



## **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA, PEDIATRÍA,  
OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA**

Algoritmo clínico-patológico para establecer  
el diagnóstico diferencial entre rechazo celular agudo  
y hepatitis C recurrente en el trasplante hepático

**D. Jesús Miguel de la Peña Moral  
2015**

*A Patricia, a mis hijos Claudia y Jesús, a mi hermana, a mis padres.*

*Quiero dedicar esta tesis a mi familia, en especial a mi mujer, Patricia, que con su apoyo incondicional e infinita paciencia ha sido el pilar fundamental en todo lo que he ido consiguiendo desde que la conocí.*

*Agradecer a mis hijos, Claudia y Jesús ya que son la principal motivación de todo lo que hago; saben aceptar y entienden que para conseguir algo tengo que renunciar y perderme determinados momentos. También, con especial cariño, a mis padres, quienes me animan continuamente y me han sabido inculcar que sólo con constancia, esfuerzo y tesón se pueden alcanzar los objetivos que nos proponemos. Un recuerdo especial a mi hermana, Eunate, su cariño, generosidad y ánimo continuo, me permitieron alcanzar muchas de las cosas que he conseguido.*

*La realización de esta tesis también ha sido posible gracias a la generosa colaboración de otras personas a las que quiero expresar mi agradecimiento.*

*En especial al Dr. José Antonio Pons, su disponibilidad y su dedicación han sido imprescindibles para la publicación y realización de la tesis doctoral. Sin su apoyo y muestras de amistad, no hubiese sido posible realizar este trabajo.*

*Mi agradecimiento también al Prof. Pascual Parrilla quien apoyó la continuidad de la tesis en la Universidad de Murcia y cada uno de los pasos que he ido dando hasta su finalización.*

*Quiero agradecer a mis compañeros del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Geral Universitario de Oporto, al Dr. Frederico Silvestre y al Dr. Antonio Paiva quienes me dieron las bases y los fundamentos en hepatopatología y nefropatología y consiguieron despertar en mi el interés por investigar e indagar sobre lo desconocido. A la Dra. Isabel Calhim quien nunca dudó en ayudarme siempre que la necesité. También al Prof. Vicente Gonçalves quien acompañó de cerca y con interés mi formación como especialista. Al Prof. Jerónimo Forteza, quien me acogió en el Hospital Universitario de Santiago de Compostela, me permitió "jugar" a ser investigador y con su apoyo conseguí desarrollar este proyecto.*

*Al Dr. Juan Bermejo que ha sido un buen compañero y mejor consejero en la patología hepática. Con él tuve la oportunidad de tener a alguien con quien poder comentar la dudas que surgían en el día a día en esta patología.*

*Al Dr. Manuel Miras, al Dr. Santiago Tomé y al Dr. Francisco Gude quienes han aportado gran dedicación y conocimiento en la realización de esta tesis.*

## **Abreviaturas y Siglas:**

**AAD:** Antivirales de acción directa.

**ALT:** Alanina aminotransferasa.

**Anti-VHC:** Anticuerpo del VHC.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**CBP:** Cirrosis biliar primaria.

**CH:** Cirrosis hepática.

**CHC:** Carcinoma hepatocelular.

**CM:** Crioglobulinemia mixta.

**DT:** Desviación típica.

**HAI:** Hepatitis autoinmune.

**HCUS:** Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

**HCUVA:** Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.

**HLA:** Antigen leucocitario humano.

**IFN:** Interferón.

**IL28B:** Interleuquina 28B.

**MELD:** Model for end-stage liver disease.

**MHC:** Complejo mayor de histocompatibilidad.

**NANB:** Hepatitis no-A no-B.

**NK:** Natural killer.

**PD-1:** Receptor 1 de muerte celular programada.

**PEG-IFN:** interferón pegilado.

**PN:** Polimorfismos de nucleótidos.

**PQID:** Personas que se inyectan drogas.

**RAI:** rejection activity index.

**RBV:** Ribavirina.

**RCA:** Rechazo celular agudo.

**RVS:** Respuesta viral sostenida.

**TH:** Trasplante hepático.

**VHB:** Virus de la hepatitis B.

**VHC:** Virus de la hepatitis C.

**VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana.

Algoritmo clínico-patológico para establecer  
el diagnóstico diferencial entre rechazo celular agudo  
y hepatitis C recurrente en el trasplante hepático



## Índice

<b>I. Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>I.1. El virus de la hepatitis C (VHC)</b> .....	<b>2</b>
I.1.1. Estructura y mecanismos de persistencia en el huésped .....	<b>2</b>
I.1.2. Heterogeneidad genética del VHC: Cuasiespecies - adaptación al medio y genotipos .....	<b>4</b>
I.1.3. Etiopatogenia de la infección por el VHC: respuesta inmune del huésped .....	<b>8</b>
<b>I.2. EL VHC en el individuo inmunocompetente</b> .....	<b>10</b>
I.2.1. Descubrimiento del VHC .....	<b>10</b>
I.2.2. Epidemiología de la infección por el VHC .....	<b>12</b>
I.2.3. Diagnóstico de la infección por el VHC .....	<b>14</b>
I.2.4. Historia natural/evolución natural y carga de la salud pública de la hepatitis C .....	<b>16</b>
I.2.4.1. Hepatitis aguda .....	<b>16</b>
I.2.4.2. Hepatitis crónica .....	<b>18</b>
I.2.4.3. Cirrosis hepática .....	<b>20</b>
I.2.4.4. Pronóstico de la CH por VHC .....	<b>25</b>
I.2.4.5. Tratamiento de la hepatitis C .....	<b>27</b>
I.2.4.5.a. Tratamiento farmacológico .....	<b>27</b>
I.2.4.5.b. Trasplante hepático. Indicación de trasplante en la hepatitis por el VHC .....	<b>31</b>
<b>I.3. Historia natural de la hepatitis C recurrente postrasplante hepático</b> .....	<b>33</b>
I.3.1. Fisiopatología de la infección por el VHC en el trasplante hepático .....	<b>33</b>
I.3.2. Evolución histológica .....	<b>35</b>
I.3.3. Pronóstico de la hepatitis C recurrente postrasplante .....	<b>39</b>
I.3.4. Pronóstico en la hepatitis C recurrente postrasplante con los nuevos AAD .....	<b>41</b>
<b>I.4. El Rechazo agudo en el TH por infección por el VHC</b> .....	<b>43</b>
I.4.1. Fisiopatología del rechazo agudo en el TH por infección por el VHC .....	<b>43</b>
I.4.2. Aspectos morfológicos del RCA en el trasplante hepático por el VHC .....	<b>48</b>
<b>I.5. Solapamiento que existe entre la morfología del RCA y la morfología de la hepatitis C recurrente postrasplante</b> .....	<b>58</b>
<b>I.6. Otras patologías que plantean diagnóstico diferencial en el trasplante hepático por el VHC</b> .....	<b>60</b>

---

<b>II. Hipótesis y objetivos .....</b>	<b>65</b>
<b>III. Pacientes y métodos .....</b>	<b>67</b>
<b>IV. Resultados .....</b>	<b>75</b>
<b>V. Discusión.....</b>	<b>81</b>
<b>VI. Conclusiones .....</b>	<b>87</b>
<b>VII. Bibliografía.....</b>	<b>91</b>
<b>VIII. Publicación.....</b>	<b>127</b>

---

---

# I. Introducción

Algoritmo clínico-patológico para establecer  
el diagnóstico diferencial entre rechazo celular agudo  
y hepatitis C recurrente en el trasplante hepático



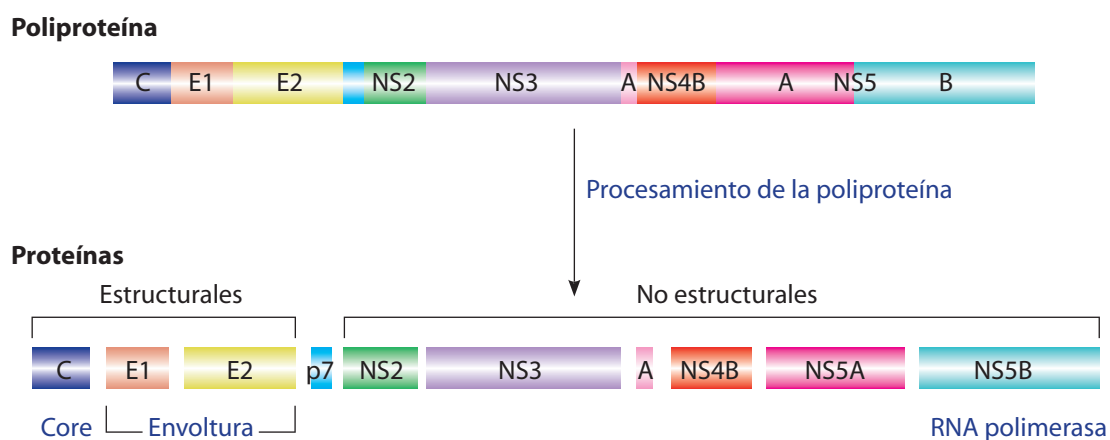
## I. Introducción

### I.1. El virus de la hepatitis C (VHC).

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es una de las principales causas de enfermedad hepática crónica en todo el mundo. Las repercusiones que tiene a largo plazo la infección por VHC son muy variables, y van desde alteraciones mínimas hasta la fibrosis extensa y la cirrosis hepática (CH) con o sin carcinoma hepatocelular (CHC). El número de personas con infección crónica en todo el mundo se estima en 160 millones, pero la mayoría de ellas no son conscientes de la presencia de la infección. La asistencia clínica de los pacientes con hepatopatía asociada al VHC ha avanzado considerablemente durante las dos últimas décadas gracias a un mejor conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad, y a los avances que se han producido en las técnicas diagnósticas y en el tratamiento y prevención de la enfermedad. En el momento actual, la cirrosis por VHC con o sin CHC supone una de las dos principales causas, junto a la cirrosis etanólica, del trasplante hepático (TH).

#### I.1.1. Estructura y mecanismos de persistencia en el huésped.

El VHC es un virus de pequeño tamaño (30-38 nm) recubierto por una membrana lipoproteica. El genoma del VHC está formado por una cadena única de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad positiva que contiene 9500 nucleótidos que codifican para una poliproteína de unos 3000 aminoácidos (Figura 1) [1, 2].



**Figura 1.** Estructura del genoma del virus de la hepatitis C (VHC). La poliproteína es segmentada por las proteasas virales y del hospedero para dar origen a las proteínas virales estructurales (core, E1 y E2) y las proteínas no estructurales NS2 a NS5B.

Se le considera el único representante del género Hepacivirus, perteneciente a la familia de los Flaviviridae [3]. Su genoma contiene una única región de lectura abierta (*Open Reading Frame*), flanqueada por dos regiones no codificantes (*Untranslated Region*). La 5' *Untranslated Region* es una región altamente conservada de unos 340 nucleótidos. Dicha región, que adopta una compleja estructura secundaria, contiene una zona de anclaje al ribosoma de la célula del huésped conocida como *Internal Ribosomal Entry Site* y su función es unirse a la subunidad 40S del ribosoma para iniciar la traducción del ARN de manera independiente. La región no codificante 3' se puede dividir en tres zonas: una región variable de unos cuarenta nucleótidos, seguida de una secuencia poli-U/polipirimidinas de longitud variable y la región terminal de 98 nucleótidos, altamente conservada entre las variantes de VHC y esencial para iniciar la replicación viral.

El tercio N-terminal de la poliproteína codificada en el genoma del VHC da lugar a las proteínas estructurales, core, E1 y E2. Así, la proteína del core es la que forma la nucleocápside, dentro de la cual se encuentra el ARN viral. El VHC cuenta con una envoltura en la que se encuentran dos glucoproteínas virales, E1 y E2 que son proteínas estructurales necesarias para formar partículas infectivas. Las estructuras E1 y E2 estarían implicadas en la unión a los receptores celulares y su posterior fusión, es decir, en la entrada del virus dentro de las células del huésped. Separando esta región estructural de la no estructural, se encuentra el polipéptido p7 de 63 aminoácidos, que parece estar involucrado en la formación de hexámeros con actividad de canal iónico.

El grupo de las proteínas no estructurales, se codifican a partir de los dos tercios C-terminales de la poliproteína. Las proteínas no estructurales son esenciales para la replicación del ARN viral y estas proteínas son procesadas por dos proteasas virales: a) la autoproteasa zinc-dependiente NS3/NS4A que corta la unión NS2-NS3 y libera NS3, la cual, junto con su cofactor NS4A en el primer tercio N-terminal de la proteína, posee una actividad serín-proteasa, responsable del procesamiento de la parte no estructural de la poli-proteína. En las dos terceras partes de la región C-terminal, existe una molécula necesaria para la traducción y replicación del genoma viral; b) La NS5A, parece tener una función esencial en la regulación de la replicación viral, esta molécula se ha implicado en la modulación de la respuesta antiviral del huésped mediada por el interferón. En concreto se ha observado que el acúmulo de mutaciones en una determinada región de NS5A, la conocida como *Interferon sensitivity determining region* se relaciona

con una mejor respuesta al tratamiento con interferón en pacientes infectados por el genotipo 1b del VHC. Además, la región NS5A está implicada en el acoplamiento final de los viriones completos antes de salir del hepatocito [3, 4]. Finalmente, c) NS5B es la ARN-polimerasa ARN-dependiente, clave para la síntesis de nuevos genomas de ARN y del mismo modo que las demás ARN polimerasas, no posee mecanismos de corrección de error, de manera que cada mutación introducida al azar durante el proceso de copia es fijada en la nueva secuencia sintetizada.

### I.1.2. Heterogeneidad genética del VHC: Cuasiespecies - adaptación al medio y genotipos.

Una de las características más destacables del VHC es su extrema heterogeneidad genética. El VHC es un virus ARN y como tal evoluciona rápidamente debido a las elevadas tasas de mutación [5, 6] y replicación que posee y también debido a la falta de mecanismos de corrección de error de su ARN-polimerasa. Esta característica se refleja en la gran heterogeneidad del genoma viral, que es distinta según las regiones del genoma. La región 5' no codificante representa la región más fielmente conservada frente a la alta variabilidad en las regiones codificantes de las proteínas de la envuelta [6].

La heterogeneidad genética se refleja a dos niveles: la existencia de genotipos o "variantes" entre distintos aislados, y la existencia de cuasiespecies en un único individuo (Figura 2).

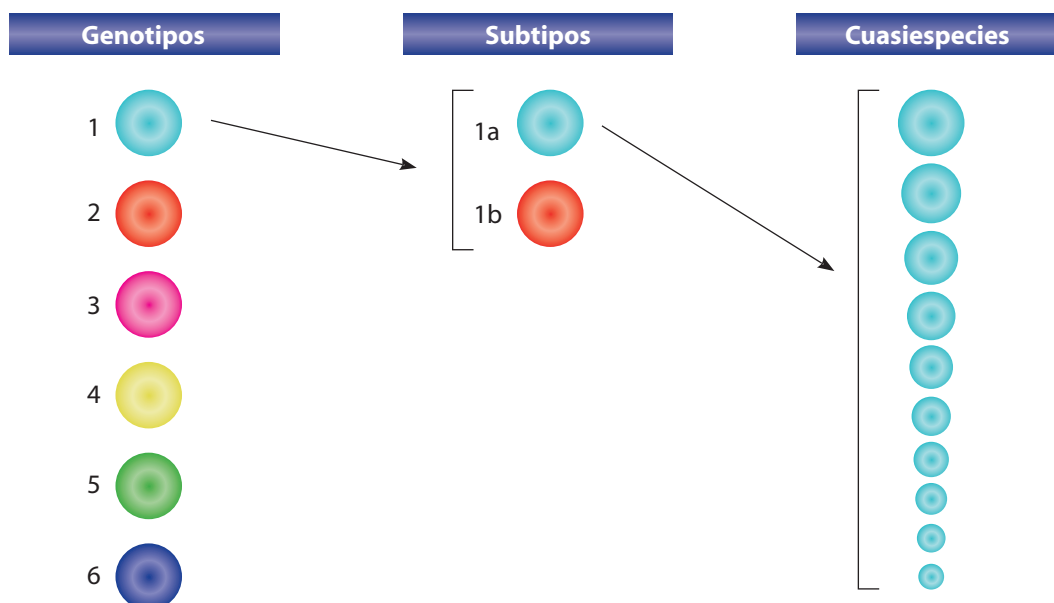


Figura 2. Variabilidad genética del VHC.

Cuasiespecies y adaptación al medio:

Se refiere a la heterogeneidad genética entre las diversas secuencias del VHC presentes en un individuo [7, 8]. La consecuencia directa de todo esto, es que en un paciente infectado, la población viral circula como una cuasiespecie [7, 9], es decir, como una mezcla compleja de mutantes que se diferencian por pequeños cambios, en general mutaciones puntuales (cambios de nucleótidos) [10]. Los cambios secuenciales en estas regiones (cambios en la infección por el VHC), dan lugar a las generaciones diferentes (cambios diferentes con neoantígenos no reconocidos por los anticuerpos originados en una etapa previa de la infección) [11, 12]. La existencia de cuasiespecies y la capacidad del VHC de mutar le permite escapar a la respuesta inmune del huésped, [12, 13]. Las diversas implicaciones biológicas del VHC por su estructura en cuasiespecies incluyen: una correlación entre el tamaño del inóculo y el resultado de la infección, el establecimiento de una infección persistente, la selección de mutantes que son resistentes a antivirales o mutantes de escape a vacunas, los cambios en el tropismo celular, los cambios en el potencial patogénico, la modificación potencial de la progresión natural de la enfermedad y la selección de mutantes indetectables con pruebas moleculares estándar entre otras.

Un factor importante en la diversidad genómica es el número de partículas virales que se pueden llegar a transmitir, de tal forma que, hay un menor riesgo de desarrollar persistencia viral tras la exposición a un inóculo viral pequeño. Esto se ha relacionado con un fenómeno llamado de cuello de botella genético [14]. Estas partículas llevarán una determinada carga mutacional, que puede limitar su capacidad de generación de variantes comparado con lo que ocurriría si se transmitiera a una gran población. La carga mutacional y el escaso número de variantes son un límite que tiene el virus para conseguir el teórico umbral de diversidad, o sea, para poder generar un número suficiente de mutantes que le permita adaptarse al nuevo medio y así superar la respuesta inmune antiviral con la finalidad de persistir [15-17].

De estos estudios de variabilidad se deduce que en ningún caso se puede suponer que un paciente que haya entrado en contacto con el VHC y haya resuelto la infección quedará protegido contra nuevas infecciones por VHC.

La elevada heterogeneidad del genoma del VHC ha permitido no sólo la inclusión del VHC dentro

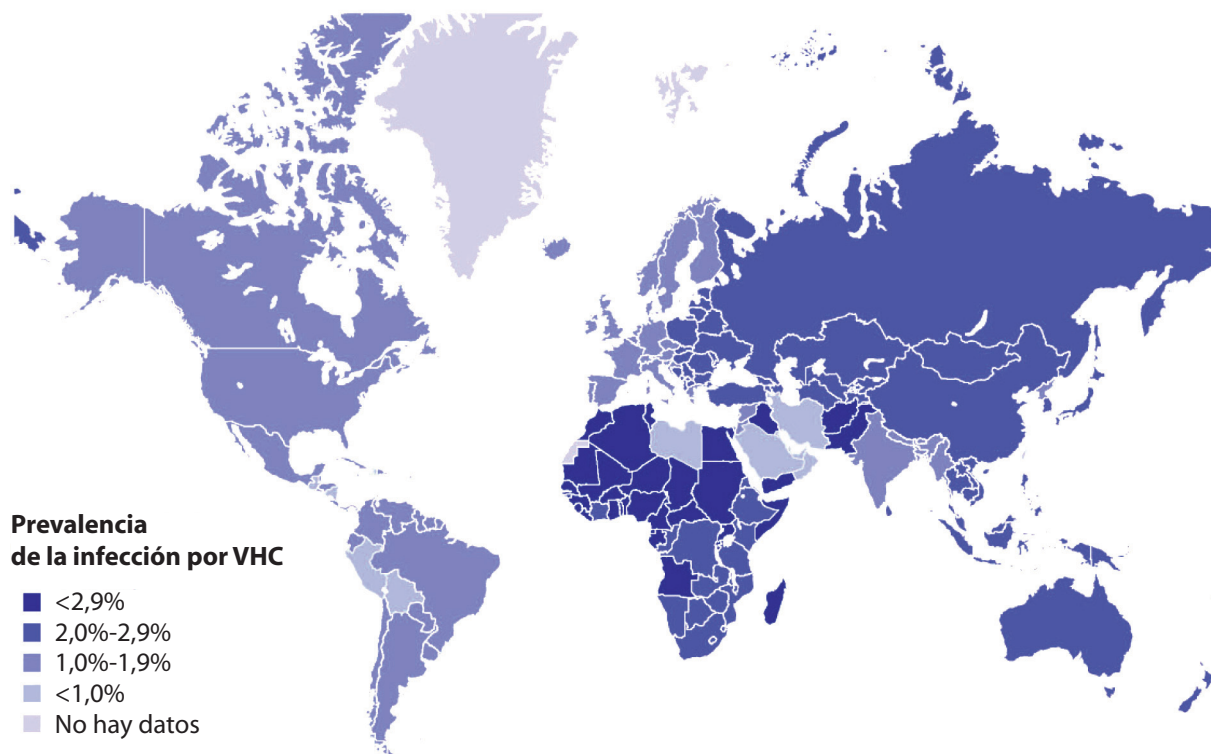


del modelo de cuasiespecies sino también la introducción del concepto de genotipos [6]. Así como el término cuasiespecies hace referencia a la variabilidad genética de la población del VHC en un mismo individuo [8], el término genotipo se aplica a la heterogeneidad observada entre diferentes aislados del VHC [6]. Estos diferentes aislados se pueden clasificar en grupos genéticos distintos como resultado del acúmulo de mutaciones que el VHC ha experimentado durante su proceso de evolución [6].

En la actualidad está asumido que podemos hablar de diferentes genotipos del VHC y que a su vez los podemos subdividir en subtipos. Los conocimientos actuales sobre la clasificación en genotipos del VHC se basan en el análisis de secuencias víricas completas y también de secuencias de regiones subgenómicas. En función de la región examinada y de su variabilidad, se han establecido diferentes clasificaciones [18, 19] creando confusión en la nomenclatura hasta el año 1994, año en que se propuso un sistema estándar que posibilita la inclusión de futuras variantes [20]. Desde la publicación por primera vez del genoma completo del VHC hasta el momento, se han publicado cerca de 30000 secuencias del VHC en todo el mundo, con 181 genomas completos (GenBank, EMBL y DDBJ). El análisis de un gran número de secuencias de aislados de VHC procedentes de todas partes del mundo, ha revelado la existencia de siete genotipos virales (G1 a G7) que además contienen muchos subtipos dentro de estos genotipos, los cuales se clasifican con números y letras (subtipo 1a, 1b, 2c, 3a, etc.) siguiendo el orden de descubrimiento en ambos casos (Figura 3) [3, 21, 22].

Existe una distribución geográfica variable de estos genotipos, y mientras algunos se reparten universalmente [23-25], otros parecen confinados a ciertas zonas (1b en Japón, Indonesia, Nepal y Tailandia; 4 en África central y del Norte y 5 en África del Sur; 6 en Hong-Kong) (Figura 4) [25].

Por otra parte también se han observado diferencias en función del tipo de población estudiada, siendo la distribución de genotipos distinta si se analizan enfermos con hepatopatía crónica o donantes de sangre [6, 26]. Igualmente, se han descrito cambios en la distribución según la edad, detectándose con mayor frecuencia el genotipo 3a en personas jóvenes [27]. Este hecho podría reflejar la introducción de diferentes tipos víricos a través de determinadas prácticas tales como el uso de drogas por vía parenteral [28]. Las implicaciones que se derivan de la existencia de estos genotipos son variadas. Los estudios respecto al papel de la heterogeneidad del VHC en la progresión de la



**Figura 4.** Distribución geográfica de la infección por el VHC.

enfermedad hepática son discordantes, y mientras algunos autores han encontrado una asociación entre el VHC genotipo 1b y una lesión hepática más grave, incluyendo el desarrollo de carcinoma hepatocelular [29, 30] otros consideran que el genotipo viral no es un factor determinante de mayor gravedad de la hepatopatía [31, 32]. Estas discrepancias pueden deberse a (i) diferencias en la distribución de genotipos; (ii) diferencias en los métodos de genotipaje; (iii) diferencias en la definición de la gravedad de la hepatopatía; (iv) presencia de factores de confusión tales como la edad y/o duración de la infección por VHC.

### **I.1.3. Etiopatogenia de la infección por el VHC: respuesta inmune del huésped.**

Se han realizado esfuerzos considerables para poder comprender la heterogeneidad clínica del resultado de la infección. Estudios inmunológicos comparativos en pacientes infectados por el VHC y en chimpancés infectados experimentalmente demuestran que el aclaramiento de la infección por VHC, se asocia a una respuesta fuerte y sostenida de células T CD4 + y CD8+ VHC específicas. El agotamiento de cualquier población de células T mediada por anticuerpos en chimpancés, proporciona evidencia

adicional en la que la inmunidad mediada por células T es crucial para el aclaramiento. Durante la fase crónica de la infección por el VHC, las células T VHC específicas están infra-reguladas y muestran un fenotipo que está agotado y es disfuncional. La inflamación crónica hepática inducida por el VHC, promueve la generación de células T reguladores, que contribuyen a una mayor supresión de la respuesta de células T específicas del VHC [33]. La infección por el VHC, induce también una fuerte respuesta de células B y anticuerpos diana de epitopos dentro de proteínas estructurales y no estructurales del VHC. Anticuerpos neutralizantes (Acn) se elevan durante la infección por VHC y la mayoría de Acn tienen como diana epitopos en las glicoproteínas de envoltura [34]. La relevancia de los anticuerpos neutralizantes en el aclaramiento del VHC no está todavía clara. Es importante conocer qué partículas del VHC interactúan con lipoproteínas séricas para formar las así llamadas lipo-viro-partículas (LVP). Aunque el diseño arquitectural global de las LVP no está todavía definido, LVP pueden facilitar la entrada de los virus en los hepatocitos y proteger el virión de la neutralización mediada por anticuerpos [35]. La mayoría de los pacientes infectados crónicamente tienen niveles altos y reactividad cruzada de anticuerpos neutralizantes [36], sugiriendo que los anticuerpos neutralizantes son incapaces de aclarar la infección. Sin embargo, la persistencia de estos anticuerpos en la infección crónica por VHC puede regular la replicación viral y modular la enfermedad crónica. Finalmente, el sistema inmune del huésped se confronta con una alta mutabilidad del virus (índice de mutación:  $10^{-5}$  -  $10^{-4}$  nucleótidos por ciclo de replicación). La alta variabilidad genética le confiere una importante ventaja al VHC, facilitando el escape de los anticuerpos neutralizantes y el reconocimiento de las células T citotóxicas.

Los hepatocitos son las células diana primarias para la infección por VHC. Un sistema altamente sensible para la detección del ARN del VHC en el hígado demuestra que la proporción de hepatocitos infectados varía de un 1% al 54% y que se correlaciona positivamente con la viremia VHC ARN [37]. La primera línea de defensa inmune en la infección por VHC comprende la activación de la inmunidad innata celular intrínseca seguida del reconocimiento del VHC. La producción local de interferones, desencadena la expresión de cientos de genes estimulantes del IFN (interferón) perturbando la replicación del genoma del VHC y extendiéndose en el parénquima hepático [38]. El conocimiento de la evolución y dinámica viral durante la fase inicial de la infección aguda por el VHC esta todavía limitado porque la mayoría de las infecciones por VHC son asintomáticas. El Estudio de Baltimore "Antes y



Después de la Hepatitis Aguda”, abarcaba y seguía mensualmente a personas VHC negativas que usaban drogas inyectables para abordar estas cuestiones importantes. En este estudio niveles altos de viremia ARN VHC predicen el aclaramiento espontáneo de la infección por VHC [39]. Aunque es probable que niveles altos de replicación del VHC hacen al virus más visible al sistema inmune innato, y por lo tanto, rápidamente activan la señalización inmune innata que resulta no solamente en funciones efectoras innatas antivirales, sino que también refuerza el desarrollo de una inmunidad de células T anti-VHC.

Sin embargo el VHC ha desarrollado estrategias eficientes para burlar la señalización del sistema inmune innato y funciones efectoras. La proteína NS3/NS4A del VHC (una serín proteasa responsable de la escisión proteolítica de la poliproteína precursora del VHC) es un componente clave en la estrategia de evasión del VHC. Por ejemplo NS3/NS4A marca y escinde la proteína mitocondrial de señalización antiviral, lo que resulta en la desorganización de la señalización antiviral innata y atenuación en la producción de IFN. Además las proteínas virales E2 y NS5A inactivan la doble cadena de ARN dependientes de proteína kinasa R, la cual es un mediador crítico de los efectos antivirales ejercidos por IFN [38].

## **I.2. El VHC en el individuo inmunocompetente.**

### **I.2.1. Descubrimiento del VHC.**

Desde hace mucho tiempo se pensaba que el cuadro asociado a la infección por el VHC correspondía a una entidad clínica distinta, aunque su diagnóstico etiológico sólo fue posible hace poco tiempo [1]. El VHC se descubrió en el inicio de la década de los noventa del siglo XX, pudiendo entonces disponerse de test simples y reproducibles para el diagnóstico, [40]. Estos test permitieron determinar la etiología de muchos casos de hepatitis crónica y de CH de causa hasta entonces desconocida, [41]. Los avances en el conocimiento de la historia natural de la hepatitis por el VHC se deben, en gran parte, a la posibilidad de estudiar un gran número de pacientes con infección de larga evolución. En las décadas de los cuarenta y cincuenta se describieron de manera pormenorizada episodios de ictericia designados como de hepatitis “sérica”, principalmente en pacientes que usaban drogas por vía parenteral y produciéndose a veces más de un brote de hepatitis aguda en el mismo paciente [42]. Más

recientemente, en pacientes hemofílicos, se observaron múltiples episodios de hepatitis, relacionados con perfusiones de concentrados de factores [43]. Fue a mediados de los años sesenta cuando *Saul Krugman et al* demostraron la capacidad de contagio del plasma humano, describiendo dos cuadros de hepatitis una "sérica" y otra "infecciosa", difiriendo estos en los periodos de incubación, en la actividad de las transaminasas y en el modo de contagio [44]. La relación establecida entre el antígeno Australia, identificado en el suero de un aborigen australiano y la hepatitis sérica representó un paso muy importante para poder comprender el diagnóstico etiológico de las hepatitis víricas [45]. Tras el aislamiento y la caracterización del VHB, en 1970 [46] se identificaron los diferentes antígenos y respectivos anticuerpos, lo que hizo posible la introducción de tests serológicos para el diagnóstico de certeza de la hepatitis B y de las diferentes fases evolutivas. Posteriormente, se identificó el virus de la hepatitis A, que se relacionaba con las formas epidémicas de hepatitis de transmisión entérica [47]. En un principio, con el descubrimiento del virus de la hepatitis A se pensó que ya se había encontrado la etiología para estas hepatitis pos-transfusionales. Más tarde, se vio que esto no era posible, ya que los diferentes estudios serológicos demostraron que la infección por el virus de la hepatitis A no estaba relacionada con las transfusiones [48], lo que evidenció que existiesen virus diferentes de los hasta ahora conocidos y cuya caracterización no era posible por el momento. La imposibilidad de identificar un agente etiológico para un gran número de hepatitis con características virales y la probable existencia de más de un virus, justificaron que se escogiese la designación de hepatitis no-A no-B. Los estudios realizados sobre las hepatitis no-A no-B, permitieron la descripción de un grupo de hepatitis crónicas basado en similitudes epidemiológicas, la determinación seriada de transaminasas y en la descripción histológica de algunas características comunes [49]. En estos casos se confirmó su naturaleza infecciosa. [50]. En 1989, investigadores de la *Chiron Corporation* utilizando plasma de chimpancés infectados, extrajeron ácido desoxirribonucleico y ARN viral que transformaron en ácido desoxirribonucleico complementario y clonaron un vector de expresión rastreando el producto obtenido con el presumible suero inmune. Solamente se encontró un clon positivo entre millones, posteriormente se secuenció el genoma y se identificó el VHC como un nuevo virus de la familia de los *flavivirus* [1]. La identificación del VHC, como causa de la mayoría de las formas de hepatitis no-A no-B y el desarrollo de tests serológicos para la detección del anticuerpo del VHC (anti-VHC) [40], además de confirmar

muchos de los conocimientos, permitieron valorar la verdadera extensión de esta infección, así como explicar algunos aspectos de la historia natural de la hepatitis C.

### **I.2.2. Epidemiología de la infección por el VHC.**

Se estima que aproximadamente 160 millones de personas, sufren una infección crónica por el VHC [51], siendo una enfermedad que provoca la muerte de 350000 personas al año [51]. Se estima que cerca de dos tercios de los individuos infectados por el VHC desarrollarán enfermedad hepática crónica y uno de cada cinco desarrollará CH. El VHC es, la principal causa de las indicaciones de trasplante hepático en los países occidentales ([www.unos.org](http://www.unos.org)) ([www.eltr.org](http://www.eltr.org)). Las estimaciones en Europa, indican que hay entre 7,3 y 8,8 millones de personas infectadas, lo que supone el doble de lo que se estimaba que había en 1997 [52]. De un modo general, la prevalencia del VHC en los diversos países europeos oscila entre el 0,4% y el 3,5%, con amplias diferencias geográficas y unas tasas más altas en el sur y en el este [53, 54] (Figura 4).

Hay países donde se llegan a encontrar tasas de aproximadamente el 20%, como sucede en la zona del delta del Nilo en Egipto [55].

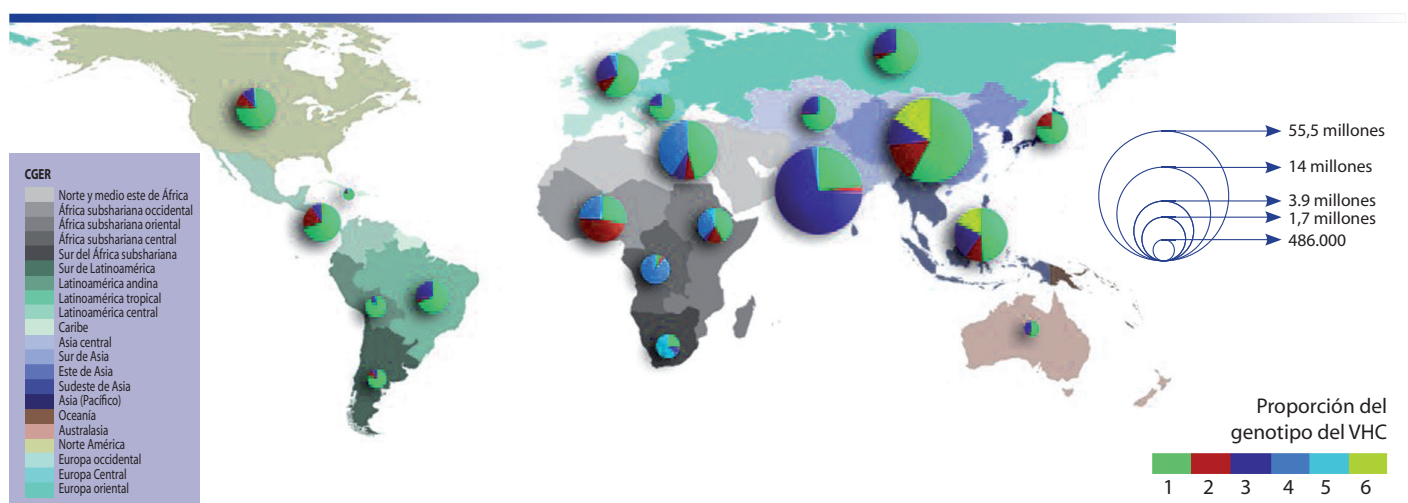
En España la prevalencia de los anticuerpos frente a dicho virus se sitúa entre el 1,6 % y el 2,6 % en la población general. Además, la prevalencia de los marcadores serológicos depende de la edad y de la región estudiada. La infección por VHC en niños y adolescentes se sitúa entre 0-0,7 % [56, 57] y asciende al 3,1-5,5 % en los mayores de 60 años [58]. La identificación de los genotipos y subtipos tiene interés epidemiológico, ya que tiene diferentes patrones de prevalencia según las diferentes zonas geográficas (Figura 5).

La identificación de los genotipos y subtipos del VHC no sólo tiene interés epidemiológico, sino que determina el tipo y la duración del tratamiento antiviral a utilizar, incluido el riesgo de seleccionar variantes asociadas a resistencia durante el tratamiento. Los genotipos y los subtipos (que se identifican con letras minúsculas) difieren entre sí en alrededor de un 30% y 20% de sus secuencias, respectivamente. El genotipo 1 es el de mayor prevalencia en todo el mundo, con un porcentaje superior del subtipo 1b en Europa y del 1a en los EEUU. El genotipo 3a tiene una prevalencia elevada en la población de personas que se inyectan drogas (PQID) en Europa. Este grupo está experimentando

actualmente un incremento de la incidencia y prevalencia de las infecciones por el VHC genotipo 4. El genotipo 2 se observa en agrupaciones de casos en la región mediterránea, mientras que los genotipos 5 y 6 son muy poco frecuentes en Europa [21]. El nuevo genotipo 7 se identificó en pacientes de Canadá y Bélgica, posiblemente infectados en África Central [59].

Las variaciones que podemos encontrar en relación a los datos de prevalencia dependen de la localización del estudio o el tipo de genotipo y subtipo. Muchas veces, los estudios generales de prevalencia de la población, pueden no ser un fiel reflejo de la realidad ya que excluyen a los grupos de alto riesgo de infección, como pueden ser la población reclusa, los drogadictos, inmigrantes ilegales o personas sin hogar [60]. La prevalencia de la infección del VHC es algo que puede variar en un país no solo con la variación en el desarrollo del mismo sino con factores como pueda ser la inmigración.

Hasta la década de los 90, las principales vías de infección por el VHC fueron las transfusiones de sangre, las técnicas de inyección poco seguras y el consumo de drogas intravenosas. Se estima que, en conjunto, estas vías son responsables de aproximadamente el 70% de los casos crónicos en los países desarrollados. Sin embargo, en la actualidad, el examen de detección sistemático del VHC en los productos hemoderivados mediante enzimoimmunoanálisis y análisis de ácidos nucleicos ha tenido como consecuencia la práctica erradicación de la hepatitis C asociada a las transfusiones. De igual modo, en los países desarrollados, es infrecuente que las nuevas infecciones por el VHC estén relacionadas



**Figura 5.** Prevalencia relativa de cada genotipo de VHC con la carga global de enfermedad por región (CGER). El tamaño de los gráficos circulares es proporcional al número de casos seroprevalentes.

con técnicas médicas o quirúrgicas poco seguras. La diseminación de la infección en la comunidad de PQID (facilitada por el hecho de compartir dispositivos, el alojamiento poco estable, el consumo frecuente de cocaína y los antecedentes de encarcelamiento) explica actualmente la inmensa mayoría de los casos incidentes en los países desarrollados. La amplia cobertura de los programas combinados de reducción del daño (por ejemplo, tratamiento sustitutivo de opiáceos y programas de intercambio de agujas) puede reducir la incidencia del VHC en la comunidad de PQID, y algunos estudios de modelización sugieren que la aplicación del tratamiento para el VHC puede reducir incluso la transmisión dentro de esta población [61]. Otras conductas invasivas, como los tatuajes o la acupuntura, realizados con materiales poco seguros, están involucradas también en transmisiones ocasionales del VHC. El riesgo de transmisión perinatal y heterosexual del VHC es bajo, mientras que la actividad homosexual masculina ha pasado a ser una vía de transmisión importante en los países occidentales [62]. En cambio, la situación es muy diferente en los países con pocos recursos, en donde la falta de concienciación pública y el uso continuado de instrumentos médicos poco seguros continúa explicando una parte considerable de las nuevas infecciones por el VHC.

Serán necesarios programas de vigilancia regionales para adoptar medidas a la hora de realizar medidas de prevención primaria y secundaria. La hepatitis C, es una enfermedad que tiene muy poca sintomatología en la fase aguda y que una vez cronificada el paciente no es consciente de que padece la enfermedad.

Normalmente el hallazgo de la enfermedad es casual, consecuencia de una analítica alterada o el paciente presenta una descompensación porque padece una CH o se le descubre un CHC. De los pacientes con hepatitis crónica, hasta un 80%, no saben que padecen la enfermedad y se calcula que aproximadamente sólo un 10% de los enfermos infectados por el VHC está recibiendo tratamiento, existiendo grandes diferencias en el tipo de asistencia que se recibe dependiendo del país [63].

### **1.2.3. Diagnóstico de la infección por el VHC.**

El diagnóstico de la infección aguda y crónica por el VHC se basa en la detección del ARN de VHC con un método molecular sensible (límite inferior de detección < 15 unidades internacionales [UI]/ml). Los anti-VHC son detectables mediante un enzimoimmunoanálisis en la inmensa mayoría de pa-

cientes con infección por VHC, pero los resultados del enzimoimmunoanálisis pueden ser negativos en la fase inicial de la hepatitis aguda C y en los pacientes con una profunda inmunosupresión. Tras la eliminación del virus espontánea o inducida por el tratamiento, los anticuerpos anti-VHC persisten sin que haya ARN de VHC pero pueden reducirse y acabar desapareciendo en algunos individuos [64, 65]. El diagnóstico de la hepatitis aguda C tan solo puede realizarse de manera fiable si se puede documentar una seroconversión a anticuerpos anti-VHC, puesto que no existe ningún marcador serológico que demuestre que la infección por VHC se encuentra en la fase aguda. Alrededor de un 50% de los pacientes con hepatitis aguda C son anti-VHC-positivos en el momento del diagnóstico. En tales casos, puede sospecharse una hepatitis aguda C si los signos y síntomas clínicos son: compatibles una hepatitis aguda C alanina aminotransferasa [ALT] > 10 × el límite superior de la normalidad con/ sin ictericia) en ausencia de antecedentes de hepatopatía crónica u otras causas de hepatitis aguda, y/o si puede identificarse un origen reciente probable de transmisión. En todos los casos, puede detectarse el ARN de VHC durante la fase aguda, aunque puede haber períodos breves de ARN de VHC indetectable. El ARN del VHC se puede detectar en suero entre los 7 y 21 días tras la transmisión del virus [66, 67]. Sin embargo y especialmente en aquellos casos en los que la cantidad de carga viral es pequeña, se producen grandes períodos de incubación [66], y por tanto, puede haber una variación del período de incubación, dependiendo de la vía de transmisión. Los niveles de ARN del VHC se elevan rápidamente tras la infección y entre las 4 y 12 semanas de la infección se produce un incremento de la ALT, lo que indica que se está produciendo lesión hepática. Los niveles de ALT, generalmente alcanzan unos valores de más de 10 veces el límite superior de la normalidad y al mismo tiempo puede producirse una elevación de la bilirrubina sérica [68, 69]. Además de las alteraciones analíticas, algunos pacientes también desarrollan síntomas entre las 2 y 12 semanas de producirse la transmisión viral [70, 71].

El diagnóstico de hepatitis crónica C se basa en la detección tanto de anticuerpos para el VHC como de ARN de VHC en presencia de signos de hepatitis crónica, sea por elevación de aminotransferasas, sea por las observaciones histológicas. Habitualmente se establece el criterio de hepatitis crónica ante la persistencia de ARN del VHC positivo al menos durante 6 meses o más. Los anticuerpos contra el VHC persisten durante todas las fases de la infección y también durante un tiempo tras

producirse la recuperación. La seroconversión con presencia de anticuerpos anti-VHC detectables, se produce normalmente entre los 32 a 46 días tras producirse la viremia [68]. Aun así, puede suceder, que el período hasta producirse la seroconversión se prolongue por encima de las 12-48 semanas, especialmente en pacientes inmunodeprimidos. Los test con identificación del ARN del VHC se recomiendan en todos los pacientes que presenten un cuadro de hepatitis aguda y alguna deficiencia del sistema inmune [72, 73].

#### **I.2.4. Historia natural/evolución natural y carga de la salud pública de la hepatitis C. (Figura 6).**

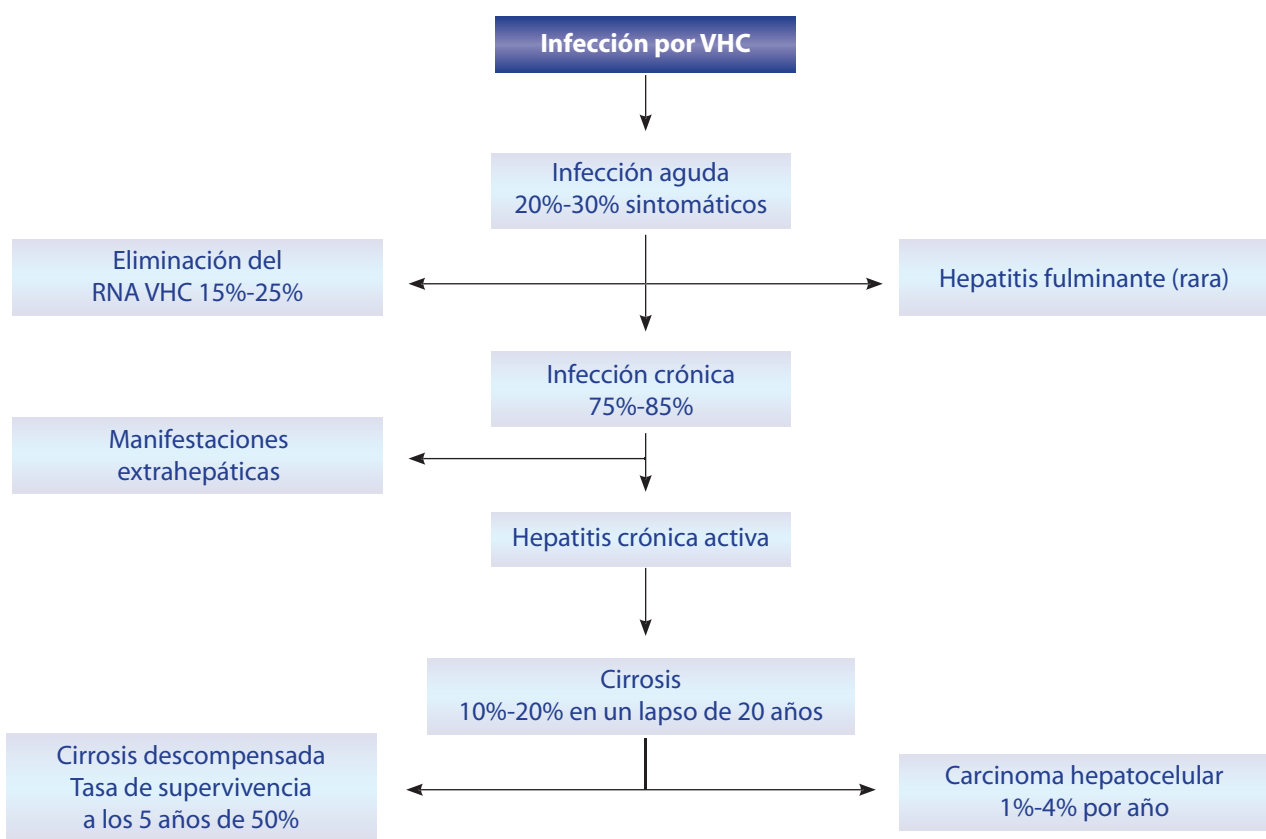
La hepatitis aguda C rara vez es grave, y produce síntomas en un 10% a 50% de los casos. En Europa, la infección por VHC es responsable de alrededor de un 10% de los casos de hepatitis aguda [58]. La incidencia de infecciones agudas por VHC ha disminuido y actualmente es de alrededor de 1/100.000 al año, aunque esta cifra constituye probablemente una infravaloración ya que se refiere principalmente a los pacientes sintomáticos. La progresión a una infección persistente o crónica se produce en alrededor de tres cuartas partes de los casos y muestra porcentajes variables de progresión a la CH. Tan solo, excepcionalmente, se produce una eliminación espontánea de la infección en el estadio crónico. La hepatitis crónica C evoluciona hacia la CH a lo largo de varias décadas. Aproximadamente, un 10% a 20% de los pacientes desarrollan CH a lo largo de un período de 20-30 años de infección [74]. En un meta-análisis de estudios transversales PQID con infección por VHC, la prevalencia de la CH a los 20 años fue del 15% [75]. Una vez alcanzado el estadio cirrótico, el riesgo de desarrollar un CHC es de aproximadamente un 1% a 5% al año. Los pacientes a los que se ha diagnosticado un CHC tienen una probabilidad de muerte del 33% durante el primer año siguiente al diagnóstico [76].

Las consecuencias clínicas de la infección por el VHC pueden ser una hepatitis aguda o la evolución hacia una hepatitis crónica.

##### **I.2.4.1. Hepatitis aguda.**

La hepatitis aguda, normalmente suele cursar asintomática, por lo que es poco frecuente que se reconozca el episodio agudo, siendo este rara vez diagnosticado. Aún así han sido publicados varios trabajos realizados en pacientes que presentaban una fase aguda sintomática de la infección por VHC, presen-

tando más del 81% diversos tipos de síntomas [69, 77]. Entre el 50% al 84% de los pacientes con infección aguda por VHC y que presentan una clínica manifiesta, presentan ictericia como el síntoma clínico hepático más específico [77, 78]. Los síntomas de una hepatitis aguda por VHC suelen ser generalmente de carácter leve e inespecíficos: pérdida de apetito, fatiga, ictericia (20%) malestar abdominal, prurito o síntomas seudogripales. Sólo en algunos casos aislados se ha documentado la evolución fulminante de la hepatitis aguda C, aspecto este, que contrasta con la infección por otros virus hepatotrópicos [72].



**Figura 6.** Historia natural de la infección por el VHC en el paciente inmunocompetente.

En algunos pacientes la infección por el VHC es una enfermedad autolimitada y en la mayoría de estos casos, entre los 3 y 4 meses tras producirse la infección aguda, no se detecta el ARN del VHC [79]. Desafortunadamente el aclaramiento espontáneo del VHC se produce solamente en una minoría de casos, de tal modo, que en la mayoría de los pacientes adultos (54-86%) se establece una infección crónica. Todavía no se conocen con exactitud los factores asociados a la erradicación viral definitiva, aunque se han identificado varios factores que podrían influir en el control de la erradicación viral. En el caso de



las mujeres, la resolución de la hepatitis C aguda es dos veces más frecuente que en los hombres [80, 81]. El desarrollo sintomático de la hepatitis puede ser predictivo del aclaramiento viral. En un meta-análisis, Micallef *et al* consiguieron demostrar que la incidencia de un aclaramiento espontáneo viral era muy superior en los pacientes que presentaban una clínica de infección aguda del VHC [82]. Otros autores también observaron que la presencia de síntomas durante la fase aguda se asociaba a un curso autolimitado de la propia enfermedad, lo que parece indicar la presencia de una respuesta inmune más fuerte en los pacientes sintomáticos [82, 83]. De hecho varios estudios demostraron una asociación entre la resolución de la hepatitis C aguda y la respuesta antiviral de las células T [84]. También se ha observado que las células NK (*natural killer*) desempeñan una función importante en la resolución / *clearance* de la hepatitis aguda C [85, 86].

#### **1.2.4.2. Hepatitis crónica.**

La hepatitis crónica por VHC se define cuando la infección del VHC, demostrada mediante la presencia de ARN-VHC en sangre, persiste durante más de 6 meses desde que se produce la infección [87]. En el caso de la hepatitis crónica, la persistencia de la infección tras el episodio agudo se produce en gran número de pacientes aunque todavía no se conozca bien la frecuencia con que evolucionan a la cronicidad. La evolución a la cronicidad se ha descrito en una proporción elevada y muy variable de casos, sobre todo dependiendo de la forma de infección. Así, la evolución a la cronicidad se produce en un 77% de casos ocasionados por transfusiones [88], un 78,5 % y 86 % de los infectados por el uso de drogas vía intravenosa [89] y un 55 % de niños infectados por transfusiones durante la cirugía cardíaca [90]. Estos datos sugieren que estas diferencias se pueden deber a factores como la edad, el sexo o la gravedad de presentación del episodio agudo. Una vez se establece la infección crónica, el aclaramiento espontáneo del VHC se produce en raras ocasiones [91]. En la mayor parte de los pacientes el diagnóstico se produce de un modo casual, tras el descubrimiento de enzimas hepáticas elevadas o en tests de rutina con estudios serológicos donde se demuestra la presencia de anticuerpos anti-VHC o ARN del VHC. La hepatitis C crónica puede ocasionar una lesión continua del parénquima hepático desencadenando CH y consiguientemente CHC. En relación a los valores analíticos, en general el 60-70% de los pacientes que presentan infección crónica por el VHC presentan valores de transaminasas

elevadas u oscilantes, y además, normalmente no superan 1,5 ó 10 veces el límite superior de la normalidad. No obstante se ha podido demostrar en diversos estudios que la actividad de las transaminasas se mantenía normal o sólo intermitentemente anormal en cerca de un tercio de los pacientes [92, 93] sin que los valores de transaminasas puedan establecer una distinción en relación a la intensidad de la enfermedad [94]. La presencia de anti-VHC no permite conocer si el paciente se recuperó de una infección, si nos encontramos ante una evolución crónica o cual es el grado de gravedad. Para conocer si existe una infección crónica por el VHC es necesario determinar la presencia de viremia, que persista durante más de 6 meses desde la infección aguda. En la práctica diaria, es prudente realizar dos determinaciones de ARN del VHC separadas por 6 meses y si son positivas diagnosticará al paciente como portador de una infección crónica por VHC. Para determinar la viremia del VHC se utilizan técnicas de biología molecular basadas en la amplificación de ácidos nucleicos virales por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. Normalmente la elevación de las aminotransferasas se produce entre las 2 y 4 semanas posteriores a la infección. El primer marcador vírico encontrado en el suero es el ARN del VHC que se encuentra entre la 1ª y 3ª semana. Los anticuerpos contra proteínas virales específicas se observan entre las 2 semanas y 6 meses posteriores a la infección [71]. Se han utilizado otros marcadores como antígenos del core del VHC, que puede ser útil para diagnosticar la infección, con una alta especificidad y valor predictivo positivo, si bien puede fallar en cuanto a la sensibilidad y valor predictivo negativo [95].

El curso individual de la enfermedad hepática es muy variable. Los pacientes pueden presentar diferentes síntomas tales como malestar abdominal, náuseas, fatiga, mialgia, artralgia o pérdida de peso [70]. Sin embargo, ninguno de estos síntomas es característico y tampoco se asocian con la gravedad de lesión hepática. La mayoría de los síntomas relacionados con la enfermedad hepática suelen relacionarse con la presencia de una CH avanzada. La infección crónica del VHC puede causar, además, manifestaciones extrahepáticas. Más del 40-74% de los pacientes con infección por el VHC, a lo largo de su vida desarrollan por lo menos una manifestación extrahepática. En algunas manifestaciones extrahepáticas se puede establecer una relación causal de un modo claro, mientras que para otras, esta asociación no es tan clara [96, 97]. La manifestación extrahepática que más se asocia a la infección por VHC es la crioglobulinemia mixta (CM). La CM es la presencia de crioglobulinas en sangre que son inmunoglobulinas que precipitan a temperaturas

inferiores a 37°C. Las crioglobulinas se pueden observar aproximadamente en cerca al 19-55% de los individuos infectados por VHC [98, 99], hay tres tipos de crioglobulinemia.

La infección por VHC se asocia en un 60-90% de los casos con los tipos II y III de CM, en la cual se observa por lo menos un componente policlonal “mixto” en las inmunoglobulinas precipitadas [99]. La mayoría de los pacientes con CM están asintomáticos y la presencia de crioglobulinas no afecta al curso natural de la infección crónica por VHC [100].

El VHC también parece influir en otros aspectos del metabolismo sistémico. Se ha observado un aumento de la resistencia a la insulina y de una mayor incidencia de diabetes tipo 2 en los pacientes con infección crónica por VHC [101]. La resistencia a la insulina se asocia a una progresión más rápida de la fibrosis así como una mayor prevalencia de CHC [102]. Los pacientes con infección por VHC tienen niveles más bajos de colesterol y triglicéridos que los individuos con negatividad para el VHC, aunque el riesgo de padecer arterioesclerosis no difiere de los individuos negativos [103]. Una importante manifestación extrahepática de la infección por VHC es la afectación del sistema nervioso central. Aproximadamente entre un 20 a 80 % de los pacientes con infección crónica por VHC desarrollan fatiga en algún momento, independientemente del grado de gravedad de la hepatitis. Los pacientes también pueden tener depresión o alteraciones en la capacidad cognitiva independientemente del estadio de la enfermedad [104, 105]. También puede causar tanto neuropatía sensorial como motora periférica en el contexto de CM, y han sido reconocidas recientemente como un factor de riesgo independiente de accidente cerebrovascular [105].

La hepatitis crónica C evoluciona a CH en un número significativo de pacientes [72]. Aunque la evolución de la CH relacionada con la hepatitis C generalmente sigue un curso lento, presenta diversas variaciones a nivel individual, probablemente debido a la interacción con otras causas potenciales de enfermedad hepática tanto a nivel del huésped como a nivel ambiental [106, 107].

#### **1.2.4.3. Cirrosis hepática.**

La CH es el estadio final de todas las enfermedades hepáticas crónicas. Su historia natural se caracteriza por una fase asintomática, denominada CH compensada, de duración variable. En esta fase los pacientes pueden llegar a tener hipertensión portal y varices esofágicas [108, 109]. A medida que la enfermedad progresa con el desarrollo de mayor hipertensión portal y mayor deterioro de la función

hepática aparecen las complicaciones de la denominada CH descompensada como ascitis, hemorragia por varices, encefalopatía hepática o ictericia [109]. El desarrollo de cualquiera de estas complicaciones marca la transición de la fase compensada a la descompensada [109]. La complicación de la infección crónica del VHC más relevante en cuanto a la morbilidad y mortalidad son la CH descompensada y el desarrollo de CHC. Los estudios publicados durante las últimas décadas muestran grandes diferencias en relación con la incidencia de la CH en los pacientes con hepatitis crónica por VHC. Son varios los estudios que muestran una visión de los diferentes resultados obtenidos [110, 111]. De los pacientes con infección crónica por VHC aproximadamente un cuarto desarrollará una CH con una mortalidad relacionada con enfermedad hepática que varía entre 1 y 11,7% según los estudios [112]. En un meta-análisis, Thein *et al* calcularon que en una gran parte de los estudios que habían sido publicados, la CH se desarrollaba en una media del 16% de los pacientes dentro de los 20 años tras la infección del VHC [74]. Globalmente, la CH se ha atribuido en un 27% a la infección crónica por el VHC con un rango amplio (14-62%) entre diferentes estudios, que se puede explicar por la presencia de diferencias regionales, así como por la presencia de otros co-factores [113]. Desde el diagnóstico de la CH muchos de los pacientes permanecen asintomáticos durante largos períodos de tiempo, mientras que otros pacientes presentan síntomas que nos indican la presencia de una enfermedad hepática avanzada como fatiga incapacitante, debilidad muscular ictericia, ascitis, hemorragia debida a hipertensión portal o encefalopatía porto-sistémica [114]. En la CH normalmente el intervalo de tiempo entre el diagnóstico de CH y cualquiera de las manifestaciones de enfermedad hepática avanzada suele oscilar entre dos y tres años [115, 116] siendo difícil el identificar factores que de modo independiente tengan una influencia en el pronóstico.

Los factores que influyen en la evolución de la enfermedad son:

a) Una mayor duración de la infección se asocia con un grado más elevado de fibrosis hepática. Es interesante observar que la infección del VHC adquirida durante la infancia, parece tener un curso menos severo [90]; b) la edad del paciente, pero no el modo de contagio, contribuían a la gravedad de la infección. Además, la edad del paciente parece tener influencia en la evolución hacia la cronicidad [88, 117]. El desarrollo de la CH relacionada con el VHC, parece ser un proceso dinámico que se acelera exponencialmente con el aumento de la edad. En una edad temprana, la fibrosis hepática progresa

de una manera lenta, lo cual puede explicar la baja prevalencia de pacientes cirróticos en los estudios realizados en pacientes jóvenes [90]. Es de señalar un mayor riesgo de progresión hacia fibrosis en los pacientes mayores de 40 años con diferentes causas de enfermedad hepática [118]. Algunos estudios sugieren que no solo hay riesgo hacia la progresión de fibrosis a una edad avanzada sino que una edad avanzada a la hora de adquirir la infección es el factor que resulta en un mayor riesgo para desarrollar esa fibrosis, aunque este último aspecto es algo discutido [119, 120]; c) el modo de transmisión de la infección viral puede influir en el daño hepático futuro; Gordon *et al* verificaron que la evolución era peor cuando la hepatitis era postransfusional que cuando se asociaba al uso de drogas intra-venosas [121]. No obstante, no está claro que el modo de transmisión del VHC sea un factor de progresión de la fibrosis [110]; d) Sexo: la influencia del sexo en la evolución de la enfermedad no está bien definida ya que algunos estudios demuestran una asociación del sexo masculino con una peor evolución [110, 122] y otros estudios parecen demostrar que el sexo femenino es protector frente a la fibrosis [110]. Estos hallazgos sugieren que los factores hormonales podrían ser importantes a la hora de regular la fibrosis hepática [123]. Otros estudios no confirman esta asociación [124, 125]. e) En cuanto a la influencia de la raza en la evolución de la enfermedad, parece que la evolución a la CH es menos frecuente en los africanos y afro-americanos [126, 127]. f) Hay varios genes específicos que parecen estar implicados en la progresión hacia la fibrosis, incluyendo determinadas variantes de los antígenos HLA (antigen leucocitario humano) clase I y II [128, 129]. Se ha propuesto un *score* sobre el riesgo de desarrollar CH, basado en los polimorfismos de 7 genes en pacientes con hepatitis C [130]. De hecho este *score* fue capaz de predecir la fibrosis en los pacientes con hepatitis C crónica leve [131, 132]; g) la presencia simultánea de otras infecciones, como el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), parecen aumentar la gravedad de la enfermedad. Soto *et al*, en un estudio multicéntrico de pacientes infectados por VHC por vía parenteral verificaron que, en la co-infección por el VIH, el intervalo entre la infección y la aparición de la CH era significativamente menor [133]. Hay numerosos datos que indican que la co-infección de VIH-VHC tiene un efecto negativo en la evolución natural así como en la respuesta a tratamientos antivirales para los dos tipos de infección. En estos pacientes se produce una enfermedad hepática que es más agresiva y progresa de un modo más rápido; del mismo modo que la respuesta a las terapias antivirales del VHC se ve disminuida [134]. Actualmente se está

observando una disminución de los casos en los que existe una coinfección de VHC y VIH en España, aspecto este que se ha observado de un modo general en todos los grupos de riesgo, consecuencia de una disminución de la infección por VHC en la población general [135]. h) El consumo de alcohol juega un papel importante en la evolución de la hepatitis crónica por el VHC, siendo su consumo excesivo una causa principal e independiente en el desarrollo de CH. Se ha demostrado que el consumo crónico de alcohol de más de 50 gr por día en los pacientes con infección por VHC da lugar a una evolución más grave con un mayor riesgo de CH [110, 120], y un mayor riesgo de muerte [136] y de carcinoma hepatocelular [137, 138]. El aumento de la actividad inflamatoria así como la fibrosis identificada en la biopsia son factores de riesgo a la hora de la progresión de la hepatitis crónica C [139]; i) el consumo de café puede tener efectos beneficiosos sobre la mortalidad global en estudios poblacionales [140]. En numerosos estudios, tanto en la hepatitis C como en otras enfermedades hepáticas, el consumo de café se ha asociado con una evolución más benigna de la enfermedad hepática [141]. Freedman *et al* fueron capaces de demostrar que consumos mayores de café se correlacionaban con un menor grado de fibrosis y esteatosis hepática así como de menor resistencia a la insulina y niveles menores de ALT, siendo estos resultados todavía mejores en las personas que bebían tres o más tazas de café al día [141]. Además, bebiendo más de tres tazas de café al día parece también incrementar la probabilidad de una respuesta virológica sostenida al tratamiento antiviral con PEG-IFN (Interferón pegilado) y RBV (Ribavirina) [142]. Otros autores también demostraron que el consumo de café se asocia con una menor actividad inflamatoria, menos fibrosis avanzada y una reducción del riesgo de desarrollar un CHC [143, 144]; j) Los factores virales juegan también un papel en la progresión de la enfermedad en la hepatitis C. Se han realizado estudios buscando una asociación entre genotipos y gravedad de la enfermedad y se han observado diferencias en la historia natural de la hepatitis C para diferentes genotipos del VHC. En el caso del genotipo 1b hay estudios que lo correlacionan con una evolución más frecuente a CH o descompensación hepática y presencia de CHC [29, 145]. También sucede con el genotipo 3, donde en estudios recientes se evidencia una progresión acelerada de la enfermedad, lo cual se correlacionaría con una mortalidad más elevada en pacientes con este genotipo [146]. En el genotipo 2 se pueden dar con una mayor frecuencia procesos hepatíticos, los cuales se pueden correlacionar a una progresión más grave de la enfermedad hepática [147]; k) El tabaco puede aumentar la

inflamación y acelerar la fibrosis hepática [148]. De igual modo, el consumo diario de cannabis se ha asociado a una fibrosis hepática más avanzada, aunque algunos datos recientemente publicados han puesto en duda tal asociación [149].

Al contrario, la carga viral no se correlaciona con el grado de fibrosis hepática ni de lesión hepática [110, 150].

La modificación de todos estos cofactores constituye un aspecto muy importante en el tratamiento del VHC teniendo en cuenta que muchos de estos cofactores pueden reducir también la tasa de respuesta al tratamiento basado en interferón (IFN).

En un estudio retrospectivo de A. Sangiovanni *et al* como resultado de una reclasificación retrospectiva, analizó la evolución de la CH por VHC durante un período medio de observación de 17 años, con respecto a otras posibles causas relevantes de enfermedad hepática. Se pudo observar que la CH por VHC es una enfermedad lentamente progresiva cuyo curso puede acelerarse en los pacientes de un modo individual si se produce abuso de alcohol, infección por VHB, o por la sobrecarga de hierro. El hallazgo de que el CHC era la causa principal de muerte en los pacientes con CH compensada por VHC sugiere indirectamente la importancia de un diagnóstico precoz de un tumor.

La CH descompensada se define por la presencia de ascitis, hemorragia por varices, encefalopatía hepática y/o la aparición de ictericia [109]. La ascitis es la complicación que marca el inicio de la fase de CH descompensada en la mayoría de los casos; por lo tanto, se considera el signo clave de CH descompensada [109, 151]. Una vez alcanzada esta fase, el pronóstico con respecto a la supervivencia marcadamente empeora con una supervivencia al año y a los dos años del 61% y el 50%, respectivamente, y una supervivencia a los 10 años del 7% [109].

La identificación de factores pronósticos de mortalidad en la fase descompensada es de gran relevancia, ya que estos pacientes son los que tienen mayor riesgo de muerte. Los factores que se identifican con mayor frecuencia son aquellos asociados a la disfunción circulatoria con deterioro de la función renal, la presencia de CHC y las variables asociadas a mayor deterioro de la función hepática [109]. Serfaty *et al* concluyeron que el único factor que de modo independiente se asociaba con la descompensación era la ausencia de tratamiento con IFN [152], mientras que HU *et al* observaron que cuando la edad de exposición era superior a 55 años o el valor de albúmina sérica en el momento de entrar en el estudio era infe-

rior a 3,5 mg/dl, el riesgo de descompensación aumentaba [116]. Un aspecto importante en la práctica clínica sería el poder identificar a individuos que tuviesen un riesgo muy bajo para que la enfermedad progresase y que por lo tanto no fuesen candidatos susceptibles de un tratamiento antiviral inmediato.

#### **I.2.4.4. Pronóstico de la CH por VHC.**

Hoy por hoy, y a diferencia de la cirrosis biliar primaria [153], no se dispone de un modelo que sea capaz de predecir con suficiente fiabilidad la supervivencia del paciente con CH por VHC en ausencia de trasplante. Además, el pronóstico de la CH por el VHC, tanto compensada como descompensada, no está claramente definido. En ausencia de CH, la expectativa de vida es similar a la de individuos no infectados. Incluso tras el desarrollo de CH evidenciada histológicamente, solamente un 30% de los pacientes presentan complicaciones significativas en los siguientes 10 años, siendo el riesgo anual de desarrollo de CHC del 2-3% [115, 116]. En efecto, en un estudio Europeo [115], en el que se evaluaron 384 cirróticos seropositivos durante un período medio de 5 años, la supervivencia de los pacientes con CH descompensada alcanzó solamente el 50%. En pacientes con CH por el VHC compensada, las conclusiones son más difíciles. En el estudio Europeo [115], la supervivencia a 5 años de los pacientes con CH por el VHC compensada fue del 91%, siendo las tasas de descompensación hepática y de desarrollo de CHC del 18% y del 7%, respectivamente. En otro estudio [152], la supervivencia a 4 años de 103 cirróticos fue del 84%, siendo las tasas de descompensación hepática y CHC del 20% y 11,5%, respectivamente.

La valoración adecuada del pronóstico de vida en pacientes portadores de CH es de gran relevancia clínica y contribuye a tomar decisiones de manejo en diferentes escenarios clínicos tales como la indicación de cirugía, *shunt* portosistémico intrahepático transyugular o trasplante hepático. En los últimos cincuenta años se han desarrollado diversas herramientas clínicas con este propósito. Una de las más conocidas y utilizadas es la escala de Child-Pugh, diseñada en 1964 por Child y Turcotte [154] y posteriormente modificada por Pugh [155] (Tabla 1).

Esta escala fue diseñada para evaluar la mortalidad asociada a la cirugía de transección de varices esofágicas, pero con el tiempo se extendió a la evaluación de mortalidad de pacientes cirróticos a 1-2 años de plazo, sin mediar cirugía. Esta clasificación tiene limitaciones, como la inclusión de dos variables cuya evaluación puede ser subjetiva, por lo que hace una década, investigadores de la Clínica Mayo en Estados



Unidos desarrollaron el sistema de puntuación de MELD (*model end-stage liver disease*) [156].

Las características de este índice y su amplio uso en la asignación de órganos para trasplante hepático han determinado que sea hoy considerada la mejor herramienta para estimar el pronóstico a corto plazo de pacientes con CH [157, 158]. El sistema MELD se desarrolló a partir del análisis de 231 pacientes cirróticos que fueron sometidos a la colocación de un shunt portosistémico intrahepático transyugular. Mediante un riguroso análisis estadístico se derivó una fórmula para predecir la mortalidad asociada a la intervención basada en 3 variables objetivas: bilirrubina (mg/dl), creatinina (mg/dl) y tiempo de protrombina. La puntuación de MELD se correlacionó con la mortalidad observada a los 3 meses en estos pacientes [157]. El índice MELD fue levemente modificado por la *United Network for Organ Sharing* para ser introducido oficialmente en el año 2002 como el método oficial de priorización de pacientes en lista de espera para trasplante hepático con donante cadavérico en Estados Unidos. De esta forma, se estableció una política de asignación de órganos basada en la gravedad del paciente y no en la antigüedad en la espera del órgano. Este índice se aplica hoy en día en muchas unidades de trasplante hepático. El índice MELD ha sido validado en diversas publicaciones de pacientes cirróticos de diversas etiologías y con diferente grado de gravedad. Todos los estudios han demostrado que el índice MELD es reproducible y con una excelente capacidad predictiva de la mortalidad de pacientes cirróticos ambulatorios y hospitalizados, tanto a los 3 meses como al año. Por otra parte, en un análisis retrospectivo de pacientes con puntuación de MELD igual o menor a 14 se determinó que éstos presentan una supervivencia sin trasplante igual o superior a su pronóstico al recibir un órgano. Por este motivo, se recomendó que fuesen candidatos a trasplante los pacientes con puntuación de MELD superior a 15 [157]. Una excepción a la priorización por puntuación de MELD la constituyen los pacientes que presentan un CHC con indicación de trasplante hepático.

Índice de Child-Pugh	1 punto	2 puntos	3 puntos
Albúmina	>35	28-35	<28
Bilirrubina	>34	34-50	>50
Tiempo de Quick	>1,7	1,7-2,3	>2,3
Ascitis	No	Tratable	Refractaria
Encefalopatía	No	I/II	III/IV

**Tabla 1.** Índice de Child-Pugh

### **I.2.4.5. Tratamiento de la hepatitis C:**

#### **I.2.4.5.a. Tratamiento farmacológico.**

Hasta 2012, el tratamiento estándar para la hepatitis C era la combinación de PEG-IFN semanalmente y dosis diarias de RBV, durante un período de 24 ó 48 semanas. La terapia dual de PEG-IFN/RBV, está asociada con varios efectos secundarios incluyendo anemia, depresión y náuseas, lo que condiciona en ocasiones que la terapia sea interrumpida. La curación de la hepatitis C crónica es el equivalente de una respuesta viral sostenida (RVS), la cual se define como la persistencia del ARN del VHC negativa entre 3 y 6 meses después de finalizar el tratamiento antiviral [159]. Los niveles de RVS varían según el genotipo de VHC, los índices de RVS son de cerca del 70% al 90% para los serotipos 2, 3, 5 y 6, pero son menores del 50% para los genotipos 1 y 4 [91, 160]. Además de este aspecto importante como un factor predictivo para el aclaramiento del VHC, se ha demostrado que el polimorfismo genético de la interleuquina 28B (IL28B), suponen un factor predictivo importante para la respuesta del tratamiento con IFN [91, 160]. Los resultados en la cohorte más grande, en el análisis del tratamiento estándar con IFN en más de 1000 pacientes infectados por VHC genotipo 1, mostró que los pacientes portadores del fenotipo favorable rs 12979860 CC, estaban asociados con el doble de posibilidades de alcanzar una RVS que los paciente con un fenotipo no favorable TT [91]. El descubrimiento del polimorfismo genético IL28B, como un factor predictivo del tratamiento estándar con IFN, rápidamente estimuló el desarrollo de un test comercial que permitiese definir el estado de la IL28B en los pacientes infectados con el VHC genotipo 1. El rápido desarrollo de la nuevas terapias antivirales contra el VHC por medio de antivirales de acción directa (AAD) ha hecho que el genotipaje de la IL28B pierda relevancia como factor pronóstico de respuesta.

En 2011, la llegada de la primera generación de AAD cambió profundamente el panorama de la terapia del VHC así como de los niveles de RVS. Aunque virtualmente cada paso del ciclo vital del VHC (incluidos los receptores de unión y liberación del virus), pueden ser *target* para el desarrollo de fármacos, los AAD dirigidos contra los pasos clave de la replicación viral y por lo tanto dirigidos contra el procesamiento de las poliproteínas, han sido la clave del importantísimo avance en el tratamiento de la hepatitis crónica por VHC. Los primeros AAD orales disponibles fueron dos inhibidores de la proteasa NS3, el telaprevir (Incivek, Vertex) y el boceprevir (Victrelis, Merck). Estos fármacos eran inhibidores lineales de ketoamide, los cuales forman un complejo reversible pero covalente con el

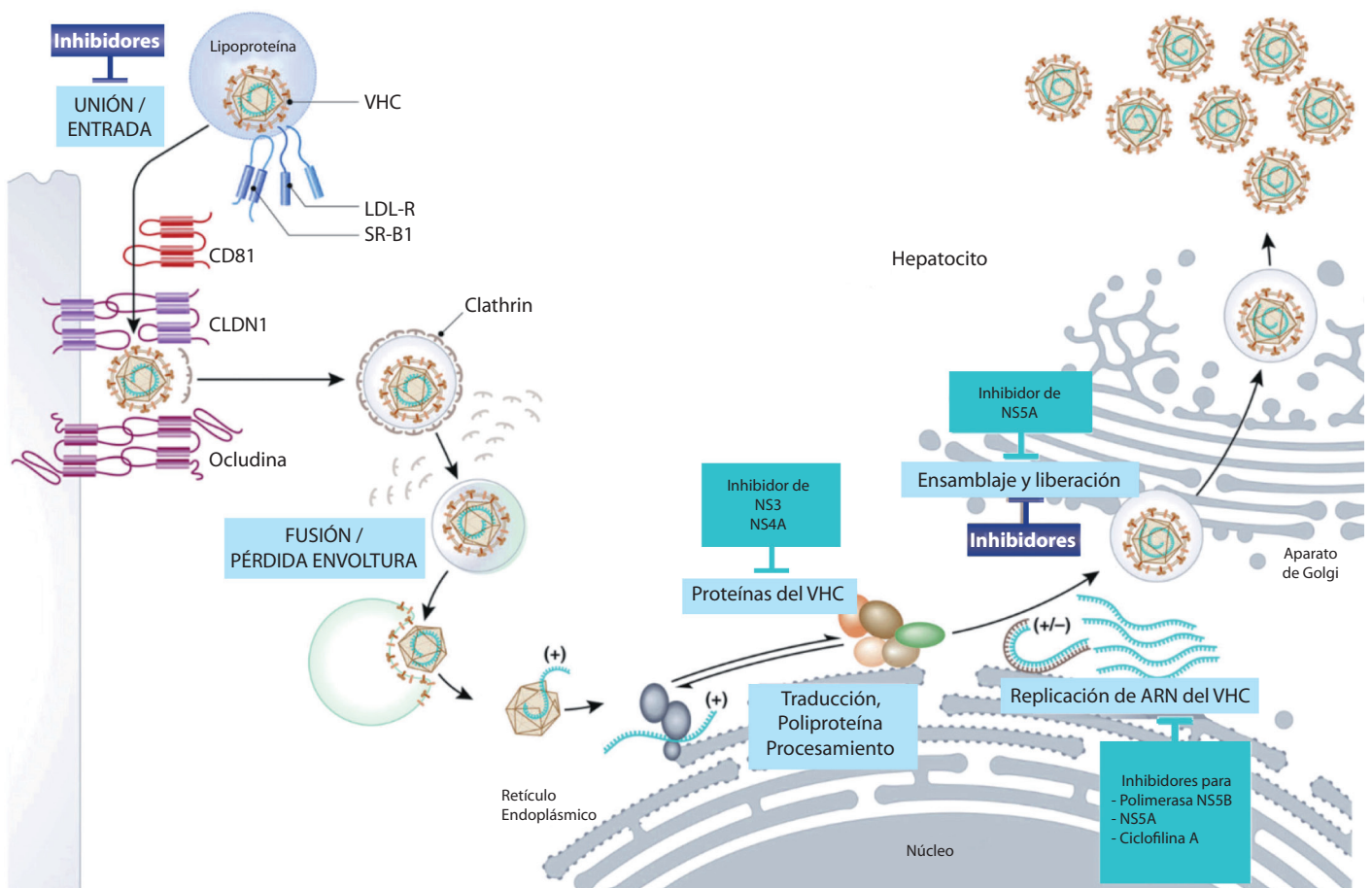
sitio catalítico de la serín proteasa NS3/4A del VHC. Añadiendo uno de los dos inhibidores NS3/4A a la terapia dual PEG-IFN/RBV incrementan los niveles de RVS hasta un 75% en el tratamiento de pacientes sin tratamientos previos y por encima del 64% para aquellos pacientes que previamente no habían respondido a la terapia dual PEG-IFN/RBV [161, 162]. El análisis de los niveles de RVS en el contexto del genotipo IL28B, demuestran que el genotipo rs12979860 CC genotipo IL28B permanecen como un factor predictivo de respuesta favorable a los pacientes con terapia triple [163]. Aunque la introducción de inhibidores de la proteasa del VHC era el mayor hito en la terapia del VHC, existen considerables inconvenientes de esta primera generación de inhibidores de la proteasa: 1 El desfavorable perfil farmacocinético de los inhibidores de la proteasa, los cuales necesitan dosis tres veces al día; 2 La interacción que existe con otros medicamentos, desde que los inhibidores de la proteasa del VHC se metabolizan en el hígado vía citocromo P450 3A; 3 Los eventos adversos relacionados con el tratamiento de proteasas, incluyen ras/prurito intenso cutáneo, anemia y disgeusia y 4 Esta opción de tratamiento está limitada para los pacientes infectados por el genotipo 1 del VHC.

El desarrollo de los fármacos ha estado focalizado en el genotipo 1 del VHC, a causa de su alta prevalencia en Europa y los Estados Unidos y los bajos índices de RVS en los pacientes infectados por el genotipo 1 del VHC tras la terapia dual PEG-IFN/RBV [25]. Se han realizado enormes esfuerzos para poder superar estas deficiencias, lo que ha resultado en el desarrollo de numerosos fármacos de los llamados inhibidores de la proteasa de segunda generación con un efecto pan-genotípico, mejorando los perfiles farmacocinéticos y de tolerabilidad. En 2013, simeprevir (Olysio, Janssen) un inhibidor de la proteasa de segunda generación de administración única diaria, se probó en combinación la terapia dual de PEG-IFN/RBV. Esta triple combinación incrementa los niveles de RVS por encima de los 85% en pacientes *naive* infectados por el genotipo 1, con muchos menos efectos secundarios asociados con la terapia dual de PEG-IFN/RBV [164].

Las polimerasas virales son los principales objetivos para el desarrollo de fármacos antivirales, ya que sus lugares enzimáticos están altamente conservados entre los diferentes genotipos. Además, las mutaciones en el sitio activo de las polimerasas virales, raramente son bien toleradas porque se asocian con una replicación viral reducida. En 2014, se realizó la primera aprobación comercial del primer nucleótido inhibidor de la polimerasa NS5B, Sofosbuvir (Sovaldi, Gilead Sciences) representando la

principal piedra angular en el tratamiento de la hepatitis C crónica. Sofosbuvir, se considera seguro y bien tolerado así como con una actividad pan-genotípica y de alta barrera a la resistencia. El sofosbuvir, en el tratamiento de los pacientes *naive* infectados con los genotipos 1, 4, 5 ó 6, administrado diariamente en combinación con la terapia dual de PEG-IFN/RBV, durante 12 semanas mejora los niveles de RVS hasta alcanzar el 82%-100% [165].

Pero sin duda, el gran avance actual en el tratamiento de la hepatitis C, en el año 2015, se debe a las combinaciones de AAD sin IFN. En este sentido disponemos en este año de nuevos fármacos inhibidores de la región NS5A (daclatasvir, ledipasvir, ombitasvir) y de la región NS5B (sofosbuvir, dasabuvir) (Figura 7) [166].



**Figura 7.** El ciclo de vida del VHC y dianas del tratamiento antiviral. El procesamiento de la poliproteína del VHC está dirigido por inhibidores NS3/4A (inhibidores de la proteasa). La realización del RNA del VHC, está dirigida por inhibidores de la polimerasa NS5B (nucleosidos y no nucleosidos), inhibidores NS5A e inhibidores de la ciclofilina A. Los inhibidores de NS5A interfieren con la realización del VHC, ensamblaje y liberación. Inhibidores específicos de la entrada viral están dirigidos contra la claudina 1 (CLDN1), receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL-R), o receptor *scavenger* B1 (SR-B1).

Estas moléculas poseen una alta potencia con una amplia cobertura de genotipos [167]. La combinación de ledipasvir y sofosbuvir en un régimen de un solo comprimido diario (Harvoni, Gilead) tiene como resultado unos altos índices de RVS (93%-99%) en el tratamiento de los pacientes con infección por VHC *naive* genotipo 1 y los pacientes que previamente no responden a la terapia dual PEG-IFN/RBV [168-170]. En octubre del 2014, Harvoni se aprobó para el tratamiento de los pacientes con VHC crónica genotipo 1. La combinación de sofosbuvir y daclatasvir administrado en régimen de un comprimido diario en pacientes infectados por los genotipos 1,2 y 3 del VHC, reveló niveles de RVS que oscilaban del 89% al 100 % respectivamente para pacientes con infección crónica por VHC, tratados y sin tratar previamente [171]. También se han observado tasas elevadas de SVR (>90%) para el régimen de tratamiento dual de daclatasvir [164]. La primera aprobación regulatoria para esta combinación en pacientes infectados con VHC genotipo 1 se obtuvo en Japón [172]. De igual manera, un régimen combinado de simeprevir (Olysio, Janssen) y sofosbuvir (Sovaldi, Gilead Sciences) fue eficaz, bien tolerado y aprobado para el VHC genotipo 1 [173]. La llamada combinación 3D contiene el inhibidor de la proteasa ABT-450 con ritonavir (ABT-450/r, AbbVie), el inhibidor NS5A ombitasvir (ABT-267, AbbVie), el inhibidor de polimerasa no nucleósido dasabuvir (ABT-333, AbbVie) se asocia con niveles de curación del 99% [174]. Grazoprevir (MK-5172, Merck) que es una segunda de inhibidores de la proteasa, en combinación con el inhibidor NS5A elbasvir (MK-8742, Merck) en un solo comprimido, en régimen de uno diario [175], ha demostrado también tasas de RVS superiores al 90% y se espera que se solicite la aprobación reglamentaria. La llegada de potentes AAD, ha revolucionado el tratamiento de la hepatitis C crónica, y las terapias orales libres de PEG-IFN y libres de RBV, logradas por la administración de dos o tres AAD, ya no es ciencia ficción. Los AAD, prometen ser una terapia del VHC de una alta efectividad, pan-genotípica y bien tolerada con la administración de un comprimido diario y periodos cortos de tratamiento (8-12 semanas o probablemente menos). La reducción rápida y drástica en plasma de los niveles de ARN del VHC, observados durante el tratamiento con AAD (negatividad de ARN del VHC 2-3 semanas tras iniciar la terapia con AAD), muy probablemente mejorará y facilitará el manejo y cuidado clínico de los pacientes con infección crónica por el VHC.

Los fármacos disponibles para el tratamiento de la infección del VHC , actualmente, desde septiembre de 2015, están reflejados en la [tabla 2](#).

Clase	Acción	Ejemplos
Inhibidores de la proteasa	Inhibe la traducción y procesamiento de la poliproteína	Aprobados: telaprevir, boceprevir, asunaprevir, vaniprevir, simeprevir, paritaprevir En desarrollo: grazaprevir En espera: faldaprevir
Inhibidores NS5A	Inhibe el complejo de realización	Aprobados: daclatasvir, ledipasvir, ombitasvir En desarrollo: elbasvir, odalasvir, velpatasvir
Inhibidores NS5B	Inhibe realización viral de ARN	Aprobados: sofosbuvir, dasabuvir En desarrollo: becladuvir En espera: deleobuvir, valopicitabine

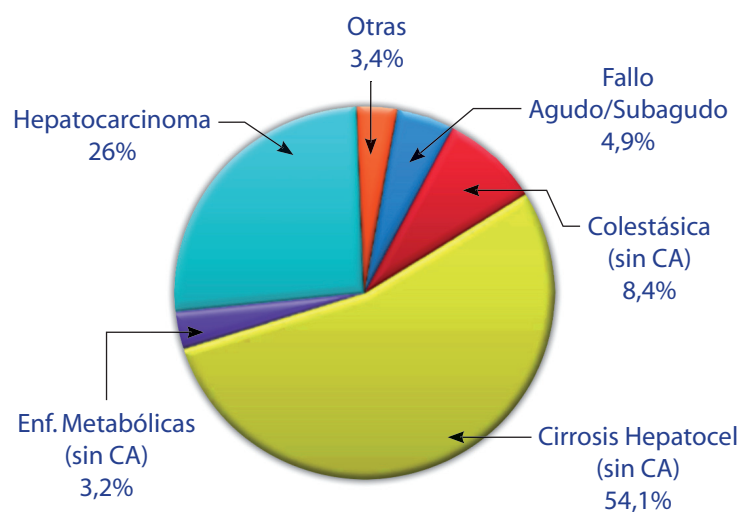
**Tabla 2.** Antivirales de acción directa (AAD) contra el VHC en el momento actual (septiembre 2015).

#### I.2.4.5.b. Trasplante hepático. Indicación de trasplante en la hepatitis por el VHC.

En la mayoría de centros en España, el VHC representa el 30-50% de las indicaciones de TH (Registro Español de Trasplante Hepático (RETH) 2013) (Figura 8).

EN USA y Europa la cirrosis por VHC con o sin hepatocarcinoma supone la primera indicación de TH (Registro UNOS y ELTR) (Figura 9).

El trasplante debe considerarse una alternativa terapéutica en caso de enfermedad hepática suficientemente avanzada con consiguiente escasa probabilidad de supervivencia a medio plazo en ausencia de éste. Un objetivo fundamental es pues la identificación del momento idóneo para la realización del trasplante, lo que implica que existan complicaciones que ponen en peligro la vida del paciente, pero aún queda suficiente reserva funcional para tolerar la cirugía. Por lo tanto, cuando hablamos de indicación de trasplante hepático, lo más difícil de saber es cuándo



**Figura 8.** Enfermedad de base del receptor del primer TH\* 1984-2013 en España (RETH).

(\*) Todas las edades

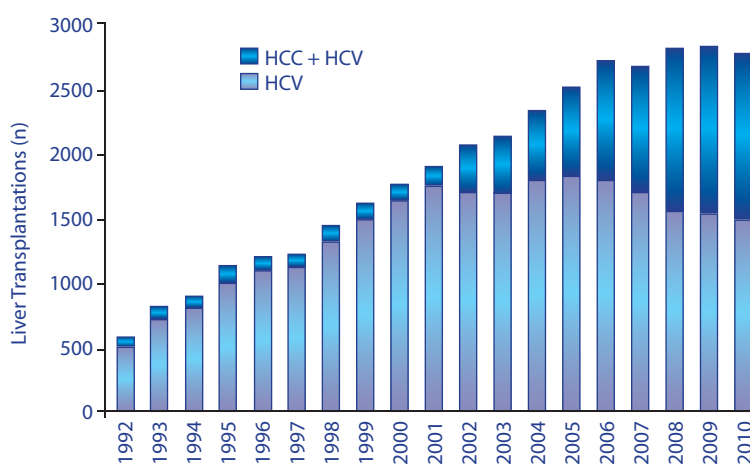
es el momento adecuado para realizar la indicación de trasplante. La elección del momento de acceso a la lista de espera es uno de los aspectos del TH de mayor variabilidad en la práctica clínica. No se ha determinado con precisión el grado de disfunción hepática que justifica el riesgo de este procedimiento ni un límite máximo de deterioro que permita la exclusión de un potencial candidato. El establecimiento de una puntuación mínima en la clasificación de Child-Pugh o

en el sistema MELD en los pacientes con cirrosis para acceder a la lista de espera permitiría simplificar el proceso y proporcionar un respaldo frente a posibles problemas éticos y legales asociados con limitar el TH en pacientes por debajo de una determinada puntuación.

En la primera (MELD), la indicación de trasplante es a partir de 15 puntos ya que con puntuaciones menores se ha observado una peor supervivencia al año con el TH. Algunos grupos de trasplante utilizan esta clasificación para priorizar por gravedad el trasplante hepático de los pacientes en lista de espera. En la segunda (Child-Pugh), existe indicación de trasplante cuando el paciente alcanza 7 ó más puntos (grados B o C), ya que en estos casos la esperanza de vida al año es inferior al 20%.

En resumen:

1. Debe haber una puntuación mínima para acceder a la lista de espera.
2. Sólo deberían incluirse en lista de espera los pacientes con cirrosis descompensada con una puntuación  $\geq 7$  puntos en la clasificación Child-Pugh y una puntuación  $> 15$  en el sistema MELD.
3. Se recomienda la incorporación en el RETH de la clasificación de Child-Pugh (cualitativa y numérica), la puntuación MELD y el sodio sérico, tanto en el momento de incluir al paciente en la lista de espera como en el momento del trasplante.
4. No deberían trasplantarse a los pacientes en situación terminal, intubados, con fallo multiorgánico



**Figura 9.** La enfermedad hepática por VHC representa el 50% de los trasplantes en los Estados Unidos.

\* Organ Procurement and Transplantation Network (OPTN) 2011.

u otras circunstancias que se asocien con una supervivencia estimada postrasplante inferior al 50% a los 5 años [176].

### **I.3. Historia natural de la hepatitis C recurrente postrasplante hepático.**

#### **I.3.1. Fisiopatología de la infección por el VHC en el trasplante hepático.**

La infección del injerto hepático por el VHC se ha reconocido a nivel virológico, tanto como por un aumento en suero de los niveles de ARN de VHC como por la detección de antígenos de VHC en el propio injerto [177]. Hay estudios en los que el análisis de ARN del VHC en suero demuestra que el período inicial de la infección se puede producir durante la fase de reperfusión del injerto [178]. En este estudio los niveles virales en suero alcanzaron en un número significativo de pacientes valores similares al período pre-trasplante hacia el día 4 postrasplante, confirmando hallazgos previos [179]. Se comprobó que este aumento inicial en los niveles del VHC puede ser mayor en aquellos pacientes a los que se les administra corticoesteroides como parte de su terapia inmunosupresora [178]. Posteriormente, la carga viral tiende a aumentar durante las siguientes semanas, alcanzando su máximo aproximadamente al mes del postrasplante [180].

Los mecanismos inmunopatogénicos responsables del daño del injerto inducido por el VHC son similares a los observados en los hígados nativos. La excepción más importante es la inmunosupresión basal y la incompatibilidad HLA que aumenta en gran medida la replicación viral e interfiere con el aclaramiento viral respectivamente. Estos factores, conducen hacia una fibrosis de un modo mucho más rápido que en los hígados nativos [181]. Las proteínas del VHC interfieren con: a) la inmunidad innata del huésped mediante la interrupción de las vías de reconocimiento antigénico iniciando patrones de subversión de la actividad de las células NK y b) Inmunoregulación celular, vía unión a CD81.

Las *Tetraspanins* son proteínas transmembrana integrales organizadas en microdominios que muestran interacciones específicas y directas con otros tetraspaninas y socios moleculares. Entre ellos, CD81 ha sido implicado en una variedad de procesos fisiológicos y patológicos [182]. CD81 también juega un papel crucial en la entrada de patógenos en las células huésped, incluyendo la entrada del VHC en los hepatocitos [183, 184]. La infección de novo de los hepatocitos por el VHC se facilita por medio de dos mecanismos llamados: "libre de célula" (*cell-free*) y "transmisión célula a célula" [185]. Ambos



modos de transmisión dependen de la glicoproteínas de la envoltura viral E1 y E2 y varios factores de entrada en la célula huésped incluyendo CD81 [185-187]. El tetraspanin CD81 fue el primer factor del huésped en el que se vio que interactuase con una forma soluble del VHC [188]. Se demostró posteriormente que la CD81 es necesaria para la infección por VHC de hepatocitos. De hecho, la entrada del VHC y la infectividad se inhibe de una manera pan genotípica por anticuerpos CD81 - específica [189]. En conjunto, estos obstáculos dificultan el desarrollo de la respuesta antiviral temprana, disminuyendo una respuesta adaptada de las células T CD4+ y CD8+. Estas células son necesarias para el aclaramiento viral y, por lo tanto, la disminución de su respuesta promueve la persistencia viral y la infección crónica [190]. Se produce un daño continuo del injerto hepático consecuencia de la existencia de una lucha indefinida entre la respuesta inmune antiviral vs inmunidad antiviral mediada por células TH1 y la replicación viral y evasión mutacional de la respuesta inmune antiviral. Los altos niveles de replicación del VHC, también incrementan el estrés oxidativo, disparan el daño hepático y hacen ineficaz una respuesta inmune antiviral [190]. Esta respuesta lesiona a los hepatocitos por medio de la vía de la perforina/granzima, por la liberación del ligando Fas, por medio de citoquinas inflamatorias y por medio diversas moléculas solubles efectoras. Hay otras células inflamatorias efectoras "no-específicas" que son reclutadas al lugar donde se está produciendo la lesión, estas células dañan a las células hepáticas cercanas (efecto espectador) [190]. Si la replicación viral persiste, en algunas ocasiones la continua lucha que existe entre el virus y el sistema inmune ocasiona una fibrosis hepática/CH [191]. La respuesta de las células T específicas CD4 y CD8 ante el VHC parecen ser aspectos importantes del aclaramiento viral durante la infección aguda del VHC y también parecen tener su importancia a la hora de la recurrencia que sigue al trasplante hepático, tanto en el grado de gravedad como en la afectación histológica [192, 193]. Los pacientes con recurrencia grave fallan a la hora de desarrollar inmunoreactividad a antígenos del VHC, aunque en las primeras semanas de hepatitis aguda induce la respuesta de células T específicas CD4+ y CD8+, y así de este modo la respuesta de anticuerpos. En los pacientes con persistencia viral crónica se desarrolla un proceso de control viral incompleto que se acompaña de una disminución en la respuesta de células T CD4+ específicas. Por el contrario los pacientes con una hepatitis aguda C autolimitada, son pacientes que mantienen niveles altos de células T CD4+ durante muchos años, terminando este proceso en la resolución de la enfermedad [194]. Lucas

*et al* han demostrado que la pérdida de la función (ie secreción de IFN- y proliferación) disminuye la eliminación de células T CD4+ específicas del VHC [195]. La respuesta de células T específicas contra el VHC se puede detectar desde las 6 semanas hasta los 3 meses después del trasplante hepático [196, 197]. Se ha visto que una respuesta fuerte de las células T CD4+ está asociada con un mejor desarrollo y con un daño menos severo a los 12 meses post-trasplante [197].

### I.3.2. Evolución histológica.

El diagnóstico de hepatitis C recurrente se basa en los hallazgos histológicos. La evolución es variable y mientras en algunos casos la recurrencia histológica es leve y no es progresiva, en muchos otros casos, sigue un curso mucho más rápido que el observado en individuos inmunocompetentes, frecuentemente, con progresión a cirrosis y pérdida del injerto [198, 199] (Figura 10).

El injerto se infecta en la reperusión y ya se pueden observar aspectos histológicos de lesión hepática dentro de los 9 días postrasplante [178, 200]. La mayoría de los pacientes desarrollará características histológicas de hepatitis C aguda entre las 4 y 12 semanas del período postrasplante, acompañándose de un importante aumento en la carga viral de VHC [201, 202]. En la mayoría de los pacientes trasplantados hepáticos por hepatitis C se pueden observar aspectos histológicos de hepatitis C crónica. En los injertos hepáticos se puede observar hepatitis crónica en cerca del 70% a 90% al año y entre el 90% a 95% tras 5 años del trasplante [203].

Existen evidencias que demuestran que la infección por el VHC se comporta de un modo mucho más agresivo en el trasplantado hepático que en los hígados nativos. Histológicamente se han observado casos con una actividad necroinflamatoria de mayor gravedad que los observados en pacientes que

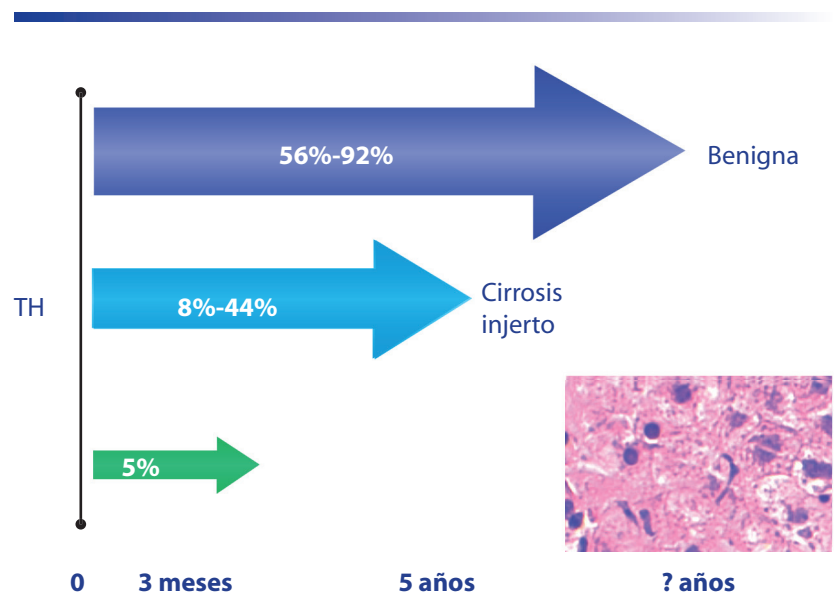


Figura 10. Historia natural de la hepatitis C post TH.

no están inmunodeprimidos, incluso llegando a observar la presencia de áreas de necrosis confluyente / en puentes, aspecto este último que es muy raro observar en los pacientes no inmunodeprimidos [204]. También hay una progresión mucho más rápida de la fibrosis y, por lo tanto, hacia cirrosis [204, 205]. La fibrosis suele estar presente en las biopsias que se realizan 1 año tras el trasplante hepático. Aproximadamente entre el 10-30% presentan cirrosis a los 5 años postrasplante y el 50% entre los 7-10 años. Un ejemplo de rápida progresión de la enfermedad lo observamos en aquellos casos en los que se desarrolla un hepatocarcinoma *de novo* en asociación con una cirrosis por VHC recurrente tras 7 años del trasplante [206]. La recurrencia por VHC está reconocida actualmente como la mayor causa del fallo del injerto tardío y en algunos centros es actualmente la principal causa de re-trasplante en pacientes con más de 12 meses de supervivencia [207].

La evolución del VHC en el trasplante es bastante similar a la que se observa en la población general, excepto que en los injertos hepáticos en la fase aguda, que se observa menos inflamación que en la fase crónica y se ven con menos frecuencia agregados nodulares portales con linfocitos, habiendo más actividad de interfase de tipo ductular [208]. La hepatitis aguda, generalmente suele aparecer entre las tres y las seis semanas postrasplante, pero puede llegar a detectarse tan temprano como dentro de los diez o catorce días postrasplante. Inicialmente se presenta como una hepatitis lobular. Las características típicas incluyen el desorden lobular, hipertrofia de células de Kupffer, apoptosis de hepatocitos, discreta linfocitosis sinusoidal con una inflamación portal mononuclear discreta y esteatosis macrovacuolar periportal y de los hepatocitos de la zona media. A nivel del epitelio biliar se puede observar focalmente, colangitis linfocítica y cambios reactivos del epitelio de los conductos biliares que nunca son severos ni extensos. La fase aguda/lobular generalmente se acompaña de un aumento de los niveles de RNA del VHC en sangre periférica. La transición entre la fase aguda y crónica está marcada por una disminución de los cambios lobulares y un aumento de la inflamación portal, formación de agregados linfoides nodulares portales y la aparición de actividad necro-inflamatoria y ductular de interfase que comienza a alterar la arquitectura.

La hepatitis crónica C generalmente tiene su inicio entre cuatro y doce meses después del trasplante y normalmente se observan cambios portales y periportales. Las características morfológicas predominantes son, inflamación crónica portal, agregados linfoides portales y actividad de interfase

neco-inflamatoria y ductular con diferentes grados de intensidad (Figuras 11 y 12). Se puede ver un daño de los conductos biliares, pero este tipo de lesión por lo general no es grave ni extensa y lo más común es que no se produzca una pérdida de conductos biliares. En los casos en los que la lesión de los conductos biliares es notable, la distinción del rechazo agudo puede llegar a ser difícil. Los cambios lobulares son generalmente menos llamativos e incluyen alteraciones lobulares leves y actividad necro-inflamatoria. Ocasionalmente y en una minoría de las vénulas centrolobulares, se puede observar inflamación alrededor y dentro del tejido conjuntivo que rodea a las venas “perivenulitis central” (Figura 13) [208].

Desde el punto de vista evolutivo, podemos definir dos patrones de recurrencia viral con clínica y pronóstico diferentes: a) un patrón de hepatitis crónica C, que es similar al observado en los pacientes no trasplantados pero con un índice de progresión de fibrosis mayor (0,3-0,8 unidades de fibrosis por año comparado con 0,2 unidades/año en pacientes no trasplantados) y, por lo tanto, con un período de tiempo más corto para el establecimiento de una fibrosis avanzada o cirrosis (9-12 años confrontado con los 20-50 años) [199, 204]; b) un segundo patrón, denominado “hepatitis fibrosante colestática” (HFC) (Figura 14), posiblemente mediado por un efecto citopático directo del VHC; este patrón es infrecuente (menos del 10%), pero muy grave y generalmente se asocia a un estado

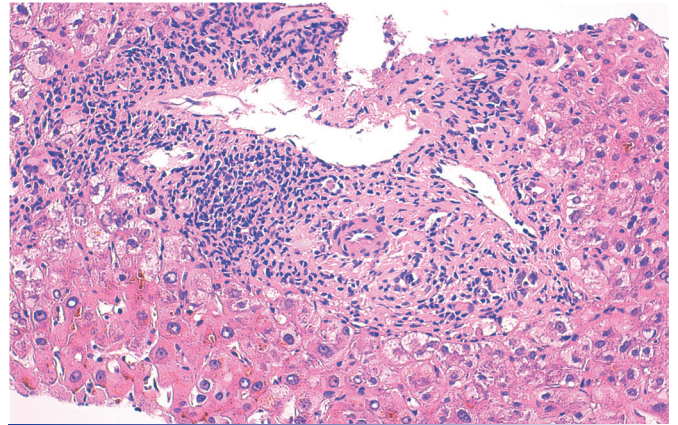


Figura 11. Agregados linfoides.

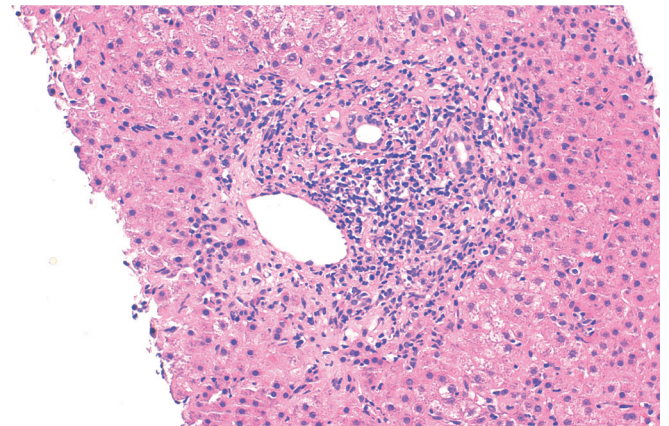


Figura 12. Actividad de interfase.

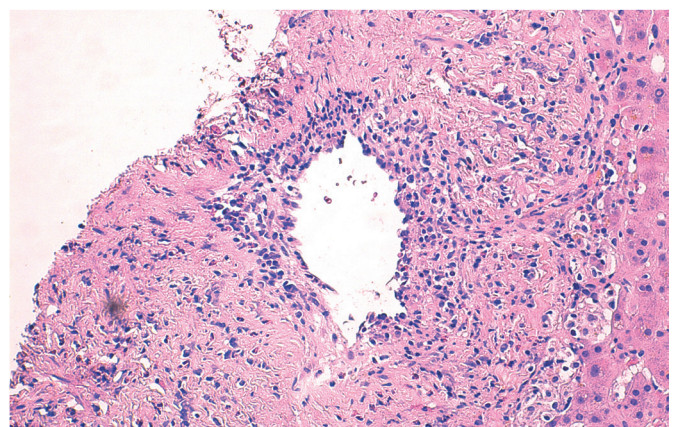
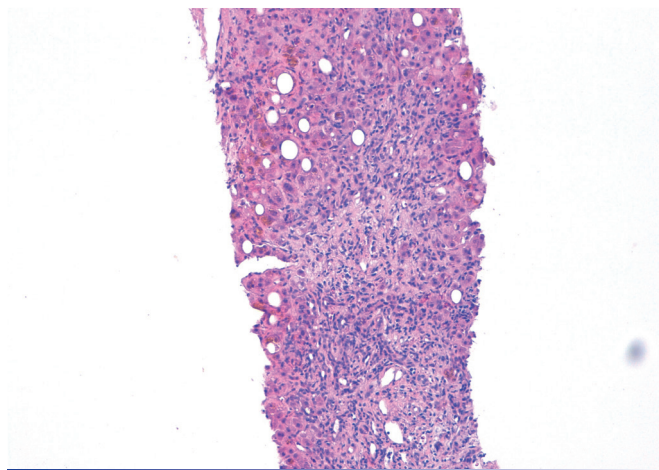


Figura 13. Perivenulitis central.

de inmunosupresión intensa [199, 204]. Se puede desarrollar como una manifestación inicial de enfermedad recurrente y menos frecuentemente como una hepatitis crónica. Se caracteriza por colestasis con ictericia marcada y elevación importante de la viremia. A nivel del injerto suele existir una extensa tumefacción citoplasmática, degeneración celular, colestasis, hepatocitos necróticos y apoptóticos e hipertrofia de las células de Kupffer. Además suele apreciarse una expansión portal originada por una marcada actividad de interfase de tipo ductular y de tipo fibrótico y un leve infiltrado inflamatorio portal mixto o incluso de predominio neutrofílico [210, 211]. Es necesario para su diagnóstico una confirmación histológica exacta así como la exclusión de problemas biliares y/o arteriales. Independientemente del patrón de recurrencia, estudios prospectivos han demostrado que la historia natural de la hepatitis C crónica sigue un curso más rápido en los pacientes con trasplante hepático que en pacientes no trasplantados [212].

Se ha descrito un subtipo de hepatitis C recurrente rica en células plasmáticas [213], el cual se comporta de modo más agresivo, presenta actividad de interfase y algunos de estos pacientes desarrollan una “perivenulitis central”. Muchos de estos pacientes también desarrollan auto-anticuerpos y/o tienen elevadas las gamma globulinas [213] y también son más propensos a desarrollar una fibrosis progresiva. Aspectos similares se han observado en hígados nativos donde se superponen aspectos clínicos, serológicos e histopatológicos de VHC y hepatitis autoinmune (HAI) [214]. Si la “perivenulitis central” afecta a una mayor parte de las vénulas centrales, probablemente se ha desarrollado un rechazo agudo en el contexto de una hepatitis C recurrente. Si la “perivenulitis central” es rica en células plasmáticas y afecta a una mayor parte de las vénulas centrales, entonces lo que debe de estar ocurriendo es que se está desarrollando una hepatitis autoinmune o mecanismos de tipo autoinmune en el contexto de una hepatitis C recurrente. Aunque es difícil distinguir entre rechazo y hepatitis autoinmune existe la ventaja de que ambos responden al aumento de la inmunosupresión.

Algunos estudios no muestran una correlación



**Figura 14.** Hepatitis y fibrosis colestática.

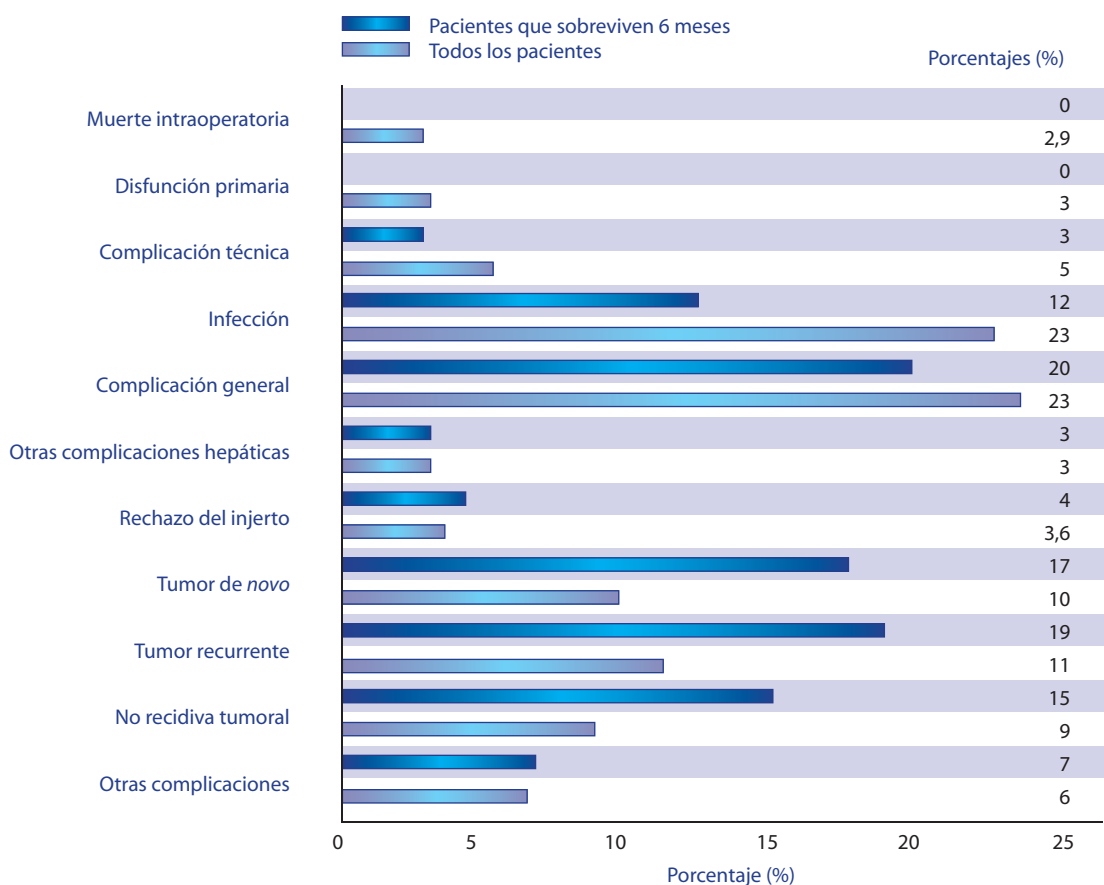
entre el genotipo viral y/o los niveles y la severidad de lesión hepática [215], mientras que en otros estudios, han demostrado que durante la fase aguda/lobular, tenían niveles altos de RNA del VHC y que la fase de progresión a la hepatitis crónica estaba asociada con una disminución significativa de los niveles hepáticos de RNA del VHC, probablemente consecuencia del control inmunológico de la replicación viral. Hay otros trabajos que demuestran que si en fase inicial hay una degeneración hepatocitaria con tumefacción y colestasis [216], en estos casos la evolución del injerto a cirrosis es más rápida [216]. Otro estudio mostró que no había diferencias en el aspecto histopatológico ni en el nivel de progresión entre la hepatitis C recurrente ni en la hepatitis C “de novo”, mientras que en otros estudios, se ha observado que la infección “de novo” causa una enfermedad más agresiva [211]. El genotipo 3 del VHC se puede manifestar como esteatosis hepática, aunque en este caso se tienen que excluir también otras causas de esteatosis [217].

### **I.3.3. Pronóstico de la hepatitis C recurrente postrasplante.**

La recurrencia de la hepatitis C sobre el injerto hepático, que es universal, condiciona una de las causas de mortalidad más importantes en los pacientes trasplantados hepáticos por VHC (Tabla 3).

Prieto *et al*, verificaron que entre un 25% a 30% de pacientes progresan a CH en los 5 años posteriores al trasplante (8-44% tras 5-10 años). En otro estudio se analizaron 81 pacientes con ARN del VHC positivo (genotipo 1b en el 96%), que se habían sometido a trasplante hepático entre 1991 y 1996. Doce de estos pacientes desarrollaron CH relacionada con el VHC en un tiempo medio de 24 meses (rango de 12-48 meses), con un índice de cirrosis relacionada con VHC del 3,7%, 8,5%, 28%, 28% y 36%, a los 1, 2, 3, 4 y 5 años respectivamente [179, 199]. La media de aparición de CH en el trasplante hepático es de 9,5 años desde el trasplante [178, 218], mientras que en los pacientes inmunocompetentes es de 30 años desde la adquisición de la infección [179, 219, 220]. El mejor predictor del riesgo de CH a 5 años es la gravedad de la actividad necroinflamatoria en el injerto a los 12 meses postrasplante [204, 221]. Parece ser que la relación entre el tiempo transcurrido desde el trasplante y el estadio de fibrosis es lineal durante los primeros 5 años. Sin embargo, en estudios longitudinales a largo plazo, se ha observado una aceleración en la progresión de la fibrosis cuando se sobrepasan los 5 años de período postrasplante [222]. De todo ello podemos concluir que sería útil la realización de biopsias de proto-

colo en todos los pacientes a menos que se haya identificado ya la CH. Una vez constatada la presencia de CH sobre el injerto hepático, el intervalo de tiempo que transcurre hasta la primera descompensación clínica es también más corto que en los sujetos no trasplantados. Berenguer y colaboradores observaron, a través de un estudio retrospectivo, que este intervalo era de tan sólo 8 meses, con una tasa acumulada de descompensación en los trasplantes hepáticos con CH establecida del 42% al año y del 63% a los 3 años [223], frente a un 5% y 10% respectivamente en el caso de los pacientes inmunocompetentes [115]. Los factores que predicen la descompensación incluyen un Child-Pugh superior al estadio A, un nivel de albúmina sérica < 3.4 g/dL y un período desde el trasplante al diagnóstico de CH descompensada inferior a 1 año. El desarrollo de una CH descompensada tras el trasplante hepático marca un punto en el tiempo a partir del cual la expectativa de vida del paciente disminuye de



**Tabla 3.** Causas de mortalidad post-TH Europa . European Liver Transplantation Register (ELTR) 1968-2009.

forma dramática (supervivencia al año del 50%) [223]. La tasa de supervivencia es del 10% a los 3 años tras producirse un fallo hepático relacionado con el VHC en los pacientes trasplantados [223], frente a un 60% de supervivencia después de producirse la descompensación en el caso de los pacientes no trasplantados [115, 223]. En otro estudio, una graduación de MELD mayor de 16 era el principal factor de riesgo para la descompensación y para mortalidad tras desarrollar una CH postrasplante por VHC [224]. Globalmente la recurrencia de la enfermedad primaria en el injerto en los pacientes trasplantados por CH por VHC disminuye la supervivencia a largo plazo siendo esta supervivencia inferior a la observada en los pacientes trasplantados sin infección por el VHC [225, 226]. En el estudio realizado del registro de los pacientes con TH de la Sociedad Española de Trasplante Hepático la supervivencia de los pacientes y del injerto en el caso de los trasplantados por VHC fue del 73% y 66% a los 3 años, 67% y 59% a los 5 años y 54% y 45% a los 10 años, en comparación con el 82% y 76% a los 3 años, 78% y 71% a los 5 años y 66% y 59% a los 10 años, observado en los pacientes trasplantados y sin VHC [227].

Se puede concluir que mientras la supervivencia del trasplante en otras condiciones ha mejorado a lo largo del tiempo, la supervivencia en el caso de los pacientes trasplantados con VHC, ha disminuido o incluso no mejora en los últimos años [228, 229].

Sin embargo, la historia natural de la recurrencia, es distinta según la respuesta al tratamiento antiviral. Hasta el momento hemos contado con el tratamiento con el IFN y RBD. De los estudios con esta terapia clásica, se deduce una mayor supervivencia en los pacientes con RVS. Es de esperar que el panorama cambie radicalmente con la introducción de los nuevos AAD contra la hepatitis C [230].

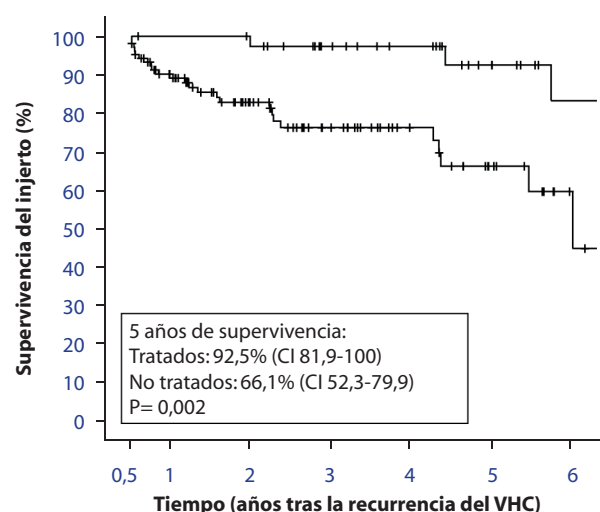
#### **I.3.4. Pronóstico en la hepatitis C recurrente postrasplante con los nuevos AAD.**

La historia natural de la hepatitis C recurrente en el postrasplante va a experimentar importantes modificaciones con la introducción de los nuevos AAD, ya que a pesar de que van a existir pacientes que no respondan a los nuevos tratamientos, las tasas de remisión completa que se están consiguiendo actualmente están próximas al 90%. El único factor que de un modo consistente va a conseguir una modificación de la historia natural de la hepatitis C recurrente es la terapia antiviral. Una RVS alcanzada en el 90% de los pacientes con la nueva terapia antiviral, probablemente, se va a asociar a una mejora de los hallazgos histopatológicos, reducción de las complicaciones relacionadas con el hígado



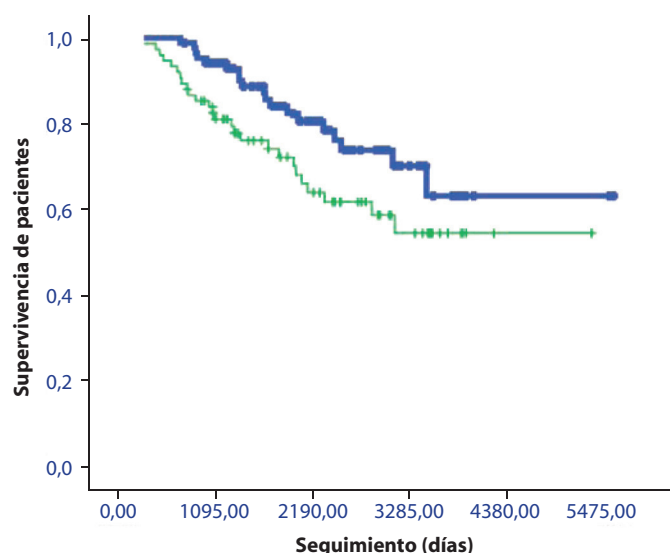
y por supuesto un aumento de la supervivencia (Figuras 15 y 16). Las variables que están asociadas con una buena respuesta al tratamiento serán el tipo de tratamiento oral escogido y el tiempo de administración de ese tratamiento, el perfil genético, la adherencia al tratamiento, el grado de fibrosis hepática y el genotipo viral.

La recurrencia viral en el futuro pasará a ser un fenómeno raro y que en pocas ocasiones observaremos, todo esto gracias a los nuevos tratamientos. Consecuencia de ello será una menor experiencia de los nuevos patólogos en el reconocimiento de las características histológicas de la recidiva viral. Aún así su reconocimiento será un aspecto muy importante a la hora de decidir actitudes terapéuticas en los pacientes trasplantados que podrá determinar su supervivencia.



En riesgo:							
Tratados:	40	39	37	29	24	14	9
Eventos	0	0	1	1	1	2	3
No tratados:	105	83	55	36	23	13	3
Eventos	0	10	16	20	20	23	25

**Figura 15.** Análisis Kaplan-Meier que muestra la supervivencia del injerto en pacientes con recurrencia del VHC tratados y no tratados. En este análisis, se toma como tiempo 0, 6 meses después de la recurrencia y los pacientes se clasifican según su historial de tratamiento a los 6 meses. Cuarenta de los 78 pacientes fueron tratados dentro de los 6 meses de la recidiva del VHC. [Ref. 231].



	<b>Grupos</b>					
Pacientes						
Tratados	89	80	41	16	2	1
Controles	75	56	31	13	1	0

**Figura 16.** Supervivencia de los pacientes tratados desde el trasplante (n=89), versus grupo de pacientes control no tratados en el mismo período (n=75). La supervivencia de los pacientes desde el trasplante fue mayor en los pacientes tratados, comparada con el grupo control no tratado, con supervivencia del 94%, 85% y 74% a los 3, 5 y 7 años respectivamente en los pacientes tratados y del 81%, 72% y 62% respectivamente en el grupo de control (p=0,04). [Ref. 232].

## **I.4. El Rechazo agudo en el TH por infección por el VHC.**

### **I.4.1. Fisiopatología del rechazo agudo en el TH por infección por el VHC.**

Un concepto básico es que los leucocitos del donante trasplantado con el órgano, viajan a los tejidos linfoides del receptor tras la revascularización en el receptor. De igual modo ocurre a la inversa, que los leucocitos del receptor penetran en el aloinjerto. Todo esto conduce al reconocimiento del aloinjerto como extraño tanto en el tejido linfoide del aloinjerto como en el del receptor. La masiva migración de leucócitos desencadena una cascada de acontecimientos que desarrolla cambios tanto en el aloinjerto como en el receptor. Los leucocitos del receptor sensibilizados en el tejido linfoide pasan al aloinjerto durante varios días tras el trasplante, donde se unen a los leucocitos del receptor sensibilizados en el aloinjerto para causar rechazo.

La secreción de citoquinas y quemoquinas dentro del aloinjerto altera la expresión de MHC, moléculas de adhesión y coestimuladoras en varias poblaciones celulares dentro del hígado. De este modo se produce una retención de células inflamatorias dentro del injerto, especialmente dentro de los espacios porta y en los tejidos perivenulares. En los momentos iniciales tras el trasplante, el objetivo preferente de la respuesta inmune es el epitelio biliar de los conductos biliares pequeños, el endotelio de las venas centrolobulares y el endotelio de los espacios porta y de las ramas de la arteria hepática (en el rechazo grave). Todo esto es lo que conlleva a las características histopatológicas del RCA y crónico [233, 234]. Los mecanismos inmunológicos que actúan contribuyendo a la lesión del injerto durante el RCA incluyen la lesión mediada por anticuerpos y por el complemento, la linfólisis de las células T citolíticas (interacciones del Fas FasL) y la liberación de moléculas efectoras y citoquinas desde diferentes células inflamatorias (ie., TNF, proteína catiónica eosinofílica, especies reactivas del oxígeno). Todos estos mecanismos efectoras diferentes, lesionan el parénquima y las células endoteliales, lo cual a su vez puede interferir con el flujo sanguíneo y produce lesiones isquémicas [235, 236]. La prevalencia y la gravedad tanto de la inflamación como de la lesión se utilizan para graduar el RCA histopatológicamente. La lesión microcirculatoria mediada inmunológicamente y un flujo arterial débil o la trombosis tienen el potencial de causar el daño más significativo. Comparado con el aloinjerto de otros órganos sólidos, es poco frecuente que el RCA conduzca a la fibrosis del injerto y al rechazo crónico [237].

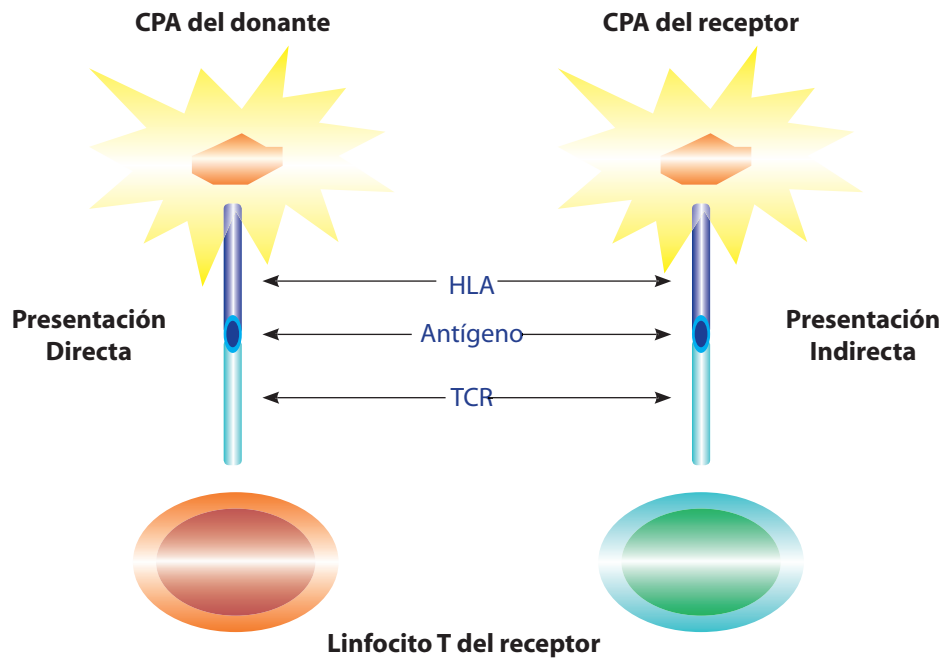
De forma esquemática, podemos dividir los estadios del rechazo del injerto en tres fases:

A) Una primera fase en la que se desarrolla la presentación de aloantígenos del injerto y el reconocimiento de estos antígenos por linfocitos T del receptor (vía directa y vía indirecta). (Figura 17).

B) Una segunda fase en la que se produce una activación de células T y liberación de citoquinas.

C) Una tercera fase o fase final en la que se produce un reclutamiento y activación de células efectoras, las cuales median el daño a determinados objetivos dentro del injerto.

A) Presentación de aloantígenos: en la primera fase, la parte central de este proceso es la interacción antígeno específica entre el receptor de células T expresado en la superficie de los linfocitos T y las moléculas de MHC expresadas en la superficie de las células presentadoras de antígeno del injerto. Las células dendríticas son las principales células presentadoras de antígeno MHC clase II y están localizadas en las áreas portales y en menor medida en la zona 3 (acinar) en el parénquima hepático [238, 239]. Existen dos vías principales de presentación de antígeno, vía directa y vía indirecta de presentación antigénica [240]. En la primera (vía directa) ante un daño inflamatorio como la propia cirugía y la isquemia que sufre el órgano trasplantado, las células presentadoras de antígeno y en especial las células dendríticas (DCs) (las células presentadoras de antígenos más importantes) donantes presentes en el injerto, maduran y emigran vía aferente o a través de la sangre a órganos linfoides de drenaje del injerto. Allí presentan péptidos alogénicos y MHC del donante a las células T alorreactivas preexistentes del receptor [241, 242]. Estas células T del receptor son en su mayoría, pero no exclusivamente, linfocitos CD4 (colaboradores) reactivos a los antígenos MHC de clase II [243]. Esta es la principal vía que se ve implicada en el período postrasplante inmediato. Posteriormente se produce una vía indirecta de presentación en la cual las CPA del receptor captan y procesan los antígenos MHC del donante y los presentan en el contexto del MHC del receptor a los linfocitos T del receptor [241, 244]. Esta vía indirecta parece importante en mantener en curso una respuesta inmune persistente. Es posible que la vía indirecta de presentación antigénica suponga un débil estímulo para el rechazo, dado que la eliminación de las DC donantes del injerto, que eliminaría la vía directa de presentación, es suficiente para prevenir el rechazo [241, 245]. Posiblemente la vía directa predomine en el postrasplante inmediato siendo el factor más importante del RCA, dada la rápida migración de las DC del injerto expresando antígenos del donante a los órganos linfoides secundarios, donde encuentran los linfocitos T aloespecíficos [246].



**Figura 17.** Vías de presentación directa e indirecta de los antígenos. En la presentación directa, el antígeno es presentado en el contexto HLA de la célula presentadora de antígenos (CPA) del donante, mientras que en la presentación indirecta, el antígeno es presentado por la CPA del receptor en el contexto del HLA del receptor.

Las interacciones que implican a antígenos CD4 y el complejo MHC expresado por células presentadoras de antígeno “profesionales” están primariamente implicados en las fases iniciales de reconocimiento del injerto. Las células de Kupffer también expresan antígenos MHC clase II y se pueden también ver envueltas en la presentación de antígenos a células T CD 4 positivas.

B) Activación de células T y liberación de citoquinas: En una segunda fase, la unión de receptores de células T a antígenos MHC, desencadena una cascada de acontecimientos de señalización intracelular que permiten la respuesta de células T que se activan y proliferan, con la subsiguiente migración de estas células en el injerto hepático. Allí estas células secretan citoquinas promoviendo funciones efectoras no solamente de linfocitos T sino también de otras células efectoras, tales como macrófagos, células NK y otras células inflamatorias. Hay dos subtipos principales de células T CD4 que son las Th1 y las Th2 [240]. A las células Th1 las induce la IL-12 y el interferon gamma (IFN-gamma) para secretar IL-2, factor de necrosis tumoral B (TNF-B) e IFN-gamma. Todas estas citoquinas tienen diferentes efectos pro-inflamatorios induciendo la activación de linfocitos T citotóxicos, activación de macrófagos y la regulación de moléculas que intervienen en una

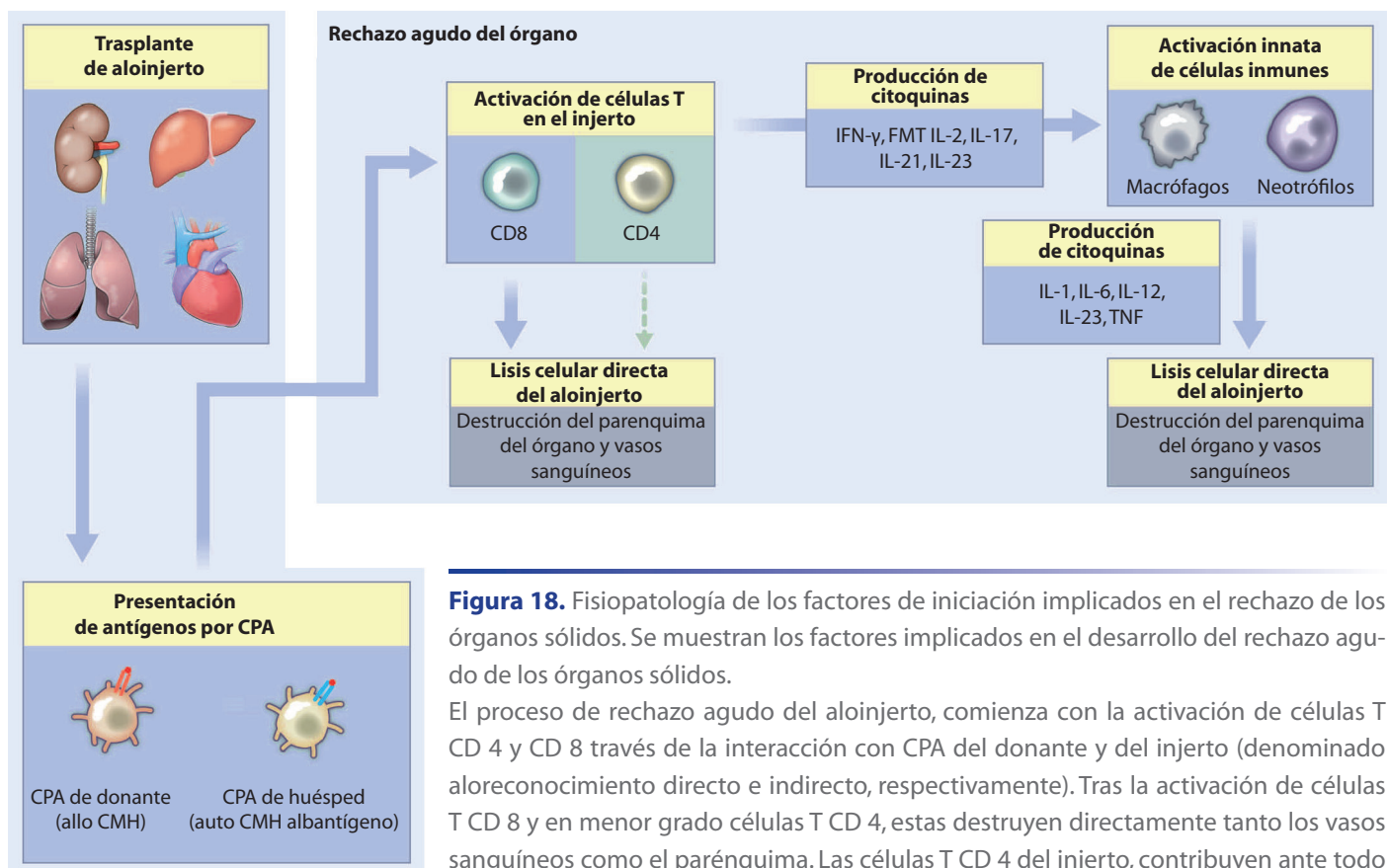
mayor activación de células T. Las células Th2 son estimuladas por la IL-4 para secretar IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. Las células Th2 estimulan a las células B para que produzcan anticuerpos y también activan a eosinófilos y mastocitos. La citoquina de la célula Th1, IFN-gamma tiene un efecto inhibitor en la proliferación de células Th2 y para la secreción de citoquinas. Al contrario, la citoquina IL-10 producida por las células Th2 tiene un efecto inhibitor sobre la proliferación de células Th1 y sobre la secreción de citoquinas. La interrelación existente entre las citoquinas de las células Th1 y Th2 y el balance entre estas, es algo que está íntimamente relacionado con el rechazo del injerto, de tal modo que se ha observado que la expresión de citoquinas de las células Th1 dentro del injerto está típicamente asociada con el rechazo, mientras que las citoquinas de las células Th2 parecen estar involucradas con la aceptación del injerto. Sin embargo a pesar de la especificidad y el significado funcional de Th1 y Th2, hay respuestas que no están claras en el contexto del trasplante hepático de humanos [240, 247].

C) Reclutamiento y activación de células efectoras: existe una tercera fase o fase final en la que se produce un reclutamiento y activación de células efectoras, las cuales median en el daño a determinados objetivos dentro del injerto. Estos mecanismos los podemos agrupar en 4 tipos (Figura 18).

El daño antígeno específico a las células del injerto está mediado por linfocitos T. En estudios inmunohistoquímicos se ha demostrado que las células T predominan en los infiltrados del injerto. Se ha identificado una población mixta de células CD4 y CD8 positivas en diferentes proporciones [234]. Las células CD8 positivas, parecen estar especialmente involucradas en la mediación de la lesión celular tanto del epitelio biliar como del endotelio vascular [248] y son el componente celular predominante encontrado en los infiltrados de los parénquimas, especialmente en las zonas perivenulares y en casos de rechazo crónico [234]. Linfocitos activados CD8+ pueden interactuar directamente con moléculas MHC clase I expresadas en las células del injerto desencadenando la apoptosis de estas células. Se han identificado dos vías principales por medio de las cuales las células T inducen apoptosis [249]: a) La primera implica la síntesis y secreción de gránulos citolíticos que contienen perforina, granzimas y granulinsina. Estos gránulos unidos a las células dianas, desencadenan la apertura de poros que terminan por activar la vía de las caspasas la cual desencadena la apoptosis de la célula diana; b) La segunda vía implica la interacción entre el ligando Fas el cual está sobrerregulado en la superficie de las células T, y el Fas expresado en la superficie de las células dianas. La sobrerregulación de la expresión

del Fas, muy probablemente inducido por la liberación de citoquinas por parte de células T activadas, se ha demostrado en hepatocitos, en células endoteliales (sinusoidales y vascular) y en células de los conductos biliares en injertos hepáticos con rechazo [250, 251]. Todos estos cambios están asociados con la infiltración del injerto por linfocitos con ligando Fas positivos y terminan en un aumento de la apoptosis de los hepatocitos y del epitelio biliar [251, 252].

Algunas de las citoquinas que son liberadas por linfocitos T activados, pueden terminar dañando estructuras adyacentes de una manera antígeno no específica. Además las citoquinas resultantes de las células T tienen un efecto llamada sobre otras células inflamatorias como son los neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y células NK. Todas estas células pueden también incrementar el daño mediado por células T a estructuras diana de una forma no antígeno específica [236, 253].



**Figura 18.** Fisiopatología de los factores de iniciación implicados en el rechazo de los órganos sólidos. Se muestran los factores implicados en el desarrollo del rechazo agudo de los órganos sólidos.

El proceso de rechazo agudo del aoinjerto, comienza con la activación de células T CD 4 y CD 8 través de la interacción con CPA del donante y del injerto (denominado aloreconocimiento directo e indirecto, respectivamente). Tras la activación de células T CD 8 y en menor grado células T CD 4, estas destruyen directamente tanto los vasos sanguíneos como el parénquima. Las células T CD 4 del injerto, contribuyen ante todo al rechazo agudo a través de la producción de citoquinas que activan macrófagos y neutrófilos. Estas células innatas, atacan y producen la lisis de las células del injerto. La combinación entre linfocitos y células innatas dirigidas contra la destrucción del injerto, tienen como consecuencia la disfunción y rechazo agudo del aoinjerto.

En relación con los factores humorales del rechazo, de la misma manera que se han visto implicados en el desarrollo de una forma modificada del RCA en el período postrasplante inicial, se ha observado que están implicados en la mediación de la lesión de las células del epitelio biliar y del endotelio vascular en el rechazo crónico del injerto hepático [254].

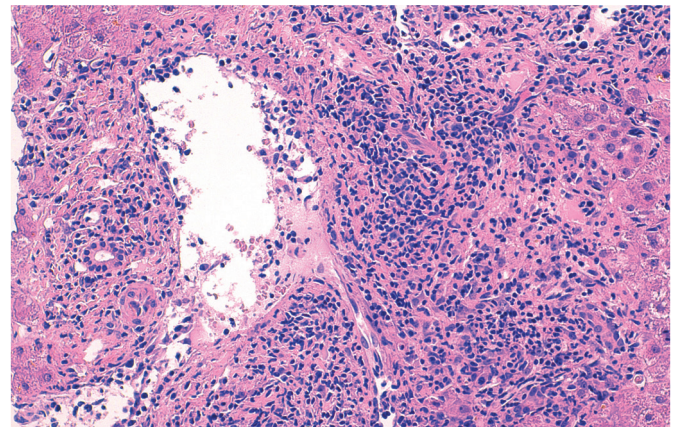
Por último, se ha observado que la isquemia puede ser muy importante en el rechazo del injerto hepático, en la mediación del daño celular de los conductos biliares así como en el de otras estructuras [255].

#### **I.4.2. Aspectos morfológicos del RCA en el trasplante hepático por el VHC.**

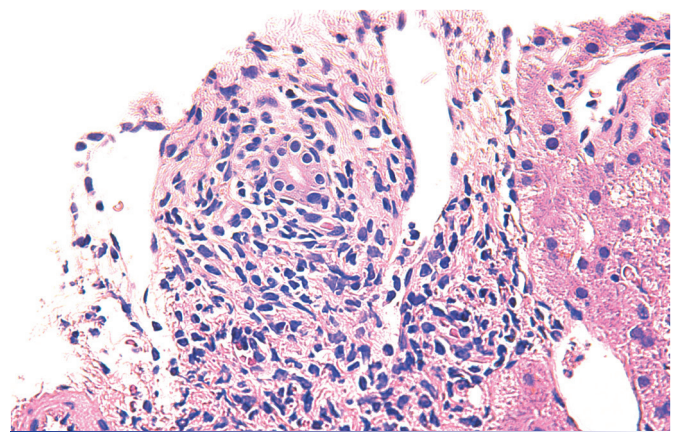
El RCA se puede definir como una lesión de mediación inmune dirigida contra el injerto hepático y caracterizada por infiltrados celulares, principalmente presentes en las áreas portales y asociados con lesión de los conductos biliares y estructuras vasculares [248, 251]. Los cambios inflamatorios se ven también frecuentemente en el parénquima hepático, principalmente alrededor de las vénulas hepáticas terminales. La mayoría de los casos se producen en el período postrasplante inmediato y son sensibles a la inmunosupresión [256]. Debido a que el diagnóstico está basado principalmente en el hallazgo histopatológico de infiltrados celulares en el hígado, el término rechazo celular se usa muy frecuentemente como una alternativa al término rechazo agudo. Otros términos que han sido usados son, rechazo no ductopénico, rechazo sin pérdida de conductos, rechazo inicial y rechazo reversible. El RCA es la forma más frecuente de rechazo del injerto hepático. La incidencia varía según como sea definido, o en base de rechazo clínicamente significativo (por ej. rechazo que se acompaña de disfunción del injerto y que necesita inmunosupresión adicional) o en base a las alteraciones histológicas. El rechazo clínicamente significativo se produce en aproximadamente el 20-40 % de pacientes, mientras que las anomalías histológicas se pueden ver en el 80 % de las biopsias obtenidas por protocolo y realizadas alrededor del final de la primera semana posterior al trasplante [257-259]. La incidencia del rechazo clínicamente significativo parece haber disminuido, probablemente debido a mejorías en la terapia inmunosupresora. Se ha observado una mayor incidencia de RCA en pacientes en los que se realiza un trasplante por enfermedad autoinmune [260, 261] y en aquellos pacientes trasplantados por hepatitis C [262]. En el caso de los pacientes con hepatitis C, la mayor incidencia de rechazo podría reflejar una diferente pauta de inmunosupresión y la valoración de las biopsias postrasplante en

pacientes trasplantados por hepatitis C. Por el contrario, se ha documentado una incidencia menor de RCA en pacientes sometidos a trasplante por enfermedad hepática alcohólica e infección por hepatitis crónica B.

Las biopsias hepáticas con RCA muestran varias combinaciones de diagnósticos basados en la triada portal, ilustrados inicialmente por Snover *et al* [263], y posteriormente confirmado en otros estudios de biopsias hepáticas [233, 264-270]. En los últimos años ha habido un aumento del interés en el conjunto de cambios que afectan las vénulas hepáticas terminales y el parénquima que las rodea. En relación a las lesiones de los espacios porta en el RCA, los tres componentes de la triada diagnóstica son: 1) la inflamación portal que es constituida predominantemente por un infiltrado inflamatorio mononuclear, aunque puede tener componente mixto que integra, blastos o linfocitos activos, neutrófilos y eosinófilos; 2) la inflamación venular subendotelial (también conocida como endotelitis, endoteliitis o endotelialitis), de las vénulas de los espacios porta y/o vénulas hepáticas terminales (Figura 19) y; 3) la lesión e inflamación de los conductos biliares (Figura 20). Como criterio diagnóstico mínimo, serán necesarios por lo menos dos de estas tres características para realizar el diagnóstico de RCA [270, 271]. Las lesiones inflamatorias que se producen en el RCA pueden mostrar una considerable variación en la intensidad en diferentes partes de una misma biopsia. Por este motivo es recomendable el realizar cortes seriados, hasta que se lleguen a valorar un mínimo de cinco espacios porta [270]. El diagnóstico tendrá un soporte más fuerte si más del 50% de los conductos o de las vénulas hepáticas terminales están dañadas o si se puede observar de modo inequívoco endotelitis de la vénulas de los espacios porta o de las vénulas



**Figura 19.** Infiltrado inflamatorio mixto portal y endotelitis.



**Figura 20.** Lesión de conducto biliar.



hepáticas terminales. La evidencia histopatológica de lesión grave, que además se usa para realizar una graduación histopatológica, incluye: inflamación peri-venular, necrosis centrolobular, arteritis y la formación de puentes entre zonas centrolobulares de tipo necrótico/inflamatorio [237, 271].

**Infiltrado inflamatorio Portal:** Los infiltrados encontrados en el RCA, se encuentran más frecuentemente en los espacios porta y alrededor de las vénulas centro-lobulares. Inicialmente la inflamación portal es linfocítica [269]. En el momento en que el rechazo se presenta clínicamente suele existir ya un infiltrado mixto incluidos linfocitos (la mayoría linfocitos T), blastos activados y células CD8+, que frecuentemente, rodean e invaden los conductos biliares lesionados [234, 248]. Las células B generalmente constituyen una pequeña proporción de los infiltrados celulares. Los macrófagos y otros leucocitos también están presentes y pueden predominar en casos agudos de rechazo grave [234, 248, 272]. Estos infiltrados los podemos encontrar de una manera más atenuada en aquellos casos en los se está sometiendo al paciente a tratamiento con corticoides o con régimen inmunosupresor de deplección linfocítica. La presencia de grandes cantidades de eosinófilos puede ser útil a la hora de identificar formas más severas de rechazo que es menos probable que responda a terapia inmunosupresora adicional [273, 274]. La presencia de una marcada hepatitis de interfase ha de considerarse como una característica de RCA más grave [270, 275]. Muy raras veces se observan granulomas en el RCA [276].

La zona de la placa limitante es una zona que por lo general no presenta complicaciones en casos de RCA inicial leve y moderado. Sin embargo, en los casos de RCA grave, se observan signos de actividad del infiltrado inflamatorio en los sinusoides peri-portales. En los casos de RCA tardío (>100 días), se suele presentar más actividad de "interfase" y son situaciones que son más difíciles de distinguir de la hepatitis crónica [277]. El RCA se puede asociar también con un ligero incremento de los linfocitos en los sinusoides.

**Lesión de los conductos biliares:** La lesión inicial de los conductos biliares, probablemente está mediada por linfocitos, aunque según evoluciona y es clínicamente evidente hay generalmente un infiltrado mixto, que en muchos casos incluye un infiltrado marcado de neutrofilos [278]. Típicamente la afectación se produce en pequeños conductos biliares, generalmente menores de 30  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los conductos biliares normalmente están rodeados y focalmente infiltrados por células inflamatorias, encontrándose linfocitos por dentro de la membrana basal. La evidencia histopatológica de la lesión de

las células del epitelio biliar se puede observar en: la relación núcleo/citoplasmática, cambios degenerativos en la forma de vacuolización citoplasmática, picnosis/cuerpos apoptóticos, mitosis y presencia de nucleolo. La eosinofilia citoplasmática y la multinucleación son generalmente signos de lesión crónica. La rotura de la membrana basal suele indicar una lesión grave de los conductos biliares. En aquellos casos en los que la inflamación es muy intensa, puede ser que se produzca como un borrado de los conductos biliares y puede ser difícil el identificarlos en cortes de rutina, en estos casos, a veces hay que demostrar la presencia de conductos biliares por medio de citoqueratinas [279]. En algunos casos la presencia de gran número de neutrófilos, incluyendo agregados de polimorfonucleares en la luz de los conductos biliares puede imitar un cuadro de una colangitis infecciosa ascendente. En los pacientes con RCA se pueden observar gran número de neutrófilos en muestras de bilis [280]. La presencia de granulomas portales y/o peribiliares no son una característica ni del RCA ni del crónico. Cuando observamos granulomas habrá que sospechar otras causas distintas del rechazo como causantes de lesión de los conductos biliares como la cirrosis biliar primaria (CBP), una coinfección de hongos o micobacterias, sarcoidosis o hepatitis C recurrente. Con cierta frecuencia podemos observar una reacción ductular en biosias con características de RCA [263, 281] y esto puede ser en parte la respuesta a otros cambios de los espacios porta, especialmente la lesión de los conductos biliares [279].

**Inflamación venular:** Podemos observar inflamación venular en ramas portales y de venas hepáticas. En casos iniciales o leves hay afectación focal linfoide de la superficie luminal de las células endoteliales. En los casos más graves hay infiltración subendotelial, asociado a elevación y a veces rotura de las células endoteliales. Las células asociadas con lesión endotelial son en su mayoría linfocitos, aunque también se puede ver un infiltrado mixto similar al que vemos en los conductos biliares. En la mayoría de los casos la inflamación endotelial afecta a pequeños segmentos de los vasos. La afectación de la circunferencia entera de la vénula se produce generalmente en aquellos casos de rechazo grave. La inflamación venosa endotelial, generalmente es considerada como la característica más específica de rechazo del injerto. Sin embargo no la encontraremos siempre de una forma constante, especialmente en aquellos casos que se producen más allá del período postrasplante inmediato [269, 282]. La inflamación endotelial también se puede observar en otras situaciones en las que existe infiltrado inflamatorio de los espacios porta o del parénquima hepático tales como hepatitis virales, CBP y procesos linfoproliferativos [283, 284].

**Arteritis:** Se han documentado casos de lesiones arteriales tales como inflamación endotelial y necrosis fibrinoide que raras veces se observan en biopsias con aguja tipo *Trucut* y cuando se han observado se han documentado como un signo de lesión grave [269, 285]. La arteritis inflamatoria y/o necrotizante es un hallazgo bastante infrecuente y de hecho los vasos que más frecuentemente se encuentran afectados son los vasos localizados en el hilio, vasos que nunca se encuentran en biopsias con aguja. Ya en estudios angiográficos se ha observado una atenuación de arterias de calibre mediano y grande, lo que indica que estos vasos se ven afectados en el caso del RCA [286]. El reconocimiento histopatológico de la arteritis en biopsias periféricas por aguja es algo que es difícilmente reproducible [287]. Por lo tanto la arteritis inflamatoria generalmente no se incluye en los sistemas de graduación, a menos que de un modo totalmente inequívoco se identifique una rama arterial conteniendo la lámina elástica interna. Si se identifica de un modo inequívoco la presencia de arteritis, se graduará la biopsia como un RCA grave.

**Cambios en el parénquima hepático:** En relación a los cambios en el parénquima, las lesiones debidas a inflamación lobular son un conjunto de cambios que afectan principalmente a las vénulas hepáticas y el parénquima que las rodea [288, 289]. En algunos casos puede darse una hepatitis lobular más difusa [290, 291]. Otros términos que se han usado para denominar estos cambios son, venulitis central, necrosis centrolobular, alteraciones centrolobulares y fase hepatítica del rechazo.

En una fase final de este espectro, que generalmente se observa en las biopsias postrasplante iniciales, la inflamación endotelial de la vénula hepática es una característica prominente. En estas situaciones los cambios portales de RCA también están presentes generalmente con un grado moderado en cuanto a la severidad. El diagnóstico y la graduación del RCA en estos casos es relativamente sencillo. Sin embargo, en otros casos como sucede en el postrasplante tardío, las lesiones centrolobulares necroinflamatorias tardías se producen sin que exista una inflamación de la vena hepática significativa y a veces también con mínimos o leves cambios inflamatorios portales. En estos últimos casos el diagnóstico de rechazo es menos fácil poderlo establecer y se tienen que barajar otras causas de lesión centrolobular. En algunos casos la inflamación endotelial de las vénulas hepáticas se puede asociar a lesiones veno-oclusivas [292, 293], y esto puede terminar dando focos de congestión y necrosis veno-oclusiva. Las lesiones necroinflamatorias y las lesiones hepáticas veno-oclusivas pueden estar asocia-

das con el desarrollo de fibrosis del parénquima [293, 294].

Hay un infiltrado inflamatorio parecido al del rechazo, similar al que se observa en los espacios porta, que se puede también observar en el tejido conjuntivo y en los sinusoides peri-venulares que rodean las venas hepáticas terminales / centro-lobulares. A este aspecto se le ha referido como “perivenulitis central” [277], ésta está presente en más del 30% de los episodios de RCA. Este aspecto es más frecuente en el período tardío (> 100 días) tras el trasplante. La presencia de lesiones necroinflamatorias perivenulares indican una forma más grave de RCA, el cual es menos probable que responda a inmunosupresión y es más probable que progrese a rechazo crónico. En muchas situaciones, parece que estos casos estén presentes en fases iniciales del rechazo crónico antes de que la pérdida de los conductos biliares sea evidente: el reconocimiento de este proceso y la instauración de una terapia inmunosupresora adecuada puede prevenir la progresión a cambios irreversibles del rechazo crónico. [295].

**Otras lesiones del parénquima hepático:** Otras alteraciones del parénquima que frecuentemente podemos observar en asociación con el RCA incluyen la colestasis, la tumefacción citoplasmática, los cambios grasos y la formación focal de cuerpos apoptóticos. Estas lesiones normalmente son más evidentes en las zonas perivenulares y en algunos casos pueden estar relacionadas de un modo casual con el RCA; hay un estudio que ha demostrado la asociación entre la severidad de la colestasis y la gravedad de las lesiones de los conductos biliares en las biopsias postrasplante inmediato [268]. Sin embargo en las biopsias del postrasplante inmediato, la mayor parte de las lesiones en el parénquima están relacionadas con alteraciones de preservación/reperfusión [296, 297]. En los casos en los que hay necrosis de la zona e inflamación, es probable que las lesiones del parénquima estén relacionadas con el rechazo, incluso si los cambios típicos portales no son evidentes [289, 298].

**Graduación del Rechazo en el TH:** Existen varios y bien conocidos sistemas de graduación para el RCA, que fueron integrados en el esquema de Banff, por el grupo de trabajo de Banff. Este grupo está constituido por reconocidos expertos en la patología del trasplante hepático, hepatología y cirugía de los principales centros de trasplante hepático de Norte América, Europa y Asia [270]. Es un sistema ampliamente utilizado, simple, fácil de aplicar y reproducir en el que de un modo científicamente correcto se ha podido demostrar que tiene un significado pronóstico tanto en estudios prospectivos [237] como retrospectivos [299]. El esquema de Banff incluye unos grados descriptivos que son, indeterminado,

leve, moderado y severo (Tabla 4) y un índice semicuantitativo *rejection activity index* (RAI) (Tabla 5). [270].

RAI se incluyó porque este era parte del sistema de graduación europeo [300] y el equivalente conceptual de índice de actividad hepático [301]. El RAI puntúa de un modo semicuantitativo la prevalencia y la severidad de otras características histopatológicas separadas en una escala de 0 a 3: la inflamación portal, la lesión de los conductos biliares y la inflamación subendotelial. Los diferentes componentes se añaden juntos para una puntuación total de RAI. En general, hay una correlación directa entre la puntuación total de RAI y el grado descriptivo de rechazo así como con un aumentado riesgo del RCA persistente/recurrente, con el rechazo crónico o con el fallo del injerto [237]. Los rangos entre los que se maneja la puntuación de RAI son, RCA indeterminado (1-2), leve (3-4), moderado (5-6) y grave (>6). Lo máximo que se puede llegar a alcanzar en la puntuación de RAI es "9", pero este es un valor que es muy raro observar en las biopsias [237]. La mayor parte de los procesos de RCA son leves, tienen un índice total de RAI inferior a 6, responden al aumento de la inmunosupresión y en biopsias posteriores no presentan una fibrosis significativa, ni pérdida de conductos biliares o arteriopatía [237]. El fallo hepático desde que se produce un RCA es algo inusual.

### Rechazo agudo tardío:

Otra forma de rechazo, es el rechazo agudo tardío, que se produce meses después del trasplante. En varios estudios se han demostrado ligeras diferencias del RCA típico que se produce al poco tiempo del trasplante [277]. El inicio tardío del rechazo agudo se caracteriza generalmente por unos pocos

Evaluación global	Criterios
1. Indeterminado	Infiltrado inflamatorio portal que no cumple los criterios para el diagnóstico de rechazo agudo.
2. Leve (Grado I)	Infiltrado de rechazo leve, en una minoría de los espacios porta y limitado a los mismos.
3. Moderado (Grado II)	Infiltrado de rechazo que afecta a la mayoría o a todos los espacios porta.
4. Severo (Grado III)	Infiltrado de rechazo como en el Grado II, que se extiende a las áreas periportales y/o inflamación perivena centrolobulillar moderada a severa asociada a necrosis hepatocitaria perivena centrolobulillar.

Nota: la evaluación global del grado de rechazo se hace en una revisión de la biopsia y después de realizar el diagnóstico de rechazo.

\* La descripción verbal del rechazo agudo como leve, moderado o severo se podría etiquetar también como grados I, II y III respectivamente.

**Tabla 4.** Terminología descriptiva de los grados de rechazo agudo. [Ref. 270].

linfocitos blásticos, actividad de “interfase”, menos inflamación venosa subendotelial, una mayor incidencia de inflamación peri-venular y una más discreta actividad lobular. Este perfil de rechazo agudo tardío hace que las biopsias sean más semejantes a la hepatitis crónica [277]. El rechazo agudo tardío se puede presentar exclusivamente o predominantemente con inflamación perivenular y destrucción hepatocitaria con mínimos o incluso sin cambios portales (perivenulitis central aislada) [256, 302, 303]. Todos estos casos pueden evolucionar posteriormente hacia formas típicas de rechazo crónico con ductopenia y fibrosis perivenular. Consecuencia de un daño grave de la zona peri-venular se puede terminar desarrollando una fibrosis perivenular y un síndrome clínico del tipo enfermedad venooclusiva o Budd-Chiari [291]. Los criterios de Banff propuestos anteriormente [270] deberían usarse

**Inflamación portal** (puntuación de 1 a 3):

1. Infiltrado inflamatorio predominantemente linfocitario que afecta a una minoría de los espacios porta y que no los expande.
2. Expansión de la mayoría o de todos los espacios porta por un infiltrado mixto que incluye linfocitos en ocasiones blastos, neutrófilos y eosinófilos.
3. Expansión marcada de la mayoría o de todos los espacios porta por un infiltrado mixto que incluye numerosos blastos y eosinófilos y, con extensión del infiltrado al área periportal.

**Lesión inflamatoria de los conductos biliares** (puntuación de 1 a 3):

1. Una minoría de los conductos están infiltrados por células inflamatorias y muestran únicamente cambios reactivos como un aumento de la reacción núcleo-citoplasmática de las células epiteliales.
2. La mayoría o todos los conductos están infiltrados por células inflamatorias. En más de un conducto se identifican cambios degenerativos como pleomorfismo nuclear, polaridad alterada y vacuolización citoplasmática del epitelio.
3. Como en el apartado 2, pero la mayoría o todos los conductos muestran cambios degenerativos o distribución luminal focal.

**Inflamación endotelial venosa** (puntuación de 1 a 3):

1. Infiltrado linfocito subendotelial que afecta a algunos, pero no a la mayoría de las vénulas portales y/o centrolobulillares.
2. Infiltrado subendotelial que afecta a la mayoría o a todas las vénulas portales y/o centrolobulillares.
3. Como en el apartado 2, con una inflamación perivenular moderada o severa que se extiende al parénquima perivenular y se asocia a necrosis hepatocitaria perivenular.

Nota: la puntuación total = la suma de los componentes. Los criterios que se pueden usar para puntuar las biopsias hepáticas del aloinjerto con rechazo agudo, son los definidos en el *World Gastroenterology Consensus Document*.

\* El índice de actividad de rechazo (RAI) es la suma de las puntuaciones para cada uno de los tres componentes del rechazo agudo.  $RAI \geq 4$  (leve),  $RAI \geq 6$  (moderado o severo).

**Tabla 5.** Esquema de graduación de Banff para el rechazo agudo. [Ref. 270].

para graduar el rechazo agudo tardío, a no ser que se presente como una perivenulitis central aislada. Para estos casos en los que solamente hay una perivenulitis centrolobular, se ha recomendado cuatro grados de graduación: mínimo/indeterminado, leve, moderado y grave [277] (Tabla 6).

Los casos de tipo “mínimo/indeterminado” y “leve”, pueden solucionarse de un modo espontáneo [303]. Pero los casos de inflamación peri-venular más graves muy probablemente necesiten de tratamientos más agresivos, aunque no se han realizado estudios prospectivos [304, 305].

La administración de inmunosupresión antes de la realización de las biopsias puede hacer que la interpretación de las mismas sea más complicada por la resolución parcial o completa de algunos de los aspectos morfológicos. Así, la inflamación venosa subendotelial es algo que puede desaparecer en 24 horas. El tratamiento antes de la biopsia, es algo que también puede contribuir a la tumefacción citoplasmática y a la colestasis canalicular lo que puede crear una mayor confusión. En general se necesitan 7-10 días de tratamiento para resolver los cambios del RCA.

Morfológicamente el diagnóstico diferencial, plantea menos problemas en el primer mes postrasplante, donde es raro encontrar otras causas de inflamación del injerto. Más difícil es realizar el diagnóstico diferencial más allá del período postrasplante inicial donde hay otras causas de inflamación del injerto que pueden ser más comunes. Muy importante entre estas es la hepatitis C, aunque hay otras causas asociadas a la presencia de infiltrado inflamatorio portal como la hepatitis autoinmune (recurrente o adquirida) y procesos linfoproliferativos asociados al virus Epstein-Barr. Además de la clásica triada diagnóstica descrita, una característica útil señalada para diagnosticar RCA es la presencia de un componente inflamatorio mixto, el cual es raro encontrarlo con una cierta intensidad en cualquiera de las otras situaciones que ocasionan inflamación en el injerto. Otro problema que surge con el rechazo tardío, es que el rechazo en sí puede tener distintas características entre las que se incluyen el tener una inflamación venosa endotelial poco prominente y cambios lobulares más marcados, incluyendo cambios de tipo hepatítico [282, 306]. En aquellos casos en los que la proliferación ductular es claramente prominente, debe considerarse la patología del tracto biliar, particularmente si existe un edema portal y un infiltrado inflamatorio desproporcionadamente rico en polimorfonucleares neutrofilos. Cuando una obstrucción biliar es clara, se puede descartar fácilmente con el estudio de imagen, pero en ocasiones tenemos cambios sutiles que pueden ser consecuencia de alteraciones

isquémicas incipientes, con lesión de los conductos biliares, en las que el diagnóstico radiológico no es evidente. Las características biliares también pueden ser el componente humoral de un rechazo agudo. [295].

El diagnóstico de rechazo agudo debe realizarse en base a todos los aspectos morfológicos descritos, teniendo en consideración las informaciones clínicas y también teniendo en consideración el período postrasplante en que se ha realizado la biopsia.

Demetris AJ *et al*, comprobaron en un estudio prospectivo criterios que identificaban rechazos agudo clínicamente significativos en el contexto de una VHC recurrente. Estos criterios fueron: 1) Inflamación portal con destrucción de los conductos biliares por la inflamación en el 50% o más de los conductos biliares y; 2) inflamación mononuclear perivenular que afecta al 50% o más de las vénulas hepáticas terminales, con componente de necrosis hepatocitaria y/o *dropout* [307]. La mayoría de estos casos se gradúan como rechazo moderado según los criterios de Banff [307]. En estos casos, el RCA se debe de colocar como el cuadro predominante. Normalmente, en estos casos los niveles de ARN de VHC en sangre periférica son relativamente bajos (< de 5 millones IU/ml). En estas circunstancias, la identificación del rechazo es relativamente sencilla ya que en estudios prospectivos, estas características son más propias de un rechazo moderado. El problema surge cuando se solapan aspectos morfológicos de ambos procesos (recidiva viral y RCA) o cuando las manifestaciones histopatológicas del RCA son leves o incipientes. En estos últimos casos, los aspectos que observamos no permiten una definición concreta de la patología, ya que no conseguimos determinar la verdadera importancia

<b>Mínimo/Intermedio</b>	Inflamación perivenular que afecta a una minoría de las venas centrolobulares con pérdida focal de hepatocitos perivenulares sin necrosis confluyente perivenular.
<b>Leve</b>	Como el mínimo / indeterminado pero que afecta a la mayoría de las vénulas centrolobulares.
<b>Moderado</b>	Como el leve, con al menos destrucción hepatocitaria focal confluyente y leve / moderada inflamación sin puentes de necrosis.
<b>Grave</b>	Como el moderado, con destrucción confluyente e inflamación que afecta a la mayoría de las vénulas centrolobulares con necrosis en puente entre vénulas centrolobulares.

**Tabla 6.** Tabla de grados del rechazo agudo tardío. [Ref. 277].



y significado de las características morfológicas que observamos. Sólo si pudiésemos saber el valor individual que debemos dar a las características morfológicas que observamos, de modo que consiguiésemos definirlas dentro de una determinada patología, podríamos clasificar y diagnosticar las diferentes patologías. Al patólogo el problema real le surge cuando está observando características morfológicas que pueden observarse en varias patologías y no sabe realmente que valor atribuir al conjunto de los aspectos morfológicos ni a cada una de estos aspectos morfológicos de modo individual en el momento de establecer el diagnóstico de una determinada patología.

El diagnóstico histopatológico de las enfermedades se basa en la valoración e interpretación de un conjunto de características morfológicas que observamos. El diagnóstico diferencial con otras patologías se establece porque vemos que la suma de esos aspectos morfológicos son más característicos de la patología que estamos diagnosticando que de otras.

### **I.5. Solapamiento que existe entre la morfología del RCA y la morfología de la hepatitis C recurrente postrasplante. [Tabla 7.](#)**

Este es un problema difícil y que frecuentemente nos encontramos, con las consiguientes implicaciones terapéuticas difíciles de determinar en un momento concreto [308]. Como ya se ha comentado, un aumento de la inmunosupresión puede acelerar la fibrogénesis en los pacientes con VHC crónica o incluso desencadenar una hepatitis colestática. Al contrario, en los casos de RCA tratados con interferón por sospecha de recidiva de hepatitis C, la enfermedad puede progresar a rechazo crónico.

La inflamación portal de células mononucleadas, así como la colangitis linfocítica son características de la hepatitis crónica, así como de la mayoría de los casos de RCA tardío. Sin embargo, en estos casos de RCA tardío, el infiltrado portal tiende a tener una distribución más difusa tanto en el espacio porta como en el resto del parénquima, al contrario de lo que suele suceder en los casos de hepatitis crónica donde el componente inflamatorio se dispone más formando agregados nodulares en el espacio porta. En el RCA tardío y en el rechazo crónico, la colangitis linfocítica y/o los cambios de senescencia del epitelio biliar respectivamente, afectan generalmente a la mayoría de los conductos biliares [308]. Cuando la venulitis centrolobular afecta también a la mayoría de las vénulas centrolobulares, favorece el diagnóstico de rechazo. Cuando las lesiones afectan a una minoría de los conductos biliares, el diag-

nóstico es más a favor de una hepatitis, sea esta aguda o crónica. Aspectos que en cierto modo son claves tanto para el diagnóstico de hepatitis crónica como aguda son: la actividad necroinflamatoria, así como la actividad de interfase de tipo ductular, ya que estos son aspectos más prevalentes y más intensos que los observados en el rechazo. Los procesos de rechazo agudo y/o crónico, son procesos que pueden coexistir con la hepatitis crónica y en estos casos se debe de identificar el proceso que predomina. Se consideran características clave de RCA en el contexto de VHC recurrente, la prevalencia y gravedad de las lesiones producidas en los conductos biliares por el componente inflamatorio mononuclear, así como la perivenulitis centrolobular. En el caso de que ambas características afecten a la mayoría de los conductos biliares o a las vénulas centrolobulares, entonces estamos antes un RCA. Sin embargo, cuando coexistan ambos procesos, solamente podremos considerar el RCA como

Características	RCA	VHC recurrente
Presencia y tipo de actividad de interfase.	Generalmente difuso. Intensidad variable. Infiltrado inflamatorio de tipo mixto.	Irregular; de intensidad variable; Pre-dominantemente mononuclear. Agregados nodulares.
Inflamación y lesión de conductos biliares.	Focalmente presente y leve de tipo necroinflamatorio. Pérdida de polaridad. Sí intensa=rechazo grave.	Variable; generalmente no es algo prominente; de tipo necroinflamatorio y ductular.
Cambios de senescencia del epitelio biliar y pérdida de pequeños conductos biliares.	No siempre presente.	Variable, sí presente, normalmente afecta a una minoría de los conductos biliares.
Inflamación mononuclear perivenular y/o deterioro hepatocitario.	Variable, si fuese una característica, debería afectar a la mayor parte de las zonas perivenulares y puede tener también inflamación perivenular. Generalmente limitado al postrasplante inmediato.	Variable, pero generalmente leve. Sí presente, afecta generalmente a una minoría de las regiones perivenulares.
Hallazgos lobulares y actividad necroinflamatoria.	Variable, sí presente, limitado /concentrado en regiones perivenulares.	Variable, desestructuración. Severidad variable.
Patrón de fibrosis durante la progresión hacia fibrosis.	Raro.	Generalmente macronodular. Patrón hepático puede ser micronodular.

**Tabla 7.** Características histológicas diferenciales del RCA vs VHC recurrente en el TH.

\*Los hallazgos histopatológicos en esta tabla, deberían de combinarse con criterios clínicos, serológicos y radiográficos y criterios de exclusión importantes para llegar a un diagnóstico.

el proceso primario cuando los cambios propios del RCA sean obvios. La mayoría de estos casos son clasificados como de grado “moderado” según el esquema de Banff [308]. El verdadero problema surge cuando los cambios no son tan obvios y la intensidad del RCA en el caso de serlo sería de leve.

En el caso del rechazo crónico en el contexto de la VHC recurrente, este se reconoce porque posee las mismas características que cuando observamos el rechazo crónico en injerto sin VHC recurrente.

Como ya se ha comentado antes, lo que el patólogo hace es ver determinados aspectos morfológicos y por sus características y modo de presentación considera si son más específicos o no de una/s determinada/s patologías. Todo esto lo hace de modo individual para cada una de las características histológicas que observa. Posteriormente, cuando ya ha observado individualmente cada una de esas características morfológicas, realiza una valoración de todas ellas en su conjunto de modo que considera si el conjunto de todas ellas es más o menos específico de una determinada patología para poder establecer un diagnóstico. La valoración del conjunto de características morfológicas que ha observado previamente de un modo individual, es el paso sometido a mayor subjetividad a la hora de establecer un diagnóstico y a la vez es el proceso más importante. En la literatura, la mayor parte de los estudios intentan encuadrar determinadas características morfológicas en patologías concretas. Si bien es verdad que es importante la correcta valoración e interpretación de cada características morfológicas individualmente, no lo es menos la correlación que pueda existir entre ellas ya que es lo que realmente ayuda a establecer un diagnóstico correcto. Solamente desarrollando metodologías que permitan interrelacionar los aspectos morfológicos que observamos individualmente en la valoración de las biopsias con determinadas patologías, excluyendo otras, es cuando realmente podremos establecer diagnósticos correctos sometidos a un mayor grado de objetividad. En este sentido, una correlación clínico-patológica es de vital importancia para concretar al máximo el diagnóstico diferencial, en este caso entre RCA y recidiva de la hepatitis C en el injerto hepático.

#### **I.6. Otras patologías que plantean diagnóstico diferencial en el trasplante hepático por el VHC.**

HAI es un proceso difícil de distinguir tanto histológicamente como conceptualmente del RCA. Teóricamente todas las formas de HAI tras el trasplante podrían clasificarse como rechazo [309, 310]. Los hallazgos serológicos e histológicos usados para distinguir entre HAI y rechazo, pueden reflejar la

naturaleza, densidad y localización de las dianas antigénicas. No hay tests clínicos que de un modo convencional logren diferenciar entre una respuesta autoinmune y un rechazo. Algunos de los casos de HAI de nueva aparición, podrían atribuirse a una expresión polimorfa del glutatión S-transferasa T1 [311]; El *score* y los criterios diagnóstico para la HAI en hígados nativos establecido por el Grupo Internacional de Hepatitis Autoinmune [312] no ha sido evaluado en los hígados trasplantados, aunque proporcionan unas útiles pautas diagnósticas. El diagnóstico de HAI se establece por medio de la combinación de hallazgos serológicos, de biología molecular e histopatológicos. La presencia de autoanticuerpos no-órgano específicos, es un requisito para el diagnóstico y dentro de estos, típicamente se incluyen los anticuerpos anti-músculo liso y anticuerpos antinucleares, así como los anticuerpos contra el microsoma hepático renal tipo 1 [310]. Lo que probablemente sucede, es que implica la activación de mecanismos inmunes que muy probablemente estén implicados primariamente en la patogénesis de la enfermedad o bien en el desarrollo de una respuesta colateral a la destrucción celular hepática y liberación de antígenos no selectivos. La presencia de autoanticuerpos tras el trasplante hepático no es un criterio que establezca el diagnóstico de HAI. Su principal valor es el hecho de poder orientar y dirigir la atención hacia la posibilidad de la HAI. Los criterios mínimos para diagnosticar HAI *de novo* o recurrente en el injerto hepático son: (1) hepatitis de interfase con presencia de un infiltrado inflamatorio portal linfocitario; (2) niveles suficientes ( $\geq 1:160$ ) de autoanticuerpos, anticuerpos de músculo liso o de anticuerpos contra el microsoma hepático renal tipo 1; (3) hipergammaglobulinemia; y (4) la exclusión de hepatitis relacionada con la presencia de fármacos o virus, así como rechazo agudo tardío o crónico. Las manifestaciones iniciales, incluyen la hepatitis lobular con formación de rosetas hepatocitarias que generalmente se desarrollan dentro de una fase de la hepatitis crónica caracterizada por una inflamación linfo-plasmocitaria portal con una marcada actividad de interfase. Los infiltrados por células plasmocitarias suelen caracterizar la HAI, pero no son un requisito diagnóstico. La presencia de necrosis confluyente y en puentes no es infrecuente, especialmente entre aquellos pacientes que presentan una inmunosupresión subóptima. La colangitis linfocitaria, cuando está presente, generalmente afecta a una minoría de los conductos biliares. La perivenulitis centrolobular puede suceder en procesos agudos de la HAI en hígados nativos [313, 314] y aunque de otra manera también en el RCA tardío. En los hígados nativos la lesión hepatocitaria peri-

venular asociada a la HAI, generalmente disminuye según aparece la hepatitis de interfase [315], aunque en los injertos hepáticos la evolución de los cambios no se ha estudiado. La hepatitis panancinar está también dentro del espectro de los hallazgos histológicos de la HAI [312], pero no se reconoce una forma colestática. Hepatitis Idiopática Postrasplante, se define como una hepatitis crónica que no se puede atribuir a ningún caso en particular. Por definición en estos casos, la lesión de los conductos biliares y la inflamación venosa endotelial no suele destacar. La prevalencia en los adultos es difícil de determinar, porque la mayoría de las enfermedades originales, tienen el potencial de recurrir con características de hepatitis crónica. En la mayoría de los centros, más del 40% de los pacientes adultos a los que se les ha realizado una biopsia en un período superior a los 12 meses postrasplante, tienen aspectos de hepatitis crónica que son inexplicables [316]. Se ha observado una prevalencia similar en la población pediátrica, en la cual la enfermedad nativa recurrente es un problema menor; en esta población, la frecuencia de hepatitis crónica "idiopática" era del 20% al año de edad y se elevaba hasta el 60% a los 10 años de edad [313].

Aquellos casos que se presentan con una perivenulitis central, probablemente corresponden a casos de RCA con componente centrolobular o casos de HAI si los autoanticuerpos están también presentes ya que la disfunción del injerto, generalmente responde a un aumento de la inmunosupresión [297, 317]. Algunos de los casos de hepatitis idiopáticas postrasplante pueden corresponder a un rechazo con características de hepatitis crónica [268]. Sin embargo un diagnóstico de hepatitis postrasplante idiopática no conlleva generalmente a un aumento de la inmunosupresión. En algunos casos que llegan a alcanzar el 50% se puede llegar a desarrollar fibrosis en puentes o CH en un período de unos 10 años [313]. Sólo esta observación justificaría la necesidad de realizar biopsias de protocolo [313].

Distinción entre varias causas de hepatitis crónica. La determinación de la causa específica de hepatitis crónica no siempre es posible, aunque diferencias muy sutiles pueden ayudar a especificar una etiología. En el caso de la HAI, suele ser característico la presencia de células plasmáticas y una actividad de interfase agresiva así como una necrosis confluyente perivenular o en puentes. En el caso de la hepatitis por VHC suele ser sugestivo de ésta la presencia de esteatosis macrovesicular y agregados linfoides portales y las inclusiones nucleares se ven solamente en la hepatitis por virus B. Debido a que las características que potencialmente pueden establecer diferencias entre los diferentes tipos de

hepatitis, son características que no se presentan de un modo constante y que no pueden ser reproducibles con seguridad, la determinación de la causa (aguda y/o crónica) de hepatitis debería estar basada en una valoración clínicopatológica completa.

Enfermedad Biliar o Colestática Versus Hepatitis crónica por VHC. En un contexto adecuado una lesión destructiva ductular única es diagnóstica de CBP. En un caso así se debe de excluir una causa infecciosa de colangitis granulomatosa aunque esto es infrecuente. La presencia de granulomas portales sin evidencia de colangitis granulomatosa se ha observado en casos de hígados nativos con VHC [318]. Si no existen lesiones patognomónicas la CBP o Colangitis esclerosante recurrentes se distinguen generalmente por un aspecto de dificultad de drenaje biliar.

La hepatitis viral colestática puede ser difícil el distinguirla de la estenosis biliar con o sin trombosis de la arteria hepática. El edema portal y la presencia de neutrófilos portales (más que periportal), son hallazgos frecuentes en las estenosis biliares. La proliferación ductular y la colangiitis aguda sin edema portal es más característica de la hepatitis colestática. El desorden lobular y la tumefacción citoplasmática así como la apoptosis son más frecuentes de las hepatitis virales colestáticas.



## II. Hipótesis y Objetivos

Rechazo celular agudo versus hepatitis C recurrente  
en el trasplante hepático: Aproximación racional clínico-patológica  
mediante un algoritmo de decisión



## **II. Hipótesis y Objetivos.**

### **Hipótesis.**

La realización de un diagnóstico correcto de recidiva de la hepatitis C y su diferenciación del RCA mediante el análisis histológico del hígado trasplantado, es en muchas ocasiones, difícil pero al mismo tiempo de vital importancia; un aumento de la inmunosupresión especialmente si se aumentan los esteroides, puede agravar el curso de la hepatitis C en el injerto hepático, mientras que una disminución de la inmunosupresión podría agravar el RCA. Para ello es fundamental establecer los parámetros diagnósticos que nos permitan diferenciar de una forma más exacta entre hepatitis C recurrente y RCA. En este sentido, nuestra hipótesis es que con los datos clínicos y patológicos se pueda elaborar un algoritmo que nos permita con más precisión el diagnóstico diferencial entre hepatitis C recurrente y RCA.

### **Objetivo.**

Desarrollar y validar un sistema de algoritmo estratificado basado en las características clínicas y morfológicas en el injerto hepático de los pacientes trasplantados por hepatopatía crónica por VHC, con la intención de optimizar el diagnóstico, para discriminar con precisión entre hepatitis C recurrente y RCA.

## III. Pacientes y métodos

Rechazo celular agudo versus hepatitis C recurrente  
en el trasplante hepático: Aproximación racional clínico-patológica  
mediante un algoritmo de decisión

### III. Pacientes y métodos.

#### Pacientes.

Este es un estudio multicéntrico desarrollado en dos hospitales españoles, el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela (HCUS) y el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA) en Murcia, desarrollado entre enero de 1993 y diciembre del 2006. Durante este período se realizaron 1127 trasplantes hepáticos en ambos centros, de los que 282 (25%) pacientes fueron trasplantados por CH por VHC. En este estudio, se analizaron 288 biopsias hepáticas de 121 pacientes trasplantados por hepatitis C. Este es un estudio retrospectivo que se realizó a partir de una base de datos prospectiva de acuerdo con los criterios establecidos por el Comité de Ética e Investigación de ambos hospitales para el manejo de datos personales.

Los **criterios de inclusión** para el análisis de las biopsias hepáticas fueron:

- (1) presencia de al menos 6 espacios porta y 3 vénulas terminales.
- (2) presencia de al menos 2 hematoxilinas-eosinas en cortes seriados.
- (3) presencia de una sección de tricrómico de Masson.

Los **criterios de exclusión** (n= 161 pacientes) fueron:

- (1) mortalidad temprana (menor de un mes).
- (2) no cumplir los criterios de inclusión.

Las características clínicas de los pacientes estudiados y de los pacientes no incluidos en el trabajo fueron

similares (Tabla 8). La edad media (52 Vs

51 años), el % de hombres (73% Vs 72%) y

la causa de la CH (VHC+alcohol, CHC con

VHC+, VHC+ y enfermedad metabólica),

fue similar entre los pacientes incluidos

en el estudio y los que fueron excluidos.

La supervivencia a 1, 3 y 5 años fue del

84,2%, 77,1% y 56% en los 121 pacientes

estudiados respectivamente, siendo

la supervivencia similar a la de los

	n = 121	n = 161
<b>Hombres (%)</b>	73	72
<b>Edad en el TH (años) (media±DT)</b>	52,1±1,1	51,6±1,0
<b>Cirrosis VHC (%)</b>	45	47
<b>VHC + alcohol (%)</b>	17	15
<b>VHC + cáncer (%)</b>	34	35
<b>VHC + enfermedad metabólica (%)</b>	4	3

**Tabla 8.** Características clínicas de los pacientes estudiados (n = 121) y de los pacientes no incluidos en el estudio (n = 161) en el momento del trasplante.

\* Los datos se expresan como mediana (percentil 25, percentil 75) o media ± desviación típica. No existían diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos. VHC, virus de hepatitis C, TH, trasplante hepático, DT desviación típica.

pacientes no incluidos en el estudio (85,1%, 78,2% y 56,5% respectivamente).

De los 121 pacientes cuyas biopsias hepáticas fueron analizadas la mayoría fueron hombres con genotipo 1b del VHC y más de la mitad de los casos fueron trasplantados por CH por VHC asociado al consumo de alcohol, carcinoma hepatocelular o por enfermedad metabólica. En el momento del estudio, el fármaco inmunosupresor más frecuentemente administrado fue tacrolimus con o sin esteroides.

## **Metodología.**

### **Biopsias hepáticas.**

Las biopsias hepáticas se realizaron cuando las pruebas de función hepática estuvieron alteradas de forma significativa y se realizaron a criterio médico para facilitar el diagnóstico. De las 288 biopsias hepáticas estudiadas, 66 (23%) se realizaron durante el primer mes postrasplante, 84 (29 %) entre el primer mes y el sexto mes, 45 (16%) entre los 6 meses y 1 año y 93 (32%) entre 1 año y 10 años tras el trasplante hepático. El número de biopsias hepáticas osciló entre 1 a 8 biopsias por paciente, con una media de  $2.3 \pm 1.6$  DT. Las biopsias hepáticas se analizaron de forma independiente por 3 patólogos con experiencia en la patología del trasplante hepático. Uno de los patólogos (JMPPM) revisó las preparaciones de los 2 hospitales con el objetivo de diferenciar entre 2 entidades específicas: VHC recurrente y RCA.

#### ***Criterios morfológicos generales para el análisis de las biopsias hepáticas***

Los hallazgos morfológicos observados se definieron con los siguientes criterios: [210, 301, 319].

- a) Agregados linfoides: presencia de simples agregados de células linfoides en cualquier localización del espacio porta.
- b) Endotelitis: la presencia de linfocitos por debajo del endotelio de la vena porta y vena centrolobular.
- c) Hepatitis de interfase: muerte de hepatocitos asociada a inflamación y localizada en la transición entre el tejido conjuntivo del espacio porta y el parénquima adyacente.
- d) Leucocitos polimorfonucleares en el espacio porta: la presencia de 2 o más células polimorfonucleares (tanto neutrófilos como eosinófilos) en el espacio porta.
- e) Esteatosis: la presencia de más del 5% de hepatocitos con esteatosis.

f) Filas de linfocitos: cuando los linfocitos se disponían en fila india en el espacio sinusoidal independientemente de dónde estuviesen localizados en la biopsia.

g) Células polimorfonucleares periféricas: presencia de 2 ó más células polimorfonucleares (tanto neutrófilos como eosinófilos) en la placa limitante de los espacios porta.

h) Infiltrado inflamatorio mixto: presencia de modo conjunto de células polimorfonucleares y linfocitos.

i) Infiltración linfocitaria focal de los conductos biliares: presencia de linfocitos en íntima relación con el epitelio ductal con o sin cambios reactivos del epitelio ductular.

j) Reacción ductular: proliferación de células biliares formando estructuras de tipo ductular dentro del espacio porta.

k) Ductopenia: pérdida de número significativo de conductos biliares interlobulares.

l) Otros aspectos morfológicos: la necrosis, la fibrosis, así como la tumefacción citoplasmática también se tuvieron en cuenta cuando estuvieron presentes.

### ***Criterios morfológicos diferenciales entre RCA y Recurrencia de hepatitis C***

Los criterios utilizados para poder distinguir entre RCA y VHC recurrente se basaron en los criterios originariamente desarrollados para VHB [320, 321]. así como en los diferentes criterios morfológicos ya definidos para RCA [270, 271]. Los criterios que permiten definir, graduar y estadificar las hepatitis crónicas [301], también se tuvieron en consideración así como las diferentes aportaciones ya realizadas a la hora de intentar diferenciar entre ambas entidades [210, 319].

### **RCA**

En el caso del RCA, los infiltrados celulares están localizados en las áreas portales y producen lesión de los conductos biliares y estructuras vasculares. Los tres componentes de la triada diagnóstica son:

1) inflamación portal, que en el inicio es predominantemente mononuclear y posteriormente pasa a ser mixta conforme la enfermedad avanza, aumentando también su intensidad.

2) inflamación venular subendotelial, tanto de las vénulas de los espacios porta como de las vénulas hepáticas terminales. El número de vénulas afectas y la intensidad de la afectación también varía conforme avanza la enfermedad.

3) la lesión e inflamación de los conductos biliares.

Se consideran dos de estas tres características para poder realizar el diagnóstico de RCA [270, 271].

### **Hepatitis C recurrente**

Los criterios morfológicos tenidos en consideración para el diagnóstico de hepatitis C fueron tanto aquellos observados normalmente en una hepatitis aguda como en una hepatitis crónica: desorden lobular, hipertrofia de células de Kupffer, apoptosis de los hepatocitos, linfocitosis sinusoidal, inflamación portal de predominio mononuclear, agregados linfoides, esteatosis macrovacuolar y microvacuolar, colangitis linfocítica y cambios reactivos del epitelio de los conductos biliares, actividad de interfase - actividad necroinflamatoria, actividad ductular, perivenulitis centrolubular, fibrosis sinusoidal y fibrosis portal, colestasis y tumefacción citoplasmática.

Teniendo en cuenta todas estas características morfológicas la distinción no resulta complicada cuando los aspectos que observamos son claramente de un RCA moderado/severo o de una hepatitis C franca. El problema surge cuando el conjunto de características morfológicas que observamos, no definen claramente una entidad y tampoco nos ayudan ni los datos clínicos ni el período postrasplante, ya que sabemos de la rápida evolución que puede llegar a tener la hepatitis C en el paciente trasplantado.

#### ***Consenso clínico-patológico de RCA o Recurrencia de VHC***

Se analizó el historial médico de los pacientes buscando información de los diversos parámetros clínicos y de función hepática: fecha de trasplante hepático, tiempo desde el trasplante hepático hasta la realización de la biopsia, tests hematológicos y de función hepática, genotipo viral, cuantificación del ARN del VHC, tipo de tratamiento proporcionado y seguimiento del paciente. (Tabla 9).

De las 288 biopsias hepáticas estudiadas, se alcanzó un consenso diagnóstico entre clínico y patólogo para el diagnóstico VHC recurrente o de RCA en 214 biopsias. Los criterios para alcanzar el consenso diagnóstico en las 214 biopsias fueron los siguientes:

- 1) RCA: diagnóstico histológico inicial de RCA y respuesta al tratamiento del RCA con bolus de metilprednisolona y/o con incremento de la inmunosupresión de base.
- 2) VHC recurrente: diagnóstico inicial de hepatitis recurrente con respuesta al tratamiento con interferón + ribavirina, así como en aquellos casos en los que aunque no hubo respuesta al tratamiento, se produjo la confirmación clínica o histológica de progresión a hepatitis crónica por el VHC.

En las 74 biopsias donde no hubo consenso diagnóstico entre el patólogo y el clínico, se estudió de modo individual la evolución de cada una de las biopsias con la intención de alcanzar un

diagnóstico clínico e histológico. Posteriormente se aplicó el algoritmo diagnóstico alcanzado a cada una de las 74 biopsias.

### **Análisis estadístico y establecimiento de un algoritmo diagnóstico:**

Las variables continuas se describen en medianas (percentil 25, percentil 75). Para la comparación de las variables entre ambos grupos se utilizaron las pruebas de chi-cuadrado o la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, según procediese. Para encontrar un algoritmo que nos permitiese evaluar si un conjunto de características morfológicas presentaba utilidad para conocer la causa (RCA/recidiva) de la lesión en pacientes trasplantados por VHC, se elaboró, como primer paso un modelo de regresión logística. En este modelo de regresión se introdujeron como variables predictivas todas las características morfológicas anteriormente descritas. Como variable respuesta, se utilizó el diagnóstico clínico de consenso finalmente realizado (RCA/recidiva). Para ello se utilizaron las biopsias de los

<b>Nº de biopsias</b>	<b>Total (n = 214)</b>	<b>VHC Recurrente (n = 157)</b>	<b>RCA (n = 57)</b>	<b>P</b>
Tiempo desde el trasplante hasta BH (días) †	209 (44,583)	359 (150,764)	14 (8,38)	<0,0001
Bilirrubina (mg/dL)	2 (0,1+35)	2,1 (0,3-35)	2,2 (0,2-36)	0,45
ALT (UI/L)	187 (28-557)	191 (28-810)	189 (52-1290)	0,20
AST (UI/L)	147 (9-1615)	145 (35-1615)	146 (9-580)	0,55
Fosfatasa Alcalina (UI/L)	186 (110-356)	178 (124-371)	197 (107-320)	0,46
Eosinófilos periféricos 10 <sup>3</sup> /μL	150 (100-500)	154 (110-550)	158 (112-620)	0,60
Albúmina, g/dL	3,7 (3,4-4,1)	3,8 (3,6-4,3)	3,7 (3,1-4,0)	0,21
Hemoglobina, g/L	12 (11-14)	13 (11-14)	11 (11-14)	0,78
Triglicéridos, mg/dL	136 (87-201)	132 (92-197)	137 (102-205)	0,47
Número de plaquetas (10 <sup>3</sup> )	121 (35-293)	119 (35-293)	121 (71-218)	0,85
Glucosa, mg/dL	103 (84-147)	100 (92-147)	95 (94-147)	0,33
Creatinina, mg/dL	1,4 (0,9-1,8)	1,4 (0,9-1,8)	1,4 (0,9-1,8)	0,54
Genotipo (% 1b)	202 (94%)	154 (98%)	48 (84%)	<0,0001
<b>Inmunosupresión:</b>				
Tracolimus	148 (69%)	112 (98%)	36 (63%)	0,25
Ciclosporina	66 (31%)	45 (30%)	21 (37%)	0,25

†Mediana (percentil 25, percentil 75).

RCA, Rechazo celular agudo; ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; VHC virus de hepatitis C; BH, biopsia hepática.

**Tabla 9.** Características básicas en el momento de la VHC recurrente y de RCA.

pacientes procedentes del HCUS y del HCUVA. Para la selección de las variables se utilizó el procedimiento *stepwise*, teniendo como parámetros de salida del modelo, p-valores superiores a 0,10, y de entrada inferiores a 0,05. De esta forma, las características morfológicas seleccionadas por el modelo de regresión logística fueron: endotelitis, hepatitis de interfase, agregados linfoides y esteatosis. En una segunda fase, se seleccionaron las 214 biopsias hepáticas de las 288 biopsias estudiadas, en las que se había alcanzado un consenso diagnóstico entre clínico y patólogo para el diagnóstico VHC recurrente o de RCA. En una tercera fase, se eligió entre las 214 biopsias pertenecientes a los dos hospitales, y en las que se disponía de un diagnóstico definitivo de RCA o VHC recurrente, una muestra al azar de 114 biopsias (denominada cohorte de derivación), y las 100 restantes biopsias se utilizaron para su validación (cohorte de validación). En las 114 biopsias de la cohorte de derivación se procedió a realizar un análisis de árboles de regresión, en el que se introdujeron las 4 variables morfológicas obtenidas en el modelo de regresión logística, y a las que se añadió el tiempo transcurrido entre el trasplante hepático y la realización de la biopsia. Para este propósito se utilizó el paquete estadístico "rpart" disponible de forma libre en the Comprehensive R Archive Network (CRAN-R) (<http://cran.r-project.org>). Esta metodología, también denominada árboles de clasificación, introduce de forma secuencial aquellas variables que presentan mayor capacidad de discriminación para el diagnóstico de RCA o VHC recurrente. En un primer paso, se introduce la primera variable que aporta la mayor información para constituir el primer nodo; a continuación, partiendo de cada una de las ramas, se introduce la segunda variable, abriendo ramificaciones, y así sucesivamente, hasta que la información aportada por la siguiente variable no es suficiente para constituir un nuevo nodo. Con el objetivo de generar los nodos con la mayor pureza posible se han utilizado los criterios de Gini [322, 323], y para reducir la secuencia de árboles resultantes se ha utilizado un procedimiento de validación cruzada 10-k. Además de la validación cruzada sobre la cohorte de derivación ya descrita, se procedió a una validación "externa" sobre la muestra de las 100 biopsias restantes (cohorte de validación) que no habían entrado en el análisis inicial. Finalmente, sobre estas dos muestras, de forma separada, evaluamos las características del modelo de clasificación obtenido, estimando la prevalencia de hepatitis C recurrente, así como la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo y las razones de verosimilitud. [324]. Los procedimientos usados en el trabajo están en conformidad con la Declaración de Helsinki de 1975.





## IV. Resultados

Rechazo celular agudo versus hepatitis C recurrente  
en el trasplante hepático: Aproximación racional clínico-patológica  
mediante un algoritmo de decisión

## IV. Resultados.

### Resultados globales.

El tiempo medio (percentil 25: p25, percentil 75: p75) desde el trasplante hasta la biopsia hepática fue de 359 días (150-764) en los pacientes con VHC recurrente, mientras que el tiempo medio fue de 14 días (8-38) en aquellos pacientes con RCA. En los pacientes que tuvieron cualquier otra característica diferente de las VHC recurrente o de RCA, el tiempo medio hasta realizar la biopsia hepática fue de 82

	Recurrente HCV (n = 157), %	RCA (n = 57), %	Otros (n = 74), %
Aragados linfoides**	119 (78)	7 (11)	21 (28)
Endotelitis**	15 (10)	53 (86)	10 (14)
Hepatitis de interfase**	111 (73)	22 (36)	7 (10)
PMN en los espacios porta**	20 (13)	52 (84)	18 (24)
Esteatosis**	78 (51)	18 (29)	3 (5)
Linfocitos en fila**	36 (24)	3 (5)	6 (8)
PMN periféricos**	55 (36)	11 (17)	17 (23)
Infiltrados mixtos**	12 (8)	51 (83)	44 (59)
ILFCB (ns)	122 (80)	56 (91)	13 (18)
Neocanículos (ns)	21 (14)	8 (13)	36 (49)
Infiltrados acinares**	131 (86)	30 (48)	36 (49)
Linfocitos**	137 (90)	27 (43)	11 (15)
PMN lobulares**	18 (12)	19 (30)	0 (0)
Endotelitis de vena centrolobular*	3 (2)	8 (13)	00 (00)
Fibrosis**	76 (50)	14 (22)	24 (33)
Necrosis*	46 (30)	32 (52)	23 (31)
Necrosis centroacinar*	21 (14)	19 (30)	19 (26)
Apoptosis*	125 (82)	40 (65)	44 (59)
Colestasis (ns)	36 (24)	22 (35)	24 (33)
Micro-macro**	112 (74)	27 (43)	28 (38)
Balonización*	137 (90)	46 (74)	57 (77)

\* P<0,05, \*\*P<0,001; diferencias estadísticamente significativas para la comparación entre VHC recurrente y RCA.

RCA, rechazo celular agudo; ILFCB, infiltración linfocitaria focal de los conductos biliares; VHC virus de la hepatitis C; ns, no significativo; PMN, leucocitos polimorfonucleares.

**Tabla 10.** Frecuencia de las características morfológicas de los pacientes trasplantados por infección crónica por VHC asociada a cirrosis, en relación con los diagnósticos de VHC recurrente, RCA y otros.

días (30-348) (p=0.000).

De las 214 biopsias hepáticas en las cuales se alcanzó un consenso diagnóstico entre patólogos y clínicos, 73 (23 RCA y 50 VHC recurrente) se realizaron en el HCUS y 141 (34 RCA y 107 VHC recurrente) en el HCUVA. El diagnóstico de las 214 biopsias se basó exclusivamente en los resultados de las biopsias correlacionado con la evolución clínica. Hubo un paciente en el cual una segunda biopsia contradijo el diagnóstico realizado previamente. En este caso el diagnóstico inicial fue de RCA en la biopsia tomada en el día 856 tras el trasplante; posteriormente, se realizó otra biopsia en el día 871 que demostró cambios característicos de VHC recurrente lo que llevó a cambiar el diagnóstico inicial. No se llegó a alcanzar un consenso diagnóstico entre patólogos y clínicos en 74 biopsias hepáticas. Los hallazgos morfológicos más significativos se muestran en la [tabla 10](#).

La media de espacios porta y vénulas hepáticas terminales observada fue de  $6.7 \pm 0.8$  (rango de -8) y 4,1 (rango 3-6) respectivamente. El RCA se caracterizaba inicialmente por la presencia de infiltración linfocitaria ductal, infiltrados inflamatorios mixtos, presencia de células polimorfonucleares en los espacios porta y endotelitis. Sin embargo, la presencia de VHC recurrente se asoció especialmente a la presencia de agregados linfoides portales, hepatitis de interfase y presencia de linfocitos en los espacios porta. En la cohorte de derivación compuesta por 114 biopsias hepáticas la prevalencia de VHC recurrente y de RCA fue del 72% y 28% respectivamente.

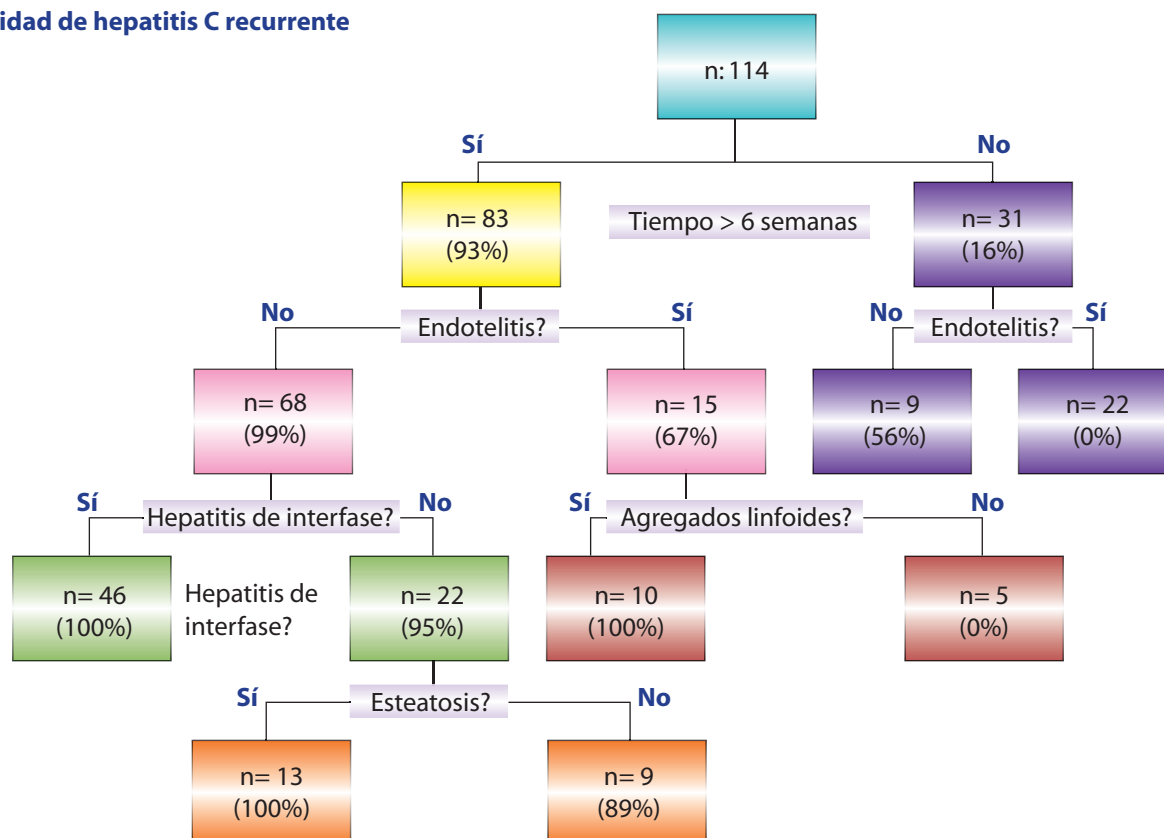
### **Algoritmo estratificado para diferenciar entre Recurrencia de hepatitis C y RCA**

La primera variable que pasó a formar parte del árbol de regresión fue el tiempo desde la realización del trasplante hasta que se realizó la biopsia hepática. Se demostró que 6 semanas era el punto de corte que mejor diferenciaba entre RCA y VHC recurrente. El árbol de decisión diagnóstico (algoritmo) creado, mostró la probabilidad de que el diagnóstico fuese de VHC recurrente con respecto a diferentes variables ([Figura 21](#)). La probabilidad de tener VHC recurrente fue del 93% si el tiempo transcurrido desde la biopsia hepática era mayor de 6 semanas, disminuyendo esta probabilidad al 16% si el tiempo desde la biopsia hepática era menor de 6 semanas. La segunda variable más significativa fue la presencia de endotelitis. En aquellas biopsias hepáticas con endotelitis realizadas dentro de un período inferior a 6 semanas tras el trasplante, la probabilidad de VHC recurrente era del 0% mientras que esta misma probabilidad se incrementaba al 67% en los pacientes en los que la biopsia hepática se realizó dentro del periodo superior a las 6 semanas. En estos casos, si el infiltrado inflamatorio no formaba agregados linfoides, esta probabilidad era del 0%. La ausencia de endotelitis refuerza el diagnóstico de hepatitis C recurrente. En aquellos pacientes en los que la biopsia hepática no mostró endotelitis, la probabilidad de VHC recurrente fue del 99% y 56% respectivamente, dependiendo de si la biopsia hepática se había realizado dentro del período superior o inferior a las 6 semanas tras el trasplante hepático. En estos últimos casos, cuando se observa la presencia de hepatitis de interfase y/o agregados linfoides, la probabilidad de tener VHC recurrente se elevaba al 80%. Sin embargo cuando el tiempo en realizar la biopsia tras el trasplante era inferior a 6 semanas, la presencia endotelitis reduce la probabilidad de VHC recurrente al 0%. La siguiente variable a formar parte del árbol de decisión

diagnóstica fue la presencia de agregados linfoides. Cuando encontramos agregados linfoides y en aquellos pacientes con un tiempo desde el trasplante hepático hasta la biopsia hepática mayor de 6 semanas, la probabilidad de VHC recurrente era el 100%, mientras que si en esta misma situación no estaban presentes los agregados linfoides, la probabilidad era del 0%. De igual modo, la probabilidad de VHC recurrente fue del 100% y de 95% respectivamente dependiendo si había o no hepatitis de interfase. La probabilidad de VHC recurrente era del 100% y 89% respectivamente para aquellos pacientes con o sin esteatosis.

Con el árbol de regresión obtenido, se obtuvo una precisión diagnóstica del 96% y 93% dependiendo si se aplicaba a la cohorte de validación o de derivación respectivamente. En ambos casos se consiguió superar el diagnóstico original del patólogo, que tuvo una precisión diagnóstica del 91% ( $p < 0.05$ ,

### Probabilidad de hepatitis C recurrente



**Figura 21.** Algoritmo diagnóstico para diferenciar la hepatitis C recurrente del RCA en 114 biopsias hepáticas de la cohorte de derivación que tuvieron un TH por infección crónica por VHC asociada a cirrosis. La “n” indica el número de biopsias analizadas en cada una de las circunstancias que se indican en el algoritmo. Los porcentajes entre paréntesis indican la probabilidad de hepatitis C recurrente en cada una de las circunstancias que se definen en el algoritmo.

	Cohorte de derivación	Cohorte de validación	Diagnóstico
	n = 114	n = 100	
Sensibilidad, %	100 (99,4-100)	100 (99,3-100)	94,0 (93,7-94,4)
Especificidad, %	84,4 (82,7-86,1)	76,7 (74,9-78,4)	82,3 (81,6-83,1)
PPV, %	94,2 (93,6-94,9)	90,9 (90,2-91,6)	92,9 (92,5-93,2)
VPP, %	100 (98,1-100)	100 (97,8-100)	85,0 (84,1-85,9)
VPN, %	95,6 (95,1-96,1)	93,0 (92,5-93,5)	90,6 (90,4-90,9)
CP	6,40 (6,37-6,43)	4,29 (4,27-4,30)	5,30 (5,29-5,32)

Consideramos 214 biopsias hepáticas. Se alcanzó un consenso en el diagnóstico de rechazo celular agudo (n= 57) o hepatitis recurrente (n = 157).

Los datos se presentan en porcentajes (intervalo de confianza del 95%).

CP, probabilidad para un resultado del test positivo; VPN, Valor predictivo negativo; VPP, valor predictivo positivo.

**Tabla 11.** Los datos interpretados por un patólogo de la cohorte de derivación, cohorte de validación y diagnóstico, se usaron para determinar la sensibilidad, especificidad y cocientes de probabilidad de detectar hepatitis recurrente.

para ambas comparaciones) (Tabla 11).

De las 74 biopsias en las que no se alcanzó inicialmente consenso diagnóstico entre patólogo y clínico se logró obtener un diagnóstico definitivo clínico-patológico en 51 biopsias. Aun así, el diagnóstico continuó siendo inespecífico en 24 biopsias. De las 51 biopsias donde se alcanzó el diagnóstico, en

	n = 74	Diagnóstico definitivo †	Diagnóstico patológico inicial †	Previsión de VHC
		A / B / C / D	A / B / C	
<b>Tiempo ≥ 6 semanas</b>				
Endotelitis (-)	3	3 / 0 / 0	0 / 0 / 3	100%
<b>Hepatitis de interfase (+)</b>				
Endotelitis (-)	7	7 / 0 / 0	0 / 0 / 7	100%
<b>Hepatitis de interfase (-)</b>				
<b>Esteatosis (+)</b>				
Endotelitis (-)	34	14 / 5 / 14 / 1	0 / 2 / 32	89%
<b>Hepatitis de interfase (-)</b>				
<b>Esteatosis (-)</b>				
Endotelitis (+)	7	0 / 6 / 1	0 / 1 / 6	0%
<b>Agregados linfoides (-)</b>				
<b>Tiempo &lt; 6 semanas</b>				
Endotelitis (-)	21	10 / 2 / 9	0 / 0 / 21	56%
Endotelitis (-)	2	0 / 2 / 0	0 / 1 / 1	0%

† (A) VHC recurrente, (B) rechazo celular agudo, (C) indeterminado, (D) rechazo crónico.

**Tabla 12.** Diagnóstico definitivo de las 74 biopsias en las que no se alcanzó inicialmente un consenso diagnóstico.

34 biopsias (24 biopsias dentro de un período > de 6 semanas y 10 biopsias dentro del período < 6 semanas) el diagnóstico fue de VHC recurrente, RCA en 15 biopsias (11 biopsias dentro del período > 6 semanas y 4 biopsias dentro de un período < a 6 semanas) y se observó el diagnóstico de rechazo crónico en un caso ([Tabla 12](#)).

Si el algoritmo diagnóstico creado en el estudio se hubiese aplicado en estas 74 biopsias, hubiésemos obtenido los siguiente resultados: de las 51 biopsias realizadas dentro de un período superior a 6 semanas postrasplante, en 24 hubiese habido una progresión a hepatitis recurrente y el diagnóstico se hubiese confirmado en todas ellas si se hubiese aplicado el algoritmo. En las 23 biopsias realizadas en período inferior a 6 semanas postrasplante también se hubiese acertado el diagnóstico en todas ellas si se hubiese aplicado el algoritmo diagnóstico.

## V. Discusión

Rechazo celular agudo versus hepatitis C recurrente  
en el trasplante hepático: Aproximación racional clínico-patológica  
mediante un algoritmo de decisión



## V. Discusión

El principal hallazgo de este estudio fue la construcción de un sencillo sistema de algoritmo que demuestra una alta precisión diagnóstica para distinguir entre VHC recurrente y RCA después del TH. Siguiendo este algoritmo se pudo obtener una precisión diagnóstica en el diagnóstico de hepatitis C recurrente del 96% y 93% respectivamente para la cohorte de derivación y validación. En este algoritmo diagnóstico, el tiempo desde el trasplante hasta la realización de la biopsias (menor o mayor de 6 semanas) y la presencia de endotelitis, fueron los datos más específicos a la hora de distinguir entre VHC recurrente y RCA. La hepatitis C recurrente no suele ser una causa frecuente de disfunción del injerto en las primeras semanas tras el trasplante, pero ocasionalmente se pueden observar casos de VHC recurrente dentro del período comprendido desde los 10 a 14 días postrasplante [178, 200]. Aunque la viremia del VHC es universal en el período postrasplante [178], entre el 30 a 50% de los pacientes con un período corto de seguimiento pueden mostrar viremia sin tener enfermedad. También se ha observado que los niveles de viremia no se correlacionan con los hallazgos histológicos [325, 326]. Existe una amplia variación de los niveles de viremia del VHC entre pacientes, con amplias fluctuaciones de los niveles entre pacientes y también se produce una gran superposición de valores entre pacientes con diferentes diagnósticos histopatológicos, especialmente en los períodos iniciales tras el trasplante hepático [307]. Sin embargo, hay varios estudios en los que se ha observado que los niveles elevados de ARN del VHC en períodos iniciales tras el trasplante hepático, guardaban relación con episodios de hepatitis colestásica [326-328]. El diagnóstico de hepatitis C recurrente debe basarse en hallazgos histológicos. La hepatitis aguda, generalmente se desarrolla entre los 1 y 4 meses postrasplante, mientras que los cambios de hepatitis crónica se observan generalmente entre los 2 y 3 meses postrasplante [201, 202, 326]. Por el contrario, la mayoría de los casos de RCA, se producen dentro de los primeros 30 días tras el trasplante hepático, con una media de 8 días [210, 319, 329]. En nuestro estudio, 6 semanas fue el tiempo medio que de una manera más fiable distinguió el tiempo de aparición entre hepatitis C recurrente y RCA. No obstante, la distinción entre hepatitis C recurrente y RCA depende mucho de la valoración de la biopsia hepática por parte del patólogo. En diversos estudios se ha podido documentar de una manera prospectiva que la interpretación de las biopsias hepáticas del injerto, es un método útil, que de una forma rápida (6-7 horas) y precisa, permite distinguir VHC recurrente de RCA, incluso bajo condiciones difíciles [307]. Según los

---

criterios de Banff [270] y los criterios de otros muchos investigadores [269, 285, 300], las muestras de biopsia hepática con RCA, generalmente presentan inflamación portal, inflamación de los conductos biliares e inflamación subendotelial de las ramas venosas de los espacios porta y/o de las vénulas hepáticas terminales. En nuestro algoritmo, la endotelitis se identificó como la característica morfológica que de un modo más específico permitía excluir VHC recurrente. En nuestro estudio la presencia de endotelitis, junto con un tiempo desde el TH hasta la realización de la biopsia menor de 6 semanas, definitivamente excluía la presencia VHC recurrente. A pesar de los resultados obtenidos, estos datos deben tomarse con cautela, ya que pueden existir circunstancias en las que la presencia de endotelitis podría acompañar situaciones de VHC recurrente, especialmente si el componente inflamatorio es más intenso. La venulitis centrolobular se puede observar en otras entidades además de en el RCA, tales como las hepatitis virales, la toxicidad por fármacos, enfermedades autoinmunes, lesión de tipo isquémico y VHC rica en células plasmáticas [210]. Pero en el contexto de un trasplante hepático reciente, puede ayudar a distinguir de una manera más precisa el RCA [330]. Otros hallazgos histológicos menos relevantes para poder confirmar la presencia de VHC recurrente fueron la presencia de agregados linfoides, hepatitis de interfase y esteatosis.

El diagnóstico diferencial entre VHC recurrente y RCA puede ser confuso en ocasiones [307]. Desde hace más de una década se han intentado implementar las directrices para reconocer los diferentes síndromes de forma individual [320, 331]. El diagnóstico diferencial entre VHC recurrente y RCA es complicado pero de gran importancia, porque el tratamiento de ambas entidades es completamente diferente e incluso opuesto. El tratamiento de VHC recurrente precisa de tratamiento con antivirales así como una reducción de la inmunosupresión mientras que esta actitud sería perjudicial en el caso del RCA, especialmente cuando se usa interferón. La hepatitis C recurrente y el RCA son situaciones que en algunas ocasiones pueden coexistir y en estas circunstancias, la decisión sobre realizar un aumento de la inmunosupresión se puede realizar cuando hay signos histológicos en los que predomina el RCA de una manera clara [307]. En nuestro estudio no se observaron casos que de un modo concomitante presentasen RCA y VHC recurrente, ni hepatitis autoinmune postrasplante o hepatitis por VHC con abundancia en células plasmáticas. Aquellos casos que carecían de un diagnóstico específico fueron casos con una muy baja expresión histológica como para permitir considerar un diagnóstico simultáneo de VHC recurrente y RCA. En las 74 biopsias donde no hubo un consenso diagnóstico clínico-anatomopatológico, se observó que la probabilidad de obtener un

diagnóstico definitivo y seguro se incrementó tras aplicar el algoritmo diagnóstico, tanto si el algoritmo diagnóstico se aplicaba para las biopsias realizadas antes o después de las 6 semanas tras el trasplante. En estos casos que son especialmente difíciles de diagnosticar, el uso del algoritmo en un contexto clínico-anatomopatológico adecuado, puede ser una importante herramienta de predicción diagnóstica. Aun así, estos pacientes deberían de ser seguidos muy de cerca y sometidos a una nueva biopsia en el caso que los test bioquímicos de lesión hepática continuasen alterados. Estos casos, generalmente se asocian a unos valores de función hepática que son superiores a los encontrados solamente en situación de VHC o con RCA [237, 307]. Sólo se debería de considerar un aumento de la inmunosupresión cuando se asegure que el RCA es la principal causa de lesión hepática. Por el contrario, una inmunosupresión adicional, puede empeorar de modo muy significativo una situación de hepatitis o incluso desencadenar un proceso de hepatitis fibrosante colestática. En la mayoría de los estudios se ha observado que todos los errores se producen siempre de la misma manera, al conceder demasiada importancia a los hallazgos de RCA leve en el contexto de una VHC recurrente [307, 332]. Se ha comprobado que de un modo general, independientemente de la pauta de inmunosupresión adoptada, hay una tendencia a sobrediagnosticar RCA en el contexto de una VHC recurrente, especialmente si los hallazgos histopatológicos no están del todo claros [332, 333]. Este estudio tiene algunas limitaciones: fue un estudio retrospectivo y muchas de las biopsias hepáticas fueron excluidas porque no reunían unos criterios mínimos para poder realizar un diagnóstico histológico. También, todas las biopsias que tenían un diagnóstico diferente de VHC recurrente o de RCA fueron excluidas a la hora de realizar el algoritmo diagnóstico, a pesar de que algunos de estos casos progresaron hacia VHC recurrente. Sin embargo, un hecho que refuerza al estudio es el hecho que el trabajo se ha realizado entre dos hospitales localizados en puntos geográficamente opuestos en España, en los que se han utilizado protocolos de manejo clínico similares, así como los mismos criterios a la hora de establecer un consenso anatomo-clínico. Otro aspecto que le da fuerza al estudio es el hecho de que se realizó una validación del algoritmo en biopsias diferentes de aquellas utilizadas para construir el árbol de decisión diagnóstica.

Los hallazgos histológicos analizados en nuestro estudio, están bien reconocidos en la literatura médica tanto para el diagnóstico de VHC recurrente como de RCA. Sin embargo, dado el solapamiento que puede existir entre diferentes variables histológicas, cuando estas son analizadas de un modo secuencial,

---

permiten la elaboración de un sistema algoritmo que se convierte en una herramienta rápida y fácil a la hora de emitir un diagnóstico. Aunque el diagnóstico diferencial entre VHC recurrente y RCA debe basarse en la opinión de patólogos con experiencia en patología del trasplante, este modelo permite una buena correlación clínico-patológica que permanece como el verdadero *gold estándar* a la hora de realizar la diferenciación entre VHC recurrente y RCA. Anteriormente otros autores utilizaron la evolución del paciente como método para poder evaluar la exactitud de los diagnósticos histopatológicos [307]. Independientemente de la importancia estadística de este modelo, la relevancia clínica del modelo radica en que puede ser una herramienta de ayuda para el diagnóstico, tanto a patólogos que no son expertos en patología del trasplante como a aquellos patólogos con menos experiencia, ayudando a simplificar la realización del diagnóstico.



## VI. Conclusiones

Rechazo celular agudo versus hepatitis C recurrente  
en el trasplante hepático: Aproximación racional clínico-patológica  
mediante un algoritmo de decisión



## **VI. Conclusiones**

**1.** En los pacientes trasplantados de hígado, un modelo de algoritmo estratificado basado en el tiempo desde el trasplante y en diversas características histológicas del injerto hepático, permite establecer con gran precisión el diagnóstico diferencial entre hepatitis C recurrente y rechazo celular agudo.

**2.** La característica morfológica más significativa para distinguir entre hepatitis C recurrente y rechazo celular agudo fue la presencia o no de endotelitis.

**3.** En las biopsias hepáticas de los pacientes con trasplante hepático sin consenso diagnóstico clínico-patológico, la aplicación del algoritmo encontrado aumentó las posibilidades del diagnóstico diferencial entre hepatitis C recurrente y rechazo celular agudo.





## VII. Bibliografía

Rechazo celular agudo versus hepatitis C recurrente  
en el trasplante hepático: Aproximación racional clínico-patológica  
mediante un algoritmo de decisión

## VII. Bibliografía

- 1 **Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M.** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-born non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
- 2 **Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo QL.** Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 1991; 14: 381-388.
- 3 **Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM.** Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004; 39: 5-19.
- 4 **Brass V, Moradpour D, Blum HE.** Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 update. *Int J Med Sci* 2006; 3: 29-34.
- 5 **Ogata N, Alter HJ, Miller RH, Purcell RH.** Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1991; 88: 3392-3396.
- 6 **Bukh J, Miller R, Purcell R.** Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995; 15: 41-63.
- 7 **Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R et al.** Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992; 66: 3225-3229.
- 8 **Domingo E, Menendez-Arias L, Quinones-Mateu ME, Holguin A, Gutierrez-Rivas M, Martínez MA, et al.** Viral quasispecies and the problem of vaccine-escape and drug-resistant mutants. *Progress in Drug Research* 1997; 48: 99-128.
- 9 **Farci P.** New insights into the HCV quasispecies and compartmentalization. *Semin Liver Dis.* 2011; 31: 356-374.
- 10 **Higashi Y, Kakumu S, Yoshioka K, Wakita T, Mizokami M, Ohba K, et al.** Dynamic of genome change in the E2/NS1

---

*region of hepatitis C virus in vivo. Virology* 1993; 197: 659-668.

11 **Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, Hall JE, Mason TJ, Saracco G, et al.** Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3468-3472.

12 **Taniguchi S, Okamoto H, Sakamoto M, Kojima M, Tsuda F, Tanaka T, et al.** A structurally flexible and antigenically variable N-terminal domain of the hepatitis C virus E2/NS1 protein: implication for an escape from antibody. *Virology* 1993; 195: 297-301.

13 **Miura M, Maekawa S, Takano S, Komatsu N, Tatsumi A, Asakawa Y et al.** Deep-sequencing analysis of the association between the quasispecies nature of the hepatitis C virus core region and disease progression. *J Virol* 2013; 87: 12541-12551.

14 **Quer J, Esteban JL, Cos J, Saudela S, Ocana L, Martell M et al.** Effect of bottlenecks on evolution of the nonstructural protein 3 gene of hepatitis C virus during sexually transmitted acute resolving infection. *J Virol* 2005; 24: 15131-15141.

15 **Quer J, Hershey CL, Domingo E, Holland JJ, Novella IS.** Contingent neutrality in competing viral populations. *J Virol* 2001; 75: 7315-7320.

16 **Escarmis C, Davila M, Domingo E.** Multiple molecular pathways for fitness recovery of an RNA virus debilitated by operation of Muller's ratchet. *J Mol Biol* 1999; 285: 495-505.

17 **Novella IS.** Negative effect of genetic bottlenecks on the adaptability of vesicular stomatitis virus. *J Mol Biol* 2004; 336: 61-67.

18 **Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Kurai K, Iizuka H, Machida A, et al.** Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolate for conserved and divergent regions. *J Gen Virol* 1991; 72: 2697-2704.

19 **Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, Mc Omish F, Irvine B, et al.** Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of sotypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993; 74: 2391-2399.

20 **Simmonds P, Alberti A, Alter H, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, et al.** A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994; 19: 1321-1324.

21 **Andre P, Perlemuter G, Budkowska A, Bréchet C, Lotteau V.** Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 93-104.

22 **Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, et al.** Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. 2014 Jan; 59: 318-27.

23 **Annual report of the U.S. Scientific Registry for Transplant Recipients and the Organ Procurement and Transplantation Network-Transplant Data: 1988-1994.** Richmond VA, United Network for Organ Sharing and the Division of Organ Transplantation, Bureau of Health Resources Dev.

24 **The European Liver Transplant Registry Report.** Villejuif: Hôpital Paul Brousse, December 1994.

25 **Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG et al.** Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2015; 61: 77-87.

26 **Lau JYN, Davis GL, Prescott LE, Maertens G, Lindsay KL, Quian K, Hepatitis Interventional Therapy Group, et al.** Distribution of hepatitis C virus genotypes determined by line probe assay in patients with chronic hepatitis C seen at tertiary referral centers in the United States. *Ann Intern Med* 1996; 124: 868-876.

27 **Pol S, Thiers V, Nousbaum JB, Legendre C, Berthelot P, Kreis H, et al.** The changing prevalence of hepatitis c virus genotypes: evidence in hemodialyzed patients and kidney recipients. *Gastroenterology* 1995; 108: 581-583.

- 
- 28 **Brechot C.** *Hepatitis C virus genetic variability: clinical implications.* Am J Gastroenterol 1994; 89: S41-S47.
- 29 **Pozzato G, Kaneko S, Moretti M, Croc  LS, Franzin F, Unoura M, et al.** *Different genotypes of hepatitis C virus are associated with different severity of chronic liver disease.* J Med Virol 1994; 43: 291-296.
- 30 **Bruno S, Sillini E, Crosignani A, Borzio F, Leandro G, Bono F, et al.** *Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study.* Hepatology 1997; 25: 754-758.
- 31 **Mahaney K, Tedeschi V, Maertens G, Di Bisceglie AM, Vergalla J, Hoofnagle JH, et al.** *Genotypic analysis of Hepatitis C Virus in American Patients.* Hepatology 1994; 20: 1405-1411.
- 32 **Benvegn  L, Pontisso P, Cavaletto D, Noventa F, Chemello L, Alberti A.** *Lack of correlation between hepatitis C virus genotypes and clinical course of hepatitis C virus-related cirrhosis.* Hepatology 1997; 25: 211-215.
- 33 **Rehermann B.** *Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells.* Nat Med 2013; 19: 859-868.
- 34 **Ball JK, Tarr AW, McKeating JA.** *The past, present and future of neutralizing antibodies for hepatitis C virus.* Antiviral Res 2014; 105: 100-111.
- 35 **Lindenbach BD, Rice CM.** *The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly.* Nat Rev Microbiol 2013; 11: 688-700.
- 36 **Bartosch B, Bukh J, Meunier JC, Granier C, Engle RE, Blackwelder WC, et al.** *In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes.* Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 14199-14204.
- 37 **Wieland S, Makowska Z, Campana B, Calabrese D, Dill MT, Chung J, et al.** *Simultaneous detection of hepatitis C virus and interferon stimulated gene expression in infected human liver.* Hepatology 2014; 59: 2121-2130.

- 38 **Horner SM, Gale M.** Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. *Nat Med* 2013; 19: 879-888.
- 39 **Liu L, Fisher BE, Thomas DL, Cox AL, Ray SC.** Spontaneous clearance of primary acute hepatitis C virus infection correlated with high initial viral RNA level and rapid HVR1 evolution. *Hepatology* 2012; 55: 1684-1691.
- 40 **Kuo G, Choo Q-L, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, et al.** An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244: 362-364.
- 41 **Jeffers LJ, Hasan F, De Medina M, Reddy R, Parker T, Silva M, et al.** Prevalence of antibodies to hepatitis C virus among patients with cryptogenic chronic hepatitis and cirrhosis. *Hepatology* 1992; 15: 187-190.
- 42 **Havens WP JR.** Viral hepatitis: multiple attacks in a narcotic addict. *Ann Intern Med* 1956; 44: 199-203.
- 43 **Craske J, Dilling N, Stern D.** An outbreak of hepatitis associated with intravenous injection of factor-VIII concentrate. *Lancet* 1975; 2: 221-223.
- 44 **Krugman S, Giles JP, Hammond J.** Infectious hepatitis: evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *JAMA* 1967; 200: 365-373.
- 45 **Blumberg BS, Gerstley BIS, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI.** A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med* 1967; 66: 924-931.
- 46 **Dane DS, Cameron CH, Briggs M.** Virus-like particles in serum of patients with Australian-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1970; 1: 695-698.
- 47 **Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH.** Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science* 1973; 182: 1026-1028.
- 48 **Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV.** Transfusion-associated hepatitis not due to viral

---

hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975;292: 767-770.

49 **Jové J, Sánchez-Tapias JM, Bruguera M, Mas A, Costa J, Barrera JM, et al.** Post-transfusional vs. sporadic non-A, non-B chronic hepatitis. A clinico-pathological and evolutive study. *Liver* 1988;8: 42-47.

50 **Bradley DW, Maynard JE, Popper H, Ebert JW, Cook EH, Fields HA, et al.** Persistent non-A, non-B hepatitis in experimentally infected chimpanzees. *J Infect Dis.* 1981; 143: 210-218.

51 **Lavanchy D.** Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17: 107-115.

52 **World Health Organization.** *Hepatitis C Weekly Epidemiol Rec* 1997;72: 65-69.

53 **Cornberg M, Razavi HA, Alberti A, Bernasconi E, Buti M, Cooper C, et al.** A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. *Liver Int* 2011;31: 30-60.

54 **Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla D-C, Roudot-Thoraval F.** *The burden of liver disease in Europe, a review of available epidemiological data.* Geneva: European Association for the Study of the Liver; 2013. [www.easl.eu](http://www.easl.eu).

55 **Center for Disease Control and Prevention.** *CDC Health Information for International Travel 2014.* New York: Oxford University Press; 2014. Available at: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2014/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/hepatitis-c>. Accessed February 8, 2014.

56 **Montes Martínez I, Agulla Budino A.** Prevalence of antibodies against hepatitis A, B, C and E viruses in the rural child population in Northern Extremadura. *An Esp Pediatr* 1996; 45: 133-136.

57 **Martínez Pérez JA, Gomeno Fernández C, González Praetorius A, Gascuena Luengo M, Calvo Orduna MJ, Caballero Moreno L.** Seroprevalence of three types of hepatotropic virus in a population of adolescents of the province of Guadalajara. *Rev Esp Salud Pública* 2001; 75: 151-157.



58 **Esteban JI, Sauleda S, Quer J.** *The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe.* J Hepatol 2008; 48: 148-162.

59 **Murphy DG, Sablon E, Chamberland J, Fournier E, Dandavino R, Tremblay CL.** *Hepatitis C virus genotype 7, a new genotype originating from central Africa.* Journal of clinical microbiology 2015; 53: 967-972,

60 **ChaKE, Talal AH, Sherman KE, Schiff ER and Saab S.** *Hepatitis C virus infection in USA: an estimate of true prevalence.* Liver Int 2011; 31: 1090-1101.

61 **Martin NK, Vickerman P, Foster GR, Hutchinson SJ, Goldberg DJ, Hickman M.** *Can antiviral therapy for hepatitis C reduce the prevalence of HCV among injecting drug user populations? A modeling analysis of its prevention utility.* J Hepatol 2011; 54: 1137-1144.

62 **Van de Laar TJ, Matthews GV, Prins M, Danta M.** *Acute hepatitis C in HIVinfected men who have sex with men: an emerging sexually transmitted infection.* AIDS 2010; 24: 1799-1812.

63 **Carol Stanciu, Anca Trifan.** *Hepatitis C Virus Treatment Revolution: Eastern European Story.* Hepat Mon. 2015 July; 15: e28969.

64 **Chevaliez S, Pawlotsky JM.** *Diagnosis and management of chronic viral hepatitis: antigens, antibodies and viral genomes.* Best Pract Res Clin Gastroenterol 2008; 22: 1031-1048.

65 **Kamili S, Drobeniuc J, Araujo AC, Hayden TM.** *Laboratory diagnostics for hepatitis C virus infection.* Clin Infect Dis 2012; 55: S43-S48.

66 **Mosley J, Operskalski E, Tobler L, Andrews W, Phelps B, Dockter J, et al.** *Viral and host factors in early hepatitis C virus infection.* Hepatology 2005; 42: 86-92.

67 **Farci P, Alter H, Wong D, Miller R, Shih J, Jett B, et al.** *A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B*

---

hepatitis. *N Engl J Med* 1991; 325: 98-104.

68 **Cox A, Netski D, Mosbrugger T, Sherman S, Strathdee S, Ompad D, et al.** Prospective evaluation of community-acquired acute-phase hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 2005; 1: 951-958.

69 **Deterding K, Wiegand J, Gruner N, Hahn A, Jackel E, Jung M, et al.** The German Hep-Net acute hepatitis C cohort: impact of viral and host factors on the initial presentation of acute hepatitis C virus infection. *Z Gastroenterol* 2009; 47: 531-540.

70 **Hoofnagle J.** Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 1997; 26: 15S-20S.

71 **Orland JR, Wright TL, Cooper S.** Acute hepatitis C. *Hepatology*, 2001; 33: 321-327.

72 **EASL.** EASL clinical practice guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2011; 55: 245-64.

73 **Grebely J, Prins M, Hellard M, Cox AL, Osburn WO, Lauer G, et al.** Hepatitis C virus clearance, reinfection, and persistence, with insights from studies of injecting drug users: towards a vaccine. *Lancet Infect Dis* 2012; 12: 408-414.

74 **Thein H, Yi Q, Dore G, Krahn M.** Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and metaregression. *Hepatology* 2008; 48: 418-431.

75 **John-Baptiste A, Krahn M, Heathcote J, Laporte A, Tomlinson G.** The natural history of hepatitis C infection acquired through injection drug use: metaanalysis and meta-regression. *J Hepatol* 2010; 53: 245-251.

76 **Yang JD, Roberts LR.** Hepatocellular carcinoma: a global view. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 448-458.

77 **Loomba R, Rivera M, McBurney R, Park Y, Haynes-Williams V, Rehermann B, et al.** The natural history of acute hepatitis C: clinical presentation, laboratory findings and treatment outcomes. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 33: 559-65.

78 **Wiegand J, Buggisch P, Boecher W, Zeuzem S, Gelbmann C, Berg T, et al.** Early monotherapy with pegylated interferon alpha-2b for acute hepatitis C infection: the HEP-NET acute-HCV-II study. *Hepatology* 2006; 43: 250-256.

79 **Santantonio T, Wiegand J, Gerlach JT.** Acute hepatitis C: current status and remaining challenges. *Journal of Hepatology* 2008; 49: 625-633.

80 **Bakr I, Rekacewicz C, El Hosseiny M, Ismail S, El Daly M, El-Kafrawy S, et al.** Higher clearance of hepatitis C virus infection in females compared with males. *Gut* 2006; 55: 1183-1187.

81 **Rao H, Sun D, Jiang D, Yang R, Guo F, Wang J, et al.** IL28B genetic variants and gender are associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2012; 19: 173-181.

82 **Micallef J, Kaldor J, Dore G.** Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *J Viral Hepat* 2006; 13: 34-41.

83 **Wang C, Krantz E, Klarquist J, Krows M, McBride L, Scott E, et al.** Acute hepatitis C in a contemporary US cohort: modes of acquisition and factors influencing viral clearance. *J Infect Dis* 2007; 196: 1474-1482.

84 **Rehermann B.** Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Inves* 2009; 119: 1745-1754.

85 **Alter G, Jost S, Rihn S, Reyor LL, Nolan BE, Ghebremichael M, et al.** Reduced frequencies of NKp30+NKp46+, CD161+, and NKG2D+NK cells in acute HCV infection may predict viral clearance. *J Hepatol* 2011; 55: 278-288.

86 **Stegmann KA, Bjorkstrom NK, Ciesek S, Lunemann S, Jaroszewicz J, Wiegand J, et al.** Interferon alpha-Stimulated Natural Killer Cells From Patients With Acute Hepatitis C Virus (HCV) Infection Recognize HCV-Infected and Uninfected Hepatoma Cells via DNAX accessory molecule-1. *J Infect Dis* 2012; 205: 1351-1362.

87 **Seeff L, Hoofnagle J.** National institutes of health consensus development conference: management of hepatitis C:

---

2002. *Hepatology* 2002; 36: S1-2.

88 **Seef LB, Hollinger FB, Alter HJ, Wright EC, Cain CMB, Buskell ZJ, et al.** Long-term mortality and morbidity of transfusion-associated non-A, non-B, and type C hepatitis: a National Heart, Lung, and Blood Institute collaborative study. *Hepatology* 2001; 33: 455-463.

89 **Villano SA, Vlahov D, Nelson KE, Cohn S, Thomas DL.** Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. *Hepatology* 1999; 29: 908-914.

90 **Vogt M, Lang T, Frósner G, Klingler C, Sendl A, Zeller A, et al.** Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood-donor screening. *N Engl J Med* 1999; 341: 866-870.

91 **Ge D, Fellay J, Thompson A, Simon J, Shianna K, Urban T, et al.** Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; 461: 399-401.

92 **Alberti A, Noventa F, Benvegnú L, Boccato S, Galia A.** Prevalence of liver disease in a population of asymptomatic persons with hepatitis C virus infection. *Ann Intern Med* 2002; 137: 961-965.

93 **Conry-Cantilena C, VanRaden M, Gible J, Melpolder J, Shakil AO, Viladomiu L, et al.** Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1996; 334: 1691-1696.

94 **Arain SA, Yaeesh S, Meo SA, Jamal Q.** Serum alanine aminotransferase has limited predictive value for liver disease in chronic hepatitis C. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014; 18: 2332-2336.

95 **Buket CA, Ay e A, Selçuk K, Süleyman Ö, Emel SÇ.** Comparison of HCV core antigen and anti-HCV with HCV RNA results. *Afr Health Sci* 2014; 14: 816-820.

96 **Cacoub P, Poynard T, Ghillani P, Charlotte F, Olivi M, Piette J, et al.** Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis

C. MULTIVIRC Group. Multidepartment Virus C. Arthritis Rheum 1999; 42: 2204-2212.

97 **Zignego A, Ferri C, Pileri S, Caini P, Bianchi F.** Extrahepatic manifestations of Hepatitis C Virus infection: a general overview and guidelines for a clinical approach. Dig Liver Dis 2007; 39: 2-17.

98 **Sene D, Limal N, Cacoub P.** Hepatitis C virus-associated extrahepatic manifestations: a review. Metab Brain Dis 2004; 19: 357-381.

99 **Pischke S, Cornberg M, Manns M.** Hepatitis associated cryoglobulinemia. Internist Berl 2008; 49: 297-304.

100 **Vigano M, Lampertico P, Rumi M, Folli C, Maggioni L, Morabito A, et al.** Natural history and clinical impact of cryoglobulins in chronic hepatitis C: 10-year prospective study of 343 patients. Gastroenterology 2007; 133: 835-842.

101 **White D, Ratziu V, El-Serag H.** Hepatitis C infection and risk of diabetes: a systematic review and meta-analysis. J Hepatol 2008; 49: 831-844.

102 **Veldt BJ, Chen WD, Heathcote EJ, Wedemeyer H, Reichen J, Hofmann WP, et al.** Increased risk of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C cirrhosis and diabetes mellitus. Hepatology 2008; 47: 1856-1862.

103 **Mostafa A, Mohamed M, Saeed M, Hasan A, Fontanet A, Godsland I, et al.** Hepatitis C infection and clearance: impact on atherosclerosis and cardiometabolic risk factors. Gut 2010; 59: 1135-1140.

104 **Weissenborn K, Krause J, Bokemeyer M, Hecker H, Schuler A, Ennen J, et al.** Hepatitis C virus infection affects the brainevidence from psychometric studies and magnetic resonance spectroscopy. J Hepatol 2004; 41: 845-851.

105 **Adinolfi LE, Nevola R, Lus G, Restivo L, Guerrera B, Romano C et al.** Chronic hepatitis C virus infection and neurological and psychiatric disorders: An overview. World J Gastroenterol 2015; 28; 21: 2269-2280.

106 **Seeff LB.** Natural history of hepatitis C. Hepatology 1997; 26: 21S-28S.

- 107 **Sangiovanni A, Del Ninno E, Fasani P, De Fazio C, Ronchi G, Romeo R, et al.** *Increased survival of cirrhotic patients with a hepatocellular carcinoma detected during surveillance.* *Gastroenterology* 2004; 126: 1005-1014.
- 108 **Benvegnù L, Gios M, Boccato S, Alberti A.** *Natural history of compensated viral cirrhosis: a prospective study on the incidence and hierarchy of major complications.* *Gut* 2004; 53: 744-749.
- 109 **D'Amico G, García-Tsao G, Pagliaro L.** *Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies.* *J Hepatol.* 2006; 44: 217-231.
- 110 **Poynard T, Bedossa P, Opolon P.** *Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups.* *Lancet* 1997; 349: 825-832.
- 111 **Butt AA, Yan P, Lo Re V 3rd, Rimland D, Goetz MB, Leaf D et al.** *Liver fibrosis progression in hepatitis C virus infection after seroconversion.* *JAMA Intern Med.* 2015; 175: 178-185.
- 112 **Pawlotsky JM.** *Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease.* *Trends Microbiol,* 2004; 12: 96-102 (El-Serag HB. *Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States.* *Hepatology* 2002; 36: S74-S83.
- 113 **Perz J, Armstrong G, Farrington L, Hutin Y, Bell B.** *The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide.* *J Hepatol* 2006; 45: 529-538.
- 114 **Lee DH, Jamal H, Regenstein FG, Perrillo RP.** *Morbidity of chronic hepatitis C as seen in a tertiary care medical center.* *Dig Dis Sciences* 1997; 42: 186-191.
- 115 **Fattovich G, Giustina G, Degos F, Tremolada F, Diodati G, Almasio P, et al.** *Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients.* *Gastroenterology* 1997; 112: 463-472.
- 116 **Hu KQ, Tong MJ.** *The long-term outcomes of patients with compensated hepatitis C virus-related cirrhosis and history of parenteral exposure in the United States.* *Hepatology* 1999; 29: 1311-1316.

117 **Locasciulli A, Testa M, Pontisso P, Benvegnú L, Fraschini D, Corbetta A, et al.** Prevalence and natural history of hepatitis C infection in patients cured of childhood leukemia. *Blood* 1997; 90: 4628-4633.

118 **Poynard T, Mathurin P, Lai CL, et al.** A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2003; 38: 257-265.

119 **Svrtlih N, Jevtovic D, Simonovic J, Delic D, Dokic L, Gvozdenovic E, et al.** Older age at the time of liver biopsy is the important risk factor for advanced fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 2324-2327.

120 **Zarski J, Mc Hutchison J, Bronowicki J, Sturm N, García-Kennedy R, Hodaj E, et al.** Rate of natural disease progression in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2003; 38: 307-314.

121 **Gordon SC, Bayati N, Silverman AL.** Clinical outcome of hepatitis C as a function of mode of transmission. *Hepatology* 1998; 28: 562-567.

122 **Harris HE, Ramsay ME, Andrews N, Eldridge KP** on behalf of the HCV National Register Steering Group. Clinical course of hepatitis C virus during the first decade of infection: cohort study. *BMJ* 2002; 324: 450-453.

123 **Yasuda M, Shimizu I, Shiba M, Ito S.** Suppressive effects of estradiol on dimethylnitrosamine-induced fibrosis of the liver in rats. *Hepatology* 1999; 29: 719-727.

124 **Roudot-Thoraval F, Bastie A, Pawlotsky JM, Dhumeaux D,** and the Study Group for the Prevalence and the Epidemiology of Hepatitis C Virus. Epidemiological factors affecting the severity of hepatitis C virus-related liver disease: a french survey of 6,664 patients. *Hepatology* 1997; 26: 485-490.

125 **Minola E, Prati D, Suter F, Maggiolo F, Caprioli F, Sonzogni A, et al.** Age at infection affects the long-term outcome of transfusion-associated chronic hepatitis C. *Blood* 2002; 99: 4588-4591.

- 
- 126 **Tong MJ, El-Farra NS, Reikes AR, Co RL.** *Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C.* N Engl J Med 1995; 332: 1463-1466.
- 127 **Sterling RK, Stravitz RT, Luketic VA, Sanyal AJ, Contos MJ, Mills AS, et al.** *A comparison of the spectrum of chronic hepatitis C virus between Caucasians and African Americans.* Clinical Gastroenterology and Hepatology 2004; 2: 469-473.
- 128 **Tillmann H, Chen D, Trautwein C, Kliem V, Grundey A, Berning-Haag A, et al.** *Low frequency of HLA-DRB1\* 11 in hepatitis C virus induced end stage liver disease.* Gut 2001; 48: 714-718.
- 129 **Thursz M, Yallop R, Goldin R, Trepo C, Thomas HC, Grp H, et al.** *Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus.* Lancet 1999; 354: 2119-2124.
- 130 **Huang H, Shiffman ML, Cheung RC, Layden TJ, Friedman S, Abar OT, et al.** *Identification of two gene variants associated with risk of advanced fibrosis in patients with chronic hepatitis C.* Gastroenterology 2006; 130: 1679-1687.
- 131 **Marcolongo M, Young B, Dal Pero F, Fattovich G, Peraro L, Guido M, et al.** *A seven-gene signature (cirrhosis risk score) predicts liver fibrosis progression in patients with initially mild chronic hepatitis C.* Hepatology 2009; 50: 1038-1044.
- 132 **Trepo E, Pradat P, Potthoff A, Gustot T, Lemmers A, Quertinmont E, et al.** *Impact of *pnpla3* (Rs738409 C > G) polymorphism on fibrosis progression and steatosis in chronic hepatitis C.* Journal of Hepatology 2011; 54: S55-S60.
- 133 **Soto B, Sánchez-Quijano A, Rodrigo L, Olmo JA, García-Bengoechea M, Hernández-Quero J, et al.** *Human immunodeficiency virus infection modifies the natural history of chronic parenterally-acquired hepatitis C with an unusually rapid progression to cirrhosis.* J Hepatol 1997; 26: 1-5.
- 134 **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.



135 **Serrano-Villar S, Sobrino-Vegas P, Monge S, Dronda F, Hernando A, Montero M et al.** Decreasing prevalence of HCV coinfection in all risk groups for HIV infection between 2004 and 2011 in Spain. *J Viral Hepat* 2015; 22: 496-503.

136 **Matsuda Y, Amuro Y, Higashino K, Hada T, Yamamoto T, Fijikura M, et al.** Relation between markers for viral hepatitis and clinical features of Japanese patients with hepatocellular carcinoma: possible role of alcohol in promoting carcinogenesis. *Hepatology* 1995; 42: 151-154.

137 **Bellentani S, Pozzato G, Saccoccio G, Crovatto M, Croce LS, Mazzoran L, et al.** Clinical course and risk factors of hepatitis C virus related liver disease in the general population: report from the Dionysos study. *Gut* 1999; 44: 874-880.

138 **Ikeda K, Saitoh S, Koida I, Arase Y, Tsubota A, Chayama K, Kumada H, et al.** A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis: a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis. *Hepatology* 1993; 18: 47-53.

139 **Thomas DL, Seef LB.** Natural history of hepatitis C. *Clin Liver Dis* 2005; 9: 383-398.

140 **Altekruse S, McGlynn K, Reichman M.** Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1485-1491.

141 **Freedman N, Everhart J, Lindsay K, Ghany M, Curto T, Shiffman M, et al.** Coffee intake is associated with lower rates of liver disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2009; 50: 1360-1369.

142 **Freedman N, Curto T, Lindsay K, Wright E, Sinha R, Everhart J.** Coffee consumption is associated with response to peginterferon and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2011; 140: 1961-1969.

143 **Costentin CE, Roudot-Thoraval F, Zafrani ES, Medkour F, Pawlotsky JM, Mallat A, et al.** Association of caffeine intake and histological features of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2011; 54: 1123-1129.

144 **Modi AA, Feld JJ, Park Y, Kleiner DE, Everhart JE, Liang TJ, et al.** Increased caffeine consumption is associated with

*reduced hepatic fibrosis*. Hepatology 2010; 51: 201-209.

145 **Ze in NN, Rakela J, Krawitt EL, Reddy KR, Tominaga T, Persing DH** and the Collaborative Study Group. *Hepatitis C virus genotypes in the United States: epidemiology, pathogenicity, and response to interferon therapy*. Ann Intern Med 1996; 125: 634-639.

146 **Backus LI, Boothroyd DB, Phillips BR, Belperio P, Halloran J, Mole LA**. *A sustained virologic response reduces risk of all-cause mortality in patients with hepatitis C*. Clin Gastroenterol Hepatol 2011; 9: 509-556.

147 **Rumi MG, De Filippi F, La Vecchia C, Donato MF, Gallus S, Del Ninno E, et al**. *Hepatitis C reactivation in patients with chronic infection with genotypes 1b and 2c: a retrospective cohort study of 206 untreated patients*. Gut 2005; 54: 402-406.

148 **Mallat A, Hezode C, Lotersztajn S**. *Environmental factors as disease accelerators during chronic hepatitis C*. J Hepatol 2008; 48: 657-665.

149 **Brunet L, Moodie EE, Rollet K, Cooper C, Walmsley S, Potter M, et al**. *Marijuana smoking does not accelerate progression of liver disease in HIV-hepatitis C coinfection: a longitudinal cohort analysis*. Clin Infect Dis 2013; 57: 663-670.

150 **Maylin S, Laouenan C, Martinot-Peignoux M, Panhard X, Lapalus M, Nicolas-Chanoine MH, et al**. *Role of hepatic HCV RNA level on the severity of chronic hepatitis C and response to antiviral therapy*. J Clin Virol 2012 Jan; 53: 43-47.

151 **Runyon BA**; AASLD Practice Guidelines Committee. *Management of adult patients with ascites due to cirrhosis: an update*. Hepatology. 2009; 49: 2087-2107.

152 **Serfaty L, Aumaitre H, Chazouillères O, Bonnand A-M, Rosmorduc O, Poupon RE, et al**. *Determinants of outcome of compensated hepatitis C virus-related cirrhosis*. Hepatology 1998; 27: 1435-1440.

153 **Kim WR and Dickson ER**. *The role of prognostic models in the timing of liver transplantation* In: Gitlin N, Keefe E (Eds): *Clinics in Liver Disease*, 1997: 263-279.

154 **Child CG, Turcotte JG.** *Surgery and portal hypertension.* Major Probl Clin Surg. 1964; 1: 1-85.

155 **Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R.** *Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices.* Br J Surg. 1973; 60: 646-9.

156 **Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, et al.** *A model to predict survival in patients with end-stage liver disease.* Hepatology. 2001; 33: 464-470.

157 **Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, et al;** *United Network for Organ Sharing Liver Disease Severity Score Committee.* *Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers.* Gastroenterology. 2003; 124: 91-96.

158 **Suman A, Barnes DS, Zein NN, Levinthal GN, Connor JT, Carey WD.** *Predicting outcome after cardiac surgery in patients with cirrhosis: a comparison of Child-Pugh and MELD scores.* Clin Gastroenterol Hepatol. 2004; 2: 719-723.

159 **Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB.** *Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update.* Hepatology 2009; 49: 1335-1374.

160 **Asselah T, De Muynck S, Broët P, Masliah-Planchon J, Blanluet M, Bièche I, et al.** *IL28B polymorphism is associated with treatment response in patients with genotype 4 chronic hepatitis C.* J Hepatol 2012; 56: 527-532.

161 **Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Marcellin P, Vierling JM, Zeuzem S, et al.** *Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection.* N Engl J. Med 2011; 364: 1207-1217.

162 **Zeuzem S, Andreone P, Pol S, Lawitz E, Diago M, Roberts S, et al.** *Telaprevir for retreatment of HCV infection.* N Engl J Med 2011; 364: 2417-2428.

163 **Poordad F, Bronowicki JP, Gordon SC, Zeuzem S, Jacobson IM, Sulkowski MS, et al.** *Factors that predict response of patients with hepatitis C virus infection to boceprevir.* Gastroenterology 2012; 143: 608-618.

- 164 **Manns M, Marcellin P, Poordad F, de Araujo ES, Buti M, Horsmans Y, et al.** Simeprevir with pegylated interferon alfa2a or 2b plus ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 2014; 384: 414-426.
- 165 **Lawitz E, Mangia A, Wyles D, Rodriguez-Torres M, Hassanein T, Gordon SC, et al.** Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. *N Engl J Med* 2013; 368: 1878-1887.
- 166 **Clercq E.** Development of antiviral drugs for threatment of hepatitis C at an accelerating pace. *Rev Med Virol* 2015; 25:254-267.
- 167 **Pawlotsky JM.** NS5A inhibitors in the treatment of hepatitis C. 2013 59: 375-82.
- 168 **Afdhal N, Zeuzem S, Kwo P, Chojkier M, Gitlin N, Puoti M, et al.** Ledipasvir and sofosbuvir for untreaed HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2014; 370: 1889-1898.
- 169 **Kowdley KV, Gordon SC, Reddy KR, Rossaro L, Bernstein DE, Lawitz E, et al.** Ledipasvir and sofosbuvir for 8 or 12 weeks for chronic HCV without cirrhosis. *N Engl J Med* 2014; 370: 1879-1888.
- 170 **Lawitz E, Poordad FF, Pang PS, Hyland RH, Ding X, Mo H, et al.** Sofosbuvir and ledipasvir fixed-dose combination with and without ribavirin in treatment-naive and previously treated patients with genotype 1 hepatitis C virus infection (LONESTAR): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet* 2014; 383: 515-523.
- 171 **Sulkowski MS, Gardiner DF, Rodriguez-Torres M, Reddy KR, Hassanein T, Jacobson I, et al.** Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. *N Engl J Med* 2014; 370: 211-221.
- 172 **Poole RM.** Daclatasvir + asunaprevir: first global approval. *Drugs* 2014; 74: 1559-157.
- 173 **Lawitz E, Sulkowski MS, Ghalib R, Rodriguez-Torres M, Younossi ZM, Corregidor A, et al.** Simeprevir plus sofosbuvir, with or without ribavirin, to treat chronic infection with hepatitis C virus genotype 1 in non-responders to

pegylated interferon and ribavirin and treatment-naive patients: the COSMOS randomised study. *Lancet* 2014; 384: 1756-1765.

174 **Ferenci P, Bernstein D, Lalezari J, Cohen D, Luo Y, Cooper C.** *N Engl J Med* 2014; 370: 1983-1992.

175 **Lawitz E, Gane E, Pearlman B, Tam E, Ghesquiere W, Guyader D, et al.** Efficacy and safety of 12 weeks versus 18 weeks of treatment with grazoprevir (MK-5172) and elbasvir (MK-8742) with or without ribavirin for hepatitis C virus genotype 1 infection in previously untreated patients with cirrhosis and patients with previous null response with or without cirrhosis (C-WORTHY): a randomised, open-label phase 2 trial. *Lancet* 2015; 385: 1075-1086.

176 **Documento de consenso de la Sociedad Española de Trasplante Hepático Acceso al trasplante hepático, indicaciones controvertidas, priorización de la lista de espera e indicadores de calidad** *Cir Esp*. 2008; 83: 290-300.

177 **Geoffrey W, McCaughan, Amany Z.** Pathogenesis of Hepatitis C Virus Recurrence in the Liver Allograft. *Liver Transplantation* 2002; 8: S7-S13.

178 **García-Retortillo M, Fornis X, Feliu A, Moitinho E, Costa J, Navasa M, et al.** Hepatitis C kinetics during and immediately after transplantation. *Hepatology* 2002; 35: 680-687.

179 **Fukumoto T, Berg T, Ku Y, Bechstein WO, Knoop M, Lemmens H-P, et al.** Viral dynamics of hepatitis C early after orthotopic liver transplantation: evidence for rapid turnover of serum virions. *Hepatology* 1996; 24: 1351-1354.

180 **Gane EJ, Naoumov NV, Quian KP, Mondelli MU, Maertens G, Portman BC, et al.** A longitudinal analysis of hepatitis C virus replication following liver transplantation. *Gastroenterology* 1996; 167-177.

181 **McCaughan GW, Zekry A.** Mechanisms of HCV reinfection and allograft damage after liver transplantation. *J Hepatol* 2004; 40: 368-374.

182 **Zona L, Tawar RG, Zeisel MB, Xiao F, Schuster C, Lupberger J et al.** CD81-Receptor Associations -Impact for

---

*Hepatitis C Virus Entry and Antiviral Therapies*. *Viruses* 2014; 6: 875-892.

183 **Cormier EG, Tsamis F, Kajumo F, Durso RJ, Gardner JP, Dragic T et al.** CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 7270-7274.

184 **Zhang J, Randall G, Higginbottom A, Monk P, Rice CM, McKeating JA.** CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J. Virol.* 2004; 78: 1448-1455.

185 **Timpe, JM, Stamataki Z, Jennings A, Hu K, Farquhar MJ, Harris HJ, et al.** Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* 2008, 47, 17-24.

186 **Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, Thumann C, Fofana I, Zona, L et al.** EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat. Med.* 2011; 17: 589-595.

187 **Zona L, Lupberger J, Sidahmed-Adrar N, Thumann C, Harris HJ, Barnes A et al.** HRas Signal Transduction Promotes Hepatitis C Virus Cell Entry by Triggering Assembly of the Host Tetraspanin Receptor Complex. *Cell Host Microbe* 2013; 13: 302-313.

188 **Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R et al.** Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; 282: 938-941.

189 **Brimacombe CL, Grove J, Meredith LW, Hu K, Syder AJ, Flores MV, et al.** Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *J. Virol.* 2011; 85: 596-605.

190 **McCaughan GW, Zekry A.** Mechanisms of HCV reinfection and allograft damage after liver transplantation. *J Hepatol* 2004; 40: 368-374.

191 **Demetris AJ, Lunz JG, 3rd.** Early HCV-associated stellate cell activation in aggressive recurrent HCV: What can liver allograft teach about HCV pathogenesis? *Liver Transpl* 2005; 11: 1172-1176.

192 **Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, et al.** *Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4+ T-cell response in acute hepatitis C.* Gastroenterology 1999; 117:933-941.

193 **Rosen HR, Hinrichs DJ, Gretch DR, et al.** *Association of multispecific CD4+ response to hepatitis C and severity of recurrence after liver transplantation.* Gastroenterology 1999; 117:926-932.

194 **Takaki A, Wiese M, Maertens G, et al.** *Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C.* Nat Med. 2000; 6: 578-582.

195 **Lucas M, Ulsenheimer A, Pfafferot K, et al.** *Tracking virus-specific CD4+ T cells during and after acute hepatitis C virus infection.* PLoS One. 2007; 2: e649.

196 **Schirren CA, Jung MC, Worzfeld T, et al.** *Hepatitis C virus-specific CD4+ T cell response after liver transplantation occurs early, is multispecific, compartmentalizes to the liver, and does not correlate with recurrent disease.* J Infect Dis. 2001; 183: 1187-1194.

197 **Weston SJ, Leistikow RL, Reddy KR, et al.** *Reconstitution of hepatitis C virus-specific T-cell mediated immunity after liver transplantation.* Hepatology. 2005; 41: 72-81.

198 **Berenguer M, Rayon JM, Cordoba J, Argüello L, Carrasco D, et al.** *High incidence of allograft cirrhosis in HCV genotype 1b following transplantation.* Hepatology 1999; 29: 250-256.

199 **Roche B, Samuel D.** *Hepatitis C virus: up to the minute.* Liver Transpl 2010; 16: S26-S35.

200 **Saraf N, Fiel MI, Deboccardo G, Emre S, Schiano TD.** *Rapidly progressive recurrent hepatitis C virus infection starting 9 days after liver transplantation.* Liver Transpl 2007; 13: 913-917.

201 **Duvoux C, Pawlotsky J-M, Cherqui D, van Nhieu JT, Metreau J-M, Fagniez P-L, et al.** *Serial quantitative determination of hepatitis C virus RNA levels after liver transplantation.* Transplantation 1995; 60: 457-461.

- 
- 202 **Ballardini G, De Raffe E, Groff P, Bioulac-Sage P, Grassi A, Ghetti S, et al.** *Timing of reinfection and mechanisms of hepatocellular damage in transplanted HCV-infected liver.* *Liver Transpl* 2002; 8: 10-20.
- 203 **Edward J, Gane.** *The Natural History of Recurrent Hepatitis C and what influences this.* *Liver Transplantation* 2008; 14: S36-S44.
- 204 **Gane EJ, Portmann BC, Naoumov NV, Smith HM, Underhill JA, Donaldson PT, et al.** *Long-term outcome of hepatitis C infection after liver transplantation.* *N Engl J Med* 1996; 334: 821-827.
- 205 **Charlton M.** *The impact of advancing donor age on histologic recurrence of hepatitis C infection: the perils of ignored maternal advice.* *Liver Transpl* 2003; 9: 535-537.
- 206 **Saxena R, Ye MQ, Emre S, Klion F, Nalenik MA, Thung SN.** *De novo hepatocellular carcinoma in a hepatic allograft with recurrent hepatitis C cirrhosis.* *Liver Transpl Surg* 1999; 5: 81-82.
- 207 **Rosen HR.** *Hepatitis B and C in liver transpl recipient: current understanding and treatment.* *Liver Transpl* 2001; 7: S87-S98.
- 208 **Ruiz P, editor.** *Transplantation pathology.* 1ª ed. Cambridge University Press; 2009.
- 209 **Schluger LK, Sheiner PA, Thung SN, et al.** *Severe recurrent cholestatic hepatitis C following orthotopic liver transplantation.* *Hepatology* 1996; 23: 971-976.
- 210 **Demetris AJ.** *Evolution of hepatitis C virus in liver allografts.* *Liver Transpl* 2009; 15: S35-S41.
- 211 **Ferrell LD, Wright TL, Roberts J, Ascher N, Lake J.** *Hepatitis C viral infection in liver transplant recipients.* *Hepatology* 1992; 16: 865-76.
- 212 **Vinaixa C, Rubín A, Aguilera V, Berenguer M.** *Recurrence of hepatitis C after liver transplantation.* *Ann Gastroent*



2013; 26: 304-313.

213 **Khettry U, Huang WY, Simpson MA, Pomfret EA, Pomposellij, Lewis WD, et al.** *Patterns of recurrent hepatitis C after liver transplantation in a recent cohort of patients.* Hum Pathol 2007; 38: 443-52.

214 **Czaja AJ, Carpenter HA.** *Histological findings in chronic hepatitis C with autoimmune features.* Hepatology 1997; 26: 459-466.

215 **Asanza CG, García-Monzón C, Clemente G, Salcedo M, García-Buey L, García-Iglesias C, et al.** *Immunohistochemical evidence of immunopathogenetic mechanisms in chronic hepatitis C recurrence after liver transplantation.* Hepatology 1997; 26: 755-763.

216 **Rosen HR, Gretch DR, Oehlke M, Flora KD, Benner KG, Rabkin JM, et al.** *Timing and severity of initial hepatitis C recurrence as predictors of long-term liver allograft injury.* Transplantation 1998; 65: 1178-82.

217 **Gordon FD, Pomfret EA, Pomposelli JJ, Lewis WD, Jenkins RL, Khettry U.** *Severe steatosis as the initial histologic manifestation of recurrent hepatitis C genotype 3.* Hum Pathol 2004; 35: 636-638.

218 **Everson GT, Trotter J, Forman L, Kugelmas M, Halprin A, Fey B, Ray C.** *Treatment of advanced hepatitis C with a low accelerating dosage regimen of antiviral therapy* Hepatology 2005; 42: 255-262.

219 **McCashland T, Watt K, Lyden E, Adams L, Charlton M, Smith AD, et al.** *Retransplantation for HCV: results of a US multicentre retransplant study.* Liver Transpl 2007; 12: 1246-1253.

220 **Alter H, Seef L.** *Recovery, persistence and sequelae in hepatitis C infection.* Semin Liver Dis 2000; 20: 17-35.

221 **Neumann UP, Berg T, Bahra M, Seehofer D, Langrehr JM, Neuhaus R, et al.** *Fibrosis progression after liver transplantation patients with recurrent hepatitis C.* J Hepatol 2004; 41: 830-836.

- 
- 222 **Sebagh M, Rifai K, Fe´ray C, Yilmaz F, Falissard B, Roche B, et al.** All liver transplant recipients benefit from a protocol 10-year biopsy. *Hepatology* 2003; 37: 1293-1301.
- 223 **Berenguer M, Prieto M, Runyon JM, Mora J, Pastor M, Ortiz V et al.** Natural history of clinically compensated hepatitis C virus-related graft cirrhosis after liver transplantation. *Hepatology* 2000; 32: 852-858.
- 224 **Firpi RJ, Clark V, Soldevila-Pico C, et al.** The natural history of hepatitis C cirrhosis after liver transplantation. *Liver Transpl* 2009; 15: 1063-1071.
- 225 **Forman LM, Lewis JD, Berlin JA, Feldman HI, Lucey MR.** Association between hepatitis C infection and survival after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology* 2002; 122: 889-896.
- 226 **Berenguer M, Prieto M, San Juan F, Rayo’n JM, Martínez F, Carrasco D, et al.** Contribution of donor age to the recent decrease in patient survival among HCV-infected liver transplant recipients. *Hepatology* 2002; 36: 202-210.
- 227 **Sociedad Española de Trasplante Hepático y Organización Nacional de Trasplantes. Registro Español de Trasplante Hepático.** Memoria de Resultados 1984-2013. Características de los Receptores Hepáticos. Diagnóstico Principal de los Receptores. Available at: [http://www.sethepatico.org/pdf/2013/MEMORIA\\_RETH\\_2013.pdf](http://www.sethepatico.org/pdf/2013/MEMORIA_RETH_2013.pdf). Accessed 10 December 2013.
- 228 **Belli L, Burroughs A, Burra P.** Liver transplantation for HCV-cirrhosis: improved survival in recent years and increased severity of recurrent disease in female recipients: results of a long-term retrospective study. *Liver Transpl* 2007; 13: 733-740.
- 229 **Thuluvath PJ, Krok KL, Segev DL, Yoo HY.** Trends in post-liver transplant survival in patients with hepatitis C between 1991 and 2001 in the United States. *Liver Transpl* 2007; 13: 719-24.
- 230 **Kwo PY, Badshah MB.** New hepatitis C virus therapies: drug classes and metabolism, drug interactions relevant in the transplant settings, drug options in decompensated cirrhosis, and drug options in end-stage renal disease. *Curr Opin Organ Transplant.* 2015; 20: 235-41.

231 **Veldt BJ, Poteruchaa JJ, Watta KDS, Wiesnera RH, Haya JE, Kremers WK.** *Impact of Pegylated Interferon and Ribavirin Treatment on Graft Survival in Liver Transplant Patients with Recurrent Hepatitis C Infection.* Am J Transpl 2008; 8: 2426-2433.

232 **Berenguera M, Palaud A, Aguilera V, Rayon JM, Juan FS, Prieto M.** *Clinical Benefits of Antiviral Therapy in Patients with Recurrent Hepatitis C Following Liver Transplantation.* Am J Transpl 2008; 8: 679-687.

233 **Demetris AJ, Lasky S, Van Thiel DH, Starzl TE, Dekker A.** *Pathology of hepatic transplantation: A review of 62 adult allograft recipients immunosuppressed with a cyclosporine/steroid regimen.* Am J Pathol, 1985; 118: 151-161.

234 **McCaughan GW, Davies JS, Waugh JA, Bishop GA, Hall BM, Gallagher ND et al.** *A quantitative analysis of T lymphocyte populations in human liver allografts undergoing rejection: the use of monoclonal antibodies and double immunolabeling.* Hepatology 1990; 12: 1305-1313.

235 **Nawaz S, Fennell RH.** *Apoptosis of the bile duct epithelial cells in hepatic allograft rejection.* Histopathology 1994; 25: 137-142.

236 **Vierling JM.** *Immunology of acute and chronic hepatic allograft rejection.* Liver Transpl Surg 1999; 5: S1-S20.

237 **Demetris AJ, Ruppert K, Dvorchik I, Jain A, Minervini M, Nalesnik MA, et al.** *Real-time monitoring of acute liver-allograft rejection using the Banff schema.* Transplantation 2002; 74: 1290-1296.

238 **Barbatis C, Kelly P, Greveson J, Heryet A, McGee JO.** *Immunocytochemical analysis of HLA class II (DR) antigens in liver disease in man.* J Clin Pathol, 1987; 40: 879-884.

239 **Hübscher SG, Adams DH, Elias E.** *Changes in the expression of major histocompatibility complex class II antigens in liver allograft rejection.* J Pathol 1990; 162: 165-171.

240 **Bishop GA, McCaughan GW.** *Immune activation is required for the induction of liver allograft tolerance: implications*

---

for immunosuppressive therapy. *Liver Transpl* 2001; 7: 161-172.

241 **Pons Miñano JA, Ramirez Romero P, Robles Campos R, Sanchez Bueno F, Pascual Parrilla P.** Tolerancia y quimerismo en el trasplante hepático. *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99: 343-350.

242 **Lechler R, Ng WF, Steinman RM.** Dendritic cells in transplantation-Friend or foe?. *Immunity* 2001; 14: 357-68.

243 **Hall BM.** Cells mediating allograft rejection. *Transplantation* 1991; 51: 1141-1151.

244 **Shoskes DA, Word KJ.** Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunol Today* 1994; 15: 32-38.

245 **Lafferty KJ, Prowse SJ, Simeonovic CJ.** Immunobiology of tissue transplantation: A return to the passenger leukocyte concept. *Ann Rev Immunol* 1983; 1: 143-173.

246 **Demetris AJ, Qian S, Sun H, Fung JJ, Yagihashi A, Murase N et al.** Early events in liver allograft rejection. Delineation of sites of simultaneous intragraft and recipient lymphoid tissue sensitization. *Am J Pathol* 1991; 138: 609-618.

247 **Conti F, Calmus Y, Rouer E, Gaulard P, Louvel A, Houssin D et al.** Increase expression of interleukin-4 during liver allograft rejection. *J Hepatol* 1999; 189: 441-446.

248 **Demetris AJ, Lasky S, Van Thiel DH, Starzl TE, Whiteside T.** Induction of DR/IA antigens in human liver allografts. An immunocytochemical and clinicopathologic analysis of twenty failed grafts. *Transplantation* 1985; 40: 504-509.

249 **Martínez OM, Rosen HR.** Basic concepts in transplant immunology. *Liver Transpl* 2005; 11: 370-381.

250 **Afford SC, Randhawa S, Eliopoulos Ag, Hübscher SG, Young LS, Adams DH.** CD40 activation induces apoptosis in cultured human hepatocytes via induction of cell surface fas ligand expression and amplifies fas-mediated hepatocyte death during allograft rejection. *J Exp Med* 1999; 189: 441-446.

251 **Rivero M, Crespo J, Mayorga M, Fabrega E, Casafont F, Pons-Romero F.** *Involvement of the Fas system in liver allograft rejection.* Am J Gastroenterol 2002;97: 1501-1506.

252 **Tannapfel A, Kohlhaw K, Ebelt J, Hauss J, Liebert U, Berr F et al.** *Apoptosis and the expression of Fas and Fas Ligand (FasL) antigen in rejection and reinfection in liver allograft specimens.* Transplantation 1999;67: 1079-1083.

253 **Hsieh CL, Obara H, Ogura Y, Martínez OM, Krams SM.** *NK cells and transplantation.* Transpl Immunol 2002;9: 111-114.

254 **O'Keeffe C, Baird Aw, Nolan N, McCormick PA.** *Mast cell hyperplasia in chronic rejection after liver transplantation.* Liver Transpl 2002; 8: 50-57.

255 **Wang Y, Wu J, Jiang B, Wang J, Liu C, Peng C et al.** *Relationship Between Ischemia/Reperfusion Injury and Acute Rejection of Allogeneic Liver Transplant in Rats.* Transplantation Proceedings; 46: 50-55.

256 **Tsamandas AC, Jain AB, Felekouras ES, Fung JJ, Demetris AJ, Lee RG.** *Central venulitis in the liver allografts: a clinicopathologic study.* Transplantation 1997;64: 252-257.

257 **Schlitt HJ, Nashan B, Krick P, Ringe B, Wittekind C, Wonigeit K et al.** *Intragraft immune events after human liver transplantation. Correlation with clinical signs of acute rejection and influence of immunosuppression.* Transplantation 1992; 54: 273-278.

258 **Tippner C, Nashan B, Hoshino K, Schimdt-Sandte E, Akimaru K, Boker KH et al.** *Clinical and subclinical acute rejection early after liver transplantation: contributing factors and relevance for the long-term course.* Transplantation 2001; 72: 1122-1128.

259 **Bartlett AS, Ramadas R, Furness S, Gane E, McCall JL.** *The natural history of acute histologic rejection without biochemical graft dysfunction in orthotopic liver transplantation: a systematic review.* Liver Transpl 2002;8: 1147-1153.

260 **Berlakovich GA, Imhof M, Karner-Hanusch J, Gotzinger P, Gollackner B, Gnant M et al.** *The importance of the*

---

*effect of underlying disease on rejection outcomes following orthotopic liver transplantation.* Transplantation 1996; 61: 554-560.

261 **Florman S, Schiano T, Kim L, Maman D, Levay A, Gondolesi G et al.** *The incidence and significance of late acute cellular rejection (>1000 days) after liver transplantation.* Clin Transplant 2004; 18: 152-155.

262 **McTaggart RA, Terrault NA, Vardanian AJ, Bostrom A, Feng S.** *Hepatitis C etiology of liver disease is strongly associated with early acute rejection following liver transplantation.* Liver Transpl 2004; 10: 975-985.

263 **Snover DC, Sibley RK, Freese DK, Sharp HL, Bloomer JR, Najarian JS et al.** *Orthotopic liver transplantation: a pathological study of 63 serial liver biopsies from 17 patients with special reference to the diagnostic features and natural history of rejection.* Hepatology 1984; 4: 1212-1222.

264 **Hübscher SG, Clements D, Elias E, McMaster P.** *Biopsy findings in cases of rejection of liver allograft.* J Clin Pathol 1985; 38: 1366-1373.

265 **Williams JW, Peters TG, Vera SR, Britt LG, Van Voorst SI, Haggitt RC.** *Biopsy-directed immunosuppression following hepatic transplantation in man.* Transplantation 1985; 39: 589-596.

266 **Eggink HF, Hofstee N, Gips CH, Krom RA, Houthoff HI.** *Histopathology of serial graft biopsies from liver transplant recipients.* Am J Pathol 1984; 114: 18-31.

267 **Vierling JM, Fennell RH, Jr.** *Histopathology of early and late destruction of interlobular bile ducts.* Hepatology 1985; 5: 1076-1082.

268 **Kemnitz J, Gubernatis G, Bunzendahl H, Ringe B, Pichlmayr R, Georgii A.** *Criteria for the histopathological classification of liver allograft rejection and their clinical relevance.* Transplant Proc 1989; 21: 2208-2210.

269 **Demetris AJ, Qian SG, Sun H, Fung JJ.** *Liver allograft rejection: an overview of morphologic findings.* Am J Surg

Pathol 1990; 14: 49-63.

270 **International Panel.** *Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document.* Hepatology 1997; 25: 658-663.

271 **International Working Party.** *Terminology for hepatic allograft rejection.* International Working Party. Hepatology 1995; 22: 648-654.

272 **Steinoff G, Beherend M, Wonigeit K.** *Expression of adhesion molecules on lymphocytes/monocytes and hepatocytes in human liver grafts.* Hum Immunol 1990; 28: 123-127.

273 **Ben Ari Z, Dhillon AP, Garwood L, Rolles K, Davidson B, Burroughs AK.** *Prognostic value of eosinophils for therapeutic response in severe acute hepatic allograft rejection.* Transplant Proc 1996; 28: 3624-3628.

274 **Nagral A, Ben Ari Z, Dhillon AP, Burroughs AK.** *Eosinophils in acute cellular rejection in liver allografts.* Liver Transpl Surg 1998; 4: 355-362.

275 **Demetris AI, Seaberg EC, Batts KP, Ferrell LD, Ludwig J, Markin RS et al.** *Reliability and predictive value of the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database nomenclature and grading system for cellular rejection of liver allografts.* Hepatology, 1995; 21: 408-416.

276 **Ferrell LD, Lee R, Brixko C, Bass NM, Lake JR, Roberts JP et al.** *Hepatic granulomas following liver transplantation. Clinicopathologic features in 42 patients.* Transplantation 1995; 60: 926-933.

277 **Banff Working G, Demetris AJ, Adeyi O, Bellamy CO, Clouston A, Chalotte F, et al.** *Liver biopsy interpretation for causes of late liver allograft dysfunction.* Hepatology 2006; 44: 489-501.

278 **Hübscher SG, Clements D, Elias E, McMaster P.** *Biopsy findings in cases of rejection of liver allograft.* J Clin Pathol 1985; 38: 1366-1373.

- 279 **Harrison RF, Patsiaoura K, Hübscher SG.** Cytokeratin immunostaining for detection of biliary epithelium: its use in counting bile ducts in cases of liver allograft rejection. *J Clin Pathol* 1994; 47: 303-308.
- 280 **Adams DH, Burnett D, Stockley RA, Elias E.** Patterns of leukocyte chemotaxis to bile after liver transplantation. *Gastroenterology* 1989; 97: 433-438.
- 281 **Van den Heuvel MC, de Jong KP, van der Horst ML, Poppema S, Slooff MJ, Gouw AS.** Impaired regeneration of biliary cells in human chronic liver allograft rejection. Special emphasis on the role of the finest branches of the biliary tree. *Liver Transpl* 2004; 10: 28-35.
- 282 **Pappo O, Ramos H, Starzl TE, Fung JJ, Demetris AJ.** Structural integrity and identification of causes of liver allograft dysfunction occurring more than 5 years after transplantation. *Am J Surg Pathol* 1995; 19: 192-206.
- 283 **Nonomura A, Mizukami Y, Matsubara F, Kobayashi K.** Clinicopathological study of lymphocyte attachment to endothelial cells (endothelialitis) in various liver diseases. *Liver* 1991; 11: 78-88.
- 284 **Lory J, Zimmermann A.** Endotheliitis-like changes in chronic hepatitis C. *Histol Histopathol* 1997; 12: 359-366.
- 285 **Snover DC, Freese DK, Sharp HL, Bloomer JR, Najarian JS, Ascher NL.** Liver allograft rejection. An analysis of the use of biopsy in determining outcome of rejection. *Am J Surg Pathol* 1987; 11: 1-10.
- 286 **Devlin J, Page AC, O'Grady J, Portmann B, Karani J, Williams R.** Angiographically determined arteriopathy in liver graft dysfunction and survival. *J Hepatol* 1993; 18: 68-73.
- 287 **Demetris AJ, Belle SH, Hart J, Lewin K, Ludwig J, Snover DC, et al.** Intraobserver and interobserver variation in the histopathological assessment of liver allograft rejection. The Liver Transplantation Database (LTD) Investigators. *Hepatology* 1991; 14: 751-755.
- 288 **Neil DA, Hübscher SG.** Histologic and biochemical changes during the evolution of chronic rejection of liver allografts.



Hepatology 2002; 35: 639-651.

289 **Lovell MO, Speeg KV, Halff GA, Molina DK, Sharkey FE.** *Acute hepatic allograft rejection: a comparison of patients with and without centrilobular alterations during first rejection episode.* Liver Transpl 2004; 10: 369-373.

290 **Quaglia AF, Del Vecchio BG, Greaves R, Burroughs AK, Dhillon AP.** *Development of ductopaenic liver allograft rejection includes a 'hepatic' phase prior to duct loss.* J Hepatol 2000; 33: 773-780.

291 **Sebagh M, Blakolmer K, Falissard B, Roche B, Emile JF, Bismuth H et al.** *Accuracy of bile duct changes for the diagnosis of chronic liver allograft rejection: reliability of the 1999 Banff schema.* Hepatology 2002; 35: 117-125.

292 **Ludwig J, Gross JB, Jr., Perkins JD, Moore SB.** *Persistent centrilobular necroses in hepatic allografts.* Hum Pathol 1990; 21: 656-661.

293 **Nakazawa Y, Chisuwa H, Mita A, Ikegami T, Hashikura Y, Terada M et al.** *Life-threatening veno-occlusive disease after living-related liver transplantation.* Transplantation 2003; 75: 727-730.

294 **Martin SR, Russo P, Dubois J, Álvarez F.** *Centrilobular fibrosis in long-term follow-up of pediatric liver transplant recipients.* Transplantation 2002; 74: 828-836.

295 **Burt AD, Portman BC and Ferrell LD** (eds). *MacSween's Pathology of the Liver.* 5ª ed Elsevier 2007.

296 **Hübscher SG.** *Histological findings in liver allograft rejection new insights into the pathogenesis of hepatocellular damage in liver allografts.* Histopathology 1991; 18: 377-383.

297 **Khettry U, Backer A, Ayata G, Lewis WD, Jenkins RL, Gordon FD.** *Centrilobular histopathologic changes in liver transplant biopsies.* Hum Pathol 2002; 33: 270-276.

298 **Neil DA, Hübscher SG.** *Are parenchymal changes in early post-transplant biopsies related to preservation-reperfusion*

---

*injury or rejection?* Transplantation 2001; 71: 1566-1572.

299 **Demirhan B, Bilezikci B, Haberal AN, Sevmis S, Arat Z, Haberal M.** Hepatic parenchymal changes and histologic eosinophilia as predictors of subsequent acute liver allograft rejection. Liver Transpl 2008; 14: 214-219.

300 **Hübscher SG.** Diagnosis and grading of liver allograft rejection: a European perspective. Transplant Proc 1996; 28: 504-507.

301 **Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, et al.** Histological grading and staging of chronic hepatitis. J Hepatol 1995; 22: 696-699.

302 **Demetris AJ, Fung JJ, Todo S, McCauley J, Jain A, Takaya S, et al.** Conversion of liver allograft recipients from cyclosporine to FK506 immunosuppressive therapy a clinicopathologic study of 96 patients. Transplantation 1992; 53: 1056-1062.

303 **Krasinskas AM, Ruchelli ED, Rand EB, Chittams JL, Furth EE.** Central venulitis in pediatric liver allografts. Hepatology 2001; 33: 1141-1147.

304 **Krasinskas AM, Demetris AJ, Poterucha JJ, Abraham SC.** The prevalence and natural history of untreated isolated central perivenulitis in adult allograft livers. Liver Trasplan 2008; 14: 625-632.

305 **Hübscher SG.** Central perivenulitis: a common and potentially important finding in late posttransplant liver biopsies. Liver Transpl. 2008; 14: 596-600.

306 **Cakaloglu Y, Devlin J, O'Grady J, Sutherland S, Portmann BC, Heaton N et al.** Importance of concomitant viral infection during late acute liver allograft rejection. Transplantation 1995; 59: 40-45.

307 **Demetris AJ, Eghtesad B, Marcos A, Ruppert K, Nalesnik MA, Randhawa P, et al.** Recurrent hepatitis C in liver allografts: prospective assessment of diagnostic accuracy, identification of pitfalls, and observations about pathogenesis. Am J Surg Pathol 2004; 28: 658-6.

308 **Lunz JG 3rd, Contrucci S, Ruppert K, Murase N, Fung JJ, Starzl TE, et al.** Replicative senescence of biliary epithelial cells precedes bile duct loss in chronic liver allograft rejection: increased expression of p21 (WAF1/Cip1) as a disease marker and the influence of immunosuppressive drugs. *Am J Pathol* 2001; 158: 1379-1390.

309 **Aguilera I, Wichmann I, Sousa JM, Bernardos A, Franco E, García-Lozano JR, et al.** Antibodies against glutathione S-transferase T1 (GSTT1) in patients with de novo immune hepatitis following liver transplantation. *Clin Exp Immunol* 2001; 126: 535-539.

310 **Czaja AJ.** Autoimmune hepatitis after liver transplantation and other lessons of self-intolerance. *Liver Transpl* 2002; 8: 505-513.

311 **Aguilera I, Sousa JM, Gavilán F, Bernardos A, Wichmann I, Nuñez-Roldán A.** Glutathione S-transferase T1 mismatch constitutes a risk factor for de novo immune hepatitis after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2004; 10: 1166-1172.

312 **Álvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, et al.** International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 929-938.

313 **Pratt DS, Fawaz KA, Rabson A, Dellelis R, Kaplan MM.** A novel histological lesion in glucocorticoid-responsive chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1997; 113: 664-668.

314 **Czaja AJ.** Autoimmune liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2003; 19: 232-242.

315 **Okano N, Yamamoto K, Sakaguchi K, Miyake Y, Shimada N, Hakoda T, et al.** Clinicopathological features of acute-onset autoimmune hepatitis. *Hepatol Res* 2003; 25: 263-270.

316 **Neuberger J.** Chronic allograft dysfunction: diagnosis and management. Is it always progressive? *Liver Transpl* 2005; 11: S63-S68.

- 317 **Demetris AJ, Fung JJ, Todo S, McCauley J, Jain A, Takaya S, et al.** FK 506 used as rescue therapy for human liver allograft recipients. *Transplant Proc* 1991;23: 3005-3006.
- 318 **Farges O, Bismuth H, Sebagh M, Reynes M.** Granulomatous destruction of bile ducts after liver transplantation: primary biliary cirrhosis recurrence or hepatitis C virus infection?. *Hepatology* 1995;21: 1765-1767.
- 319 **Demetris AJ, Adeyi O, Bellamy CO, Clouston A, Charlotte F, Czaja A, et al.** Liver biopsy interpretation for causes of late liver allograft dysfunction. *Hepatology* 2006; 44: 489-451.
- 320 **Demetris AJ, Jaffe R et al.** Recurrent hepatitis B in liver allograft recipients: differentiation between viral hepatitis B and rejection. *Am J Pathol* 1986; 125: 161-172.
- 321 **Demetris AJ, Todo S, et al.** Evolution of hepatitis B virus liver disease after hepatic replacement: practical and theoretical considerations. *Am J Pathol.* 1990; 137: 667-676.
- 322 **Gini G, Gini M.** A serial model for computer assisted medical diagnosis. *Int J Biomed Comput.* 1980; 11: 99-113.
- 323 **Breiman L, Friedman JH, Olshen RA, Stone CJ,** editors. *Classification and Regression Trees (Wadsworth Statistics/Probability)*. 1ª ed Belmont, Ca, 1983.
- 324 **Therneau TM, Atkinson EJ.** An introduction to recursive partitioning using the RPART routines. <http://ndc.mayo.edu/mayo/research/biostat/upload/61.pdf>. Accessed Feb 22, 2011.
- 325 **Bonilla R, Batts KP, Burgart LJ, Barret SL, Germer JJ, Poterucha JJ, et al.** Early detection of hepatitis C allograft reinfection after orthotopic liver transplantation: A molecular and histologic study. *Mod Pathol* 2000; 13: 229-237.
- 326 **Berenguer M.** Natural history of recurrent hepatitis C. *Liver Transpl* 2002; 8, S1-1.
- 327 **McCaughan GW, Zekry A.** Pathogenesis of hepatitis C virus recurrence in the liver allograft. *Liver Transpl* 2002; 8): 1-7.

328 **Zekry A, Bishop GA, Bowen DG, Gleeson MM, Guney S, Painter DM et al.** *Intrahepatic cytokine profiles associated with posttransplantation hepatitis C virus-related liver injury.* Liver Transpl 2002; 8: 292-301.

329 **Wiesner RH, Demetris AJ, Belle SH, Seaberg EC, Lake JR, Zetterman RK et al.** *Acute hepatic allograft rejection: incidence, risk factors, and impact on outcome.* Hepatology 1998; 28: 638-645.

330 **Demetris AJ.** *Central venulitis in liver allografts: considerations of differential diagnosis.* Hepatology 2001; 33: 1329-1330.

331 **Demetris AJ, Murase N, et al.** *Dendritic cells in rejection and acceptance of solid organ allografts.* In: Lotze MT, Thomson A, eds. Dendritic Cells. San Diego: Academic Press; 2001: 439-458.

332 **Abrazzinskas DR, Chung R. T.** *Allograft dysfunction and hyperbilirubinemia in a liver transplant recipient.* Transpl Infect Dis 2000; 2: 186-193.

333 **Gottschlich MJ, Aardema KL, Burd EM, Nakhleh RE, Brown KA, Abouljoud MS et al.** *The use of hepatitis C viral RNA levels in liver tissue to distinguish rejection from recurrent hepatitis C.* Liver Transpl 2001; 7: 436-441.

## VIII. Publicación

Rechazo celular agudo versus hepatitis C recurrente  
en el trasplante hepático: Aproximación racional clínico-patológica  
mediante un algoritmo de decisión

**De la Peña-Moral JM, Pons JA, Tome S, Gude F, Miras M, Bermejo J, Ramirez P, Berenguer M, Varo E, Forteza J,**

**Parrilla P.** *Acute cellular rejection versus recurrent hepatitis C after liver transplantation: Clinical and pathological features driving a rational diagnostic approach.* Hepatol Res. 2015; 45: 423-431.

**Factor Impacto:** 2.735.

**Original Article**

## Acute cellular rejection versus recurrent hepatitis C after liver transplantation: Clinical and pathological features driving a rational diagnostic approach

Jesús M. de la Peña-Moral,<sup>1</sup> Jose A. Pons,<sup>2,3</sup> Santiago Tome,<sup>4</sup> Francisco Gude,<sup>5</sup> Manuel Miras,<sup>2,3</sup> Juan Bermejo,<sup>1</sup> Pablo Ramirez,<sup>3,6</sup> Marina Berenguer,<sup>3,7</sup> Evaristo Varo,<sup>8</sup> Jeronimo Forteza<sup>9</sup> and Pascual Parrilla<sup>3,6</sup>

<sup>1</sup>Pathology Department, <sup>2</sup>Liver Transplant Unit, <sup>6</sup>Surgery Department, Hospital Clínico Universitario Virgen la Arrixaca, Murcia, <sup>3</sup>CIBEREHD (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas), <sup>7</sup>Liver Transplantation and Hepatology Unit, La Fe Hospital, Valencia, <sup>4</sup>Liver Transplant Unit, <sup>5</sup>Clinical Epidemiology Unit, <sup>8</sup>Surgery Department, <sup>9</sup>Pathology Department, Hospital Clínico Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, Spain

**Aim:** The aim of our study was develop and validate an algorithm system based on morphological features for finding the differences between recurrent hepatitis C virus (HCV) and acute cellular rejection (ACR) in liver biopsies of HCV-transplanted patients.

**Methods:** Two hundred and eighty-eight liver biopsies were analyzed from 121 patients transplanted for HCV. A diagnostic consensus was reached between clinicians and pathologists in 214 biopsies for the diagnosis of recurrent HCV or ACR. A random sample of 114 liver biopsies (derivation cohort) was taken to generate the diagnostic tree and was subsequently evaluated using the validation cohort in 100 liver biopsies by recursive partitioning analysis of morphological variables and time since transplantation.

**Results:** The presence of endotheliitis together with a time of less than 6 weeks since LT definitely excluded recurrent HCV. After obtaining the regression tree, diagnostic accuracy was 96% and 93% in the derivation and validation cohort, respectively. Both cases surpassed the pathologist's original diagnosis, which had a diagnostic accuracy of 91% ( $P < 0.05$ , for both comparisons).

**Conclusion:** A recursive partitioning analysis of the morphological features in liver biopsies from HCV-transplanted patients may be useful for easily distinguishing between recurrent HCV and ACR.

**Key words:** acute cellular rejection, algorithm system, liver biopsy, liver transplantation, recurrent hepatitis C

**INTRODUCTION**

HEPATITIS C VIRUS (HCV) has become the most common indication for liver transplantation (LT), accounting for nearly 50% of LT in Western countries.<sup>1–3</sup> Nearly all patients transplanted for HCV show positive viral replication at the time of surgery and recurrence of HCV shortly after LT is almost universal.<sup>4,5</sup> Several studies in the USA and Europe have shown that patients

with HCV recurrence have lower survival rates after LT.<sup>1–4</sup> Furthermore, the natural history of hepatitis C after LT shows an accelerated course compared to the development in immunocompetent patients.<sup>4</sup> Among patients transplanted for HCV, approximately 20–40% will develop cirrhosis within 5 years of transplantation.<sup>4,6</sup> In addition, there is evidence that more intensive immunosuppression given to these patients when they develop acute cellular rejection (ACR) of the graft may aggravate hepatitis.<sup>6–9</sup> Therefore, correctly diagnosing and distinguishing accurately between a histological recurrence of hepatitis C and other entities (i.e. ACR) is essential. It is also vital to establish the definite presence of recurrent hepatitis due to HCV for the appropriate management of these patients, so that it does not negatively impact on either the graft or patient survival.<sup>10</sup>

Correspondence: Dr Jesús M. de la Peña-Moral, Hepatology and Nephropathology Unit, Department of Pathology, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, Ctra. Madrid-Cartagena s/n, 30120. El Palmar (Murcia), Spain. Email: jesusmdelap@gmail.com  
Received 25 December 2013; revision 20 May 2014; accepted 2 June 2014.



Histological assessment of the liver biopsy (LB) from the graft plays a key role in the follow up of patients after LT.

The physician uses the interpretation of the LB as a basis for diagnosing or excluding ACR, drug toxicity, pretransplant disease recurrence (i.e. viral hepatitis), and/or the development of new diseases (i.e. hepatitis due to cytomegalovirus).<sup>11</sup> However, it has been shown that differentiating between recurrent HCV and ACR is one of the most difficult problems to resolve.<sup>11–13</sup> In fact, it has been found that the morphological features typically associated with immunological rejection are relatively frequent in biopsies of native livers in patients with hepatitis C.<sup>14–16</sup>

With the intention of optimizing diagnosis, the purpose of this study was to develop and validate an algorithm system based on morphological features to discriminate accurately between recurrent HCV and ACR in the LB of HCV-transplanted patients.

## METHODS

**T**HIS WAS A multicenter study conducted at two Spanish hospitals, the Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela (HCUS) and the Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA) in Murcia, between January 1993 and December 2006. During this period, 282 patients were transplanted for HCV cirrhosis from a total of 1127 liver transplants in both centers. In this study, 288 LB were analyzed from 121 patients transplanted for HCV who met the following inclusion criteria: (i) the presence of at least six portal spaces and three terminal venules on biopsy; (ii) a biopsy with two original hematoxylin-eosin stains in serial tissue sections; and (iii) the presence of a tissue section with Masson-trichrome.

The LB of 161 patients were not analyzed, either because the biopsy was not performed for medical reasons, there was early mortality or because the inclusion criteria were not met.

This was a retrospective study conducted from a prospective database in accordance with the criteria of the institutional review board on personal data management.

The clinical characteristics of the study patients and of the patients not included in the study were similar (data not shown). The baseline characteristics of the patients analyzed were similar (Table 1).

The mean age (52 vs 51 years), the percentage of men (73% vs 72%) and the cause of cirrhosis (HCV + alcohol, HCV + cancer, HCV + metabolic disease) was

**Table 1** Clinical characteristics of study patients ( $n = 121$ ) and patients not included in the study ( $n = 161$ ) at transplantation time

	$n = 121$	$n = 161$
Male (%)	73	72
Age at LT (years) (mean $\pm$ SD)	52.1 $\pm$ 11	51.6 $\pm$ 10
Diseases		
HCV cirrhosis (%)	45	47
HCV + alcohol (%)	17	15
HCV + cancer (%)	34	35
HCV + metabolic disease (%)	4	3

Data are expressed as median (percentile 25, percentile 75) or mean  $\pm$  standard deviation. There were no statistically significant differences between groups.

HCV, hepatitis C virus; LT, liver transplantation; SD, standard deviation.

similar among patients enrolled in the study and those excluded, respectively. Likewise, patient survival at 1, 3 and 5 years was 84.2%, 77.1% and 56%, respectively; which was similar in both groups.

Most patients were men with HCV genotype 1b and more than half of cases were transplanted for HCV cirrhosis associated with alcohol consumption, hepatocellular carcinoma or metabolic diseases. At the time of the study, the most commonly administered immunosuppressive drug was tacrolimus with or without steroids. When liver function tests revealed deterioration, LB were obtained.

Of the 288 LB studied, 66 (23%) were performed in the first month post-transplant, 84 (29%) between 1 and 6 months, 45 (16%) between 6 months and 1 year, and 93 (32%) between 1 and 10 years after LT. The number of biopsies varied between one and eight biopsies per patient, with a mean of  $2.3 \pm 1.6$  standard deviation.

Assessment of LB was performed independently by three pathologists with experience in transplant pathology and one of them (P. M. J. M.) reviewed the preparations carried out in the two hospitals for the purpose of differentiating between the two specific entities: recurrent HCV and ACR. The following definitions were used to assess the morphological findings:<sup>16–18</sup> “lymphoid aggregates”, the presence of simple aggregations of lymphoid cells in any location within the portal space; “endotheliitis”, the presence of lymphocytes underneath the portal and central vein endothelium; “interface hepatitis”, the death of hepatocytes at the interface of connective tissue and the parenchyma accompanied by inflammatory cell infiltration;

“polymorphonuclear leukocytes in the portal space”, the presence of two or more polymorphonuclear cells (both neutrophils and eosinophils) in the portal space; “steatosis”, the presence of more than 5% of steatotic hepatocytes; “lymphocytes in rows”, when lymphocytes are arranged in rows in the sinusoidal space regardless of their location in the biopsy; “peripheral polymorphonuclear cells”, the presence of two or more polymorphonuclear cells (both neutrophils and eosinophils) in the limiting plate of the portal spaces; “mixed inflammatory infiltrates”, the presence of polymorphonuclear cells and lymphocytes jointly forming a group; “the focal lymphocytic infiltration of bile ducts”, the presence of lymphocytes in ductal epithelial cells where bile duct damage is conspicuous with or without mild reactive changes in the epithelial cells; “ductular reaction”, the presence of a proliferation of biliary cells into duct-like structures in the portal space; and “ductopenia”, the loss of a significant number of interlobular bile ducts. Other morphological aspects such as necrosis, fibrosis and cytoplasmic swelling were also reported when present.

The patients' medical history was analyzed, seeking information on various clinical parameters and liver function: the date of LT, time from LT to biopsy, liver and hematological tests, viral genotype, type of treatment provided and patient follow up (Table 2).

Of the 288 LB, a diagnostic consensus was reached between clinicians and pathologists on 214 biopsies for the diagnosis of recurrent HCV or ACR.

The following criteria was used for reaching a consensus on the 214 biopsies: “ACR”, the initial histological diagnosis of acute rejection and response to anti-rejection treatment with boluses of methylprednisolone and/or increasing baseline immunosuppression; and “recurrent HCV”, the initial diagnosis of recurrent hepatitis and the response to treatment with interferon + ribavirin or if no response, subsequent clinical or histological confirmation of chronic HCV hepatitis.

In the 74 biopsies where there was no diagnostic consensus between the pathologist and the clinician, the evolution of each one of the biopsies was studied individually in order to try and reach a clinical and histological diagnosis.

Afterwards, the diagnostic algorithm was applied to each of the 74 biopsies.

### Statistical analysis

Descriptive data are expressed as a median (percentile 25, percentile 75). Either the  $\chi^2$ -test or the Mann-Whitney *U*-test was used to compare categorical or continuous variables, where appropriate. Of those 214 LB where the consensus was reached in two hospitals, a random sample of 114 LB (derivation cohort) was taken to generate the diagnostic tree. To identify morphological variables that optimally separate patients with ACR from those with recurrent HCV, we used a recursive partition (RPART) approach.<sup>19</sup> Also referred to as classification and regression tree analysis, RPART has been

**Table 2** Baseline characteristics at time of recurrent HCV and ACR

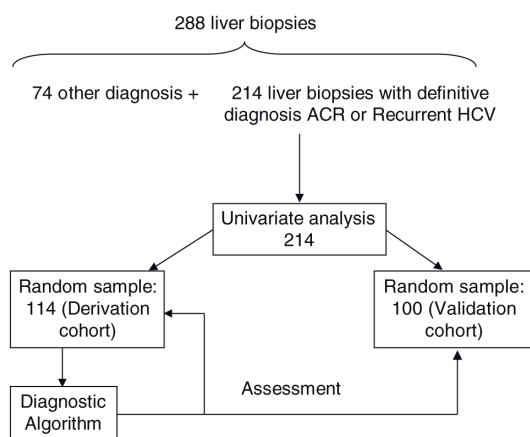
No. of biopsies	Overall (n = 214)	Recurrent HCV (n = 157)	ACR (n = 57)	P
Time from transplantation to LB (days)†	209 (44, 583)	359 (150, 764)	14 (8, 38)	<0.0001
Bilirubin (mg/dL)	2 (0.1–35)	2.1 (0.3–35)	2.2 (0.2–36)	0.45
ALT (IU/L)	187 (28–557)	191 (28–810)	189 (52–1290)	0.20
AST (IU/L)	147 (9–1615)	145 (35–1615)	146 (9–580)	0.55
Alkaline phosphatase (IU/L)	186 (110–356)	178 (124–371)	197 (107–320)	0.46
Peripheral eosinophil (10 <sup>3</sup> /μL)	150 (100–500)	154 (110–550)	158 (112–620)	0.60
Albumin, g/dL	3.7 (3.4–4.1)	3.8 (3.6–4.3)	3.7 (3.1–4.0)	0.21
Hemoglobin, g/L	12 (11–14)	13 (11–14)	11 (11–14)	0.78
Triglycerides, mg/dL	136 (87–201)	132 (92–197)	137 (102–205)	0.47
Platelet count (10 <sup>3</sup> )	121 (35–293)	119 (35–293)	121 (71–218)	0.85
Glucose, mg/dL	103 (84–147)	100 (92–147)	95 (94–147)	0.33
Creatinine, mg/dL	1.4 (0.9–1.8)	1.4 (0.9–1.8)	1.4 (0.9–1.8)	0.54
Genotype (% 1b)	202 (94%)	154 (98%)	48 (84%)	<0.0001
Immunosuppression:				
Tacrolimus	148 (69%)	112 (70%)	36 (63%)	0.25
Cyclosporin	66 (31%)	45 (30%)	21 (37%)	0.25

†Median (percentile 25, percentile 75).

ACR, acute cellular rejection; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; HCV, hepatitis C virus; LB, liver biopsy.

used to derive prediction rules for other conditions. RPART first identifies the variable with the highest discrimination for the outcome of interest (node) and then repeats the process to partition subsequent nodes. RPART yields a tree-like algorithm with numerous nodes. To further improve ease of use, we simplified the algorithm giving equal weight (1 point) to each covariate identified by the RPART. This model was evaluated using the validation cohort that was made up of 100 additional LB from the whole cohort (Fig. 1). The number of biopsies with a diagnosis of recurrent hepatitis C and acute rejection was similar in both cohorts (data not shown). Recursive partitioning analysis was carried out in R using the rpart library, which is freely available at <http://cran.r-project.org>.

We assessed the classification characteristics of the final model by estimating the prevalence of recurrent HCV, the positive and negative predictive value, as well as sensitivity, specificity and positive likelihood ratios among recurrent HCV and ACR groups, respectively.<sup>19</sup> This was evaluated in the 214 biopsies in which a consensus was reached between the clinician and the pathologist about diagnosing ACR or recurrent hepatitis (the gold standard).



**Figure 1** Study outline. Two hundred and eighty-eight liver biopsies (LB) were analyzed from 121 patients transplanted for hepatitis C virus (HCV). A diagnostic consensus was reached between clinicians and pathologists in 214 biopsies for the diagnosis of recurrent HCV or acute cellular rejection (ACR). A random sample of 114 LB (derivation cohort) was taken to generate the diagnostic tree and subsequently evaluated using the validation cohort in 100 LB by recursive partitioning analysis of morphological variables and time since transplantation.

The procedures used in the study are in accordance with the 1975 Declaration of Helsinki.

## RESULTS

**T**HE MEDIAN (PERCENTILE 25, percentile 75) time from transplantation to LB was 359 days (150, 764) in patients with recurrent HCV, whereas it was 14 days (8, 38) in patients with ACR. In patients who had any other characteristic different from recurrent HCV or ACR, time to LB was 82 days (30, 348) ( $P = 0.000$ ).

Of the 214 LB in which a diagnostic consensus was reached between pathologists and clinicians, 73 (23 ACR and 50 recurrent HCV) were performed at the HCUS hospital and 141 (34 ACR and 107 recurrent HCV) at the HCUVA hospital.

The diagnosis of these 214 biopsies, was based solely on the results of the biopsy and the clinical course.

There was one patient in which a second biopsy refuted the initial diagnosis. In this case, there was evidence of rejection in the biopsy obtained on day 856 after transplantation and this was followed by another biopsy on day 871 which showed changes in the characteristics of recurrent HCV changing the initial diagnosis.

No diagnostic consensus was reached between pathologists and clinicians on 74 LB.

The most significant morphological findings are shown in Table 3.

The mean portal tracts and terminal hepatic venules observed were  $6.7 \pm 0.8$  (range, 6–8) and 4.1 (range, 3–6), respectively.

Acute cellular rejection was characterized primarily by the presence of ductal lymphocyte infiltration, mixed inflammatory infiltrates, polymorphonuclear cells in portal spaces and endotheliitis. Recurrent HCV, however, was especially associated with portal lymphoid aggregates, interface hepatitis and the presence of lymphocytes in the portal space.

The first variable entered in the regression tree was time from transplantation to biopsy, where it was found that 6 weeks was the best cut-off point for differentiating between ACR and recurrent HCV.

In the derivation cohort, composed of 114 LB, prevalence of recurrent HCV and ACR was 72% and 28%, respectively. The diagnostic decision tree constructed shows the probability that the diagnosis is recurrent HCV in terms of different variables (Fig. 2). The probability of having recurrent HCV was 93% if the time from transplantation to LB was 6 weeks or more, decreasing to 16% if the time to biopsy was less

**Table 3** Frequency of morphological features in liver biopsies from HCV-transplanted patients according to the diagnosis of recurrent HCV, ACR or others

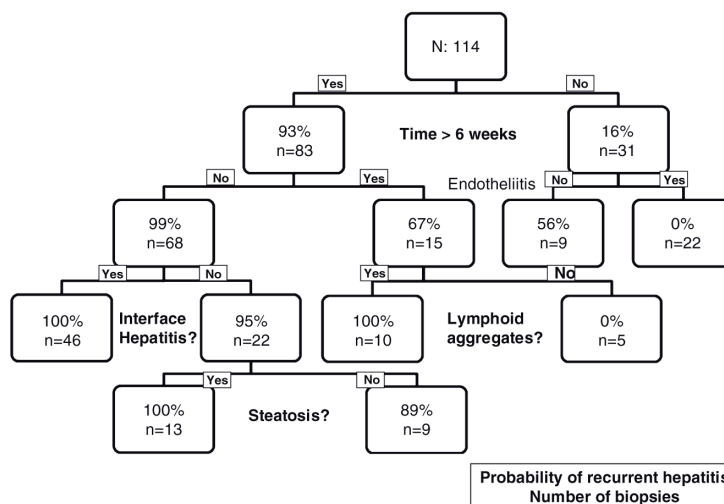
	Recurrent HCV (n = 157), %	ACR (n = 57), %	Others (n = 74), %
Lymphoid aggregates**	119 (78)	7 (11)	21 (28)
Endotheliitis**	15 (10)	53 (86)	10 (14)
Interface hepatitis**	111 (73)	22 (36)	7 (10)
PMN in portal space**	20 (13)	52 (84)	7 (10)
Steatosis**	78 (51)	18 (29)	18 (24)
Lymphocytes in rows**	36 (24)	3 (5)	3 (5)
Peripheral PMN**	55 (36)	11 (17)	6 (8)
Mixed infiltrates**	12 (8)	51 (83)	17 (23)
FLIBD (ns)	122 (80)	56 (91)	44 (59)
Neo ducts (ns)	21 (14)	8 (13)	13 (18)
Acinar infiltrates**	131 (86)	30 (48)	36 (49)
Lymphocytes**	137 (90)	27 (43)	36 (49)
Lobular PMN*	18 (12)	19 (30)	11 (15)
Central vein endotheliitis*	3 (2)	8 (13)	0 (0)
Fibrosis**	76 (50)	14 (22)	24 (33)
Necrosis*	46 (30)	32 (52)	23 (31)
Centroacinar necrosis*	21 (14)	19 (30)	19 (26)
Apoptosis*	125 (82)	40 (65)	44 (59)
Cholestasis (ns)	36 (24)	22 (35)	24 (33)
Micro-macro**	112 (74)	27 (43)	28 (38)
Ballooning*	137 (90)	46 (74)	57 (77)

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ ; statistically significant differences for the comparison between recurrent HCV and ACR.

ACR, acute cellular rejection; FLIBD, focal lymphocytic infiltration of bile ducts; HCV, hepatitis C virus; ns, not significant; PMN, polymorphonuclear cells.

than 6 weeks. The second significant variable was presence of endotheliitis. In LB with endotheliitis performed within a period of less than 6 weeks after LT, the probability of recurrent HCV was 0%, a probability that increased to 67% in patients in whom LB was performed within a period of 6 weeks or more. In these cases, if the inflammatory infiltrate does not form lymphoid aggregates, this probability is 0%. The absence of endotheliitis reinforces the diagnosis of recurrent HCV. In those patients in whom the LB did not show endotheliitis, the probability of recurrent HCV was 99% and 56%, respectively, depending on whether the LB was performed within a period of 6 weeks or more, or less than 6 weeks from LT. In these latter cases, when we observed the presence of interface hepatitis and/or lymphoid aggregates, the probability of having recurrent HCV rose to 80%. The next variable in the decision tree was the presence of lymphoid aggregates. When the lymphoid aggregates were present in patients with a time from LT to biopsy of 6 weeks or more, the probability of recurrent HCV was 100%, whereas if lymphoid aggregates were absent, the probability was 0%. Similarly, the probability of recurrent HCV was 100% and 95%, respectively, if interface hepatitis was present or absent. The probability of recurrent HCV was 100% and 89%, respectively, for patients with or without steatosis.

With the regression tree obtained, diagnostic accuracy was 96% and 93% in the derivation and validation cohort, respectively. Both cases surpassed the



**Table 4** Data from the derivation cohort, validation cohort and diagnosis performed by a pathologist was used to determine the sensitivity, specificity, and likelihood ratios of detecting recurrent hepatitis

	Derivation cohort, <i>n</i> = 114	Validation cohort, <i>n</i> = 100	Pathologist
Sensitivity, %	100 (99.4–100)	100 (99.3–100)	94.0 (93.7–94.4)
Specificity, %	84.4 (82.7–86.1)	76.7 (74.9–78.4)	82.3 (81.6–83.1)
PPV, %	94.2 (93.6–94.9)	90.9 (90.2–91.6)	92.9 (92.5–93.2)
NPV, %	100 (98.1–100)	100 (97.8–100)	85.0 (84.1–85.9)
Accuracy, %	95.6 (95.1–96.1)	93.0 (92.5–93.5)	90.6 (90.4–90.9)
LR	6.40 (6.37–6.43)	4.29 (4.27–4.30)	5.30 (5.29–5.32)

214 liver biopsies were considered. A consensus was reached on diagnosing acute cellular rejection (*n* = 57) or recurrent hepatitis (*n* = 157).

Data are presented as percentages (95% confidence intervals).

LR, likelihood ratio for a positive test result; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

pathologist's original diagnosis, which had a diagnostic accuracy of 91% ( $P < 0.05$ , for both comparisons) (Table 4).

Of the 74 biopsies in which a consensus between pathologists and clinicians was not originally made, a definitive clinicopathological diagnosis was able to be made in 50 biopsies. The diagnosis continued to be non-specific in 24 biopsies. In these 24 patients, the non-specificity of the biopsies did not allow us to reach a consensus diagnosis, because from the point of view of pathology, they were biopsies that showed a minimal inflammatory infiltrate portal without a specific distribution or without affinity for any structure and, from

the point of view of the clinical course of patients, there was no clarification of etiology. Of the 50 biopsies where a diagnosis was reached, the diagnosis was recurrent HCV in 34 biopsies (24 biopsies within a period of  $\geq 6$  weeks and 10 within a period of  $< 6$  weeks), ACR in 15 cases (11 biopsies within a period of  $\geq 6$  weeks and four within a period  $< 6$  weeks) and chronic rejection in one case (Table 5). No cases of de novo autoimmune hepatitis were diagnosed.

If the diagnostic algorithm created in this study had been applied, we would have obtained the following results: of the 50 LB performed within a period of 6 weeks or more post-transplant, 24 progressed to

**Table 5** Definitive diagnosis of the 74 biopsies in which a consensus had not initially been reached

	<i>n</i> = 74	Definitive diagnosis† A / B / C / D	Initial pathological diagnosis† A / B / C	Recurrent HCV predicted
Time $\geq 6$ weeks				
Endotheliitis (–)	3	3 / 0 / 0	0 / 0 / 3	100%
Interface hepatitis (+)				
Endotheliitis (–)	7	7 / 0 / 0	0 / 0 / 7	100%
Interface hepatitis (–)				
Steatosis (+)				
Endotheliitis (–)	34	14 / 5 / 14 / 1	0 / 2 / 32	89%
Interface hepatitis (–)				
Steatosis (–)				
Endotheliitis (+)	7	0 / 6 / 1	0 / 1 / 6	0%
Lymphoid aggregates (–)				
Time $< 6$ weeks				
Endotheliitis (–)	21	10 / 2 / 9	0 / 0 / 21	56%
Endotheliitis (+)	2	0 / 2 / 0	0 / 1 / 1	0%

†(A) Recurrent HCV, (B) acute cellular rejection, (C) undetermined, (D) chronic rejection.

recurrent hepatitis and the diagnosis would have been confirmed in all cases with the application of the algorithm. In the 23 biopsies performed within a period of less than 6 weeks post-transplant, the correct diagnosis could also have been applied in all cases.

## DISCUSSION

**T**HE MAIN FINDING of this study was that a simple algorithm system shows high diagnostic accuracy in distinguishing with high confidence between recurrent HCV and ACR. Thus, by following this algorithm, we were able to obtain a diagnostic accuracy of 96% and 93% in the derivation and validation cohort, respectively. In this diagnostic algorithm, time since transplantation (</≥6 weeks) and the presence of endotheliitis were the most specific findings for distinguishing recurrent HCV from ACR.

Recurrent HCV is not a frequent cause of graft dysfunction in the first weeks after LT, but cases of recurrent HCV are occasionally seen in the period from 10 to 14 days post-transplant.<sup>20,21</sup> Although viremia occurs almost universally post-transplantation,<sup>20</sup> 30–50% of patients with short-term follow up may be viremic without disease, and levels of viremia do not correlate with histological findings.<sup>22,23</sup> Diagnosis of recurrent disease should thus be based on histological findings. Acute hepatitis typically develops between months 1 and 4 post-transplantation, whereas changes consistent with chronic hepatitis are usually seen after 2–3 months post-transplantation.<sup>23–28</sup> In contrast, most cases of ACR occur within the first 30 days, with a median of 8 days.<sup>16,17,29</sup> In our study, 6 weeks after transplantation was the time that best discriminated between recurrent HCV and ACR in a more reliable way.

According to the Banff criteria<sup>30</sup> and to the criteria of many other investigators, LB specimens with ACR usually show portal inflammation, bile duct inflammation and subendothelial inflammation of the portal vein branches or terminal hepatic venules. Endotheliitis was identified in our algorithm as the most specific characteristic capable of excluding recurrent HCV. Thus, the presence of endotheliitis together with a time from LT of less than 6 weeks definitely rules out recurrent HCV. Despite the results obtained, these data should be treated with caution, because there could be circumstances in which the presence of endotheliitis could accompany HCV recurrence, particularly if the inflammatory component is more severe. Centrilobular venulitis can be observed in other entities besides ACR, such as viral hepatitis, drug toxicity, autoimmune dis-

eases, ischemic type injury and particularly in situations of plasma cell-rich HCV<sup>16</sup> but in the context of a recent liver transplant, it can help to identify ACR more appropriately.<sup>31</sup> Other less relevant histological findings for confirming recurrent HCV were the presence of lymphoid aggregates, interface hepatitis and steatosis.

The differential diagnosis between recurrent HCV and ACR may sometimes be confused.<sup>11</sup> A differential diagnosis between recurrent HCV and ACR is complicated but of great importance because treatment of the two entities is completely different and opposite to each other. Recurrent HCV will require antiviral treatment and a reduction in immunosuppression, while on the other hand, ACR will require an increase in immunosuppression, which could be detrimental in the case of the former disease. Recurrent HCV and ACR may sometimes coexist and in these circumstances the decision to increase immunosuppression can be taken when the histological signs of ACR predominate.<sup>11,32</sup> In our series, there were no cases with findings of concomitant recurrent HCV and ACR, or post-transplant autoimmune hepatitis. In cases with a non-specific diagnosis (23 cases), the low histological expression did not allow for a simultaneous diagnosis of recurrent HCV and ACR or autoimmune hepatitis to be considered.

Of the 74 biopsies where a diagnostic consensus could not be reached between the clinician and the pathologist, application of the algorithm would have increased diagnostic accuracy if we take into account the subsequent course of the patient. The diagnosis of recurrent HCV is often based on the clinical and histological progression given that we lack instruments that can reliably allow us to hasten the diagnosis when the first clinical event or first changes in liver biochemistry parameters occur.

In the 74 biopsies in which there was no clinicopathological consensus, it was observed that the probability of a sure and definitive diagnosis increased after applying the diagnostic algorithm if the diagnostic algorithm used in this study was applied, both for biopsies performed prior to 6 weeks and those performed at 6 weeks or more post-transplant.

Therefore, we believe that in these cases that are especially difficult to diagnose, the use of the algorithm in a proper clinicopathological context could be an important diagnostic prediction tool.

This study has some limitations. First, it was a retrospective study and many LB were excluded because they did not meet the minimum criteria for histological diagnosis. Second, all biopsies with a diagnosis other than recurrent HCV or ACR were excluded for

construction of the diagnostic algorithm, though some of these cases progressed to recurrent HCV. Therefore, the model should only be used in these two diseases. If the algorithm is used in other diseases this could lead to a misdiagnosis. The fact that there were no cases of recurrent HCV and concomitant ACR was a further limitation of the study. However, an important strength of this study is that it was conducted in two hospitals located at opposite geographical ends of Spain, providing a representative sample of the general Spanish population, using a clinical management protocol and a similar clinicopathological consensus, thus giving consistency to the diagnostic tree found in this study. Another strong point of the study is that we performed validation of the algorithm in different biopsies from those used to obtain the diagnostic tree. The histological findings analyzed in our study are well recognized in the medical published work for the diagnosis of both recurrent HCV and ACR, however, our work is the first to establish a category of morphological and clinical variables that establish a diagnosis of recurrent HCV or ACR. However, given the overlap that may exist between different histological variables when they are analyzed sequentially, they make up an algorithmic system that is an easy and rapid tool for performing diagnosis.

Differential diagnosis between recurrent HCV and ACR should be assessed primarily on the opinion of pathologists who are experienced in liver transplant pathology. This model also shows a good pathology-clinical correlation that remains the true gold standard when differentiating between recurrent HCV and ACR. Moreover, irrespective of the statistical importance of this model, the clinical relevance of this simple algorithmic system could be useful to aid pathologists who are not experts in transplant pathology or who are less experienced in making a diagnosis, thereby helping to simplify diagnosis. In conclusion, morphological features in LB from HCV-transplanted patients may be useful for simplifying the distinction between recurrent HCV and ACR.

## REFERENCES

- 1 Forman LM, Lewis JD, Berlin JA, Feldman HI, Lucey MR. The association between Hepatitis C infection and survival after liver transplantation. *Gastroenterology* 2002; 122: 889–96.
- 2 Shiffman ML, Saab S, Feng S *et al.* Liver and intestine transplantation in the United States, 1995–2004. *Am J Transpl* 2006; 6: 1170–87.
- 3 European Liver transplant Registry (ELTR). Registry for the European Transplant Registry Association. Available at: <http://www.eltr.org>. Accessed 2012.
- 4 Berenguer M, Prieto M, Runyon JM *et al.* Natural History of clinically compensated HCV relates graft cirrhosis following liver transplantation. *Hepatology* 2000; 32: 852–8.
- 5 Ramirez S, Perez-Del-Pulgar S, Forns X. Virology and pathogenesis of hepatitis C virus recurrence. *Liver Transpl* 2008; 14 (Suppl 2): S27–35.
- 6 Berenguer M. Natural history of recurrent hepatitis C. *Liver Transpl* 2002; 8: S14–18.
- 7 Burton JR Jr, Rosen HR. Acute rejection in HCV-infected liver transplant recipients: the great conundrum. *Liver Transpl* 2006; 12: S38–47.
- 8 Berenguer M, Aguilera V, Prieto M *et al.* Significant improvement in the outcome of HCV-infected transplant recipients by avoiding rapid steroid tapering and potent induction immunosuppression. *J Hepatol* 2006; 44: 717–22.
- 9 Tisone G, Orlando G, Cardillo A *et al.* Complete weaning of immunosuppression in HCV liver transplant recipients is feasible and favourably impacts on the progression of disease recurrence. *J Hepatol* 2006; 44: 702–9.
- 10 Sheiner PA, Schwartz ME, Mor E *et al.* Severe or multiple rejection episodes are associated with early recurrence of hepatitis C after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1995; 21: 30–4.
- 11 Demetris AJ, Eghtesad B, Marcos A *et al.* Recurrent Hepatitis C in liver allografts: prospective assessment of diagnostic accuracy, identification of pitfalls, and observations about pathogenesis. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 658–69.
- 12 Khettry U, Huang WY, Simpson MA *et al.* Patterns of recurrent hepatitis C after liver transplantation in a recent cohort of patients. *Hum Pathol* 2007; 38: 443–52.
- 13 Demetris AJ, Sebagh M. Plasma cell hepatitis in liver allografts: variant of rejection or autoimmune hepatitis? *Liver Transpl* 2008; 14: 750–5.
- 14 Souza P, Prihoda TJ, Hoyumpa AM, Sharkey FE. Morphologic features resembling transplant rejection in core biopsies of native livers from patients with Hepatitis C. *Hum Pathol* 2009; 40: 92–7.
- 15 Czaja AJ, Carpenter HA. Sensitivity, specificity, and predictability of biopsy interpretations in chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1993; 105: 1824–32.
- 16 Demetris AJ. Evolution of hepatitis C virus in liver Allografts. *Liver Transpl* 2009; 15: 35–41.
- 17 Demetris AJ, Adeyi O, Bellamy CO *et al.* Liver biopsy interpretation for causes of late liver allograft dysfunction. *Hepatology* 2006; 44: 489–501.
- 18 Ishak K, Baptista A, Bianchi L *et al.* Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22: 696–9.
- 19 Therneau TM, Atkinson EJ. An introduction to recursive partitioning using theRPARTroutines. Available at: <http://ndc.mayo.edu/mayo/research/biostat/upload/61.pdf>. Accessed February 22, 2011.

*Hepatology Research* 2015; 45: 423–431

Acute rejection vs recurrent HCV after LT 431

- 20 Garcia-Retortillo M, Forns X, Feliu A *et al.* Hepatitis C kinetics during and immediately after transplantation. *Hepatology* 2002; 35: 680–7.
- 21 Saraf N, Fiel MI, Deboccardo G, Emre S, Schiano TD. Rapidly progressive recurrent hepatitis C virus infection starting 9 days after liver transplantation. *Liver Transpl* 2007; 13: 913–7.
- 22 Bonilla R, Batts KP, Burgart LJ *et al.* Early detection of hepatitis C allograft reinfection after orthotopic liver transplantation: a molecular and histologic study. *Mod Pathol* 2000; 13: 229–37.
- 23 Berenguer M. Natural history of recurrent hepatitis C. *Liver Transpl* 2002; 8 (10 Suppl 1): S14–18.
- 24 Duvoux C, Pawlotsky J-M, Cherqui D *et al.* Serial quantitative determination of hepatitis C virus RNA levels after liver transplantation. *Transplantation* 1995; 60: 457–61.
- 25 DiMartino V, Saurini F, Samuel D *et al.* Longitudinal study of intra-hepatic HCV replication after liver transplantation. *Hepatology* 1997; 26: 1343–50.
- 26 Ballardini G, De Raffe E, Groff P *et al.* Timing of reinfection and mechanisms of hepatocellular damage in transplanted HCV-infected liver. *Liver Transpl* 2002; 8: 10–20.
- 27 Gane E, Naoumov N, Qian K *et al.* Longitudinal analysis of hepatitis C virus replication following liver transplantation. *Gastroenterology* 1996; 110: 167–77.
- 28 Fukumoto T, Berg T, Ku Y *et al.* Viral dynamics of hepatitis C early after orthotopic liver transplantation: evidence for rapid turnover of serum virions. *Hepatology* 1996; 24: 1351–4.
- 29 Wiesner RH, Demetris AJ, Belle SH *et al.* Acute hepatic allograft rejection: incidence, risk factors and impact on outcome. *Hepatology* 1998; 28: 638–45.
- 30 International Panel: banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology* 1997; 25: 658–63.
- 31 Demetris AJ. Central venulitis in liver allografts: considerations of differential diagnosis. *Hepatology* 2001; 33: 1329–30.
- 32 Demetris AJ, Eghtesad B, Marcos A *et al.* Recurrent hepatitis C in liver allografts: prospective assessment of diagnostic accuracy, identification of pitfalls and observations about pathogenesis. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 658–69.



