

11201
30



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES DE POSTGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SÓCIAL
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI
"BERNARDO SEPULVEDA"

RELACION ENTRE LOS NIVELES DE RNA DEL VIRUS C (RNA-VHC), CARACTERISTICAS HISTOLOGICAS Y DE INMUNOHISTOQUIMICA EN BIOPSIAS HEPATICAS DE PACIENTES CON INFECCION POR VHC

TESIS DE POSTGRADO

PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA EN

ANATOMIA PATOLOGICA

P R E S E N T A :

DRA. FRANCISCA I. SIERRA SANTIESTEBAN

27 de Feb



IMSS

MEXICO, D. F.

FEBRERO DEL 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DR. NIELS WACHER RODARTE

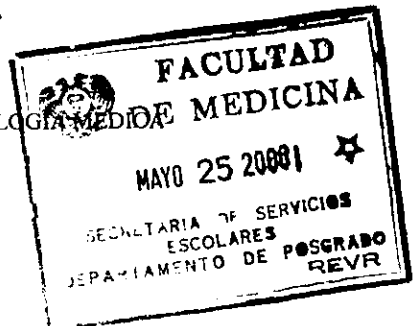
JEFE DE LA DIVISION DE EDUCACION E INVESTIGACION MEDICA

DRA. MA. DE LOURDES CABRERA MUÑOZ
JEFE DEL SERVICIO DE ANATOMIA PATOLOGICA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO

ASESORES DE TESIS

DRA. MA. DE LOURDES CABRERA MUÑOZ
JEFE DEL SERVICIO DE ANATOMÍA PATÓLOGICA

DRA. MARGARITA DEHESA VIOLANTE
JEFE DEL SERVICIO DE GASTROENTEROLOGIA MEDICA



AGRADECIMIENTO

A mis Padres por haberme dado la vida, a mis hermanos y especialmente a Isabel por compartirla conmigo.

A mis Maestros por su dedicación y apoyo, a la Dra. Lourdes Cabrera por su orientación y ayuda incondicional en todo momento.

A mis compañeras Myriam, Argelia, Rocío y Valeria por su compañía durante todo este tiempo.

A todos los que participaron para la elaboración de este trabajo.

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	3
3. ANTECEDENTES	3
4. CURSO CLINICO	4
5. DIAGNOSTICO	5
6. MATERIAL Y METODOS	7
7. RESULTADOS	9
8. DISCUSION	10
9. CONCLUSIONES	12
10. TABLA Y FIGURAS	13
11. BIBLIOGRAFIA	24

RESUMEN

Introducción. La infección por virus de la hepatitis C (VHC) representa la principal causa de infección hepática crónica en el mundo y más del 90% de las hepatitis postransfusionales son secundarias a infección por este virus. El 60-70% de los pacientes progresan a enfermedad hepática crónica y de estos el 20% evoluciona a cirrosis hepática. Existe poca información en la literatura que demuestre la distribución del virus en el lobulillo hepático humano y en México no hay informes de la detección del VHC por inmunohistoquímica. El objetivo de este estudio fue determinar si los niveles séricos del RNA de VHC se correlacionan con las características histológicas e inmunohistoquímicas del VHC en tejido hepático.

Material y métodos. De 94 casos de pacientes con infección por VHC confirmado por serología positiva por RIBA y/o PCR, se analizaron las características clínicas e histológicas y posteriormente se investigó la presencia del VHC por inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal comercial (HVC 88 San Ramon California) dirigido contra el antígeno NS3 del VHC.

Resultados. La edad de los pacientes fue de 17 a 68 años (42.7). El 55.3% del sexo masculino y 44.7% del sexo femenino. El factor de riesgo más frecuentemente observado fue la transfusión sanguínea (68%). El 79.8% de los casos presentaron niveles de ALT por arriba de 40UI/ml y en el resto se encontraron dentro de niveles normales. Todos los pacientes presentaron serología positiva para VHC por RIBA y en el 81% se identificó el RNA- VHC por la técnica de PCR. En el 76% de los casos se encontraron datos histológicos de hepatitis crónica con diferentes grados de actividad: 55(58.5%) leve, 17(18.08%) mínima y 9(9.5%) moderada. En 6 casos (6.3%) la morfología hepática fue de características normales. En 7 casos se detectó fibrosis y 2 presentaron cirrosis hepática. Los niveles de RNA-VHC fueron muy variables, el grupo con histología normal (0 a 55,000 copias por ml.), mientras que el grupo de pacientes con hepatitis crónica con actividad mínima, leve y moderada la mediana de los niveles fue de 20 000, 67 700 y 35 000 copias/ml respectivamente. La reacción de inmunohistoquímica fue positiva en 85(90%) de los casos con infección por VHC y en el 60% de los controles.

Conclusiones. El patrón histológico más frecuentemente observado fue el de Hepatitis crónica con actividad mínima-leve. Los niveles de RNA del VHC en suero fueron muy variables y sin correlación con el grado de actividad necroinflamatoria y niveles de ALT.

La detección del VHC con el método de inmunohistoquímica utilizando anticuerpo monoclonal (HCV 88 San Ramon California) dirigido contra el antígeno NS3 del VHC fue positivo en el 90% de los casos y en el 60% de los controles, presentando una sensibilidad del 90% pero su especificidad es muy baja 10%. Estos resultados son similares a los reportados por otros autores utilizando otros anticuerpos comerciales (TORDJI 23 y TORDJI 32).

La distribución de los hepatocitos positivos para VHC por inmunohistoquímica en el acino de Rappaport fue en las tres zonas con una intensidad variable de + a +++++. Sin embargo este hallazgo debe de interpretarse con cautela debido a que los controles presentaban patrones de tinción similares.

Hasta que se demuestre la especificidad real del anticuerpo HVC88, no se deberá utilizar como prueba diagnóstica.

INTRODUCCIÓN

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es un problema de salud pública. Actualmente se considera la principal causa de infección hepática crónica en el mundo y más del 90% de las hepatitis postransfusionales son secundarias a infección por este virus (1).

La infección por VHC presenta una prevalencia mundial de 0.4 a 16 por ciento dependiendo de la zona geográfica y de 0.5 a 2.0 por ciento en donadores de sangre voluntarios. La prevalencia en América Latina no se ha estudiado en detalle sin embargo se considera que es cuarenta por ciento más frecuente en latinos que viven en Estados Unidos comparados con los estadounidenses (2).

Las principales vías de transmisión de este virus son las inoculaciones percutáneas y las transfusiones sanguíneas, se ha documentado la transmisión por contacto sexual y familiar con menor frecuencia. Los grupos de alto riesgo para adquirir la infección son los receptores de múltiples transfusiones, pacientes en programas de hemodiálisis o trasplantes de órganos, individuos adictos a drogas intravenosas así como trabajadores de la salud. Aproximadamente en la mitad de los pacientes se desconoce la vía de infección.

Los pacientes con cirrosis no explicada y carcinoma hepatocelular tienen unas tasas de prevalencia que superan el 50% (3,4).

ANTECEDENTES

El genoma del virus de la hepatitis no A no B fue clonado del plasma de un Chimpancé experimentalmente infectado por Choo y col. en 1989 y fue denominado virus de la hepatitis C (VHC) (5). Está constituido por una cadena simple de ARN que mide 50 a 60nm, contiene un genoma de más de 10,000 nucleótidos que codifica al menos 9 proteínas. Core, E1 y E2 constituyen las proteínas estructurales; NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B son proteínas no estructurales (NS). El VHC es extremadamente heterogéneo debido a la sustitución espontánea de nucleótidos. Se calcula que el número de mutaciones por genoma y por año es de 1000 a 10 000 sustituciones de bases, la mayoría ocurre en la región hipervariable de la cubierta proteica. Este elevado número de mutaciones refleja la habilidad del virus para evadir los mecanismos inmunológicos de

INTRODUCCIÓN

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es un problema de salud pública. Actualmente se considera la principal causa de infección hepática crónica en el mundo y más del 90% de las hepatitis postransfusionales son secundarias a infección por este virus (1).

La infección por VHC presenta una prevalencia mundial de 0.4 a 16 por ciento dependiendo de la zona geográfica y de 0.5 a 2.0 por ciento en donadores de sangre voluntarios. La prevalencia en América Latina no se ha estudiado en detalle sin embargo se considera que es cuarenta por ciento más frecuente en latinos que viven en Estados Unidos comparados con los estadounidenses (2).

Las principales vías de transmisión de este virus son las inoculaciones percutáneas y las transfusiones sanguíneas, se ha documentado la transmisión por contacto sexual y familiar con menor frecuencia. Los grupos de alto riesgo para adquirir la infección son los receptores de múltiples transfusiones, pacientes en programas de hemodiálisis o trasplantes de órganos, individuos adictos a drogas intravenosas así como trabajadores de la salud. Aproximadamente en la mitad de los pacientes se desconoce la vía de infección.

Los pacientes con cirrosis no explicada y carcinoma hepatocelular tienen unas tasas de prevalencia que superan el 50% (3,4).

ANTECEDENTES

El genoma del virus de la hepatitis no A no B fue clonado del plasma de un Chimpancé experimentalmente infectado por Choo y col. en 1989 y fue denominado virus de la hepatitis C (VHC) (5). Está constituido por una cadena simple de ARN que mide 50 a 60nm, contiene un genoma de más de 10,000 nucleótidos que codifica al menos 9 proteínas. Core, E1 y E2 constituyen las proteínas estructurales; NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B son proteínas no estructurales (NS). El VHC es extremadamente heterogéneo debido a la sustitución espontánea de nucleótidos. Se calcula que el número de mutaciones por genoma y por año es de 1000 a 10 000 sustituciones de bases, la mayoría ocurre en la región hipervariable de la cubierta proteica. Este elevado número de mutaciones refleja la habilidad del virus para evadir los mecanismos inmunológicos de

defensa del huésped y es responsable del curso crónico de la enfermedad en un gran número de individuos infectados. En base al porcentaje de homología de la secuencia de nucleótidos se han descrito 11 genotipos y alrededor de 90 subtipos. La distribución geográfica y epidemiológica de los genotipos del VHC están bien documentada, hasta el momento el tipo I del VHC es el genotipo mayor y corresponde aproximadamente 40 a 80 por ciento de las infecciones por VHC (6).

La inmunopatogénesis de la infección por VHC se conoce poco, existe un estado de portador asintomático y la infección aguda puede evolucionar a enfermedad crónica con persistencia del virus en sangre periférica y en hígado. Se sugiere que la infección persistente y la viremia prolongada son reflejos de las propiedades inherentes del VHC o como en el caso de la infección por virus B es indicativo de una respuesta inmune insuficiente para limitar la infección. En un estudio experimental con chimpancés infectados por VHC la replicación del virus se correlaciona con los niveles séricos de ALT, lo que sugiere que está directamente relacionada con la lesión del hepatocito (7); sin embargo no se ha podido demostrar la correlación entre los niveles séricos de la ALT y la necrosis de las células hepáticas, además el VHC no se ha detectado en las áreas de necrosis (8).

CURSO CLINICO

Los individuos con infección por VHC presentan un amplio espectro clínico. La infección aguda por éste virus es asintomática en el 95 por ciento de los pacientes, sólo el 5 por ciento manifiesta cuadro clínico con ictericia y el riesgo de insuficiencia hepática fulminante es mínimo (9).

La infección persistente y la hepatitis crónica son signos característicos de la infección por VHC. El 60 a 70 por ciento de los pacientes progresan a enfermedad hepática crónica con niveles fluctuantes de aminotransferasas séricas y el 20 por ciento de los pacientes evoluciona a cirrosis hepática. Se sugiere que el carcinoma hepatocelular puede ser una consecuencia tardía de la infección crónica por este virus pues en el 75 por ciento de los pacientes con esta neoplasia se detectan anticuerpos contra el VHC. El intervalo medio que transcurre entre la infección por VHC y la hepatitis crónica sintomática, cirrosis hepática sintomática y carcinoma hepatocelular se ha observado que es de 10, 21 y 29 años respectivamente (10, 11).

defensa del huésped y es responsable del curso crónico de la enfermedad en un gran número de individuos infectados. En base al porcentaje de homología de la secuencia de nucleótidos se han descrito 11 genotipos y alrededor de 90 subtipos. La distribución geográfica y epidemiológica de los genotipos del VHC están bien documentada, hasta el momento el tipo I del VHC es el genotipo mayor y corresponde aproximadamente 40 a 80 por ciento de las infecciones por VHC (6).

La inmunopatogénesis de la infección por VHC se conoce poco, existe un estado de portador asintomático y la infección aguda puede evolucionar a enfermedad crónica con persistencia del virus en sangre periférica y en hígado. Se sugiere que la infección persistente y la viremia prolongada son reflejos de las propiedades inherentes del VHC o como en el caso de la infección por virus B es indicativo de una respuesta inmune insuficiente para limitar la infección. En un estudio experimental con chimpancés infectados por VHC la replicación del virus se correlaciona con los niveles séricos de ALT, lo que sugiere que está directamente relacionada con la lesión del hepatocito (7); sin embargo no se ha podido demostrar la correlación entre los niveles séricos de la ALT y la necrosis de las células hepáticas, además el VHC no se ha detectado en las áreas de necrosis (8).

CURSO CLINICO

Los individuos con infección por VHC presentan un amplio espectro clínico. La infección aguda por éste virus es asintomática en el 95 por ciento de los pacientes, sólo el 5 por ciento manifiesta cuadro clínico con ictericia y el riesgo de insuficiencia hepática fulminante es mínimo (9).

La infección persistente y la hepatitis crónica son signos característicos de la infección por VHC. El 60 a 70 por ciento de los pacientes progresan a enfermedad hepática crónica con niveles fluctuantes de aminotransferasas séricas y el 20 por ciento de los pacientes evoluciona a cirrosis hepática. Se sugiere que el carcinoma hepatocelular puede ser una consecuencia tardía de la infección crónica por este virus pues en el 75 por ciento de los pacientes con esta neoplasia se detectan anticuerpos contra el VHC. El intervalo medio que transcurre entre la infección por VHC y la hepatitis crónica sintomática, cirrosis hepática sintomática y carcinoma hepatocelular se ha observado que es de 10, 21 y 29 años respectivamente (10, 11).

Los niveles de aminotransferasas fluctúan con periodos intercurrentes cercanos a la normalidad y no siempre se correlacionan con los hallazgos histopatológicos, los pacientes con niveles normales de aminotransferasas pueden tener una enfermedad histológicamente avanzada.

La infección por VHC puede presentar manifestaciones extrahepáticas entre las que destacan glomerulonefritis membranoproliferativa, crioglobulinemia, porfiria cutánea tardía, vasculitis leucocitoclástica y fibrosis pulmonar (12).

DIAGNOSTICO

La hepatitis crónica constituye un síndrome clínico morfológico de etiología variable que incluye: viral, autoinmunidad y reacción a drogas. El diagnóstico específico es el resultado de la combinación de características clínicas, histológicas y serológicas.

El virus de la hepatitis C circulante en suero se encuentra en concentraciones bajas entre 10^2 a 10^7 partículas por mililitro, su detección y cuantificación requiere de pruebas altamente sensibles.

La prueba de ELISA de 1ª. Generación se basa en la detección del anticuerpo contra el antígeno C100-3 que es un polipéptido de 363 aminoácidos de la región no estructural NS4 del genoma de VHC y muestra una sensibilidad del 89 por ciento y alto rango de falsos positivos. La prueba de ELISA de 2ª generación detecta el anticuerpo dirigido contra las fracciones C200 de la región NS3 y NS4 o de un pequeño fragmento c33c de la región NS3 en la primeras cuatro semanas después de la inoculación del virus con una especificidad y sensibilidad del 98 por ciento. La prueba de RIBA se basa en la detección de bandas de 5-1-1, C100-3, c22-3 y c33c, constituye una prueba confirmatoria de infección por VHC con una sensibilidad del 98% (13, 14 y 15).

El ARN del VHC puede ser detectado en suero por técnicas de amplificación como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en las primeras dos semanas después de la inoculación, encontrándose presente en forma transitoria en la hepatitis aguda resuelta e indefinidamente cuando la evolución es crónica. La detección por PCR se utiliza como el mejor predictor del estado infeccioso así como para evaluar la respuesta al tratamiento antiviral y ha demostrado excelentes resultados con una sensibilidad de 100 por ciento. El ARN del VHC se ha detectado en tejido hepático mediante ésta técnica, sin embargo la

Los niveles de aminotransferasas fluctúan con periodos intercurrentes cercanos a la normalidad y no siempre se correlacionan con los hallazgos histopatológicos, los pacientes con niveles normales de aminotransferasas pueden tener una enfermedad histológicamente avanzada.

La infección por VHC puede presentar manifestaciones extrahepáticas entre las que destacan glomerulonefritis membranoproliferativa, crioglobulinemia, porfiria cutánea tardía, vasculitis leucocitoclástica y fibrosis pulmonar (12).

DIAGNOSTICO

La hepatitis crónica constituye un síndrome clínico morfológico de etiología variable que incluye: viral, autoinmunidad y reacción a drogas. El diagnóstico específico es el resultado de la combinación de características clínicas, histológicas y serológicas.

El virus de la hepatitis C circulante en suero se encuentra en concentraciones bajas entre 10^2 a 10^7 partículas por mililitro, su detección y cuantificación requiere de pruebas altamente sensibles.

La prueba de ELISA de 1ª. Generación se basa en la detección del anticuerpo contra el antígeno C100-3 que es un polipéptido de 363 aminoácidos de la región no estructural NS4 del genoma de VHC y muestra una sensibilidad del 89 por ciento y alto rango de falsos positivos. La prueba de ELISA de 2ª generación detecta el anticuerpo dirigido contra las fracciones C200 de la región NS3 y NS4 o de un pequeño fragmento c33c de la región NS3 en la primeras cuatro semanas después de la inoculación del virus con una especificidad y sensibilidad del 98 por ciento. La prueba de RIBA se basa en la detección de bandas de 5-1-1, C100-3, c22-3 y c33c, constituye una prueba confirmatoria de infección por VHC con una sensibilidad del 98% (13, 14 y 15).

El ARN del VHC puede ser detectado en suero por técnicas de amplificación como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en las primeras dos semanas después de la inoculación, encontrándose presente en forma transitoria en la hepatitis aguda resuelta e indefinidamente cuando la evolución es crónica. La detección por PCR se utiliza como el mejor predictor del estado infeccioso así como para evaluar la respuesta al tratamiento antiviral y ha demostrado excelentes resultados con una sensibilidad de 100 por ciento. El ARN del VHC se ha detectado en tejido hepático mediante ésta técnica, sin embargo la

localización del virus en los hepatocitos infectados y la cantidad de genomas del VHC no se ha podido demostrar por éste método(12,13,14).

La biopsia hepática es el elemento más útil para determinar la gravedad y el potencial de progresión de la infección por VHC. El patrón histológico más común es una hepatitis crónica leve con actividad necroinflamatoria mínima y solo en raras ocasiones se observa actividad intensa; no existe un signo histopatológico patognomónico para establecer el diagnóstico de hepatitis crónica por virus C sin embargo la presencia de agregados o folículos linfoides, esteatosis y lesión de los conductos biliares son altamente sugestivos de infección por este virus(15,16,17).

Existen pocos estudios realizados para la detección del VHC por medio de inmunohistoquímica en hígado. En un estudio retrospectivo de la universidad de Osaka, Japón por Hiramatsu N. y colaboradores, examinaron 48 biopsias hepáticas para la detección por inmunohistoquímica del antígeno del core, envoltura y región NS3, encontrando positividad en el 23 al 24 por ciento de las muestras en forma casi similar para los tres antígenos. Los autores señalan que éste porcentaje es bajo debido a que el tejido estudiado era insuficiente y probablemente el tipo viral contra el cual fueron preparados los anticuerpos era diferente al tipo viral presente en el tejido estudiado. Es importante resaltar que los anticuerpos utilizados en éste estudio fueron elaborados por los autores y el procedimiento utilizado para la conservación del tejido fue la congelación (18).

En otro estudio realizado por Svoboda y colaboradores para la detección del VHC por RT-PCR e inmunohistoquímica en biopsias hepáticas fijadas en formol de pacientes transplantados encontró una sensibilidad del 98 y 47 por ciento respectivamente, utilizando un anticuerpo monoclonal comercial TORDJI-22 (BioGenex, San Ramon, California) (19).

A pesar de los avances de la biología molecular en el diagnóstico de la infección por VHC, existe poca información en la literatura que demuestre la distribución del virus en el lobulillo hepático humano por el método de inmunohistoquímica, en México no hay informes de la detección del VHC por inmunohistoquímica en biopsias hepáticas.y en nuestra institución no existen estudios que correlacionen la carga viral, alteraciones histopatológicas y presencia de VHC por inmunohistoquímica en tejido hepático.

El procedimiento de inmunohistoquímica es técnicamente sencillo y accesible para confirmar la presencia de antígenos virales en tejidos. Consideramos importante investigar la sensibilidad y especificidad diagnóstica de ésta prueba en la detección del VHC en tejido hepático fijado en formol y conservado en parafina utilizando un nuevo anticuerpo monoclonal HCV88 (BioGenex, San Ramon, California) dirigido contra la región NS3 del virus, determinar la frecuencia y distribución del VHC en el lobulillo hepático y su correlación con los hallazgos histopatológicos, datos clínicos, elevación de ALT y carga viral RNA-VHC en suero por PCR.

MATERIAL Y METODOS

Es un estudio retrospectivo realizado en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, durante 1995 a 1998. En el archivo del servicio de Anatomía Patológica se encontraron 1176 biopsias hepáticas de las cuales se seleccionaron 94 casos de pacientes con infección por VHC diagnosticados por RIBA y/o PCR en suero y 10 casos de pacientes controles con otras enfermedades hepáticas: 5 casos de esteatohepatitis no alcohólica, 1 caso de hepatitis granulomatosa y 4 de hígados normales a los cuales se les realizó biopsia hepática como parte del protocolo de estudio.

Las muestras de tejido hepático fijado en formol neutro al 10% y/o fijador de Bouin e incluidos en parafina se evaluaron histológicamente para establecer el diagnóstico de anormalidad y de infección por VHC de acuerdo a criterios establecidos (15), posteriormente se investigó la presencia del VHC mediante el método de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo monoclonal comercial HCV88 (BioGenex, San Ramon, California) dirigido contra el antígeno NS3 del VHC. Los datos clínicos se obtuvieron del expediente clínico y del archivo del Servicio de Gastroenterología incluyendo edad, sexo, factor de riesgo, así como resultados de pruebas de funcionamiento hepático (determinación de ALT) y de estudios serológicos que confirmaron la presencia del VHC (RIBA y PCR).

El análisis estadístico se realizó utilizando estadística descriptiva.

El procedimiento de inmunohistoquímica es técnicamente sencillo y accesible para confirmar la presencia de antígenos virales en tejidos. Consideramos importante investigar la sensibilidad y especificidad diagnóstica de ésta prueba en la detección del VHC en tejido hepático fijado en formol y conservado en parafina utilizando un nuevo anticuerpo monoclonal HCV88 (BioGenex, San Ramon, California) dirigido contra la región NS3 del virus, determinar la frecuencia y distribución del VHC en el lobulillo hepático y su correlación con los hallazgos histopatológicos, datos clínicos, elevación de ALT y carga viral RNA-VHC en suero por PCR.

MATERIAL Y METODOS

Es un estudio retrospectivo realizado en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, durante 1995 a 1998. En el archivo del servicio de Anatomía Patológica se encontraron 1176 biopsias hepáticas de las cuales se seleccionaron 94 casos de pacientes con infección por VHC diagnosticados por RIBA y/o PCR en suero y 10 casos de pacientes controles con otras enfermedades hepáticas: 5 casos de esteatohepatitis no alcohólica, 1 caso de hepatitis granulomatosa y 4 de hígados normales a los cuales se les realizó biopsia hepática como parte del protocolo de estudio.

Las muestras de tejido hepático fijado en formol neutro al 10% y/o fijador de Bouin e incluidos en parafina se evaluaron histológicamente para establecer el diagnóstico de anormalidad y de infección por VHC de acuerdo a criterios establecidos (15), posteriormente se investigó la presencia del VHC mediante el método de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo monoclonal comercial HCV88 (BioGenex, San Ramon, California) dirigido contra el antígeno NS3 del VHC. Los datos clínicos se obtuvieron del expediente clínico y del archivo del Servicio de Gastroenterología incluyendo edad, sexo, factor de riesgo, así como resultados de pruebas de funcionamiento hepático (determinación de ALT) y de estudios serológicos que confirmaron la presencia del VHC (RIBA y PCR).

El análisis estadístico se realizó utilizando estadística descriptiva.

PROCEDIMIENTOS

Histología

Cortes de tejido hepático procesados por métodos de histología de rutina, teñidos con hematoxilina-eosina y tinciones especiales de PAS, tricrómico de Masson y retículo (20).

Inmunohistoquímica

Se realizó el siguiente protocolo utilizando el método de avidina-biotina-fosfatasa alcalina y como cromógeno New fuschin (BioGenex, San Ramon, California)

1. Cortes de tejido incluido en parafina de 5 micras, montados en portaobjetos con adhesivo
2. Eliminación de parafina e hidratación de los cortes gradualmente a través de alcoholes en concentraciones decrecientes
3. Enjuague en agua destilada por 1 a 2 minutos
4. Lavado en tres ocasiones con PBS durante 5 minutos cada uno
5. Bloqueo de proteína y biotina endógena durante 20 minutos
6. Incubación con anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C
7. Lavado con PBS en tres ocasiones durante 5 minutos cada vez
8. Incubación con anticuerpo secundario LINK durante 20 minutos
9. Lavado con PBS en tres ocasiones durante 5 minutos cada vez
10. Incubación con el complejo fosfatasa alcalina LABEL durante 20 minutos
11. Lavado con PBS en tres ocasiones durante 5 minutos cada vez
12. Revelado New Fuchsin durante 15 a 20 minutos
13. Lavado con agua durante 5 minutos
14. Tinción de contraste con hematoxilina de Harris durante 20 a 30 segundos
15. Lavado con agua corriente
16. Solución amoniacal durante 10 segundos seguido de lavado con agua corriente
17. Paso por etanol al 96% en dos ocasiones durante 5 segundos cada vez
18. Paso por etanol al 100% durante 5 segundos cada vez
19. Aclaramiento con xilol y montaje permanente con resina sintética

En todos los casos se incluyeron controles adecuados; para determinar la conservación del tejido y posible pérdida de los antígenos secundaria a la fijación con formol neutro al 10 % y fijador de Bouin se empleó un anticuerpo contra vimentina y para descartar tinción inespecífica se omitió el anticuerpo primario.

RESULTADOS

Se analizaron un total de 94 biopsias hepáticas de pacientes con un rango de edad de 17 a 68 años y una media de 42.7. El 55.3% (52) fueron del sexo masculino y 44.7% (42) del sexo femenino. El factor de riesgo que se encontró con mayor frecuencia fue la transfusión sanguínea en 64 casos (68%), seguido por el antecedente de cirugía en 22 casos (23.4%) y riesgo de exposición laboral en trabajadores de la Salud en 5 (5.3%). Los niveles de ALT en suero fluctuaron entre 10 y 482 UI/ml. con una media de 79UI/ml.

En el 100% de los casos estudiados se confirmó la presencia del VHC por serología positiva por RIBA de 2ª generación. En 81 casos se identificó el RNA del VHC por PCR en suero. La carga viral detectada fluctuó entre 100 a 7,000,000 copias/ml. (Tabla 1).

En la mayoría de los casos se encontraron datos histológicos de hepatitis crónica con diferentes grados de actividad : 55 (58.5%) leve, 17 (18.08%) mínima y moderada en 8 (9.5%). En seis casos (6.3%) la morfología del hígado fue de características normales y en los 5 casos restantes las muestras fueron insuficientes para diagnóstico ya que solo se observaron 1 a 2 espacios porta.

En casos se detectó la presencia de fibrosis y dos presentaban cirrosis hepática.

La carga viral de RNA del VHC para el grupo de casos con morfología hepática normal fue de 0 a 55,000 copias/ml. con una mediana de 11 750, en los casos de hepatitis crónica la carga viral detectada según el grado de actividad fue la siguiente: con actividad mínima de 0 a 3,000 000 copias/ml. (mediana de 20 000), con actividad leve de 0 a 7,000 000 copias / ml (mediana de 67 700) y actividad moderada de 1000 a 55 000 copias / ml (mediana de 35 000).

La presencia de VHC por inmunohistoquímica en el control positivo y las biopsias de hígado estudiadas fue identificada en el núcleo de los hepatocitos el cual se observó de color rojo. La intensidad de la reacción se graduó usando la siguiente escala semicuantitativa : negativa 0 %, + de 1 a 25 %, ++ de 26 a 50 %, +++ 51 al 75 % y ++++ más del 75 % de los hepatocitos.

En 85 (90.4%) de las biopsias de pacientes con serología positiva para VHC se demostró la presencia del VHC. Los hepatocitos con núcleos positivos se encontraron distribuidos en las tres zonas del acino hepático de Rappaport sin predilección por alguna y en el

66% de los casos la reacción fue calificada como +++ a ++++ (51 a 100%) de los hepatocitos positivos para VHC.

En 6 de los 10 casos controles de pacientes con otras enfermedades hepáticas e hígados normales con serología negativa para VHC se observó tinción positiva del núcleo de los hepatocitos con distribución e intensidad de tinción similares a las observadas en los pacientes con infección por VHC.

DISCUSION

Los pacientes con infección por VHC presentan un amplio espectro clínico patológico, el 60-70% progresan a enfermedad hepática crónica con niveles fluctuantes de aminotransferasas que no siempre se correlacionan con los hallazgos histopatológicos, los pacientes con niveles normales de aminotransferasas pueden presentar una enfermedad histológicamente avanzada (21,22). En nuestro estudio el 80% de los pacientes con infección por VHC presentan elevación de transaminasas (ALT) con una media de 72UI/ml. y en el 20% se encontraron dentro de niveles normales (menos de 40UI/ml). El patrón histológico más frecuentemente observado fue el de hepatitis crónica con actividad leve - mínima (58.5 - 18%) por Índice de Knodell. No se identificaron casos con actividad intensa y en el 6.3% de los casos no se encontraron alteraciones histopatológicas. Cuando se analizó la relación entre grado de actividad y los niveles de ALT observamos que existe una tendencia de incremento en los niveles de ALT en suero conforme aumenta el grado de actividad necroinflamatoria, sin embargo no se puede establecer una correlación estadísticamente significativa.(Figura 2)

El significado clínico y patológico de los niveles de RNA del VHC se desconoce. Gordon y col. (23) refieren que existe una relación directamente proporcional entre los niveles de RNA-VHC y el grado de actividad. En una serie de 47 pacientes de Lau y col. (24) observan que los niveles de RNA VHC no se correlacionan con el diagnóstico histológico ya que algunos de los pacientes con hepatitis crónica activa presentan cargas virales inferiores a las de los pacientes con hepatitis crónica persistente.

En nuestro grupo de pacientes la mediana de los niveles séricos de RNA-VHC para los casos con histología normal (11 750 copias / ml) fue menor que en los casos de hepatitis crónica mínima y leve (20 000 y 67 700 respectivamente), sin embargo los valores encontrados en los casos de actividad moderada (35 000) no se comportan de la misma

66% de los casos la reacción fue calificada como +++ a ++++ (51 a 100%) de los hepatocitos positivos para VHC.

En 6 de los 10 casos controles de pacientes con otras enfermedades hepáticas e hígados normales con serología negativa para VHC se observó tinción positiva del núcleo de los hepatocitos con distribución e intensidad de tinción similares a las observadas en los pacientes con infección por VHC.

DISCUSION

Los pacientes con infección por VHC presentan un amplio espectro clínico patológico, el 60-70% progresan a enfermedad hepática crónica con niveles fluctuantes de aminotransferasas que no siempre se correlacionan con los hallazgos histopatológicos, los pacientes con niveles normales de aminotransferasas pueden presentar una enfermedad histológicamente avanzada (21,22). En nuestro estudio el 80% de los pacientes con infección por VHC presentan elevación de transaminasas (ALT) con una media de 72UI/ml. y en el 20% se encontraron dentro de niveles normales (menos de 40UI/ml). El patrón histológico más frecuentemente observado fue el de hepatitis crónica con actividad leve - mínima (58.5 - 18%) por Índice de Knodell. No se identificaron casos con actividad intensa y en el 6.3% de los casos no se encontraron alteraciones histopatológicas. Cuando se analizó la relación entre grado de actividad y los niveles de ALT observamos que existe una tendencia de incremento en los niveles de ALT en suero conforme aumenta el grado de actividad necroinflamatoria, sin embargo no se puede establecer una correlación estadísticamente significativa.(Figura 2)

El significado clínico y patológico de los niveles de RNA del VHC se desconoce. Gordon y col. (23) refieren que existe una relación directamente proporcional entre los niveles de RNA-VHC y el grado de actividad. En una serie de 47 pacientes de Lau y col. (24) observan que los niveles de RNA VHC no se correlacionan con el diagnóstico histológico ya que algunos de los pacientes con hepatitis crónica activa presentan cargas virales inferiores a las de los pacientes con hepatitis crónica persistente.

En nuestro grupo de pacientes la mediana de los niveles séricos de RNA-VHC para los casos con histología normal (11 750 copias / ml) fue menor que en los casos de hepatitis crónica mínima y leve (20 000 y 67 700 respectivamente), sin embargo los valores encontrados en los casos de actividad moderada (35 000) no se comportan de la misma

manera. Además los rangos de carga viral en cada grupo son muy variables y no muestran correlación con el grado de actividad necroinflamatoria.(Figura 3).

Existen pocos estudios realizados para la detección del VHC por inmunohistoquímica, Hiramatsu N y col.(18) encontró una sensibilidad de 23 a 24% utilizando antígenos del core, envoltura y NS3 en tejido congelado. En otro estudio de detección del VHC por inmunohistoquímica en tejido fijado en formol y conservado en parafina realizado por Svoboda y col. (19) utilizando un anticuerpo monoclonal comercial TORDJI-22 reporta una sensibilidad del 47% . En este estudio investigamos la presencia del RNA VHC en tejido hepático fijado en formol neutro al 10% y fijador de Bouin utilizando un nuevo anticuerpo monoclonal comercial (HCV 88 BioGenex, San Ramón california) mediante la técnica de avidina biotina fosfatasa alcalina y usando como revelador cromógeno New Fushin. Se utilizaron varios protocolos de tinción que incluyeron la recuperación de antígenos y diferentes tiempos de incubación del anticuerpo primario. La detección del VHC por este método fue positiva en el 90% de los casos sin embargo en 60% de los casos controles se detectó reacción positiva semejante a los casos con infección por VHC. La sensibilidad de esta prueba fue del 90% y la especificidad del 10%. La inmunoreactividad en tejido hepático de pacientes con infección por VHC con el anticuerpo monoclonal HCV88, es similar a la informada por otros autores para los anticuerpos monoclonales TORDJI-22 y TORDJI-32 (25).

En tejido fijado en formol, estos anticuerpos además de reconocer el epítipo del VHC reconocen otros epítipes lo que se traduce en un porcentaje alto de falsos positivos del 60 a 80 %, como se encontró en nuestra serie. (25). Para los anticuerpos monoclonales TORDJI-22 y TORDJI-32 se ha demostrado que las proteínas mitocondriales producen esta reacción cruzada (26). En el caso de HCV88 se desconocen los antígenos presentes en el núcleo de los hepatocitos que expliquen la reacción cruzada positiva. Se probaron otros tejidos que incluyeron próstata, ganglio linfático, riñón y mucosa gástrica y no se observó reacción en los núcleos en ninguno de ellos, lo que sugiere que el epítipo que reconoce este anticuerpo es casi exclusivo de los hepatocitos.

CONCLUSIONES

- El 80% de los pacientes con infección por VHC presentan elevación de aminotransferasas (ALT) con niveles de 10 a 482 UI/ml y una media de 79 UI/ml. En el 20% se encuentran dentro de niveles normales (menos de 40UI/ml).
- En el 76.5% de los casos el diagnóstico histopatológico fue de hepatitis crónica con actividad mínima a leve por índice de Knodell, en el 7.4% se identificó fibrosis portal con formación de puentes y el 2% presentó cirrosis hepática. En 6 casos (6.3%) no se encontraron alteraciones histopatológicas. Se observó una tendencia de incremento en los niveles de aminotransferasas (ALT) en suero a medida que aumenta el grado de actividad necroinflamatoria; sin embargo no fue posible demostrar una correlación estadísticamente significativa.
- El RNA-VHC por PCR en suero fluctuó entre 100 y 7 000 000 copias por ml. En los pacientes con biopsia hepática sin alteraciones histopatológicas los niveles detectados fueron de 0 a 55 000 copias por ml. En los casos con diagnóstico de hepatitis crónica con actividad mínima (0 a 3 000 000), con actividad leve (0 a 7 000 000) y con actividad moderada (1000 a 55 000). No se encontró correlación del RNA-VHC en suero con el grado de actividad necroinflamatoria ni con los niveles de aminotransferasas (ALT).
- La detección del RNA del VHC por inmunohistoquímica en tejido hepático fijado en formol neutro al 10% y/o fijador de Bouin, utilizando el anticuerpo monoclonal comercial HCV88 (BioGenex San Ramon , California) fue positiva en 90% de los casos con infección por VHC y en el 60% de los controles. La sensibilidad de esta prueba fue del 90% y la especificidad del 10%.
- La distribución de los hepatocitos positivos para VHC por inmunohistoquímica en el acino de Rappaport fue en las tres zonas con una intensidad variable de + a +++++. Sin embargo este hallazgo debe de interpretarse con cautela debido a que los controles presentaban patrones de tinción similares.
- Hasta que se demuestre la especificidad real del anticuerpo HVC88, no se deberá utilizar como prueba diagnóstica.

Tabla 1. Características de los pacientes y resultados

No.	Edad	Sexo	Factor de riesgo	ALT UI/ml	RIBA	RNA-VHC Copias /ml	Indice de Knodell	Actividad	IHQ VHC
1	58	F	transfusión	17	positivo	0	M.I.	M.I.	negativa
2	54	F	transfusión	43	positivo	185000	M.I.	M.I.	negativa
3	57	F	transfusión	20	positivo	0	M.I.	M.I.	XXXX
4	67	F	cirugía	43	positivo	0	0,0,1-0	minima	XXXX
5	24	M	cirugía	34	positivo	0	Normal	normal	XXXX
6	50	F	transfusión	45	positivo	0	0,1,0-0	minima	XXX
7	29	M	transfusión	46	positivo	0	0,1,1-0	minima	XXXX
8	26	M	cirugía	33	positivo	0	M.I.	M.I.	XX
9	54	F	cirugía	24	positivo	0	0,0,0-0	normal	XXXX
10	37	F	transfusión	38	positivo	70400	0,0,4-0	leve	XX
11	45	F	cirugía	32	positivo	51700	0,0,1-0	minima	XXXX
12	43	F	transfusión	10	positivo	55000	Normal	normal	XXXX
13	24	M	transfusión	17	Positivo	100	Normal	normal	XXXX
14	47	F	cirugía	33	Positivo	793000	1,0,3-0	leve	XXXX
15	27	F	transfusión	29	Positivo	25000	M.I.	M.I.	XX
16	52	F	transfusión	18	Positivo	0	0,0,1-0	minima	X
17	36	M	transfusión	62	Positivo	65000	0,0,4-0	leve	XXXX
18	43	M	transfusión	102	Positivo	25000	0,1,3-0	leve	XXX
19	54	M	transfusión	168	Positivo	500000	0,0,1-0	leve	XXXX
20	37	M	transfusión	74	Positivo	20000	0,0,3-0	leve	X
21	37	F	transfusión	86	Positivo	1500000	1,0,3-1	leve	XX
22	48	F	transfusión	60	Positivo	8000	0,1,4-0	leve	XX
23	27	M	transfusión		Positivo	3500	Normal	normal	XX
24	48	M	transfusión	69	Positivo	2000	1,1,4-0	leve	XXX
25	27	M	MCS DIV	85	Positivo	1500	0,0,1-1	leve	XX
26	34	M	cirugía	66	Positivo	20000	Normal	normal	X
27	50	F	transfusión	98	Positivo	550000	0,1,3-0	leve	XXXX
28	47	M	transfusión	70	Positivo	20000	0,0,3-0	leve	XXXX
29	24	M	transfusión	146	Positivo	150000	0,0,4-0	leve	XX
30	44	M	transfusión	64	Positivo	55000	3,1,4-3*	moderada	XX
31	30	M	transfusión	63	Positivo	2000	0,0,4-0	leve	XX
32	38	F	transfusión	77	Positivo	4000	1,0,4-0	leve	XXX
33	39	M	transfusión	60	Positivo	300000	0,0,1-0	leve	XXX
34	51	F	cirugía	60	Positivo	1000000	1,0,4,0	leve	X
35	41	F	cirugía	88	Positivo	0	1,1,4-0	leve	negativo
36	48	F	cirugía	77	Positivo	100000	0,1,4-0	leve	X
37	45	F	transfusión	61	Positivo	15000	0,1,3-0	leve	XXXX
38	56	F	transfusión	87	Positivo	150000	0,0,1-0	minima	X
39	26	M	transfusión	46	Positivo	40000	0,0,1-0	minima	XXXX
40	46	F	transfusión	62	Positivo	0	1,0,4-0	leve	XXX
41	36	M	transfusión	81	Positivo	50000	1,0,1-0	minima	XXX
42	45	M	transfusión	83	Positivo	5500	3,1,4-0	leve	XXXX
43	33	M	transfusión	120	Positivo	1500	0,0,1-0	leve	XXXX
44	33	F	cirugía	108	Positivo	20000	1,1,4-0	leve	XX
45	48	M	transfusión	50	Positivo	2000	1,1,3-0	leve	XXX
46	44		transfusión	61	Positivo	15000	0,1,1-0	minima	XXX
47	17	F	transfusión	64	Positivo	1000	0,1,3,0	leve	XX
48	43	M	transfusión	53	Positivo	7000000	3,1,4-0	leve	XXXX
49	39	M	cirugía	39	Positivo	40000	Normal	normal	XXXX
50	57	F	transfusión	70	Positivo	25000	3,1,3-4	Moderada+	XXXX
51	41	F	transfusión	192	Positivo	4000	1,0,1-0	leve	XX

No.	Edad	Sexo	Factor de riesgo	ALT UI/ml	RIBA	RNA-VHC Copias /ml	Indice de Knodell	Actividad	IHQ VHC
52	33	F	cirugía	68	Positivo	300000	1,0,4-0	leve	XXX
53	31	M	transfusión	76	Positivo	1000000	0,0,1-0	mínima	XXX
54	45	M	transfusión	77	Positivo	70000	0,0,3-0	mínima	XXX
55	61	M	transfusión	238	Positivo	0	1,1,3-3	Leve*	X
56	67	F	transfusión	74	Positivo	1000	1,0,1-0	mínima	XXX
57	41	F	transfusión	103	Positivo	0	0,0,1-0	mínima	XXX
58	53	F	transfusión	64	Positivo	3500	0,0,3-0	mínima	XXX
59	29	M	transfusión	130	Positivo	1500000	0,1,3-1	leve	XXX
60	41	F	transfusión	60	Positivo	150000	1,1,3-1	leve	XXXX
61	50	M	transfusión	68	Positivo	45000	M.I.	M.I.	X
62	21	M	enfermero	227	Positivo	15000	3,3,4-0	moderado	XXXX
63	36	M	transfusión	80	Positivo	6500	1,0,3-0	leve	negativo
64	46	M	transfusión	86	Positivo	60000	1,0,4-0	leve	XXXX
65	30	M	transfusión	72	Positivo	150000	1,1,3-0	leve	negativo
66	52	F	transfusión	98	Positivo	0	1,1,4-0	leve	XXX
67	63	F	cirugía	58	Positivo	7000	3,1,4-3	Moderada*	XXXX
68	43	M	transfusión	39	Positivo	283000	0,0,4-1	leve	XXXX
69	68	F	transfusión	34	Positivo	81300	3,1,4-3	Moderada*	XXX
70	42	M	cirugía	66	Positivo	1150000	0,0,3-0	leve	XXXX
71	49	F	transfusión	43	Positivo	2800	4,1,4-3	Moderada*	XXX
72	50	F	cirugía	174	Positivo	150000	1,3,1-0	leve	XXX
73	23	M	cir y tran	88	Positivo	80300	3,0,4-0	leve	XXXX
74	51	F	química	72	Positivo	100000	1,3,4-0	leve	X
75	64	M	transfusión	93	Positivo	3000000	0,0,3-0	mínima	XXXX
76	30	M	cirugía	64	Positivo	897000	1,0,4-0	leve	XXXX
77	52	M	transfusión	35	Positivo	500000	0,1,4-0	leve	XXX
78	32	M	cir y tran	29	Positivo	200000	1,1,1-1	leve	XXXX
79	44	F	transfusión	48	Positivo	150000	1,1,3-0	leve	XXX
80	30	M	cirugía	91	Positivo	2000000	0,0,3-0	mínima	XX
81	52	M	cir y trans	492	Positivo	1000	4,1,4-3	Moderada*	XXX
82	52	M	médico	115	Positivo	1180000	1,1,3-0	leve	XXX
83	42	M	transfusión	143	Positivo	924000	1,1,4-0	leve	XXX
84	42	M	Enfermero	187	Positivo	436000	1,1,4,1	leve	XXX
85	44	F	transfusión	48	Positivo	150000	3,1,4-3	Moderada*	XXX
86	27	M	cirugía		Positivo	13000	1,0,3-0	leve	XXX
87	55	M	transfusión	97	Positivo	25000	1,1,4-1	leve	XX
88	62	M	cirugía	88	Positivo	45000	1,0,4-1	leve	negativo
89	62	M	cirugía	88	Positivo	10000	0,0,4-0	leve	negativo
90	42	M	transfusión	50	Positivo	155000	1,0,4-0	leve	XXXX
91	44	M	cirugía	278	Positivo	3370000	3,0,4,0	leve	XXX
92	37	F	transfusión	80	Positivo	490000	3,0,4-4	Moderada+	negativo
93	47	F	cirugía	33	Positivo	20000	0,0,3-0	mínima	XXX
94	47	F	cirugía	33	Positivo	20000	1,0,4-1	leve	negativo

M.I. Material insuficiente

* Fibrosis

+ Cirrosis

DISTRIBUCION POR SEXO



DISTRIBUCION POR DECADA DE LA VIDA

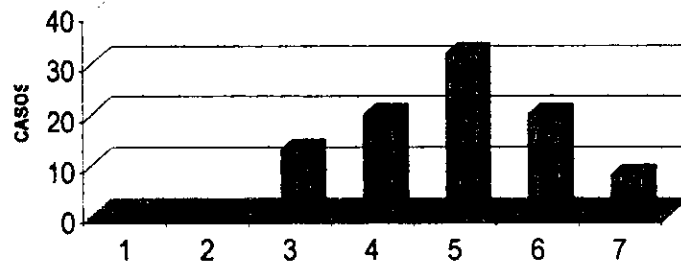
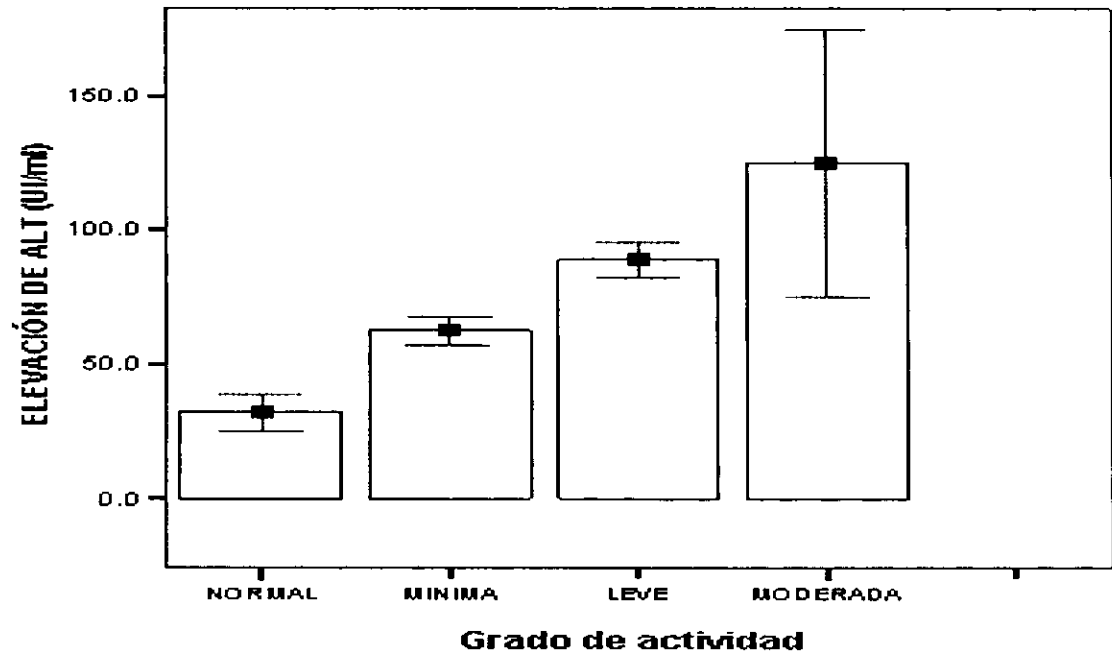
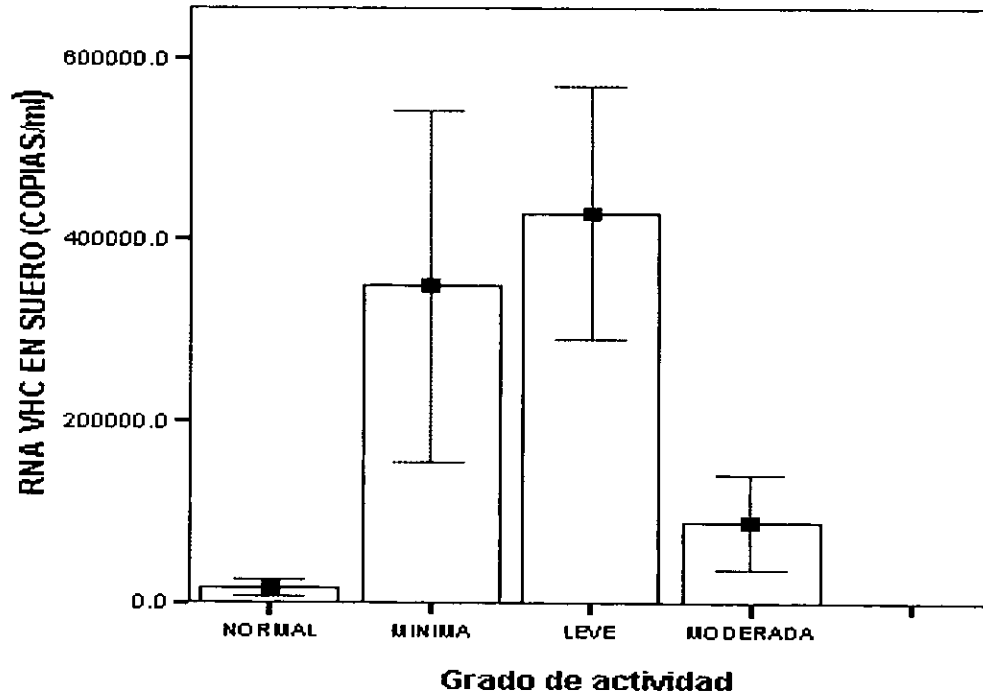


FIGURA 1

RELACION ENTRE LA ACTIVIDAD NECROINFLAMATORIA Y LA ELEVACION DE ALT SÉRICA



RELACION ENTRE LA ACTIVIDAD NECROINFLAMATORIA Y LOS NIVELES DE RNA VHC EN SUERO



DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y GASTROENTEROLOGÍA HE CMN S XXI

FIGURA 3

Relación entre el grado de actividad necroinflamatoria y la carga viral por PCR en suero

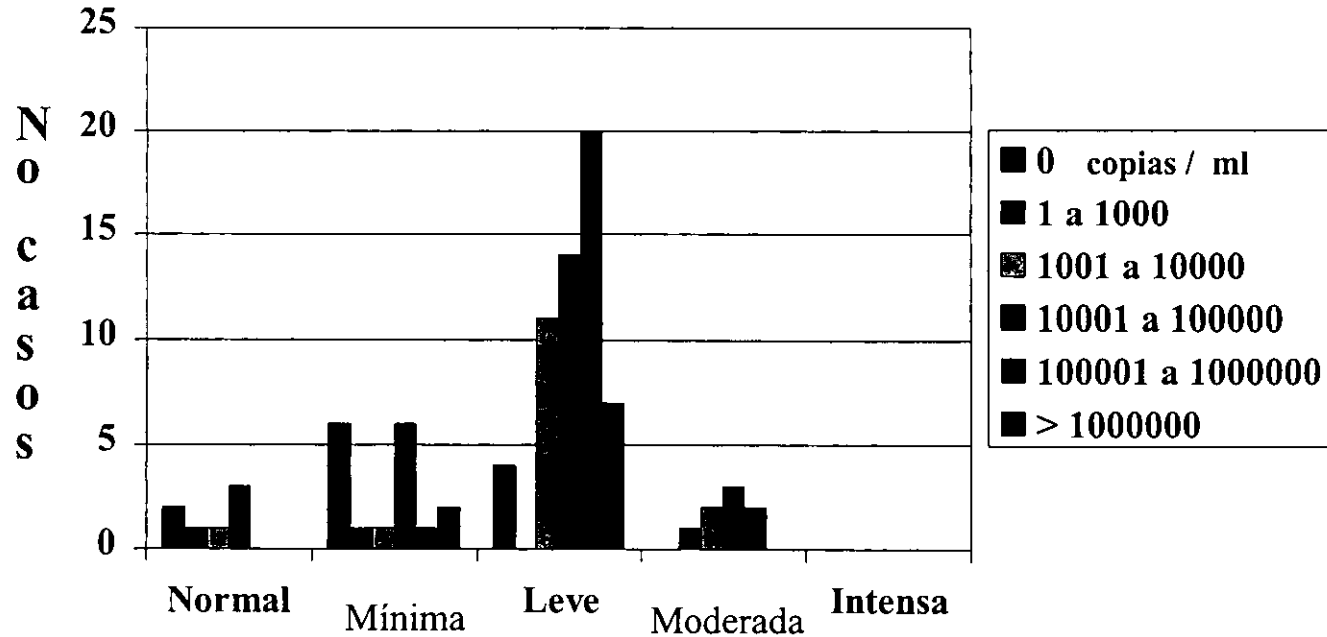
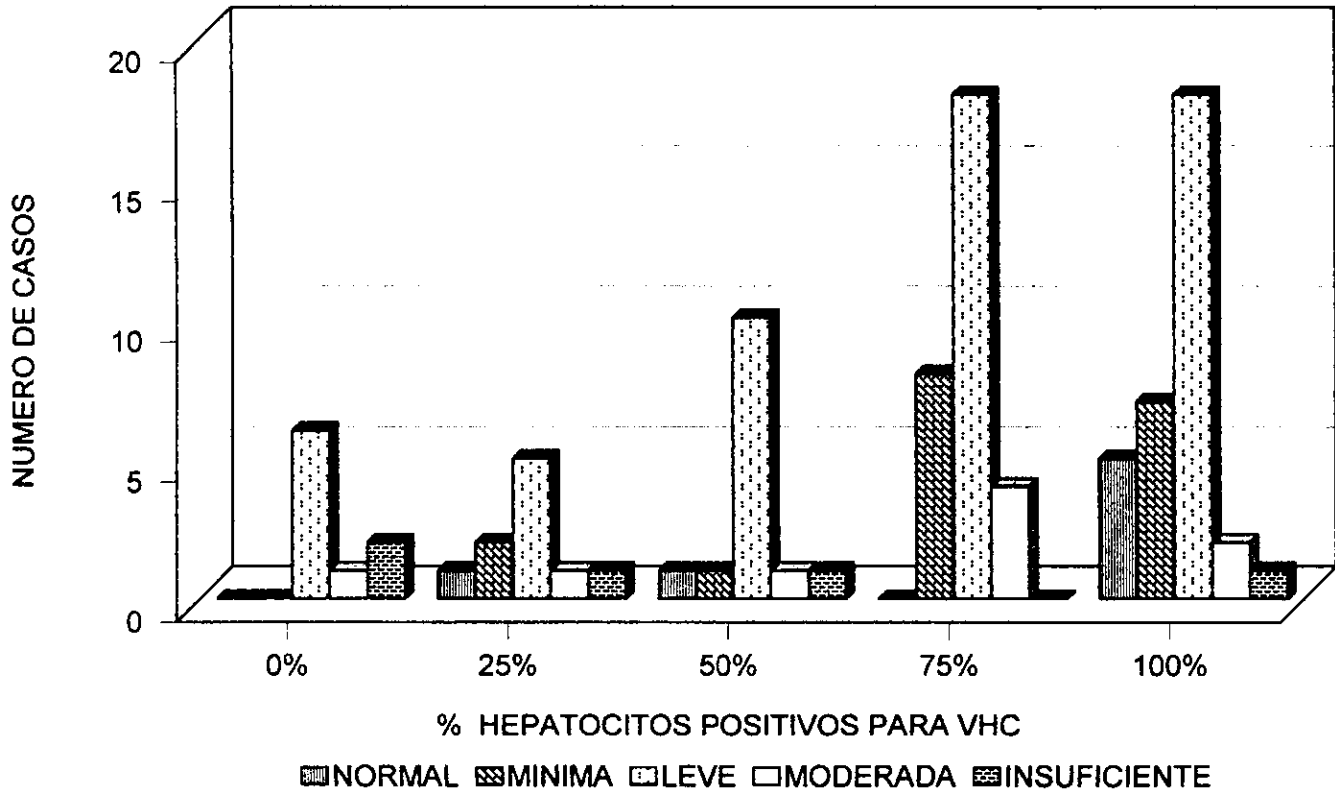


FIGURA 3

RELACION ENTRE LA ACTIVIDAD NECROINFLAMATORIA Y EL PORCENTAJE DE HEPATOCITOS POSITIVOS PARA VHC POR INMUNOHISTOQUIMICA



DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y GASTROENTEROLOGÍA HE CMN S XXI

FIGURA 4



Figura 1

A.- Biopsia hepática que muestra aumento del infiltrado inflamatorio en todos los espacios porta HE 10x AO.

B.- Acercamiento de un espacio porta con ruptura focal de la placa limitante (flecha). HE 25x AO.



Figura 2

A.- Espacio porta con ruptura de la placa limitante extensa (flecha), infiltrado linfocitario y esteatosis macrovesicular. HE 40x AO.

B.- Lobulillo hepático con esteatosis macrovesicular, infiltrado linfocitario y cuerpo acidófilo (flecha). HE 45x AO.

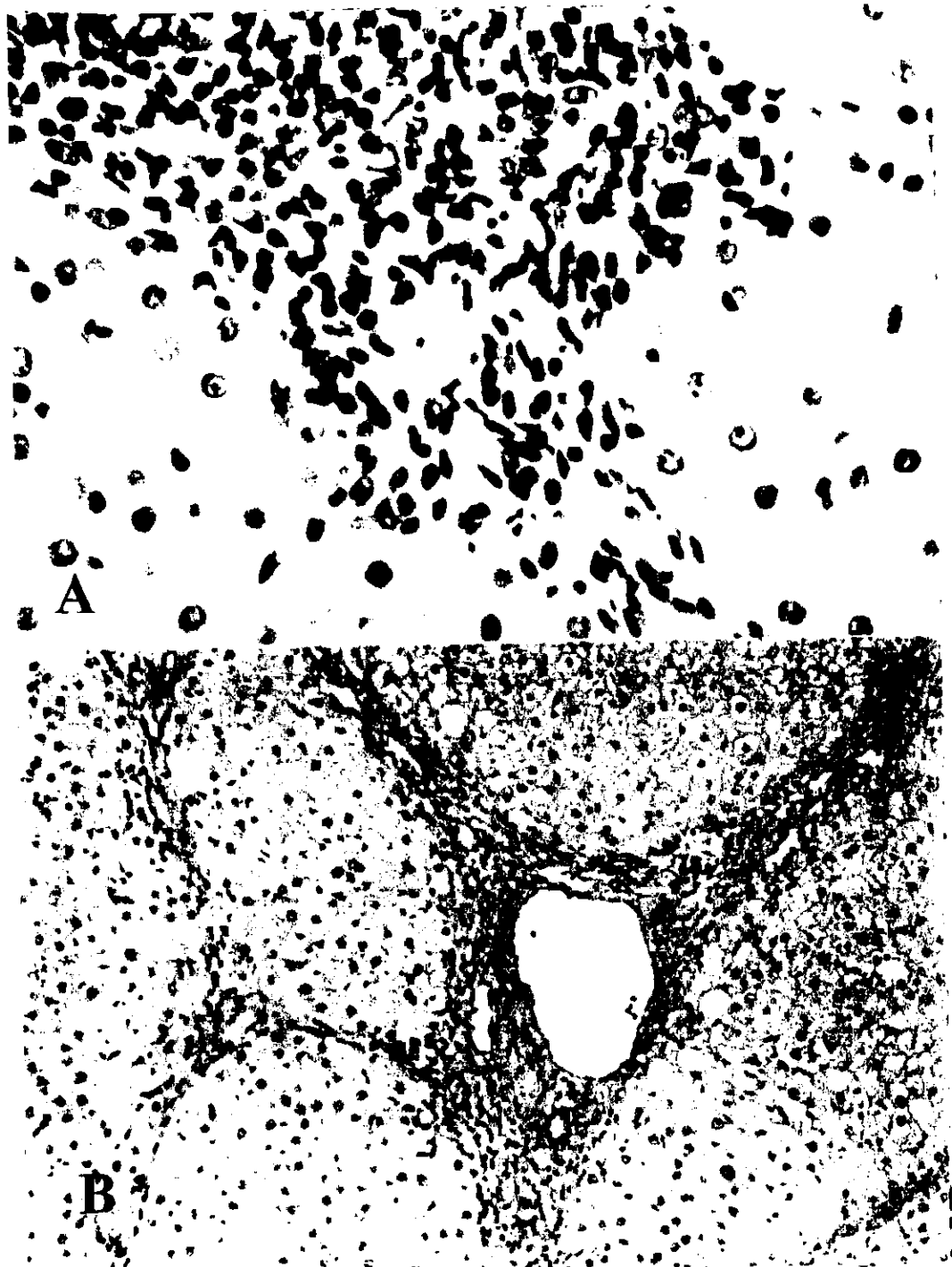


Figura 3

A.- Biopsia hepática que muestra fibrosis portal leve e infiltrado linfocitario nodular. HE 40x AO.

B.- Cirrosis hepática macro y micronodular por VHC. Masson 25x AO.

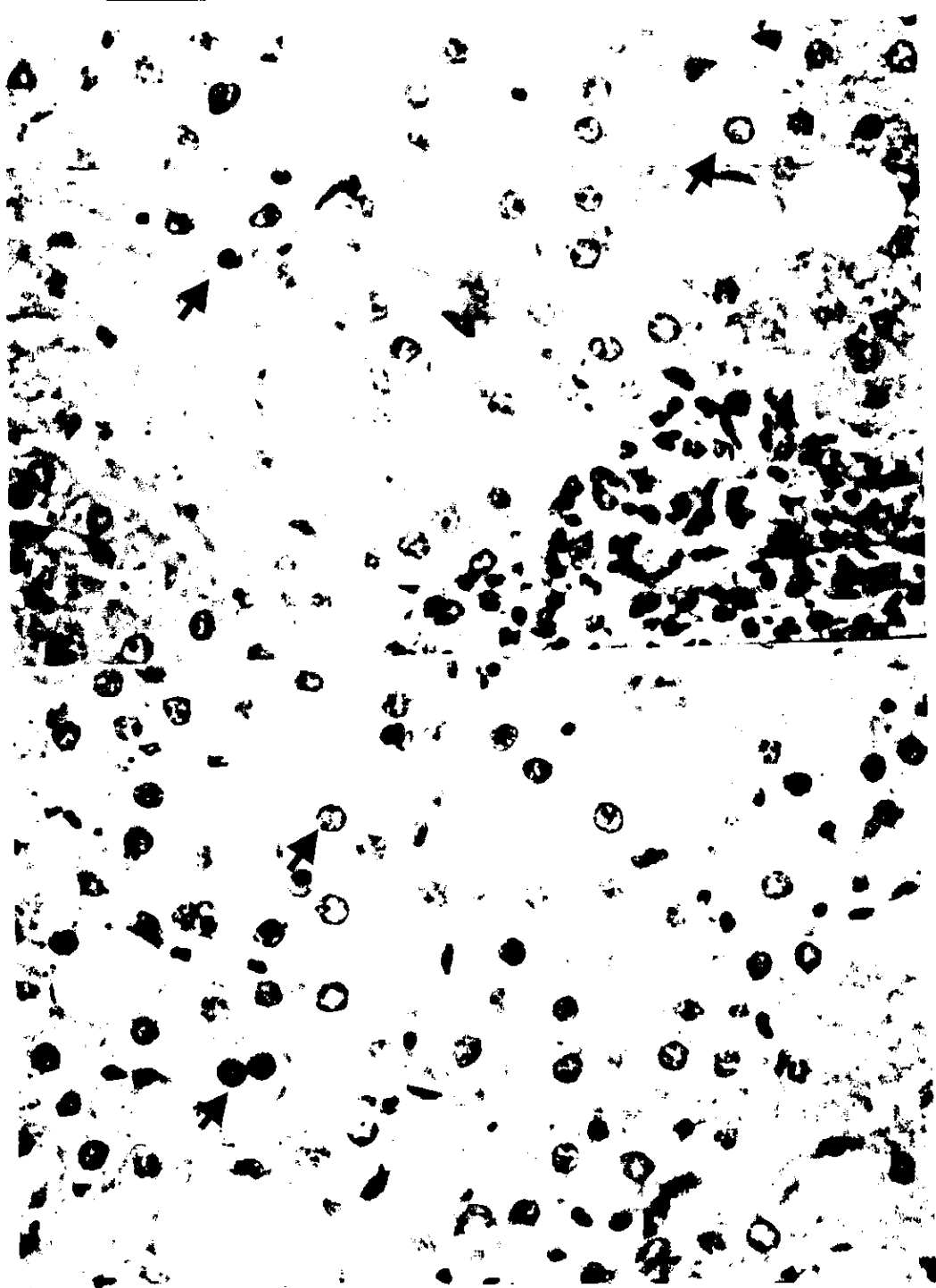


Figura 4

A.- Tinción positiva para VHC por inmunohistoquímica, los hepatocitos muestran núcleos rojos (flecha). Intensidad de tinción +/++++ . 40x AO.

B.- Tinción positiva para VHC intensidad +++/++++. 40x AO.

BIBLIOGRAFIA

1. Tremolada FC, Alberti A, Drago C, Tagger A, Rivero ML, Realdi G, Long term follow up of nonA nonB (type C) post transfusion hepatitis. *J Hepatol* 1992; 16: 273-281.
2. Poynard et al. Comparison of three interferon alfa-b2 regimens for the long term treatment of chronic nonA nonB hepatitis. *New Engl J Med* 1995; 332 : 1457-1462.
3. Ishak K, Baptista A, Bianchi L. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22: 696-99.
4. Alter M, Epidemiology of hepatitis C in the west. *Sem Liv Dis* 1995; 15;5-14.
5. Choo QL, Kuo G., Weiner Aj, Overby LR, Bradly DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne nonA nonB viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
6. Maertens G. And Stuyver L. (1996) Genotypes and genetic variation of hepatitis C virus, in *Molecular Medicine of Hepatitis* (Zuckerman, A. And Harris T, ed), *Molecular Medical Science Series* (James, K. And Morris A., ed), John Wiley, Chichester, UK, pp. 183-233.
7. Berninger M, y col. An assay for the detection of the DNA genome of hepatitis C virus in serum. *J Med Virol* 1982; 9:57.
8. Negro F, y col. Detection of intrahepatic replication of hepatitis C virus RBA by in situ hibridacion and comparasion with histopatology. *Proc Nat Acad Sci USA* 1992; 89: 2247.
9. Czaja A, Herschel A, y col. the Nature and prognosis of severe cryptogenic chronic active hepatitis. *Gastroenterology* 1993; 104: 1755-1761.
10. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, et. Al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995, 22: 696-99.
11. De Groote J, Desmet V, Gedigk P, y col. A clasification of chronic hepatitis. *Lancet* 1968, 2: 626-99.
12. Jay H, Hoofnagle, et. al., : *Serologic Diagnosis of Acute and Chronic Viral Hepatitis. Seminars Liver Disease* 1991, 11: 73-83.
13. Schmilovitz-Weiss H, Thompson N, et al: *Viral markers in the treatment of hepatitis B and C. Gut* 1993, Supplement : s26 s 35
14. Nakatsuji Y, Matsumoto A, Tanaka E, y col. Detection of chronic hepatitis C virus-infection by four diagnostic systems: First - generation and second generation, enzyme-

- linked immunosorbent assay second generation recombinant immunoblot assay and nested polymerase chain reaction analysis. *Hepatology* 1992;16:300-305.
15. Scheuer PJ, Ashrafzadeh P, Sherlock Sh, Brown D, Dusheiko G. The pathology of hepatitis C. *Hepatology* 1992; 15: 567-571.
 16. Schaffner F, y col. The histological features of chronic hepatitis C and autoimmune chronic hepatitis: A comparative Analysis. *Hepatology* 1992; 15: 572-577.
 17. Gerber MA, Danque P, y col. HLA-DR Expression in bile duct damage in hepatitis C. *Modern Pathol* 1993; 6: 327-331.
 18. Hiramatsu N, Hayashi N, y col. Immunohistochemical detection of hepatitis C virus-infected hepatocytes in chronic liver disease with monoclonal antibodies to core, envelope and NS3 regions of the hepatitis C virus genome. *Hepatology* 1992; 16: 306-311.
 19. Svoboda-Newman SM, Greenson JK, y col. Detection of hepatitis C by RT-PCR in formalin-fixed paraffin-embedded tissue from liver transplant patients. *Diagn Mol Pathol* 1997; 6: 123-129.
 20. Sheehan DC, Hrapchak BB, Theory and practice of histotechnology, 1980 second edition p.59.
 21. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N. Engl J Med* 1992; 327:1899-905.
 22. Seeff LB, Buskell-Bales Z, Wright EC. Long-term mortality after transfusion-associated nonA, nonB hepatitis. *N. Eng J Med* 1992, 327:1906-11.
 23. Gordon, SC, Vallosotaram PK, Silverman AL, Dmuchowaki CF. Levels of hepatitis C virus RNA and liver histology in chronic type C hepatitis 1994; 89:1458-1461.
 24. Lau JYN, Davis GL, Kniffen J. Significance of serum hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis C. *Lancet* 1993; 341: 1501-4.
 25. Komminoth P y col. Evaluation of methods for hepatitis C virus detection in archival liver biopsies. Comparison of histology, immunohistochemistry, in-situ hybridization, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and in-situ RT-PCR. *Pathol Res Prac* 1994; 190: 1017-1025.
 26. Sola I, Fernandez J, Idoate MA, Diaz L, Alava E. Nonspecificity of the paraffin-reactive hepatitis C virus monoclonal antibodies clones TORDJI-22 y TORDJI-32 due to cross-react with mitochondrial proteins. *Mod Pathol* 1997; 10 : 147.