 infected couples. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009; 42: 239-244.
- CDC**. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Recomendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV)

- infection and HCV-related chronic disease. *MMWR*: 47 1998. (No. RR - 19).
- Chary** A, Winters MA, Eisen R, Knight TH, Asmuth DM, Holodniy M. Quantitation of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells in HCV-monoinfection and HIV/HCV-coinfection. *J Med Virol*. 2012; 84: 431-437.
- Chen** LF, Hoy J, Lewin SR. Ten years of highlyactive antiretroviral therapy for HIV infection. *Med J Aus*. 2007; 186: 146-151.
- Chen** Z, Weck KE. Hepatitis C virus genotyping: interrogation of the 5' untranslated region cannot accurately distinguish genotypes 1a and 1b. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 3127-3134.
- Chlabicz** S, Flisiak R, Kowalczyk O, Grzeszczuk A, Pytel-Krolczuk B, Prokopowicz D, et al. Changing HCV genotypes distribution in Poland--relation to source and time of infection. *J Clin Virol*. 2008; 42: 156-159.
- Cruz** HM, Marques VA, Villela-Nogueira CA, do Ó KM, Lewis-Ximenez LL, Lampe E, et al. An evaluation of different saliva collection methods for detection of antibodies against hepatitis C virus (anti-HCV). *J Oral Pathol Med*. 2012; 41: 793-800.
- Culasso** ACA, Elizalde M, Campos RH, Barbini L. Molecular Survey of Hepatitis C Virus in the Touristic City of Mar Del Plata, Argentina. *PloS ONE*. 2012; 7(9): e44757.
- Cunningham** WE, Markson LE, Andersen RM, Crystal SH, Fleishman JA, Golin C, et al. Prevalence and predictors of highly active antiretroviral therapy use in patients with HIV infection in the United States. HCSUS Consortium. HIV Cost and Services Utilization. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2000; 25: 115-123.
- Daniel** HD, Grant PR, Garson JA, Tedder RS, Chandy GM, Abraham P. Quantitation of hepatitis C virus using an in-house real-time reverse

- transcriptase polymerase chain reaction in plasma samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008; 61: 415-420.
- De Almeida-Neto C**, Sabino EC, Liu J, Blatyta PF, Mendrone-Junior A, Salles NA, et al. Prevalence of serologic markers for hepatitis B and C viruses in Brazilian blood donors and incidence and residual risk of transfusion transmission of hepatitis C virus. *Transfusion*. 2012; 53: 827-834.
- De Francesco R**, Migliaccio G. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature*. 2005; 436: 953-960.
- De Nishioka SA**, Gyorkos TW, Joseph L, Collet JP, MacLean JD. Tattooing and transfusion-transmitted diseases in Brazil: a hospital-based cross-sectional matched study. *Eur J Epidemiol*. 2003; 18: 441-449.
- Depla M**, d'Alteroche L, Le Gouge A, Moreau A, Hourieux C, Meunier JC, et al. Viral sequence variation in chronic carriers of hepatitis C virus has a low impact on liver steatosis. *PLoS One*. 2012; 7(3):e33749.
- Di Lello F**, Garcia G, Kott V, Sookoian S, Campos R. Diversity of hepatitis C virus genotype 1b in Buenos Aires, Argentina: description of a new cluster associated with response to treatment. *J Med Virol* 2008; 80: 619-627.
- Diviney S**, Tuplin A, Struthers M, Armstrong V, Elliott RM, Simmonds P, et al. A hepatitis C virus cis-acting replication element forms a long-range RNA-RNA interaction with upstream RNA sequences in NS5B. *J Virol*. 2008; 82: 9008-9022.
- Drummond AJ**, Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214-222.
- Eirea M**, Dios PD, Hermida M, Rodríguez I, Castro A, Ocampo A. Detection of HCV-RNA in saliva of HIV-HCV coinfecting patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2005; 21: 1011-1015.

- Eksioglu** EA, Bess JR, Zhu H, Xu Y, Dong HJ, Elyar J, et al. Hepatitis C virus modulates human monocyte-derived dendritic cells. *J Viral Hepat.* 2010; 17: 757-769.
- Elazar** M, Liu P, Rice CM, Glenn JC. An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. *J Virol.* 2004; 78: 11393-11400.
- Emery** J, Pick N, Mills EJ, Cooper CL. Gender differences in clinical, immunological, and virological outcomes in highly active antiretroviral-treated HIV-HCV coinfecting patients. *Patient Preference Adherence.* 2010; 13:97-103.
- EASL.** European Association for the Study of the Liver: Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2011; 55: 245-264.
- Farci** P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, et al. The outcome of acute hepatitis C predicted by evolution of the viral quasispecies. *Science.* 2000; 288:339-344.
- Farquhar** MJ, Hu K, Harris HJ, Davis C, Brimacombe CL, Fletcher SJ, et al. Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis. *J Virol.* 2012; 86: 4305-4316.
- Fields - Virology (Two Volumes) 4th Edition:** por Fields B, Howley P, Griffin D, Lamb R, Martin M, Roizman B, Straus, Knipe D (Editores) By Lippincott Williams & Wilkins Publishers. 2001.736p.
- Friebe** P, Boudet J, Simorre JP, Bartenschlager R. Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J Virol.* 2005; 79: 380-392.
- Fuping** G, Wei L, Yang H, Zhifeng Q, Lingyan Z, Yanling L, Taisheng L. Impact of hepatitis C virus coinfection on HAART in HIV-infected Individuals:

- multicentric observation cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010; 54:137-142.
- Furler MD**, Einarson TR, Walmsley S, Millson M, Bendayan R. Longitudinal trends in antiretroviral use in a cohort of men and women in Ontario, Canada. *AIDS Patient Care STDS.* 2006; 20: 245-257.
- Garrido N**, Meseguer M, Bellver J, Remohí J, Simón C, Pellicer A. Report of the results of a 2 year programme of sperm wash and ICSI treatment for human immunodeficiency virus and hepatitis C virus serodiscordant couples. *Hum Reprod.* 2004; 19: 2581-2586.
- Gastaminza P**, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV. Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol.* 2008; 82: 2120-2129.
- Gebo KA**, Fleishman JA, Conviser R, Reilly ED, Korthuis PT, Moore RD, et al. Racial and gender disparities in receipt of highly active antiretroviral therapy persist in a multistate sample of HIV patients in 2001. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005; 38: 96-103.
- GESIDA / PNS / AEEH.** Recomendaciones sobre tratamiento y manejo del paciente adulto coinfectado por VIH y virus de las hepatitis A, B y C. Panel de expertos de Gesida, Secretaría del Plan Nacional sobre el Sida (SPNS) y Asociación Española para el Estudio del Hígado. 2009; <http://www.msc.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/publicaciones/profSanitarios/coinfectadosHepatitis1Sep2009.pdf> [acceso, 17 Abril, 2013].
- Ghany MG**, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. AASLD PRACTICE GUIDELINES. Diagnosis, Management, and Treatment of Hepatitis C: An Update. *Hepatology.* 2009; 49: 1365-1374.

- Ghany** MG, Nelson DR, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. AASLD PRACTICE GUIDELINES. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2011; 54:1433- 1444.
- Golemba** MD, Di Lello FA, Bessone F, Fay F, Benetti S, Jones LR, et al. High Prevalence of Hepatitis C Virus Genotype 1b Infection in a Small Town of Argentina. Phylogenetic and Bayesian Coalescent Analysis. *PLoS ONE*. 2010; 5(1): e8751.
- Gonsalvez** PL, Cunha CB, Busek SCU, Oliveira GC, Ribeiro-Rodriguez R, Pereira FE. Detection of Hepatitis C Virus RNA in Saliva Samples from Patients with Seric Anti-HCV Antibodies. *Braz J Infect Disease*. 2005; 9: 28-34.
- Gonzalez-Perez** I, Vina-Rodriguez A, Cayarga AA, Rosa IG, Gonzalez YJ. Design of an antisense reverse-transcriptasepolymerase chain reaction primer efficient for all hepatitis C virus genotypes: comparison of its performance vs a commercial primer. *Anal Biochem*. 2003; 315: 281-284.
- Greub** G, Ledergerber, Battegay M, Grob P, Perrin L, Furrer H, et al. Clinical progression, survival, and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HIV-1 and hepatitis C virus coinfection: the Swiss HIV Cohort Study. *Lancet*. 2000; 356: 1800-1805.
- Guichon** A, Chiparelli H, Martinez A, Rodriguez C, Trento A, Russi JC, et al. Evaluation of a new NASBA assay for the qualitative detection of hepatitis C virus based on the NucliSens Basic Kit reagents. *J Clin Virol*. 2004; 29:84-91.
- Guindon** S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol*. 2003; 52: 696-704.
- Hadziyannis** SJ, Sette H, Jr., Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic

- hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med.* 2004; 140: 346- 355.
- Halfon** P, Riflet H, Renou C, Quentin Y, Cacoub P. Molecular evidence of Male-to- Female Sexual Transmission of Hepatitis C Virus after Vaginal and Anal Intercourse. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 1204-1206.
- Hall** TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999; 41: 95-8.
- Hanafiah** KM, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to hepatitis C virus seroprevalence. *Hepatology.* 2012; 57: 1333-1342.
- Hernandez** MD, Sherman KE. HIV/hepatitis C coinfection natural history and disease progression. *Curr. Opin. HIV AIDS.* 2011; 6: 478-482.
- Hodder** S, Arasteh K, De Wet J, Gathe J, Gold J, Kumar P, et al. Effect of gender and race on the week 48 findings in treatment-naive, HIV-1-infected patients enrolled in the randomized, phase III trials ECHO and THRIVE. *HIV Med.* 2012; 13: 406-415.
- Hoofnagle** JH, Seeff LB. Peginterferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *N Engl J Med.* 2006; 355: 2444-2451.
- Hou** W, Bukong TN, Kodys K, Szabo G. Alcohol Facilitates HCV RNA Replication Via Up-Regulation of miR-122 Expression and Inhibition of Cyclin G1 in Human Hepatoma Cells. *Alcohol Clin Exp Res.* 2013; 37: 599-605.
- Indolfi** G, Bartolini E, Azzari C, Becciolini L, Moriondo M, de Martino M, et al. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus: infection of the father predicts the risk of perinatal transmission. *J Med Virol.* 2008; 80: 1907-1911.

- Jacobson** IM, Brown RS, Jr., Freilich B, Afdhal N, Kwo PY, Santoro J, et al. Peginterferon alfa-2b and weight-based or flat-dose ribavirin in chronic hepatitis C patients: a randomized trial. *Hepatology*. 2007; 46: 971-981.
- Jopling** CL. Regulation of hepatitis C virus by microRNA-122. *Biochem Soc Trans*. 2008; 36: 1220-1223.
- Jopling** CL, Norman KL, Sarnow P. Positive and negative modulation of viral and cellular mRNAs by liver-specific microRNA miR-122. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol*. 2006; 71: 369-376.
- Joyce** MA, Tyrrell DJL. *Microbes and Infection*. 2010; 12: 263-271.
- Kass** RE, Raftery AE. Bayes factors. *Journal of the American Statistical Association*. 1995; 90: 773-795.
- Kershenobich** D, Razavi HA, Sánchez-Avila JF, Bessone F, Coelho HS, Dagher L, et al. Trends and projections of hepatitis C virus epidemiology in LatinAmerica. *Liver Int. Suppl*. 2010; 2: 18-29.
- Kuiken** C, Simmonds P. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. *Methods Mol Biol*. 2009; 510: 33-53.
- Kumada** T, Toyoda H, Kiriya S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, et al. Characteristics of elderly hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012; 28: 357-364.
- Lacombe** K, Rockstroh J. HIV and viral hepatitis coinfections: advances and challenges. *Gut*. 2012; 61: 47-58.
- Larouche** A, Gaëtan G, El-Bilali N, Quesnel-Vallières M, Martin SR, Alvarez F, et al. Seronegative hepatitis C virus infection in a child infected via mother-to-child transmission. *J Clin Microbiol*. 2012; 50: 2515-2519.
- Laufer** N, Quarleri JF, Bouzas MB, Perez HM, Salomon H, Cahn PE. Coinfecciones por HBV y HCV en pacientes HIV positivos en la era "HAART": Nuevos desafíos. *Medicina*. 2007; 67: 82-91.

- Leruez-Ville** M, Kuntsmann JM, De Almeida M, Rouzioux C, Chaix ML. Detection of hepatitis C virus in semen of infected men. *Lancet*. 2000; 356: 42-43.
- Liang** TJ, Ghany MG. Current and Future Therapies for Hepatitis C Virus Infection. *Engl J Med*. 2013; 368:1907-1917.
- Lins** L, Almeida H, Vitvisk L, Carmo T, Paraná R, Reis MG. Detection of hepatitis C virus RNA in saliva is not related to oral health status or viral load. *J Med Virol*. 2005; 77: 216-220.
- Liou** TC, Chang TT, Young KC, Lin XZ, Lin CY, Wu HL. Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal urine, seminal fluids and ascites. *J Med Virol*. 1992; 37:197-202.
- Lopes Menezes** GB, Pereira FA, Barros Duarte CA, Azevedo Carmo TM, Pedreira da Silva H, et al. Quantification of HCV RNA in human serum and saliva *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012; 107: 680-683.
- Maddison**, WP, Maddison DR. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.73. <http://mesquiteproject.org>
- Magiorkinis** G, Magiorkinis E, Paraskevis D, Ho SY, Shapiro B, Pybus OG, et al. The global spread of hepatitis C virus genotypes 1a and 1b: a phylodynamic and phylogeographic analysis. *PLoS Med*. 2009.6:e1000198.
- Manavi** M, Baghestain M, Watkins-Reidel T, Battistutti W, Pischinger K, Schatten C, et al. Detection of Hepatitis C Virus RNA in Normal Cervical Smears of HCV-Seropositive Patients. *Clin Inf Dis*. 2002; 35:966-973.
- Marcelin** AG, Tubiana R, Lambert-Niclot S, Lefebvre G, Dominguez S, Bonmarchand M, et al. Detection of HIV-1 RNA in seminal plasma samples from treated patients with undetectable HIV-1 RNA in blood plasma. *AIDS*. 2008; 20:1677-1679.
- Markov** P, Pepin J, Frost E, Deslandes S, Labbé AC, Pybus OG.

- Phylogeography and molecular epidemiology of hepatitis C virus genotype 2 in Africa. *J Gen Virol.* 2009; 90: 2086 -2096.
- Markov PV**, van de Laar TJ, Thomas XV, Aronson SJ, Weegink CJ, van den Berk GE, et al. Colonial History and Contemporary Transmission Shape the Genetic Diversity of Hepatitis C Virus Genotype 2 in Amsterdam *Journal of Virology.* 2012; 86: 7677-7687.
- Marongiu A**, Hope VD, Parry JV, Ncube F. Male IDUs who have sex with men in England, Wales and Northern Ireland: are they at greater risk of bloodborne virus infection and harm than those who only have sex with women? *Sex Transm Infect.* 2012; 88: 456-461.
- Martin-Carbonero L**, Benhamou Y, Puoti M, Berenguer J, Mallolas J, Quereda C, et al. Incidence and predictors of severe liver fibrosis in HIV infected patients with chronic hepatitis C a European collaborative study. *Clin Infect Dis.* 2004;38: 128-133.
- Massard J**, Ratziu V, Thabut D, Moussalli J, Lebray P, Benhamou Y, et al. Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2006; 44: 19-24.
- Mast EE**, Hwang LY, Seto DS, Nolte FS, Nainan OV, Wurtzel H, et al. Risk factors for perinatal transmission of hepatitis C virus (HCV) and the natural history of HCV infection acquired in infancy. *J Infect Dis.* 2005;192:1880-1889.
- Mazumdar B**, Banerjee A, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus E1 envelope glycoprotein interacts with apolipoproteins in facilitating entry into hepatocytes. *Hepatology.* 2011; 54: 1149-1156.
- McCullagh, P.**, Nelder JA. *Generalized Linear Models.* Chapman and Hall. London. 1989.

- McMahon J M**, Simm M, Milano D, Clatts M. Detection of hepatitis C virus in the nasal secretions of an intranasal drug-user. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*2004; 7:3-6.
- Menezes GB**, Pereira FA, Duarte CA, Carmo TM, Silva Filho HP, Zarife MA, et al. Hepatitis C virus quantification in serum and saliva of HCV-infected patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012; 107: 680-683.
- Mengarelli S**, Correa G, Farias A, Cudola A, Juri M, Guinard S, et al. ¿Por qué el virus de la Hepatitis C en Cruz del Eje? *Acta Gastroenterol Latinoam.* 2006(a); 36:68.
- Mengarelli S**, Kohn IJ, Correa G, Farias A, Ame C, Carnevale J, et al. Circulación del virus C en la provincia de Córdoba. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 2006(b); 36:71.
- Ministerio de Salud de Argentina.** Management of adult patients with HIV infection. 2011. http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/argentina_art.pdf [acceso, 17 Abril, 2013]
- Minosse C**, Calcaterra S, Abbate I, Selleri M, Zaniratti MS, Capobianchi R. Possible compartmentalization of hepatitis C viral replication in the genital tract of HIV-1-coinfected women. *J Infect Dis.*2006; 194: 1529-1536.
- Mocroft A**, Phillips A, Soriano V, Rockstroh J, Blaxhult A, Katlama C, et al. Reasons for stopping antiretrovirals used in an initial highly active antiretroviral regimen: increased incidence of stopping due to toxicity or patient/physician choice in patients with hepatitis C coinfection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2005; 21: 527-536.
- Murakami J**, Nagata I, Iitsuka T, Okamoto M, Kaji S, Hoshika T, et al. Risk factors for mother to child transmission of hepatitis C virus: maternal

- high viral load and fetal exposure in the birth canal. *Hepatol Res.* 2012; 42:648-657.
- Nakai** K, Okamoto T, Kimura-Someya T, Ishii K, Lim CK, Tani H, et al. Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with the cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *J. Virol.* 2006; 80: 11265-11273.
- Nakano** T, Lu L, Liu P, Pybus OG. Viral gene sequences reveal the variable history of hepatitis C virus infection among countries. *J Infect Dis.* 2004; 190: 1098-1108.
- Nakano**, T., Lau GM, Lau GM, Sugiyama M, Mizokami M. An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region. *Liver Int.* 2012; 32: 339-345.
- Neumann** AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science.* 1998; 282: 103-107.
- Nguyen** O, Sheppard V, Douglas MW, Tu E, Rawlinson W. Acute hepatitis C infection with evidence of heterosexual transmission. *Journal of Clinical Virology.* 2010; 49: 65-68.
- Njouom** R, Nerrienet E, Dubois M, Lachenal G, Rousset D, Vessièrè A,,et al. The hepatitis C virus epidemic in Cameroon: genetic evidence for rapid transmission between 1920 and 1960. *Infect, Genetics and Evol.* 2007;7: 361-367.
- Núñez** M. Clinical syndromes and consequences of antiretroviral-related hepatotoxicity. *Hepatology.* 2010; 52:1143-1155.
- OMS.** World Health Organization. Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents. Recommendations for a public health approach: 2010 revision. <http://www.who.int/hiv/pub/arv/adult2010/en/index.html>. (acceso,

17 Abril, 2013)

- OMS.** World Health Organization. Viral hepatitis: Report by the Secretariat. 2009. http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB126/B126_15-en.pdf (acceso, 10 Febrero, 2012).
- Op De Beeck A, Voisset C, Bartosch B, Ciczora Y, Cocquerel L, Keck Z, et al.** Characterization of functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J. Virol.* 2004; 78: 2994-3002.
- Operskalski EA, Kovacs A.** HIV/HCV Co-infection: Pathogenesis, Clinical Complications, Treatment, and New Therapeutic Technologies. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2011; 8:12-22.
- Orsetti E, Staffolani S, Gesuita R, De Iaco G, Marchionni E, Brescini L, et al.** Changing characteristics and risk factors of patients with and without incident HCV infection among HIV-infected individuals. *Infection.* 2013; 41: 987-990.
- Ozaras R, Tahan V.** Acute hepatitis C: prevention and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009; 7: 351-361.
- Page K, Osburn W, Evans J, Hahn JA, Lum P, Asher A, et al.** Frequent longitudinal sampling of HCV infection in IDU reveals intermittently detectable viremia and reinfection. *Clin Infect Dis.* 2013; 56: 405-413.
- Pando M, Biglione M, Toscano M, Rey J, Russell K, Negrete M, et al.** Human immunodeficiency virus type 1 and others viral co-infections among heterosexual men and women in Argentina. *Am J Trop Med Hyg.* 2004; 71: 153-159.
- Panduro A, Romana S, Khanb A, Tanak Y, Kurbanov F, Martinez-Lopez E, et al.** Molecular epidemiology of hepatitis C virus genotypes in West Mexico. *Virus Research.* 2010; 151: 19-25.

- Parker J**, Rambaut A, Pybus OG. Correlating viral phenotypes with phylogeny: accounting for phylogenetic uncertainty. *Infection, Genetics and Evolution*. 2008; 8: 239-246.
- Pasquier C**, Bujan L, Daudin M, Righi L, Berges L, Thauvin L, et al. Intermittent detection of hepatitis C virus (HCV) in semen from men with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HCV. *J Med Virol*. 2003; 69: 344-349.
- Pasquier C**, Souyris C, Moinard N, Bujan L, Izopet J. Validation of an automated real-time PCR protocol for detection and quantitation of HIV and HCV genomes in semen. *J Virol Methods*. 2006; 137: 156-159.
- Pastore L**, Fiore JR, Tateo M, De Benedittis M, Petruzzi M, Casalino C, et al. Detection of hepatitis C virus-RNA in saliva from chronically HCV-infected patients. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2006; 19: 217-224.
- Pérez Cachafeiro S**, Caro-Murillo AM, Berenguer J, Segura F, Gutierrez F, Vidal F, et al. *Emerg Infect Dis*. 2011;17: 1116-1119.
- Picchio GR**, Bare' PC, Descalzi VI, Bussy MV, Soria SM, Raffa MP, et al. High prevalence of infection with a single hepatitis C virus genotype in a small rural community of Argentina. *Liver Int*. 2006; 26: 660-665.
- Posada D**, Crandall KA. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 1998; 14: 817-818.
- Ploss A**, Dubuisson J. New advances in the molecular biology of hepatitis C virus infection: towards the identification of new treatment targets. *Gut*. 2012; 61: 25-35.
- Pujol FH**, Loureiro CL. Replacement of hepatitis C virus genotype 1b by genotype 2 over a 10 year period in Venezuela. *J Clin. Gastroenterol*. 2007; 5: 518-520.
- Pulido F**, Hill A, van Delft Y, Moecklinghoff C. Impact of hepatitis C co-infection on response to antiretroviral treatment. *AIDS Rev*. 2012; 14:

124-131.

- Puoti C**, Guarisco R, Spilabotti L, Bellis L, Mitidieri O, Dell'Unto O, et al. Should we treat HCV carriers with normal ALT levels ? The "5Ws" dilemma. *J Viral Hepat.* 2012; 19: 229-235.
- Puoti M**, Bruno R, Soriano V, Donato F, Gaeta GB, Quinzan GP, et al. Hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients: epidemiological features, clinical presentation and outcome. *AIDS.* 2004; 18: 2285-2293.
- Pybus OG**, Barnes E, Taggart R, Lemey P, Markov PV, Rasachak B, et al. Genetic history of hepatitis C virus in East Asia. *J Virol.* 2009; 83: 1071-1082.
- Quarleri JF**, Bolcic FM, Bouzas MB, Laufer N, Gomez Carrillo M, Mammana L, et al. HCV genotype distribution among HIV co-infected individuals in Argentina: relationship with host and viral factors. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 2007; 37: 76-83.
- Quarleri JF**, Robertson BH, Mathet VL, Feld M, Espínola L, Requeijo MP, et al. Genomic and phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates from argentine patients: a six-year retrospective study. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 4560-4568.
- Rabe-Hesketh S**, Skrondal A. Classical latent variable models for medical research. *Stat Methods Med Res.* 2008; 17: 5-32.
- Radkowski M**, Gallegos-Orozco J.F., Jabłońska J., Colby T.V., Walewska-Zielecka B., Kubicka J., et al. Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2005; 41:106-114.
- Rallón NI**, Soriano V, Restrepo C, García-Samaniego J, Labarga P, López M, et al. HCV-specific T-cell responses in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients on highly active antiretroviral therapy are comparable to those observed in hepatitis C virus-monoinfected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2011; 57:1-8.

- Ramratnam B**, Bonhoeffer S, Binley J, Hurley A, Zhang L, Mittler JE, et al. Rapid production and clearance of HIV-1 and hepatitis C virus assessed by large volume plasma apheresis. *The Lancet*. 1999; 354: 1782-1785.
- Ré V**, Contigiani M, Yoshida TCF, Lampe E. Identification of hepatitis C virus subtype 2c by sequencing analysis in patients from Cordoba, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102: 995-998.
- Re´ V**, Lampe E, Yoshida CF, de Oliveira JM, Lewis-Ximénez L, Spinsanti L, et al. Hepatitis C virus genotypes in Cordoba, Argentina. Unexpected high prevalence of genotype 2. *Medicina* 2003; 63: 205-210.
- Re´ V**, Culasso ACA, Mengarelli S, Farías AA, Fay F, Pisano MB, et al. Phylodynamics of Hepatitis C Virus Subtype 2c in the Province of Córdoba, Argentina. *PLoS ONE*. 2011; 6(5): e19471.
- Reddy KR**, Nelson DR, Zeuzem S. Ribavirin: current role in the optimal clinical management of chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2009; 50: 402-411.
- Revie D**, Salahuddin SZ. Human cell types important for hepatitis C virus replication in vivo and in vitro: old assertions and current evidence. *J Virol*. 2011; 11: 346.
- Robinson JL**, Doucette K. The natural history of hepatitis C virus infection acquired during childhood. *Liver Int*. 2012; 32: 258-270.
- Rockstroh JK**, Spengler U. HIV and hepatitis C virus coinfection. *Lancet Infect Dis*. 2004; 4: 437-444.
- Rodrigues AF**, Guerreiro MR, Castro R, Tomás HA, Dalba C, Klatzmann D, et al. Down-regulation of CD81 in human cells producing HCV-E1/E2 retroVLPs. *BMC Proc*. 2011; 5: 72.
- Roque-Afonso AM**, Ducoulombier D, Di Liberto G, Kara R, Gigou M, Dussaix E, et al. Compartmentalization of hepatitis C virus genotypes between plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 2005; 79: 6349-6357.

- Ross RS, Viazov S, Renzing-Köhler K, Roggendorf M.** Changes in the epidemiology of hepatitis C infection in Germany: shift in the predominance of hepatitis C subtypes. *J Med Virol.* 2000; 60: 122-125.
- SADI.** Infectious Diseases Society of Argentina. Recommendations for monitoring and treatment. Infection by HIV / AIDS and its associated comorbidities. 2012; www.sadi.org.ar/files/SADI2012.pdf [acceso, 17 Abril, 2013].
- Sánchez C, Plaza Z, Vispo E, de Mendoza C, Barreiro P, Fernández-Montero JV, et al.** Scaling up epidemics of acute hepatitis C and syphilis in HIV-infected men who have sex with men in Spain. *Liver Int.* 2013; 33: 1357-1362.
- Savasi V, Oneta M, Parrilla B, Cetin I.** Should HCV discordant couples with a seropositive male partner be treated with assisted reproduction techniques (ART)? *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 2013; 167: 181-184.
- Savasi V, Parrilla B, Ratti M, Oneta M, Clerici M, Ferrazzi E.** Hepatitis C virus RNA detection in different semen fractions of HCV/HIV-1 co-infected men by nested PCR. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology.* 2010; 151: 52-55.
- Schregel V, Jacobi S, Penin F, Tautz N.** Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106: 5342-5347.
- Shackel NA, McGuinness PH, Abbott CA, Gorrell MD, McCaughan GW, Sharma SD.** Insights into the pathobiology of hepatitis C virus-associated cirrhosis: analysis of intrahepatic differential gene expression. *Indian Am J Pathol.* 2002; 160:641-654.
- Sharma SD.** Hepatitis C virus: Molecular Biology and current therapeutic options. *Indian J Med Res.* 2010; 131: 17-34.

- Sherman KE.** HCV and HIV: A Tale of Two Viruses. *Rev Gastroenterol Disord.* 2004; 4: 48-54.
- Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, et al.** Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 2005; 42: 962-973.
- Simmonds P.** Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol.* 2004; 85: 3173-3188.
- SAMER.** Sociedad Argentina de Medicina Reproductiva, 2013. www.samer.com.ar/Código de Ética/pdf
- Song Y, Friebe P, Tzima E, Junemann C, Bartenschlager R, Niepmann M.** The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *J Virol.* 2006; 80: 11579-11588.
- Soriano V, Mocroft A, Rockstroh J, Ledergerber B, Knysz B, Chaplinskas S, et al.** Spontaneous viral clearance, viral load, and genotype distribution of HCV in HIV-infected patients with HCV antibodies in Europe. *J Infect Dis.* 2008(a); 198: 1337-1344.
- Soriano V, Puoti M, Garcia-Gasco P, Rockstroh J, Benhamou Y, Barreiro P, et al.** Antiretroviral drugs and liver injury. *AIDS.* 2008(b); 22: 1-13.
- Soriano V, Martin-Carbonero L, Vispo E, Labarga P, Barreiro P.** Human immunodeficiency virus infection and viral hepatitis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011; 29: 691-701.
- Spada E, Abbate I, Sicurezza E, Mariano A, Parla V, Rinnone S, et al.** Molecular Epidemiology of a Hepatitis C Virus Outbreak in a Hemodialysis Unit in Italy. *J Med Virol.* 2008; 80: 261-267.
- Sulkowski M, Moore R, Mehta S, Chaisson R, Thomas D.** Hepatitis C and progression of HIV disease. *JAMA.* 2002; 288: 199-206.

- Sulkowski M.** Management of hepatic complications in HIV-infected persons. *J Infect Dis.* 2008; 197: 279–293.
- Sulkowski MS.** Current management of hepatitis C virus infection in patients with HIV co-infection. *J Infect Dis.* 2013(a); 207: 26–32.
- Sulkowski MS.** HCV therapy in HIV-infected patients. *Liver International.* 2013(b); 33: 63–67.
- Suzuki T, Omata K, Satoh T, Miyasaka T, Arai C, Maeda M, et al.** Quantitative detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in saliva and gingival crevicular fluid of HCV-infected patients. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:4413–4417.
- Tan Y, Wei QH, Chen LJ, Chan PC, Lai WS, He ML, et al.** Molecular epidemiology of HCV mono-infection and HIV/HCV coinfection in injection drug users in Liuzhou, Southern China. *PLoS One.* 2008; 3(10): e3608.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 *Molecular Biology and Evolution.* 2007; 24: 1596–1599.
- Tanaka Y, Hanada K, Mizokami M, Yeo AET, Shih JW, Gojobori T, et al.** A comparison of the molecular clock of hepatitis C virus in the United States and Japan predicts that hepatocellular carcinoma incidence in the United States will increase over the next two decades. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99: 15584–15589.
- Terrault N.** Sexual activity as a risk factor for Hepatitis C. *Hepatology.* 2002; 36: 99–105.
- Terrault NA, Dodge JL, Murphy EL, Tavis JE, Kiss A, Levin TR, et al.** Sexual transmission of hepatitis C virus among monogamous heterosexual couples: the HCV partners study. *Hepatology.* 2013; 57: 881–889.

- Thein** HH, Yi Q, Dore GJ, Krahn MD. Natural history of hepatitis C virus infection in HIV-infected individuals and the impact of HIV in the era of highly active antiretroviral therapy: a meta-analysis. *AIDS*. 2008; 22: 1979–1991.
- Thomas** F, Nicot F, Sandres-Saune K, Dubois M, Legrand-Abrevanel F, Alric L, et al. Genetic Diversity of HCV Genotype 2 Strains in South Western France. *J Med Virol*. 2007; 79: 26–34.
- Torriani** FJ, Rodriguez-Torres M, Rockstroh JK, Lissen E, Gonzalez-Garcia J, et al. Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients. *N Engl J Med*. 2004; 351: 438-450.
- van Asten** L, Prins M. Infection with concurrent multiple hepatitis C virus genotypes is associated with faster HIV disease progression. *AIDS*. 2004; 18: 2319-2324.
- Veillon** P, Payan C, Le Guillou-Guillemette H, Gaudy C, Lunel F. Quasispecies evolution in NS5A region of hepatitis C virus genotype 1b during interferon or combined interferon-ribavirin therapy. *World J Gastroenterol*. 2007; 13: 1195-1203.
- Vera-Otarola** J, Barría MI, León U, Marsac D, Carvallo P, Soza A, et al. Hepatitis C virus quasispecies in plasma and peripheral blood mononuclear cells of treatment naïve chronically infected patients. *J Viral Hepat*. 2009; 16: 633-643.
- Vermehren** J, Schlosser B, Domke D, Elanjimattom S, Muller C, Hintereder G, et al. High Prevalence of Anti-HCV Antibodies in Two Metropolitan Emergency Departments in Germany: A Prospective Screening Analysis of 28,809 Patients. *PLoS ONE*. 2012; 7(7): e41206.
- Vispo** E, Mena A, Maida I, Blanco F, Córdoba M, Labarga P, et al. Hepatic safety profile of raltegravir in HIV-infected patients with chronic hepatitis C. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65: 543–547.

- Wakita** T, Pietschmann T, Kato T, Date M, Miyamoto Z, Zhao K, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*. 2005; 11: 791-796.
- Wang** CC, Morishima C, Chung M, Engelberg R, Krantz E, Krows M, et al. High Serum Hepatitis C Virus (HCV) RNA load predicts the presence of HCV RNA in Saliva from individuals with Chronic and Acute HCV Infection. *J Infect Disease*. 2006; 193: 672-676.
- Weber** R, Sabin C, Friis-Moller N, Reiss P, El-Sadr WM, Kirk O, et al. Liver-related deaths in persons with the HIV: the D:A:D study. *Arch Intern Med*. 2006; 166: 1632-1641.
- Weis** N, Lindhardt B, Kronborg G, Hansen AB, Laursen AL, Christensen PB, et al. Impact of hepatitis C virus coinfection on response to highly active antiretroviral therapy and outcome in HIV-infected individuals: a nationwide cohort study. *Clin Infect Dis* 2006; 15: 1481-1487.
- Wejstal** R. Sexual transmission of hepatitis C virus. *J Hepatol*. 1999; 13: 92-95.
- Wölfel** M, Rutebemberwa A, Mosbrugger T, Mao Q, Li HM, Netski D, et al. Hepatitis C virus immune escape via exploitation of a hole in the T cell repertoire. *Journal of Immunology*. 2008; 181: 6435-6446.
- Wolk** B, Buchele B, Moradpour D, Rice CM. A dynamic view of hepatitis C virus replication complexes. *J. Virol*. 2008; 82: 10519-10531.
- Workowski** KA, Berman SM. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. *MMWR Recomm Rep* 2006; 55:1-94. www.cdc.gov/std/treatment/2010/hepC.htm
- Yan** Z, Fan K, Wang W, Fan Y, Tan Z, Deng G. Changing Pattern of Clinical Epidemiology on Hepatitis C Virus Infection in Southwest China. *Hepat Mon*. 2012; 12: 196-204.

- Yi M, Ma Y, Yates Y, Lemon SM.** Trans-complementation of an NS2 defect in a late step in hepatitis C virus (HCV) particle assembly and maturation. *PLoS Pathog.* 2009; (5) e1000403.
- Yoo TW, Donfield S, Lail A, Lynn HS, Daar ES.** Effect of hepatitis C virus (HCV) genotype on HCV and HIV-1 disease. *J Infect Dis.* 2005; 191: 4-10.
- Yu KL, Jang SI, You JC.** Identification of in vivo interaction between hepatitis C virus core protein and 5' and 3' UTR RNA. *Virus Res.* 2009; 145: 285-292.
- Yuki N, Matsumoto S, Tadokoro K, Mochizuki K, Kato M, Yamaguchi T.** Significance of liver negative-strand HCV RNA quantitation in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2006; 44: 302-309.
- Zaltron S, Spinetti A, Biasi L, Baiguera C, Castelli F.** Chronic HCV infection: epidemiological and clinical relevance. *BMC Infect Dis.* 2012; 12:2.

7. Anexos

I

DETECCION DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC) EN SALIVA DE PACIENTES CRONICAMENTE INFECTADOS DE CORDOBA, ARGENTINA

**DETECCION DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC) EN SALIVA DE PACIENTES
CRONICAMENTE INFECTADOS DE CORDOBA, ARGENTINA.**

HEPATITIS C VIRUS (HCV) DETECTION IN SALIVA OF CHRONICALLY INFECTED PATIENTS
FROM CORDOBA, ARGENTINA.

Adrián Fariás, ^{1*} Viviana Ré, ^{1,4} Silvia Mengarelli, ² Luis Kremer, ³ María Belén Pisano, ¹ Luis Allende, ³ Juan Nicolás, ⁴ Osvaldo Elbarcha, ⁴ Marta Contigiani ¹.

RESUMEN

La posibilidad de transmisión no parenteral del virus de la Hepatitis C (VHC) se sustenta por la actual demostración del virus en diferentes fluidos biológicos. En este estudio, investigamos la relación entre la detección de ARN de VHC en la saliva de pacientes crónicamente infectados con este virus y varios factores virales y del huésped. MÉTODOS: Se estudiaron 16 individuos coinfectados VIH/VHC y 21 pacientes mono infectados con VHC, con media de edad de 38 y 45, respectivamente. El ARN de VHC se detectó mediante transcripción reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada. Los genotipos fueron detectados usando RFLP y secuenciamiento directo a partir de los productos de PCR, la carga viral se determinó usando NASBA HCV-QT. RESULTADOS: Detectamos ARN de VHC en 21,6% de las salivas analizadas. No se halló diferencia estadísticamente significativa en relación a la carga viral, genotipo, coinfección VIH/VHC y factores epidemiológicos del huésped. CONCLUSIONES: Nuestros datos sugieren que el VHC puede ser detectado en la saliva de los pacientes crónicamente infectados independientemente de estos cofactores, incluyendo carga viral y coinfección VIH/VHC. Nuevos estudios sobre dinámica de VHC serán necesarios a fin de profundizar en el conocimiento de la transmisión no parenteral de este virus.

Palabras claves:

ABSTRACT

The possibility of the non-parenteral Hepatitis C Virus (HCV) transmission is supported by the demonstration that the actual virus is present in several body fluids. In this study, we investigated the relationship between the detection of HCV RNA in saliva from chronically HCV-infected patients and several viral and host factors. METHODOLOGY: This study comprised 16 HIV/HCV coinfecting and 21 HCV mono infected patients with a median age of 38 and 45 years, respectively. HCV-RNA was detected in serum and saliva samples by reverse transcription-nested polymerase chain reaction. Genotypes were determined by using RFLP and direct nucleotide sequencing of the PCR products and plasma viral loads by using NASBA HCV-QT. RESULTS: We detected presence of RNA HCV in 21.6% of saliva samples analyzed. When compared on the basis of the results of the detection of HCV-RNA in saliva, patients did not differ significantly in relation to viral load, genotype, HCV/HIV coinfection, and epidemiological host factors. CONCLUSIONS: Our data suggest that HCV can be detected in saliva of chronically HCV-infected patients independent of these cofactors, including circulating HCV load and HCV/HIV coinfection. Studies on HCV dynamics are needed to gain insights into nonparenteral transmission of HCV.

Keywords:

¹Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella", Facultad de Ciencias Médicas – Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

²Hospital San Roque-Córdoba, Argentina.

³Hospital Nacional de Clínicas-Córdoba, Argentina.

⁴Cátedra de Virología. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Católica de Córdoba, Argentina.

* Autor: Adrián Alejandro Fariás, Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella" Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. Enfermera Gordillo Gómez s/n Ciudad Universitaria CP: 5016, Córdoba, Argentina.

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO MOLECULAR DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN LA REGIÓN CENTRAL DE ARGENTINA

Molecular epidemiology pattern of hepatitis C virus infection in central region of Argentina

Viviana E. Ré^{1,5}, Adrián A. Farías¹, María P. Díaz², María B. Pisano¹, Silvia Mengarelli³, Luis Kremer⁴, Osvaldo Elbarcha⁵, Marta Contigiani¹

¹ Instituto de Virología "Dr. José M. Vanella", Fac. de Cs. Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Enfermera Gordillo Gómez s/n, 5016 Córdoba, Argentina. www.inviv.fcm.unc.edu.ar. vivianare@fcm.unc.edu.ar

² Bioestadística. Escuela de Nutrición. Fac. de Cs. Méd., UNC, Córdoba, Argentina.

³ Hospital San Roque - Córdoba, Argentina.

⁴ Hospital Nacional de Clínicas, Córdoba, Argentina.

⁵ Cátedra de Virología, Fac. de Cs. Químicas, Universidad Católica de Córdoba

Resumen

La presencia de RNA-HCV y la distribución de genotipos se detectaron mediante técnicas moleculares (RT-nested PCR y RFLP) en 310 muestras de individuos de la región centro de Argentina. Se halló 11,8% de coinfección HCV/HIV, con mayor prevalencia de genotipo 1 (73%). La distribución de los genotipos 1 y 2 entre individuos mono infectados fue de 49,4% y 43,9%, respectivamente.

El análisis de regresión logística multivariado mostró que la edad y el uso de drogas endovenosas (UDEV) condicionó la distribución de genotipos. El genotipo 2 se halló frecuentemente entre adultos mayores y su diseminación no se pudo asociar a ninguna vía de transmisión. El genotipo 1 se lo halló principalmente en adultos jóvenes y asociados al UDEV. El notable incremento de genotipo 1, homogéneamente distribuido en todas las edades posee importantes implicancias en las decisiones terapéuticas, considerando que posee baja respuesta a la terapia antiviral.

Palabras Clave: Virus de la hepatitis C (HCV), genotipos, epidemiología molecular, coinfección HCV/HIV, Argentina.

Trabajo recibido:
agosto 2009
Aprobado: octubre 2009

Detection of Hepatitis C Virus (HCV) in Body Fluids from HCV Monoinfected and HCV/HIV Coinfected Patients

Adrián Farías¹, Viviana Ré^{1,4}, Silvia Mengarelli², Luis Kremer³, María Belén Pisano¹, Luis Allende³, Juan Nicolás⁴, Osvaldo Elbarcha⁴, Marta Contigiani¹

¹Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella", Facultad de Ciencias Médicas – Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina; ²Hospital San Roque-Córdoba, Argentina; ³Hospital Nacional de Clínicas-Córdoba, Argentina; ⁴Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba, Argentina

Corresponding Author: Adrián Alejandro Farías, Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella". Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. Enfermera Gordillo Gómez s/n Ciudad Universitaria. CP: 5016, Córdoba, Argentina. Tel: +543514334022, E-mail: tordo1974@yahoo.com

ABSTRACT

Background/Aims: The possibility of the non-parenteral Hepatitis C Virus (HCV) transmission is supported by the demonstration that the actual virus is present in several body fluids. In this study, we investigated the relationship between the detection of HCV RNA in body fluids (saliva, cervical smears, seminal fluid and peripheral blood mononuclear cells) from chronically HCV-infected patients and several viral and host factors.

Methodology: This study comprised 16 HIV/HCV coinfecting and 21 HCV monoinfected patients with a median age of 38 and 45 years, respectively. HCV-RNA was detected in serum and fluids samples by reverse transcription-nested

polymerase chain reaction. Genotypes were determined by using RFLP and direct nucleotide sequencing of the PCR products and plasma viral loads by using NASBA HCV-QT.

Results: When compared on the basis of the results of the detection of HCV-RNA in fluids, patients did not differ significantly in relation to viral load, genotype, HCV/HIV coinfection, and epidemiological host factors.

Conclusions: Our data suggest that HCV can be detected in body fluids of chronically HCV-infected patients independent of these cofactors, including circulating HCV load and HCV/HIV coinfection. Studies on HCV dynamics are needed to gain insights into nonparenteral transmission of HCV.

KEY WORDS:

Hepatitis C (HCV); HCV/HIV co infection; HCV viral load; Body fluid

ABBREVIATIONS:

Hepatitis C Virus (HCV); Human Immunodeficiency Virus (HIV); Cervical Smears (CS); Seminal Fluid (SF); Saliva (SA); Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs); Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT Nested-PCR); Restriction Length Polymorphism Analysis (RFLP); Ribonucleic Acid (RNA); 5' Non-Coding Region (5'NCR); Nonstructural Region 5B (NS5B); Non Significant (NS); Assisted Reproduction Technology (ART)

INTRODUCTION

Infections by hepatitis C virus (HCV) represent a major public health problem worldwide nowadays. HCV belongs to the *Flaviviridae* family, genus *Hepacivirus*. Epidemiological studies have demonstrated that the most efficient routes for HCV transmission are parenteral, transfusion of blood and blood products, intravenous drug use, occupational needle-stick injuries, hemodialysis and organ transplantation (1). However, 15–40% of HCV infected patients have no obvious parenteral risk factors. In these patients, perinatal, intrafamilial and/or sexual transmission is suspected. It is assumed that viral transmission in these cases occurs through various body fluids. The study of human secretions searching for the presence of HCV- genome has yielded conflicting results. Sexual transmission or other close human contacts may play a role in sporadic and community-acquired infections (2). Several studies have reported detection of HCV RNA in semen (3–5) and cervical smears (CS) (6, 7). The detection of HCV in seminal fluid (SF) and

CS would provide further evidence for the biological plausibility of sexual transmission of HCV. On the other hand, other authors have demonstrated the presence of HCV RNA in saliva (SA) of HCV infected patients, by RT-nested PCR. These studies report varying results, with detection rates ranging from 0 to 100% (8).

Although HCV is prevalently a hepatotropic virus, the presence of extra hepatic replication is still under debate. Several studies on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolated from chronically infected patients suggest that these cells also support HCV replication. Furthermore, several studies suggest that extra hepatic replication of HCV may be an important predictor of HCV treatment outcome (9).

HCV and human immunodeficiency virus (HIV) share routes of transmission, although the mechanism of interaction between both viruses remains unclear. HCV viremia is particularly high in HCV/HIV co infected patients, which would favor the presence of HCV in other fluids (10). Many studies have been conducted to demonstrate the presence

IV

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Advance Access published June 11, 2013

Trans R Soc Trop Med Hyg 2013; **107**: 1–6
doi:10.1093/trstmh/trt043

Determinants of immunological and virological responses to antiretroviral therapy amongst HIV-infected adults in central Argentina: negative influence of hepatitis C infection

Adrián Alejandro Farías^{a,*}, Luis Emilio Kremer^b, Luis Allende^b, María del Pilar Díaz^c, María Belen Pisano^a, Marta Silvia Contigiani^a and Viviana Elizabeth Ré^{a,d}^aInstituto de Virología "Dr. J. M. Vanella", Facultad de Ciencias Médicas – Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina; ^bHospital Nacional de Clínicas-Córdoba, Argentina; ^cBioestadística, Escuela de Nutrición Facultad de Ciencias Médicas – Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina; ^dCátedra de Virología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba, Argentina

*Corresponding author: Tel: +54 0351 4334 022; E-mail: adrianaefarias@hotmail.com

Received 27 November 2012; revised 17 April 2013; accepted 19 April 2013

Background: The purpose of this study was to update the epidemiological data on the prevalence of coinfection with hepatitis C virus (HCV) and HIV, and to identify whether specific clinical and epidemiological factors influenced the response of HIV-positive adults to highly active antiretroviral therapy (HAART).**Methods:** This retrospective observational cohort study of 238 HIV-infected patients evaluated the effect of different epidemiological and clinical parameters (including HCV coinfection) on therapy response among HIV-infected adults initiating HAART. Multiple logistic regression models were used to identify factors associated with therapy response and estimated risk coefficients.**Results:** Seroprevalence of HCV infection in this population was 26% (62/238). We did not observe a significant association between immunological or virological response relating to patient gender or HAART regimen. However, this analysis showed that HCV serological status, age at HIV diagnosis, duration of treatment and WHO clinical stage of AIDS (<200 CD4 cells/ml independently of viral load either < or > 100 000 copies/ml), were significantly associated with immunological and virological responses to HAART.**Conclusions:** These results show further evidence that hepatitis C serostatus is associated with a reduced response to HAART.**Keywords:** CD4 cell counts, HAART, HIV/HCV coinfection, response to therapy, viral load

Introduction

Worldwide, hepatitis C virus (HCV) accounts for approximately 130 million chronic infections, with an overall prevalence of 3%. HIV/HCV coinfection affects 4 to 5 million people. It is well established that HIV has an impact on the natural history of HCV, including a higher rate of viral persistence, increased viral load, and more rapid progression to fibrosis, end-stage liver disease, and death. Whether HCV has a negative impact on the disease progression of HIV continues to be debated.¹

Advances in highly active antiretroviral therapy (HAART) have dramatically reduced morbidity and mortality due to AIDS;^{2–4} however, all antiretrovirals have the potential to cause acute and long-term hepatotoxicity and this risk is increased two- to threefold in the presence of chronic liver disease such as that caused by HCV infection.⁵ Coinfection with HIV and HCV is, therefore, a substantial medical and public health concern because it complicates patient

management and might also decrease the effectiveness of HAART.^{5–8}

Other clinical and epidemiological factors and adherence to antiretroviral drugs have also been associated with differences in immunological and virological outcomes in patients taking HAART.^{9–11} Although data are conflicting, several studies indicate that women have lower plasma HIV RNA levels than men.¹² Since this measure influences the timing of HAART initiation, it is plausible that women might start treatment later than men, which could contribute to poorer outcomes in female patients compared to male patients.^{9,12}

HAART is comprised of complex drug regimens, which require strict adherence to complicated dosing schedules to ensure optimal long-term clinical and survival benefits. At least 95% adherence is required for an adequate virological and immunological response.^{13,14} A 2010 study demonstrated that multiple patient-related factors (age, gender, baseline CD4 count and contribution