

**EFFECTO DE LA ESTACIONALIDAD, EXPOSICIÓN A LA LUZ
SOLAR Y VITAMINA D SOBRE LA CINÉTICA VIRAL DURANTE
EL TRATAMIENTO DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C**

**Universidad de La Laguna
Programa de Investigación Biomédica Básica**

Noemi Hernández Álvarez-Buylla

2015

D. Enrique Quintero Carrión, catedrático de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Laguna y jefe del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Universitario de Canarias, y D. Manuel Nicolás Hernández-Guerra de Aguilar, Doctor en Medicina por la Universidad de Barcelona, profesor de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Laguna y Médico Adjunto del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Universitario de Canarias.

Certifican:

Que la tesis doctoral titulada "EFECTO DE LA ESTACIONALIDAD, EXPOSICIÓN A LA LUZ SOLAR Y VITAMINA D SOBRE LA CINÉTICA VIRAL DURANTE EL TRATAMIENTO DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C" presentada por Nieves Noemi Hernández Álvarez-Buylla, ha sido realizada bajo nuestra dirección y cumple todos los requisitos necesarios para su defensa pública ante el tribunal dispuesto a tal efecto, con el fin de optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Fdo.

D. Enrique Quintero Carrión

D. Manuel Hernández-Guerra de Aguilar

La Laguna, a 14 de Diciembre de 2015

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Manuel Hernández-Guerra, mi director de tesis y excelente profesional, al que le agradezco enormemente su continuo esfuerzo en introducirme en el campo de la investigación, por permitirme errar y enseñarme después a enmendar esos errores con resultados aún más satisfactorios. Le agradezco su paciencia, su confianza, su apoyo y sobre todo su tiempo y el de su familia.

Al Dr. Enrique Quintero, mi jefe y co-director de esta tesis, ejemplo de constancia y profesionalidad, por enseñarme la importancia de la investigación y permitirme desempeñar este trabajo que tanto llena mi vida, formando parte de un gran equipo.

A mis compañeros de trabajo, médicos de hospitalización, de endoscopia, residentes, enfermeros y auxiliares, con los que he compartido y comparto intensas horas de trabajo, por su apoyo en este proyecto y en el día a día.

A Macu y a Zaida por su apoyo constante, a Alejandro Jiménez por su apoyo y paciencia en la parte estadística de este estudio. A Marta y a Juan, grandes compañeros y mejores amigos. A mis amigas de profesión, por estar a mi lado y apoyarme siempre.

A mis abuelos, ejemplo de fortaleza, que siempre creyeron en mí.

A mis hermanos de los que no puedo estar más orgullosa; a Bárbara, mi mejor compañera de estudio, y a Héctor a quienes les agradezco también el apoyo en la parte informática, no sólo de este proyecto sino de toda mi vida.

A mis padres que son los que guían mi vida y a quienes les debo todo lo que soy. A mi madre, porque es un vivo ejemplo del querer es poder y por la pasión y la fuerza que ilumina su vida y que contagia la mía. A mi padre, que es mi principal inspiración en esta profesión que compartimos y que amamos, todo un ejemplo de superación.

A mi querido Thomas, mi compañero de vida, porque desde siempre entiende mis proyectos tanto personales como profesionales como algo nuestro, por su comprensión y su apoyo incondicional, por creer en mí.

A mis padres y a mis hermanos

A Thomas

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. HEPATITIS C	10
1.1.1 Etiología: el virus de la hepatitis C.....	10
1.1.1.1. Estructura genómica.....	10
1.1.2. Epidemiología	12
1.1.2.1. Prevalencia.....	12
1.1.2.2. Vías de transmisión	14
1.1.2.2.1. Transmisión parenteral	14
1.1.2.2.2. Transmisión no parenteral.....	16
1.1.3. Clínica	17
1.1.3.1. Hepatitis aguda.....	18
1.1.3.2. Hepatitis crónica.....	19
1.1.3.3. Cirrosis hepática.....	20
1.1.3.4. Carcinoma hepatocelular	21
1.1.4. Diagnóstico.....	22
1.1.4.1. Métodos indirectos: pruebas serológicas	22
1.1.4.2. Métodos directos: pruebas moleculares o virológicas	24
1.1.4.2.1. Análisis cualitativos	24
1.1.4.2.2. Análisis cuantitativos	25
1.1.4.2.3. Determinación del genotipo	26
1.1.4.3. Biopsia hepática	27
1.1.4.4. Fibrosis hepática	29
1.1.4.4.1. Métodos de imagen	30
1.1.4.4.2. Métodos séricos: marcadores biológicos.....	31
1.1.5. Tratamiento	33
1.1.5.1. Objetivos del tratamiento	34
1.1.5.2. Tipos de respuesta viral al tratamiento: definiciones	34
1.1.5.2.1. Respuesta viral sostenida (RVS)	34
1.1.5.2.2. Respuesta viral rápida (RVR)	34
1.1.5.2.3. Respuesta viral rápida extendida (eRVR).....	35
1.1.5.2.4. Respuesta viral precoz o temprana (RVP)	35
1.1.5.2.5. Respuesta viral tardía (RVT).....	35
1.1.5.2.6. No respuesta al tratamiento	35
1.1.5.2.7. Recaída	36

1.1.5.2.8. Breakthrough virológico	36
1.1.5.3. Factores predictores de respuesta al tratamiento.....	36
1.1.5.4. Indicaciones del tratamiento.....	37
1.1.5.5. Fármacos antivirales.....	38
1.1.5.5.1. Interferón.....	38
1.1.5.5.2. Ribavirina	43
1.1.5.6. Antivirales de acción directa.....	48
1.1.5.6.1. Inhibidores de la proteasa	50
1.1.5.6.1.1. Telaprevir.....	50
1.1.5.6.1.2. Boceprevir.....	51
1.1.5.6.1.3. Simeprevir.....	52
1.1.5.6.1.4. Paritaprevir	53
1.1.5.6.1.5. Ritonavir.....	53
1.1.5.6.2. Inhibidores de la polimerasa	54
1.1.5.6.2.1. Sofosbuvir.....	54
1.1.5.6.2.2. Dasabuvir.....	54
1.1.5.6.3. Inhibidores de la proteína NS5A.....	55
1.1.5.6.3.1. Daclatasvir	55
1.1.5.6.3.2. Ombitasvir.....	55
1.1.5.6.3.3. Ledipasvir.....	55
1.1.5.6.4. Combinaciones farmacológicas.....	56
1.1.5.7. Tratamiento en situaciones especiales.....	57
1.1.5.7.1. Tratamiento pre y post-trasplante hepático	57
1.1.5.6.7.2. Tratamiento en coinfección por VIH	58
1.1.5.6.7.3. Tratamiento de manifestaciones extrahepáticas	59
1.2. VITAMINA D.....	59
1.2.1. Historia de la vitamina D	59
1.2.2. Metabolismo de la vitamina D	61
1.2.3. Fisiología de la vitamina D.....	63
1.2.4. Fuentes de vitamina D.....	64
1.2.4.1. Fuente endógena: síntesis cutánea.....	64
1.2.4.2. Fuente exógena: alimentos naturales, alimentos funcionales y suplementos	65
1.2.5. Exposición a la luz solar.....	66

1.2.6. Niveles adecuados de vitamina D	69
1.2.7. Déficit de vitamina D. Efectos esqueléticos	71
1.2.7.1. Efectos óseos y sobre las caídas	71
1.2.8. Déficit de vitamina D. Efectos no esqueléticos.....	71
1.2.8.1. Vitamina D. Función autoinmune y antiinflamatoria	72
1.2.8.2. Vitamina D y enfermedades neuropsiquiátricas.....	73
1.2.8.3. Síndrome metabólico, obesidad y diabetes mellitus	73
1.2.8.4. Vitamina D y enfermedad renal	74
1.2.8.5. Vitamina D y enfermedad cardiovascular.....	75
1.2.8.6. Vitamina D y cáncer.....	77
1.2.8.7. Vitamina D y mortalidad	78
1.3. VITAMINA D Y ENFERMEDAD HEPÁTICA	78
1.3.1. Cirrosis hepática de etiología alcohólica	79
1.3.2. Enfermedad hepática por depósito de grasa	80
1.3.3. Cirrosis biliar primaria	82
1.3.4. Hepatitis crónica por virus B	83
1.3.5. Hepatitis crónica por virus C.....	83
2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	86
2.1. JUSTIFICACIÓN.....	86
2.2. HIPÓTESIS.....	87
2.2. OBJETIVOS.....	87
3. MATERIAL Y MÉTODOS	89
3.1. PACIENTES	89
3.2. DATOS CLÍNICOS Y DE LABORATORIO	90
3.3. NIVELES DE VITAMINA D.....	92
3.4. FUNDAMENTOS ÉTICOS	92
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	92
4. RESULTADOS	94
4.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.....	94
4.2. RESPUESTA VIRAL AL TRATAMIENTO Y A LA ESTACIONALIDAD	97
4.3. NIVELES DE VITAMINA D Y ESTACIONALIDAD	101
5. DISCUSIÓN	102
6. CONCLUSIÓN.....	108
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones virales y concretamente la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) constituyen una causa frecuente de enfermedad crónica hepática. En el mundo, aproximadamente 2,7 millones de personas padecen infección crónica por el VHC y en un plazo de 20 años, hasta un 30 %, desarrollarán cirrosis hepática. Se estima que más de 500.000 personas al año desarrollan complicaciones fatales secundarias al VHC lo que supone un importante problema de salud mundial (1-3).

En España, existen alrededor de 900.000 personas afectadas, con una prevalencia en torno a un 2% de la población (4). En nuestro país, representa la causa principal de hepatitis crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC). Por lo tanto, es de suma importancia su diagnóstico y posterior tratamiento.

La hepatitis C crónica, con los recientes avances en el tratamiento, en la actualidad, es una enfermedad potencialmente curable en la mayoría de los casos. Sin embargo, la tasa de respuesta al tratamiento es muy variable ya que depende de múltiples factores.

Son muchas las publicaciones que han estudiado cuales son los factores predictores de respuesta. Entre estos factores cabe destacar, por su reciente implicación, el papel de la vitamina D, que se cree está involucrada en la evolución de la enfermedad hepática y con capacidad de influir sobre la respuesta al tratamiento del VHC (5, 6).

Por ello, todos los esfuerzos en investigación por conocer las variables que pueden influir en la respuesta viral durante el tratamiento son de vital

importancia, de forma que se pueda alcanzar respuesta viral sostenida en la totalidad de los pacientes que inicien un tratamiento.

El objeto de este estudio de Tesis Doctoral ha sido investigar si la exposición a la luz solar, como marcador indirecto de vitamina D influye en la respuesta viral sostenida durante el tratamiento del VHC en una amplia cohorte de pacientes con hepatitis crónica por VHC.

1.1. HEPATITIS C

1.1.1 Etiología: el virus de la hepatitis C

En la década de los 70 se empezó a describir un nuevo tipo de hepatitis, la hepatitis no A no B, un tipo de hepatitis muy frecuente entre los receptores de transfusiones de sangre, en la que no se encontraban marcadores serológicos de hepatitis A ni B. Años después, en 1989, Houghton y colaboradores describieron, por primera vez, la estructura genómica de este virus denominándolo virus de la hepatitis C (7).

El virus de la hepatitis C es un virus pequeño (55-65 nanómetros) que pertenece a la familia Flaviviridae, género Hepacivirus. Tiene envoltura y posee una única cadena de ácido ribonucleico (ARN) que se replica de forma preferente en el citoplasma de los hepatocitos. Es un virus hepatotropo, ya que infecta principalmente a los hepatocitos, aunque puede afectar a otras células como linfocitos y monocitos (8, 9).

1.1.1.1. Estructura genómica

El virus está compuesto por un genoma de ARN rodeado de una cápside isocáedrica (core) y una envoltura lipoproteica compuesta por 2 glucoproteínas (E1 y E2). El genoma está constituido por una cadena sencilla de ARN, de

polaridad positiva, con una estructura de lectura abierta (ORF, open reading frame) que expresa una proteína de 3.011 aminoácidos. A partir de la región codificante ORF, se forman las proteínas víricas individuales, estructurales y no estructurales. Los genes estructurales (core, envoltura, E1 y E2) se localizan en la zona próxima al extremo 5' del genoma, mientras que los genes no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) se encuentran próximos al extremo 3'. Estos extremos son secuencias no codificadoras que flanquean la ORF.

El extremo 5' se inicia con una región de 341 nucleóticos y contiene importantes lugares para la traducción, replicación y ensamblaje del genoma, siendo su función principal, permitir la unión del ribosoma de la célula huésped al RNA vírico, en una estructura llamada IRES (internal ribosome entry site). El extremo 3' está constituido por dos regiones de 40 y 98 nucleótidos, y juega un papel primordial en el inicio de la replicación de la cadena de polaridad negativa y en la unión de proteínas celulares.

Las proteínas codificadoras del VHC poseen diferentes funciones. El gen C codifica una proteína de la nucleocápside; los genes E1 y E2 codifican las proteínas de la envoltura del virión, conteniendo numerosas zonas de glucosilación, teniendo además un importante papel en la maduración de la glucoproteína y en el acoplamiento del virus. Los genes no estructurales NS2 y NS3 son componentes de la proteasa NS2-3, siendo la NS3 también componente de la proteasa-serina, NTPasa y helicasa. La NS4A actúa como cofactor de la proteína-serina de NS3, siendo la función de la p27, derivada del gen NS4B, desconocida. El gen NS5A parece estar involucrado en la resistencia

al interferón, y la proteína NS5B tiene actividad de polimerasa de RNA, dependiente de RNA (10).

El virus de la hepatitis C presenta una gran variabilidad genética con importante heterogeneidad en las secuencias del genoma y de la codificación proteica. Esta heterogeneidad puede ocurrir de forma intragenómica, dando lugar a las cuasiespecies víricas, o intergenómicas, dando lugar a los genotipos y subtipos.

El genoma viral de una cuasiespecie difiere de un 1 a 2% (con un grado de homología igual o superior al 98%) a diferencia del genoma de los genotipos, que difieren hasta en un 30%, y del de los subtipos que difieren en aproximadamente un 20-25%.

Basándose en la secuencia de nucleótidos y en el análisis filogenético, se han definido seis grupos principales del virus de la hepatitis C, llamados genotipos, designándose por números del 1 al 6, que a su vez se subdividen en subtipos, designados con letras (11, 12).

Esta amplia variabilidad genética tiene su implicación en la persistencia del virus, en la patogenia de la enfermedad, así como implicaciones clínicas con dificultad en el diseño de vacunas, selección de mutantes resistentes durante el tratamiento y diseño e interpretación de los métodos diagnósticos.

1.1.2. Epidemiología

1.1.2.1. Prevalencia

Tras la primera demostración de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C en la década de los 90, se comenzaron a realizar estudios epidemiológicos dirigidos a conocer de prevalencia de la infección del virus de la hepatitis C.

La prevalencia de la infección por el virus de la hepatitis C es variable dependiendo de la zona geográfica y de los diferentes grupos de riesgo. A nivel mundial, se detectó una prevalencia global en torno a un 3 % de la población general, existiendo entre 170.000 y 240.000 millones de portadores del virus de la hepatitis C (3).

En Estados Unidos y en Europa occidental, las tasas de prevalencia son bajas, en torno a 1-2%, en Japón, intermedias de hasta un 3% y en áreas concretas de Europa Oriental, Asia, Sudamérica y África (Egipto) son elevadas, llegando hasta el 10% de la población (13).

La prevalencia de la enfermedad no sólo varía en función de la zona geográfica, sino que depende de otros factores, tales como los grupos de edad, la raza y el sexo, entre otros.

Por otra parte, la incidencia de la infección por virus C es muy difícil de estimar, ya que la mayoría de los casos cursa de forma asintomática o paucisintomática, además de que los casos nuevos no se registran de forma sistemática. Se estima un descenso de la incidencia desde la década de los 80, atribuido tanto a los rigurosos controles en las transfusiones sanguíneas como a la mejora de las medidas higiénico-sanitarias. Sin embargo, debido a la cronicidad de la enfermedad y a que el periodo entre la adquisición de la infección y la aparición de los primeros síntomas es, en la mayoría de los casos, próximo a los 20 años, la prevalencia seguirá siendo alta en los próximos años (13, 14).

En España no existen muchos estudios epidemiológicos dirigidos a la población general, pero a partir de estimaciones indirectas en donantes de

sangre o de órganos y de estudios específicos en determinados grupos de riesgo, se puede asumir una prevalencia que oscila entre el 1 y el 2,6% (4).

La distribución de los diferentes genotipos también varía según las diferentes áreas geográficas, incluso entre los diferentes grupos de población de una misma área. Así pues, los genotipos 1a, 1b, 2a, 2b, 2c y 3a se encuentran en el 90% de las infecciones por el VHC en Norteamérica y Sudamérica, Europa, Rusia, China, Japón, Australia y Nueva Zelanda; el 1b produce la mayoría de las infecciones del Este y Sur de Europa, China y Japón. El genotipo 3 es muy frecuente en América y en Europa, y el resto de genotipos se encuentran en Asia o África.

Además también varían en función de los grupos de riesgo, observando más frecuencia de genotipos 1a y 3a entre los usuarios de drogas vía parenteral (11).

En Europa y en España el genotipo 1b es el más frecuente, con un porcentaje de un 50 y 70% respectivamente. En España el genotipo 1a está presente en un 10% y los genotipos 2 y 3 representan un 3 y 14% respectivamente, con porcentajes menores al 3% para los genotipos 4 y 5 (15).

1.1.2.2. Vías de transmisión

1.1.2.2.1. Transmisión parenteral

Constituye el mecanismo de transmisión más importante, existiendo diferentes situaciones.

El uso de drogas por vía parenteral es la principal forma de transmisión del VHC, de tal forma que cerca del 90% de los adictos a drogas vía parenteral,

presentan anticuerpos positivos frente al virus de la hepatitis C. Se ha determinado que la principal vía de transmisión, en este grupo de riesgo, es el uso compartido de jeringuillas contaminadas u otros materiales de preparación (16). Es importante reseñar también la posibilidad de transmisión del VHC en usuarios de drogas vía inhalada con una prevalencia no desdeñable, en torno a un 12% (17).

El riesgo entre las personas que hubieran recibido transfusiones de sangre o hemoderivados, etc, antes de la instauración del cribado anti-VHC en 1992 se eleva hasta un 10% por cada transfusión recibida. En la actualidad, esta vía de transmisión casi ha desaparecido en los países desarrollados, disminuyendo hasta en un 0,3% si se aplican los test de ELISA de tercera generación (18).

Otra vía de transmisión parenteral incluye la hemodiálisis con una prevalencia de hasta un 30%, aumentando la probabilidad de adquirir la infección según el tiempo que lleven en el programa de hemodiálisis y del número de transfusiones recibidas (19).

El trasplante de órganos procedentes de donantes infectados con VHC (realizados antes de 1992) representan una prevalencia de un 95% por lo que hoy en día se rechazan dichos donantes (20).

La transmisión por exposición ocupacional tras pinchazo accidental en personal sanitario es rara. La cantidad de sangre transmitida a través de la aguja contaminada, la profundidad de la inoculación, la presencia de ARN en suero y la carga viral del VHC son los 4 factores que influyen en la probabilidad de transmisión por esta vía (21).

En cuanto a la transmisión nosocomial es importante destacar que la hospitalización es un factor de riesgo para adquirir la infección por VHC, este hecho se ha relacionado con deficientes medidas de asepsia (desinfección inadecuada del material, compartir material contaminado entre los pacientes) utilización de viales multidosis o jeringuillas de cristal, así como con la práctica de procedimientos invasivos (22). Puede ocurrir: de paciente a paciente (documentado en salas de hemodiálisis, hematología y hepatología), de paciente a personal sanitario (en consultas odontológicas y traumatológicas) o del personal sanitario al paciente (en casos excepcionales de cirugía cardíaca o de cavidades profundas, en las que no existe visión directa por parte del cirujano) (23).

Otra ruta descrita dentro de la transmisión parenteral es la transmisión intrafamiliar por exposición parenteral inaparente, por compartir maquinillas de afeitar, cepillos de dientes o cortaúñas con una prevalencia en torno a un 3-5% (24).

La creciente práctica de procedimientos como tatuajes y piercing o prácticas culturales y religiosas como la escarificación, la acupuntura y la circuncisión, ha propiciado un aumento de la frecuencia de infección por VHC, aunque no hay datos suficientes concluyentes para determinar si estos factores aumentan la tasa global de transmisión del VHC (25, 26).

1.1.2.2.2. Transmisión no parenteral

La transmisión sexual como vía para la infección del VHC es un aspecto polémico en la epidemiología de esta enfermedad, con resultados dispares en los diferentes estudios publicados. Se ha determinado únicamente la vía sexual

hasta en un 20% de los casos de hepatitis aguda, sin embargo, el riesgo de transmisión a largo plazo en relaciones monógamas heterosexuales y homosexuales es menor del 5%. El riesgo se incrementa hasta el doble ante las prácticas sexuales sin protección, la promiscuidad, en caso de coinfección por el VIH o si se padece otras enfermedades de transmisión sexual. Asimismo existe una elevada tasa de transmisión durante la fase aguda de la infección, debida a la mayor carga viral existente. Todo esto podría explicar la alta prevalencia descrita (27).

El riesgo de transmisión vertical o perinatal ocurre únicamente si el ARN se detecta en el suero materno, la prevalencia es del 4 al 7%, porcentaje que se triplica en los niños nacidos de madres coinfectadas por VIH (28). La rotura prolongada de membrana y la monitorización fetal están asociadas con un mayor riesgo de transmisión materno-infantil. El parto vaginal, la cesárea y la lactancia materna (excepto en casos de grietas en el pezón con sangrado) no han sido relacionadas con una mayor tasa de infección (29).

1.1.3. Clínica

En la historia natural de la infección por virus de la hepatitis C se pueden distinguir varias fases. La infección aguda es un proceso, en la mayoría, asintomático, que puede presentar una curación espontánea en el 15-25% de los casos, evolucionando a hepatitis crónica en el 75-85% restante. Transcurrido un plazo de unos 20-30 años de la infección, un 20% de estos pacientes presentarán una cirrosis hepática.

1.1.3.1. Hepatitis aguda

La infección aguda por el virus de la hepatitis C constituye el 20% del total de las hepatitis virales. Normalmente cursa de forma asintomática o paucisintomática, aproximadamente un 20% presentan síntomas y estos son muy inespecíficos tales como astenia, cansancio, inapetencia, cefalea, náuseas, vómitos, dolor en hipocondrio derecho y sólo en un 15% presentan ictericia mucocutánea. Además, es de difícil diagnóstico debido a la existencia del periodo ventana, en el cual hasta 8-10 semanas tras la infección no se detectan los anticuerpos anti-VHC en el suero.

Las alteraciones bioquímicas del perfil hepático, como el aumento de las transaminasas, no se observan, por lo general, hasta pasadas las 2-8 semanas de la infección. Además, la elevación de las transaminasas, suele ser menor de la que se puede observar en otras hepatitis agudas (30).

La hepatitis aguda puede evolucionar hacia varias situaciones (31):

- Curación espontánea: con erradicación total del virus hasta en un 15-25% de los pacientes infectados.
- Portador inactivo: se normaliza el perfil hepático alterado pero persiste la viremia.
- Hepatitis crónica: en un 75-85% de los casos, los pacientes presentan elevación persistente de las transaminasas y del ARN del virus C durante más de 6 meses.
- Hepatitis aguda fulminante: es una situación poco frecuente, normalmente se presenta cuando existe infección previa por otros virus como el virus de la hepatitis B o coinfección (32).

1.1.3.2. Hepatitis crónica

Hasta un 85% de los pacientes con infección aguda por VHC evolucionan hasta hepatitis crónica. Se desconoce, de forma certera, la causa de la evolución hacia la curación en unos pacientes y el desarrollo de cronicidad en la mayoría. El mecanismo responsable parece ser múltiple, asociado tanto a factores virales como a factores del huésped.

Determinados factores del huésped como la raza blanca, títulos altos de anticuerpos contra las proteínas estructurales del VHC y síntomas clínicos e ictericia en la fase aguda, se han relacionado con el aclaramiento espontáneo del virus (33).

Al igual que en la fase aguda de la enfermedad, la hepatitis crónica cursa de forma asintomática en la mayoría de los casos, diagnosticándose de forma casual tras una elevación persistente de las enzimas hepáticas, Alanina-aminotransferasa (ALT) y Aspartato-aminotransferasa (AST). Aproximadamente un 30% de los casos presenta clínica inespecífica, discreto dolor o molestia en hipocondrio derecho, acompañado de hepatomegalia, si presentan ictericia, se considera como signo de mal pronóstico. Hasta en un 33% presentan transaminasas normales (34), observando transaminasas levemente aumentadas en el resto de los pacientes. Sólo un 25% presentan elevación de ALT en niveles 2 veces superior al límite alto de la normalidad. Los niveles de las transaminasas no se correlacionan de forma clara con el daño histológico (35).

1.1.3.3. Cirrosis hepática

Una vez que el paciente presenta fibrosis avanzada, la lesión hepática es irreversible y el paciente ya padece una cirrosis hepática. Esto ocurre en un 20% de los pacientes con hepatitis crónica por VHC, a lo largo de un periodo largo, aproximado de 20 años. Es conocido que, otros factores como el consumo de alcohol u otros tóxicos, la infección previa o coinfección con otros virus, así como enfermedades que produzcan inmunosupresión, puedan acelerar este período (36).

Clínicamente, en las fases iniciales, es muy difícil distinguir el estado de cirrosis del previo de hepatitis crónica, ya que la sintomatología es similar. A medida de que avanza la cirrosis, el paciente presentará diferentes grados de insuficiencia hepática, así como complicaciones derivadas de la hipertensión portal. Las manifestaciones de la hipertensión portal tales como ascitis, encefalopatía, hemorragia digestiva alta secundaria a sangrado por varices esófago-gástricas, deterioro de la función renal e infecciones bacterianas, hablan de cirrosis hepática descompensada, con una incidencia anual de un 5%. La complicación más frecuente es la ascitis, seguida de la hemorragia por varices esofágicas y la encefalopatía (37, 38). Cuando la enfermedad está descompensada la supervivencia desciende cerca de un 57% a los 3 años y de un 50% a los 3 años, en comparación con los pacientes que no presentan descompensación de la cirrosis, que mantienen una supervivencia cercana al 80% a los 10 años (39).

No existen datos de laboratorio específicos para el diagnóstico de cirrosis, pero los parámetros analíticos más frecuentemente alterados son: el aumento del nivel de bilirrubina sérica, hasta en un 40%, el descenso de la albúmina

plasmática, en un 10%, así como la trombopenia (asociada a la esplenomegalia) y el alargamiento del tiempo de protrombina. Asimismo se puede observar, tanto en la infección crónica como en la fase de cirrosis, hasta en un 43% de los pacientes, una discreta elevación de la alfafetoproteína, con cifras que fluctúan desde 10 hasta 100 ng/ml (37). Teniendo en cuenta que, ante una elevación persistente y progresiva, se debe descartar un proceso maligno a nivel hepático.

1.1.3.4. Carcinoma hepatocelular

En el mundo occidental la incidencia de CHC ha aumentado de forma progresiva de tal forma que representa el quinto cáncer a nivel mundial y la primera causa de muerte, entre los pacientes con cirrosis hepática.

La incidencia y prevalencia de CHC es superior al 80% en pacientes con cirrosis hepática comparada con los individuos sin daño hepático.

El carcinoma hepatocelular se desarrolla en estadios avanzados de la enfermedad hepática, tras un largo periodo de exposición al virus, por lo que la edad media del diagnóstico se encuentra entre la séptima y octava década de la vida.

El virus de la hepatitis C es el responsable de casi un 35% de los carcinomas hepáticos, por lo que se establece, que durante la evolución de la cirrosis, se debe realizar cribado de carcinoma hepatocelular (CHC). Entre un 1 y un 4%, de los pacientes con cirrosis, al año desarrollarán un carcinoma hepatocelular (40).

Hasta el momento se desconoce el mecanismo oncopatogénico directo del virus de la hepatitis C, pero sí se sabe que existen numerosos factores que puede contribuir a la aparición del CHC. Entre los factores descritos se puede

señalar el consumo de alcohol u otros tóxicos, la coinfección por otros virus y la existencia de síndrome metabólico asociado, entre otros (36).

La supervivencia tras el diagnóstico de carcinoma hepatocelular, dependerá más del estadio en el que se encuentre el paciente, que del carcinoma en sí y vendrá marcado por el deterioro de la función hepática, así como por la aparición de las complicaciones derivadas de la enfermedad hepática (41).

1.1.4. Diagnóstico

El diagnóstico de la infección por virus de la hepatitis C es posible gracias al descubrimiento, clonación y secuenciación del genoma por primera vez en el año 1989 (7), que permitió la determinación e identificación de anticuerpos anti VHC, en el suero de los pacientes infectados.

Para el diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis C se dispone de métodos diagnósticos directos e indirectos (42).

1.1.4.1. Métodos indirectos: pruebas serológicas

Las pruebas serológicas detectan anticuerpos específicos contra el VHC. Se dividen en dos: Inmunoabsorción ligada a Enzimas o enzimoimmunoanálisis (43) y la Inmunotransferencia con antígenos recombinantes (RIBA). Su función principal es determinar los anticuerpos frente a antígenos del core y proteínas no estructurales del VHC.

En el primer contacto con el virus se desarrollan inmunoglobulinas tipo IgG frente al virus detectándose, en primer lugar, anticuerpos frente a las proteínas NS3 y core y posteriormente, frente al resto de las proteínas víricas (38).

La técnica de ELISA se emplea en el cribado de primera línea y utiliza antígenos del VHC obtenidos por ingeniería genética o síntesis química. Al ponerse en contacto con sangre de un paciente infectado, se produce una reacción lumínica secundaria a la unión de los anticuerpos séricos con los antígenos. Existen 3 generaciones de ELISA, la tercera generación de ELISA, en uso desde 1996, detecta anticuerpos dirigidos contra epítomos localizados en el core y proteínas no estructurales (NS3, NS4 y NS5). Presenta una sensibilidad y especificidad del 98 y 99% respectivamente, en individuos inmunocompetentes y consigue una reducción del período ventana a 7-8 días. Las limitaciones de esta técnica se derivan de la posibilidad de falsos negativos en la infección aguda, durante el período ventana y en pacientes inmunodeprimidos; y de falsos positivos en pacientes con hipergammaglobulinemia, enfermedades autoinmunes, síndromes metabólicos o mujeres gestantes, por lo que ante estas situaciones, se aconseja realizar la determinación del ARN del virus de la hepatitis C (44).

La RIBA es una técnica de confirmación que utiliza antígenos recombinantes VHC codificados y péptidos sintéticos VHC codificados, que han sido inmovilizados como bandas individuales en las tiras de análisis. Consiste en un enzimoimmunoanálisis cualitativo, que se realiza *in vitro*, para la detección de anticuerpos frente a proteínas individuales codificadas por el VHC. Se dispone de 3 generaciones y la utilizada en la actualidad es la tercera. Los antígenos individualizados se enfrentan por separado a la muestra del paciente. Si existe reacción a dos o más antígenos se considera positiva y si no presenta reactividad hacia ningún antígeno, se considera negativo. Se utiliza cada vez menos como

test confirmatorio, ya que ha sido desplazado por la determinación del ARN del VHC (45).

1.1.4.2. Métodos directos: pruebas moleculares o virológicas

Las pruebas moleculares o virológicas son métodos diagnósticos directos que determinan y realizan la cuantificación del ARN viral mediante la detección de los componentes virales estructurales. Durante la infección activa el ARN-VHC está presente en la sangre del paciente infectado, pudiendo detectarse entre 1 y 3 semanas tras la exposición aguda. Estos métodos pueden ser cuantitativos o cualitativos (46).

La cantidad de ARN del VHC circulante en suero es limitada, por lo que es necesario amplificar la muestra o la señal de hibridación mediante diferentes métodos como los sistemas de transcriptasa inversa con reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), la transcripción mediada por amplificación (TAM) (47) y el sistema de amplificación de señal por ácido desoxirribonucleico (ADN) ramificado o branched (bADN).

1.1.4.2.1. Análisis cualitativos

En primer lugar en la RT-PCR, la transcriptasa convierte el ARN en ADNc (ADN complementario) para obtener un molde. Tras la extracción del ARN de la muestra y la fase de amplificación se realiza la fase de detección, mediante una hibridación con sonda específica. La RT-PCR cualitativa es una prueba muy sensible y puede detectar desde 100 copias de ARN del VHC por ml (20 UI/ml). Es útil en la evaluación de la hepatitis aguda o crónica seronegativa con causa desconocida, en el estudio etiológico de enfermedad hepática crónica, en los

pacientes inmunocomprometidos, en los lactantes de madres infectadas por VHC y para monitorizar el tratamiento.

El análisis con TMA utiliza un sistema más complejo de reacciones con las enzimas ARN-T-7 polimerasa y MLV-RT transcriptasa inversa, bajo condiciones isotérmicas de amplificación del ARN, mediante intermediarios del ADN. Detectan niveles más bajos de ARN del VHC (5-10 UI/ml) que la técnica previa (48).

1.1.4.2.2. Análisis cuantitativos

El sistema de RT-PCR también se utiliza para la cuantificación del ARN, añadiendo un control externo o estándar de cantidad de ARN conocido que se amplifica junto con la muestra (PCR competitiva). La comparación de muestra y estándar nos permitirá calcular la concentración de ARN.

El método del bADN es un método cuantitativo y cualitativo de detección del ARN, que necesita una sonda de oligonucleótidos en fase sólida para capturar el blanco de ARN, seguido de una hibridación secundaria, mediante una sonda ramificada. Es un método de análisis tanto cualitativo como cuantitativo. Para poner de manifiesto la reacción, necesita un complejo de enzima conjugada al que posteriormente se le agrega un sustrato, con el que la quimioluminiscencia producida es proporcional a la cantidad de ARN del blanco. Existen bADN de segunda y tercera generación y son capaces de detectar 250 mEq/ml y 615 UI/ml respectivamente.

Los análisis cualitativos son métodos más sensibles que los métodos cuantitativos, con capacidad de detección del ARN viral menor de 50 UI/ml, por

lo que se han utilizado tanto para el diagnóstico de la infección, como para monitorizar la eficacia del tratamiento (42).

De tal forma que, en la actualidad, la detección del ARN-VHC se hace por PCR a tiempo real, que permite la amplificación y detección a la vez y es mucho más sensible y rápida que las pruebas cualitativas, con un límite inferior de detección de 15 UI/ml. Además, tiene menos posibilidad de contaminación, disminuyendo de esa forma los falsos positivos (46).

1.1.4.2.3. Determinación del genotipo

La determinación del genotipo se realiza mediante métodos moleculares y debe realizarse de forma sistemática, por su gran implicación clínica a la hora de planificar el tratamiento, ya que cada uno de ellos presenta diferente respuesta al tratamiento.

Como se describió previamente se han descrito, en función de la heterogeneidad genética, hasta 6 genotipos mayores y aproximadamente 80 subtipos (49).

Dependiendo de la tecnología utilizada, la determinación del genotipo se puede realizar mediante técnicas moleculares de genotipado o mediante técnicas serológicas o de serotipado.

Los métodos moleculares de genotipado están basados en la realización previa de una técnica de amplificación de regiones específicas del genoma del virus y posteriormente, mediante el análisis de la secuencia generada por el estudio de polimorfismo de la longitud de los fragmentos obtenidos, mediante técnicas de hibridación con diferentes sondas específicas para cada genotipo y subtipo.

Las pruebas de serotipado están basadas en la respuesta serológica específica a las proteínas antigénicas del VHC, que corresponden a determinadas regiones del genoma del virus. Pueden estar basadas en técnicas de ELISA o de RIBA y utilizan anticuerpos dirigidos contra epítomos de las regiones del core o de las regiones del NS4. Las técnicas de serotipado son más sencillas y económicas que las de genotipado pero, por su baja sensibilidad y especificidad, no son capaces de diferenciar los distintos subtipos del VHC (50).

1.1.4.3. Biopsia hepática

La biopsia hepática percutánea fue realizada por primera vez en 1883 por Paul Ehrlich, pero no fue hasta 1958, tras la modificación de la técnica por Menghini, cuando se extendió su uso.

Es una técnica invasiva que permite el análisis histológico del hígado, pudiendo evaluar la naturaleza y etiología de la enfermedad hepática, así como el grado de la lesión hepática (nivel de inflamación y de fibrosis), jugando un papel clave en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad hepática.

La biopsia hepática constituye el patrón de referencia para evaluar el estado de la enfermedad hepática, en pacientes con hepatitis C crónica. Aparte de ser la técnica más específica en su diagnóstico, proporciona información sobre la respuesta al tratamiento antiviral y permite descartar la existencia de otras causas coexistentes de enfermedad hepática, no sospechadas al inicio y que pueden favorecer la progresión de la enfermedad o influir de alguna forma en la respuesta del tratamiento (51, 52).

No está indicada de forma sistemática en los pacientes con hepatitis crónica virus C, siendo tema de revisión en los últimos años (53).

En pacientes con infección por genotipo 1, la realización de la biopsia hepática previa al tratamiento es útil, si la evidencia clínica de enfermedad avanzada no está clara o si el paciente tiene dudas sobre iniciarlo o no.

En los pacientes con genotipo 2 ó 3, que tienen mayor tasa de respuesta al tratamiento, con alto porcentaje de curación, la biopsia hepática no se realiza de forma sistemática.

Asimismo, los pacientes con evidencia clínica de fibrosis o enfermedad avanzada, no precisan la realización de la biopsia antes de iniciar el tratamiento.

La realización de una biopsia tras el tratamiento antiviral, para confirmar la mejoría de la histología, tampoco es necesaria.

Las lesiones histológicas se distribuyen desde cambios mínimos inflamatorios hasta la cirrosis. La lesión histológica, más frecuentemente observada en la hepatitis C crónica, se caracteriza por la existencia de un infiltrado inflamatorio, a expensas de linfocitos, en los espacios porta y en el parénquima periportal, asociado a necrosis de los hepatocitos de la membrana limitante (hepatitis de la interfase) con aparición de diferentes grados de fibrosis.

Existen diferentes sistemas de estadiaje tras el análisis anatomopatológico de la biopsia hepática. En 1981 Knodell y colaboradores desarrollaron el índice de actividad histológica (54) ampliamente utilizado (55). En la actualidad existen otras clasificaciones como la puntuación modificada de Ishak, la clasificación de Scheuer, y el sistema METAVIR (56). Este último fue

diseñado para establecer la lesión histológica en pacientes con hepatitis crónica por el virus de la hepatitis C.

Estas clasificaciones se basan en asignar una puntuación numérica a las tres principales alteraciones histológicas observadas en la hepatitis crónica por virus C, como son la inflamación de los tractos portales, la necrosis y apoptosis del parénquima y la fibrosis hepática.

La biopsia hepática es, por tanto, el patrón de referencia para establecer el estadiaje de la fibrosis hepática, sin embargo, no se debe olvidar que tiene una serie de limitaciones. Es un método invasivo que puede conllevar morbimortalidad, aunque las complicaciones mayores existentes son infrecuentes, sobre todo si se realiza bajo control ecográfico. Además, no es aceptada por todos los pacientes por este mismo motivo. El pequeño tamaño de la muestra hace que ésta, no sea representativa de todo el tejido hepático, lo que disminuye la sensibilidad para el diagnóstico de estadios avanzados de fibrosis. Normalmente requiere ingreso hospitalario, por lo que presenta un coste económico no despreciable.

1.1.4.4. Fibrosis hepática

La fibrosis hepática se define como un proceso de reparación tisular tras un daño del tejido hepático mantenido en el tiempo. Se trata de un proceso complejo en el que intervienen varios tipos celulares así como citocinas profibrogénicas. La respuesta inmunológica e inflamatoria, a este estímulo repetido en el tiempo, produce la formación de un infiltrado inflamatorio, proliferación de las células estrelladas del hígado que producen colágeno y glucoproteínas, entre otras sustancias, que se acumulan en el hígado

provocando la acumulación de la matriz extracelular, apareciendo la fibrosis, cuando el hígado no es capaz de degradar y eliminar el tejido matricial.

En los pacientes con hepatitis crónica C es clave establecer el estadio de fibrosis hepática y así conocer el grado de progresión de la hepatitis, para individualizar el seguimiento y tratamiento óptimo de cada paciente. Además el grado de fibrosis hepática es un factor predictivo de respuesta al tratamiento antiviral, importante para establecer un pronóstico de la misma.

La evolución de la fibrosis es un proceso lento en la mayoría de los pacientes, sobre todo en estadios iniciales de la enfermedad. La progresión a cirrosis no es uniforme en todos los pacientes. Con los datos provenientes de una biopsia basal se ha intentado establecer el desarrollo de cirrosis, observando que, en caso de no detectar fibrosis, el porcentaje de progresión a cirrosis en 30 años es un 15%, aumentando hasta un 50% a los 20 años si existe fibrosis leve en la biopsia inicial. Se han descrito tres patrones evolutivos según el tiempo de evolución a cirrosis (57):

- Fibrosantes lentos (31%): más 50 años de progresión hasta cirrosis.
- Fibrosantes intermedios (36%): entre 50 y 20 años.
- Fibrosantes rápidos (33%): progresión menor a 20 años.

Para determinar el grado de fibrosis hepática, además de la biopsia hepática, que es un método invasivo con las limitaciones anteriormente citadas, se dispone de otros métodos no cruentos, tanto de imagen como basados en la determinación de marcadores biológicos:

1.1.4.4.1. Métodos de imagen

Estos métodos se basan en la capacidad en la detección de cambios del parénquima hepático que suceden ante la fibrosis avanzada.

La elastografía transitoria o Fibroscan es un procedimiento rápido, sencillo, inocuo, reproducible y objetivo para la determinación de fibrosis hepática. Cuantifica la fibrosis hepática mediante ultrasonidos. Dispone de una sonda emisora-receptora que emite dos tipos de ondas: una onda pulsátil vibratoria, que penetra en el tejido hepático y otra onda de ultrasonidos, que capta la velocidad a la que se propaga la primera onda. La máquina procesa la información y genera, en una pantalla, una imagen correspondiente a la onda elástica, con un valor de rigidez hepática medido en kilopascales (kPa). Cuanto mayor es la velocidad, menor es la elasticidad y mayor la rigidez del hígado (fibrosis), por lo que estima el grado de fibrosis basándose en la rigidez hepática (37, 58). Es más representativa del tejido hepático que la biopsia hepática, ya que la elastografía explora un volumen 100 veces superior, pero no está exenta de limitaciones. No es capaz de discriminar entre fibrosis leve y moderada, es explorador dependiente y la presencia de ascitis, hidrotórax u obesidad hacen difícil su realización (55).

Otros métodos no invasivos son la resonancia magnética nuclear (RMN) y la tomografía computerizada (Fibro-TC), utilizando softwares específicos, con buenos resultados preliminares, pero que aún no se utilizan de forma estandarizada en la práctica clínica.

1.1.4.4.2. Métodos séricos: marcadores biológicos

Existen marcadores séricos directos e indirectos para la estimación de la fibrosis hepática. Estos biomarcadores intentan establecer el estadio de la fibrosis y actividad inflamatoria equivalente a la obtenida con una biopsia hepática. Deben ser específicos del hígado, reproducibles y fácil de realizar,

económicos, capaces de reflejar la fibrosis ante cualquier enfermedad del hígado, así como capaces de establecer el grado de la fibrosis (59).

Los marcadores indirectos determinan alteraciones de la función hepática, sin reflejar directamente el metabolismo de la matriz extracelular. Dentro de los marcadores indirectos se encuentran:

- El cociente AST/ALT que determina una alta probabilidad de cirrosis si presenta valores superiores a 2. Presenta gran especificidad para distinguir los individuos cirróticos de los que no lo son, pero una sensibilidad en torno al 47% (60).
- El índice de Forns que está basado en un análisis multivariado de varios parámetros como son: edad, niveles de colesterol sérico, plaquetas y gamma-glutamil transpeptidasa (GGT) y se trata de un modelo matemático, capaz de predecir la ausencia de fibrosis significativa (61).
- El cociente entre los niveles de AST y las plaquetas conocido como APRI (62) (63) .
- El Fibrotest que se basa en una fórmula matemática que combina 5 marcadores bioquímicos, indirectos de fibrosis, ajustados a la edad y al sexo (63) .
- El HGM1 que incluye el recuento de plaquetas, cifra de AST y glucemia en ayunas, y el HGM2 que analiza el nivel de plaquetas, el cociente internacional normalizado (INR), los niveles de fosfatasa alcalina (FA) y AST, son otros dos métodos indirectos para el análisis de la fibrosis hepática (64).
- Recientes estudios han relacionado el grado de fibrosis hepática con los niveles de colesterol y de ferritina sérica (65).

Los marcadores directos son capaces de reflejar cambios cualitativos y cuantitativos de la matriz extracelular. Entre estos biomarcadores se encuentran aquellos que intervienen en la síntesis o degradación del colágeno, enzimas involucradas en la síntesis o degradación de la matriz extracelular, glicoproteínas, proteoglicanos y citocinas profibrogénicas. Estos valores se encuentran aumentados en el tejido hepático, secundarios a la fibrogénesis y en caso de fibrosis moderada-grave estarán aumentados en el suero de los pacientes, siendo indetectables en caso de fibrosis no avanzada.

1.1.5. Tratamiento

Los datos epidemiológicos, que describen la alta prevalencia de infección y la historia natural de la hepatitis por virus C, sugieren que, todos los pacientes deberían recibir tratamiento. Al tratar a todos los pacientes infectados por el virus de la hepatitis C, se conseguiría reducir notablemente el reservorio del virus, disminuyendo la incidencia global y considerando, de este modo, la posibilidad de erradicar la infección. Por otro lado, se reduciría la necesidad de atención médica de estos pacientes, con el ahorro económico que esto supondría. Además, la infección por virus de la hepatitis C, disminuye de forma significativa la calidad de vida de los pacientes, que se corrige tras un tratamiento eficaz. Por tanto, el efecto del tratamiento no solo es a largo plazo, evitando las complicaciones (cirrosis y hepatocarcinoma) sino a corto plazo, mejorando la calidad de vida de los pacientes (66).

Los últimos años han sido trascendentales para el tratamiento de la hepatitis C, alcanzando tasas de curación de entre un 85-100% de los casos, partiendo de cifras de curación inicial que no sobrepasaban el 50%, debido al desarrollo de un amplio arsenal terapéutico en los últimos 2 años.

1.1.5.1. Objetivos del tratamiento

El objetivo principal del tratamiento consiste en frenar la evolución de la enfermedad y esto, se consigue mediante la erradicación del virus. Recientes estudios sugieren que aunque puede detectarse material genético de forma ocasional en pacientes curados de la infección, ésta puede considerarse erradicada una vez alcanza la respuesta virológica sostenida (RVS) (67). Tras alcanzar la RVS se observa una mejoría en las lesiones histológicas, incluso en el grado de fibrosis (68). Asimismo se ha observado una mejoría de los parámetros analíticos de la función hepática. Por lo que la erradicación del virus parece prevenir las complicaciones derivadas de la progresión de la enfermedad hepática (69).

1.1.5.2. Tipos de respuesta viral al tratamiento: definiciones

Es de suma importancia conocer la cinética viral, es decir, las variaciones en la carga viral, durante el tratamiento, ya que ha sido y es un relevante factor predictivo de respuesta al tratamiento, especialmente en terapias basadas en interferon y permite tomar decisiones terapéuticas (70).

1.1.5.2.1. Respuesta viral sostenida (RVS)

Se define como la negativización del ARN del VHC en plasma 12-24 semanas tras finalizar el tratamiento. La mayor parte de los pacientes que presentan este tipo de respuesta mantienen la negativización del ARN del VHC a largo plazo.

1.1.5.2.2. Respuesta viral rápida (RVR)

La respuesta viral rápida se define como ARN del VHC indetectable en la semana 4 y mantenida en la semana 24. Se considera un factor de buen

pronóstico de la RVS, con un valor predictivo positivo (VPP) del 91%. Más del 90% de los pacientes con genotipo 1 que alcanzan RVR consiguen RVS. Algunos autores han definido, dentro de la RVR, la respuesta viral muy rápida, que es aquella en la que el ARN del VHC es indetectable en la segunda semana del tratamiento.

1.1.5.2.3. Respuesta viral rápida extendida (eRVR)

Se define como aquella respuesta en la que el ARN del virus C no es detectable desde la semana 4 a la 12 semana de tratamiento.

1.1.5.2.4. Respuesta viral precoz o temprana (RVP)

La respuesta viral precoz puede dividirse en:

- Completa: en la que se observa un ARN del VHC indetectable en la semana 12 del tratamiento.
- Parcial: definida por el descenso de 2 ó más logaritmos de la carga viral basal, pero continúa habiendo niveles detectables en la semana 12.

1.1.5.2.5. Respuesta viral tardía (RVT)

Se define como el descenso de más de 2 logaritmos de la carga viral basal en la semana 12 de tratamiento, con ARN del VHC indetectable en la semana 24 y mantenida hasta el final del tratamiento. Si no se alcanza este tipo de respuesta la probabilidad de RVS es muy baja, con un valor predictivo negativo (VPN) que se aproxima al 100%.

1.1.5.2.6. No respuesta al tratamiento

Los pacientes que no responden al tratamiento, es decir, aquellos que no presentan niveles indetectables de ARN del VHC durante las primeras 24

semanas, se pueden clasificar en aquellos que tienen una nula respuesta o una respuesta parcial.

- Nula respuesta: definida por ausencia de descenso de más de 2 logaritmos de la carga viral basal en la semana 12.
- Respuesta parcial: cuando existe una caída de 2 ó más de 2 logaritmos de los niveles de ARN del VHC en la semana 12, pero son detectables en la semana 24 del tratamiento.

1.1.5.2.7. Recaída

Se define como la reaparición del ARN viral en los pacientes que han tenido una respuesta al final del tratamiento.

1.1.5.2.8. Breakthrough virológico

Se define como la reaparición del RNA del VHC durante el tratamiento, en pacientes que habían presentado algún tipo de respuesta previa con ARN indetectable.

1.1.5.3. Factores predictores de respuesta al tratamiento

Existen múltiples factores que pueden influir sobre la respuesta viral al tratamiento. Principalmente se pueden dividir en factores virales o factores del huésped, es decir, del propio individuo infectado.

Dentro de los factores virales son de gran importancia la carga viral y su cinética como se comentó en el apartado previo y el genotipo. El genotipo del VHC es el principal factor pronóstico de respuesta al tratamiento antiviral combinado (71). Aunque la viremia se ha considerado durante años como un factor pronóstico de respuesta al tratamiento, su relevancia real se ha limitado por la falta de estandarización de las técnicas para su determinación. En el

momento actual se acepta que la existencia de una alta carga viral (> 600.000 UI/ml) condiciona una peor respuesta al tratamiento (72, 73).

En cuanto a los factores que dependen del huésped, el sexo femenino, la edad superior a 40 años y la raza no caucásica (71, 74) presentan, por lo general, peor respuesta al tratamiento. Asimismo, hay que destacar los factores metabólicos como la obesidad, la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática, que influyen de forma negativa en la respuesta viral.

La fibrosis hepática desempeña un papel importante en la posibilidad de alcanzar RVS, siendo una variable independiente de predicción de respuesta, tanto al comparar el grado de fibrosis en pacientes cirróticos frente a no cirrótico, como al analizar la velocidad de progresión de la fibrosis (75).

La adherencia al tratamiento es otro factor dependiente del huésped y varios estudios han relacionado el mejor cumplimiento con una mejor tasa de respuesta al tratamiento (76).

1.1.5.4. Indicaciones del tratamiento

Todos los pacientes, naïve o no, con enfermedad hepática crónica compensada o descompensada, deben ser considerados para recibir tratamiento (77).

Se debe priorizar el tratamiento según el grado de fibrosis o cirrosis (METAVIR score \geq F3), salvo en el caso de pacientes coinfectados (VHB o VIH), pacientes en espera de trasplante hepático o postrasplante, pacientes con manifestaciones extrahepáticas graves y pacientes con fatiga debilitante. También están en la misma situación aquellos pacientes con alto riesgo de transmitir la enfermedad como usuarios de drogas vía parenteral, individuos que

tienen prácticas sexuales de alto riesgo, mujeres con deseos de gestación, pacientes en hemodiálisis e individuos encarcelados.

Los pacientes con cirrosis descompensada (Child-Pugh B y C) deben tratarse de forma urgente con un régimen libre de interferón.

El tratamiento está también justificado en pacientes con moderada fibrosis (METAVIR score F2). En pacientes sin fibrosis o con leve fibrosis la indicación debe ser individualizada.

El tratamiento no está recomendado en pacientes con limitada esperanza de vida no relacionada con la enfermedad hepática.

1.1.5.5. Fármacos antivirales

1.1.5.5.1. Interferón

El interferón (78) es una potente citocina producida por el propio organismo como respuesta frente a determinados estímulos. No sólo tiene acción antiviral, sino que posee acción antiproliferativa e inmunomoduladora.

Su acción antiviral la ejerce en tres niveles: inhibiendo la síntesis de proteínas virales, produciendo la destrucción del ARN viral y facilitando la eliminación de las células infectadas mediante la activación de las células natural killer (79). El interferón más utilizado es el IFN α , la forma recombinante que se obtiene por ingeniería genética.

Se empleó por primera vez en 1986, en el tratamiento de pacientes con hepatitis crónica no A no B de origen postransfusional, alcanzando tasas de RVS del 8-15% (80).

A partir del año 1994 comienza el empleo conjunto con otra molécula, la ribavirina (RBV) alcanzando tasas de RVS superiores entre un 35 y 45% (81, 82). A pesar de la combinación de los dos agentes, se continuaba obteniendo una baja tasa de respuesta, por lo que se investigó este fracaso, relacionándose con la presencia de mutantes virales, la baja vida media del interferón y fluctuaciones de las concentraciones séricas. Ante esto, se decidió modificar la molécula de interferón mediante la conjugación con polietilenglicol (PEG), que es un polímero hidrosoluble, mejorando así la molécula inicial, aumentando la solubilidad, reduciendo la velocidad de absorción y por tanto disminuyendo el aclaramiento renal y celular, con el consiguiente aumento de la vida media y de la biodisponibilidad, sin pérdida de su función biológica.

En la actualidad, están comercializados dos interferones pegilados (IFN-peg), el interferón α -2a, unido a una cadena ramificada de PEG de 40 kD y el interferón α -2b, unido a una cadena lineal de PEG de 12 kD. La diferencia en la molécula de PEG hace que tengan propiedades farmacocinéticas diferentes, considerándose equivalentes en cuanto a eficacia (83), pero no en cuanto a efectos adversos, siendo mayores en los tratados con IFN pegilado α -2b (84, 85).

Hasta la aparición reciente de los nuevos antivirales, el uso de los IFN-peg combinados con ribavirina estaba considerado como tratamiento estándar de elección de la hepatitis crónica C (86).

La duración del tratamiento con IFN-peg debe establecerse principalmente según el genotipo, de forma que para los genotipos 1, 4, 5 y 6 debe ser de 48 semanas y para los genotipos 2 y 3 de 24 semanas (67, 87-89).

Asimismo, la duración y la dosis de RBV a emplear en el tratamiento combinado con IFN-peg, se decide según el genotipo.

En la actualidad, según el documento de consenso de la sociedad española para el tratamiento del virus de la hepatitis C de Abril de 2015 (90) las indicaciones de IFN son las siguientes.

En pacientes naïve infectados con genotipo 1:

- IFN-RBV + Simeprevir durante 12 semanas, seguido de 12 semanas con IFN-RBV si RVR (ARN viral negativo en la semana 4 con una RVS global del 80%.
- IFN-RBV + Sofosbuvir durante 12 semanas, con una RVS global del 90%.

En pacientes previamente tratados (recidivantes) con IFN y RBV genotipo 1:

- IFN-RBV + Simeprevir durante 12 semanas, seguido de 12 semanas con IFN-RBV si RVR, con una RVS global del 80%.
- IFN-RBV + Sofosbuvir durante 12 semanas, con una RVS global del 72 al 85%.

En Pacientes genotipo 2 naïve o con fallo de respuesta al tratamiento previo IFN y RBV:

- INF-RBV + Sofosbuvir durante 12 semanas, con tasa de RVS del 96% y del 93% en cirróticos.

En pacientes genotipo 3 naïve o con fracaso a IFN y RBV:

- IFN-RBV + Sofosbuvir durante 12 semanas, con tasa de RVS del 83 al 91%.

En pacientes naïve o previamente tratados con genotipo 4:

- IFN-RBV + Sofosbuvir durante 12 semanas, con una tasa de RVS 98%.
- IFN-RBV + Simeprevir durante 24 ó 48 semanas, dependiendo de la terapia guiada por respuesta. Tasa de RVS de 83% en naïve, de 86% en recaedores, 60% en respondedores parciales y 40% en respondedores nulos.
- IFN-RBV + Daclatasvir, evaluado sólo en pacientes naïve, durante 24 semanas si eRVR y 48 semanas en el resto, con una tasa de RVS del 82%.

En pacientes naïve con genotipo 5 y 6:

- IFN-RBV + Sofosbuvir durante 12 semanas.

La dosis recomendada en el adulto del IFN-peg α -2a es de 180 μ g/semana (69), independientemente del peso corporal del paciente. La dosis del INF-peg α -2b debe ajustarse al peso, de modo que se administren 1,5 μ g/Kg a la semana.

La dosis debe ajustarse ante la aparición de determinados efectos adversos. La tasa de efectos adversos supera el 25% en algunos estudios y puede disminuirse, si estos efectos se explican de forma correcta antes de iniciar el tratamiento. El buen cumplimiento terapéutico es clave para el éxito y esto es particularmente importante en las primeras 10-20 semanas del tratamiento.

Ambos IFN-peg son relativamente seguros y muestran un perfil de efectos adversos parecido al de los interferones no pegilados.

El efecto adverso más frecuente es el síndrome pseudogripal, que normalmente desaparece en las primeras 48 horas. El desarrollo de síntomas neuropsiquiátricos, sobre todo síntomas depresivos, es uno de los efectos adversos más frecuentes, presente en hasta un 45% de los pacientes tratados. Su detección precoz y el inicio de tratamiento antidepresivo, es importante para mejorar la calidad de vida del paciente y la adhesión al tratamiento (91).

Las alteraciones hematológicas (92), como la neutropenia y la trombocitopenia también son frecuentes. La neutropenia aparece en un 20% de los tratados, no suele asociarse al desarrollo de infecciones bacterianas y generalmente se controla cuando se reduce la dosis del interferón. Este efecto adverso tiene mayor importancia en pacientes coinfectados o inmunodeprimidos por lo que en estos pacientes se ha propuesto el uso de factores estimulantes de colonias de granulocitos con resultados satisfactorios (93). Se recomienda reducir la dosis si el recuento de neutrófilos es menor de 750/ μ l y suspender el tratamiento si es menor de 500/ μ l. La trombocitopenia es menos frecuente, generalmente no tiene consecuencias clínicas con aumento de la incidencia del sangrado, excepto en pacientes cirróticos que tienen un recuento plaquetario ya alterado, secundario al hiperesplenismo. Si el recuento es menor de 50.000/ μ l se recomienda la reducción de la dosis y la suspensión del tratamiento cuando es menor de 30.000/ μ l.

Se han descrito alteraciones en la función tiroidea, tanto hipotiroidismo como hipertiroidismo, este último reflejando en ocasiones una exacerbación de una tiroiditis autoinmune y en otras apareciendo de *novo*. El hipotiroidismo no obliga a suspender el tratamiento, pero el hipertiroidismo sí, y se debe realizar

seguimiento analítico de las hormonas tiroideas de forma rutinaria a lo largo del tratamiento (94).

Otros efectos secundarios menos graves, pero que se deben tener en cuenta ya que disminuyen la calidad de vida de los pacientes e incrementan, por tanto, el riesgo del abandono del tratamiento, son las alteraciones dermatológicas como erupciones cutáneas y alopecia, alteraciones del gusto, así como síntomas dispépticos o alteración del ritmo deposicional con diarrea.

1.1.5.5.2. Ribavirina

La ribavirina es una molécula de 1-β-D-ribofuranosyl-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamida que es un análogo sintético de nucleósidos, con amplio espectro de actividad antiviral, *in vitro*, contra el ADN y el ARN de los virus. Su mecanismo de acción permanece aún desconocido pero parece estar implicada en la inhibición de la síntesis de ácido nucleico viral y debido a su efecto inmunomodulador actúa inhibiendo la producción de IL-4 (potente inhibidor de linfocitos citotóxicos) e incluso inhibiendo la respuesta proinflamatoria desencadenada por la infección viral. Además, parece tener un efecto en la inducción de mutaciones en el ARN viral (83) y en la disminución de la infectividad del VHC (95).

La RBV en monoterapia se ha empleado en la hepatitis crónica por VHC en múltiples ensayos, demostrando una disminución del nivel de aminotransferasas, una mejora histológica moderada durante el tratamiento (95) y una disminución de los niveles de ARN-VHC, pero es ineficaz para eliminar el ARN del VHC (84, 96-98). La ausencia de respuesta sugiere que tiene un valor limitado en monoterapia.

Su empleo inicial junto al interferón estándar mejoró considerablemente las tasas de RVS (81, 82). Hasta hace poco, como se comentó anteriormente, la terapia combinada con el INF-peg era la terapia de elección de la hepatitis crónica C (86) ofreciendo las mejores tasas de RVS.

En cuanto a las indicaciones de la RBV, a parte de su uso en combinación con el IFN-peg, se puede utilizar en combinación con los nuevos antivirales, dependiendo del genotipo y de si el paciente no ha recibido tratamiento previo (naïve) o sí lo ha recibido, según el último consenso español para el tratamiento de la hepatitis C, las indicaciones son las siguientes (90).

En pacientes genotipo 1 naïve:

- RBV ± Sofosbuvir y Simeprevir durante 12 ó 24 semanas, con tasas de RVS del 95%.
- RBV ± Sofosbuvir y Ledipasvir durante 12 ó 24 semanas u 8 semanas, con una RVS del 97-100% y 95% respectivamente.
- RBV ± Paritaprevir / Ritonavir, Dasabuvir y Ombitasvir durante 12 y 24 semanas. 12 semanas con una tasa de RVS del 96%, 99,5%, 97% y 95 %, según los estudios y con un porcentaje de RVS discretamente superior, en los estudios que utilizaron la combinación de RBV frente a los que no la utilizaban.
- RBV ± Sofosbuvir y Daclatasvir durante 12 ó 24 semanas, con tasa de RVS del 95% (con RBV) y del 100% (sin RBV).

En pacientes genotipo 1 no naïve:

- RBV ± Sofosbuvir y Simeprevir durante 12 ó 24 semanas, con tasas de RVS del 95%. Un estudio en cohorte de vida real, obtuvo RVS globales a las 4 semanas del 85% (90% en genotipo 1b y 80% en cirróticos).
- RBV ± Sofosbuvir y Ledipasvir durante 12 ó 24 semanas, con RVS entre un 94 y 99%. En pacientes con cirrosis la tasa de RVS fue inferior en el régimen de 12 semanas 82-86%, comparado con RVS del 99-100%, si realizaban 24 semanas de tratamiento.
- RBV ± Paritaprevir / Ritonavir, Dasabuvir y Ombitasvir durante 12 y 24 semanas, con una tasa de RVS fluctuante del 94 al 100%, según los estudios.
- RBV ± Sofosbuvir y Daclatasvir durante 24 semanas, con tasa de RVS del 95% (con RBV) y del 100% (sin RBV).

En pacientes genotipo 2:

- RBV ± Sofosbuvir durante 12 semanas , con RVS del 97%. En pacientes previamente tratados se consiguió mejor resultado con 16 semanas de tratamiento (RVS del 94 vs 86% si 12 semanas).

En pacientes genotipo 3:

- RBV ± Sofosbuvir durante 24 semanas, con RVS del 93% en pacientes naïve no cirróticos, del 92% en naïve cirróticos y en los pacientes previamente tratados, una tasa de RVS del 62 vs 86% según si presentaban cirrosis o no.
- RBV ± Sofosbuvir y Daclatasvir durante 12 semanas, con tasa de RVS del 97 y 94% en pacientes sin cirrosis hepática, naïve o previamente tratados, respectivamente. Con tasa de RVS en pacientes cirróticos del 58 y del 69% según fueran naïve o con experiencia de otros tratamientos.

- RBV ± Sofosbuvir y Ledipasvir durante 12 semanas , con RVS en los pacientes naïve de un 64% (sin RBV) a un 100% (con RBV). En pacientes previamente tratados se obtuvo una RVS en torno a 82%.

En pacientes genotipo 4:

- RBV ± Sofosbuvir durante 24 semanas, con RVS del 100% en pacientes naïve, frente a 87% en pacientes previamente tratados.
- RBV ± Sofosbuvir y Daclatasvir: no existen datos de estudios clínicos, pero está contemplada la indicación en la ficha técnica.
- RBV ± Sofosbuvir y Ledipasvir durante 12 semanas, en sólo 21 pacientes, con RVS del 95%.
- RBV ± Paritaprevir / Ritonavir y Ombitasvir durante 12 semanas, con una tasa de RVS del 100%.

En pacientes con genotipo 5 y 6: no se contempla en la guía de consenso una terapia libre de IFN.

Es de administración oral y presenta buena tolerancia. Las dosis diarias se reparten en dos tomas y son de 800 mg para los genotipos 2 y 3 y de 1.000-1.200 mg, ajustadas al peso, para el resto de genotipos. Con el ajuste de la dosis según el peso se ha logrado mejorar a tasa de RVS (99).

Aunque por lo general es bien tolerada, no está exenta de efectos adversos y, en ocasiones, es difícil distinguir a qué se atribuye un determinado efecto secundario, a esta molécula o al IFN. Los efectos adversos asociados de forma más frecuente son: síndrome pseudogripal, que ocurre sobre todo en la primera semana del tratamiento, hemólisis, depresión, insomnio, vértigo, anorexia, náuseas, congestión nasal, tos y prurito (84, 96, 100). La anemia con cifras de hemoglobina menores de 10 g/dL (101), requiere la disminución de

dosis y está presente en hasta un 15% de pacientes, se corrige tras la disminución o suspensión del fármaco, cuando alcanza cifras inferiores a 8,5 g/dl de Hb o de 10 g/dl si se trata de un paciente cardiópata.

Tras las recientes publicaciones, que relacionan claramente las concentraciones de RBV con la tasa de RVS, se ha incidido en la prevención de la anemia con fármacos estimuladores de la eritropoyesis, para reducir en lo posible la necesidad de modificación de la dosis de RBV. El uso de factores de crecimiento de eritrocitos para la prevención de la anemia secundaria a la RBV se ha empleado en pacientes con genotipo 1, 2 y 3 resultando coste-efectivo (102).

Sin embargo, a pesar de estas medidas, existen situaciones en las que habrá que modificar o suspender la dosis de la RBV. Se debe reducir hasta 600 mg/día (200 mg por la mañana y 400 mg por la noche) en pacientes no cardiopatas, con cifras de Hb entre 8,5 y 10 g/dl y en pacientes cardiopatas en los que desciende la Hb más de 2 g/dl, durante al menos 4 semanas consecutivas, en cualquier período del tratamiento. Se debe suspender si la Hb es menor a 8,5 g/dl en pacientes sin cardiopatía y en pacientes cardiopatas cuando la Hb se mantiene por debajo de 12 g/dl, a pesar de reducir la dosis durante 4 semanas. Si la anemia revierte, se puede reanudar el tratamiento con RBV a dosis de 600 mg al día e incrementarla hasta 800 según la evolución. A consecuencia de la hemólisis, se puede producir un aumento moderado y reversible de las cifras de bilirrubina y de ácido úrico, que no requieren ajuste del tratamiento. Se debe tener en cuenta que la RBV es teratógena, teniendo un efecto hasta 6 meses después del tratamiento, por lo que se deben tomar medidas contraceptivas.

La terapia combinada tiene un riesgo aumentado de efectos secundarios no graves como síndrome pseudogripal, alteraciones dermatológicas, sintomatología dispéptica y disnea, pero varios estudios sugieren que, la aparición de efectos adversos graves, no es significativa en la terapia combinada (81, 82, 103, 104).

La RBV está contraindicada en pacientes con insuficiencia renal y sólo debe usarse si se considera que tiene una indicación estricta, en este caso, se debe realizar un control estrecho de las cifras de creatinina y de los efectos secundarios, ya que son pacientes con más susceptibilidad a padecer efectos adversos durante el curso del tratamiento (105).

1.1.5.6. Antivirales de acción directa

En la última década, el tratamiento de elección de la hepatitis crónica C ha consistido en la combinación de IFN-peg y RBV durante 24 semanas, en pacientes con genotipos 2 ó 3 y durante 48 semanas, en pacientes con genotipos 1 ó 4, alcanzando tasas de RVS en torno al 45-55% y del 70-80% respectivamente. La obtención de la RVS se ha asociado a una clara mejoría en el pronóstico de la enfermedad hepática, por lo que la investigación y el desarrollo de estrategias dirigidas a mejorar la tasa de RVS en esta enfermedad, ha presentado avances relevantes en los últimos años. El gran progreso en el conocimiento del ciclo vital del VHC, así como las características estructurales de las proteínas del virus, han estimulado y facilitado el desarrollo de los nuevos agentes antivirales de acción directa (106), que son fármacos que actúan de forma específica, sobre una o varias partes del ciclo de vida del virus de la hepatitis C, interrumpiendo su cadena de reproducción.

El VHC se replica a una velocidad muy elevada en el citoplasma de los hepatocitos, durante el ciclo vital. Este ciclo transcurre desde que el VHC se une a la membrana plasmática del hepatocito y su endocitosis a través de ésta, pasando por la pérdida de la envoltura y la generación de la red membranosa, la traducción y la replicación, el ensamblaje viral, y finalmente el transporte y la liberación del nuevo virus en el espacio extracelular.

La progresiva comprensión del ciclo vital, ha permitido la identificación de dianas potenciales en puntos concretos del mismo siendo los objetivos más específicos, la proteasa NS3/4A y la polimerasa NS5B del VHC. Por tanto, la primera generación de AAD han sido los inhibidores de la proteasa y los inhibidores de la polimerasa análogos de nucleósidos o no nucleósidos. Asimismo, el descubrimiento de los inhibidores del complejo de replicación NS5A es de gran relevancia.

Según la fase del ciclo vital sobre la que actúan estas moléculas, impidiendo la replicación del VHC, se pueden clasificar en 3 familias diferentes:

- Inhibidores de la proteasa (107): telaprevir, boceprevir, simeprevir y paritaprevir.
- Inhibidores de la polimerasa: sofosbuvir y dasabuvir.
- Inhibidores de la proteína NS5A: daclatasvir, ombitasvir, ledipasvir.

El virus de la hepatitis C presenta una reproducción incontrolada, produciendo diariamente millones de copias, que pueden presentar variaciones en la estructura genética, es decir, mutaciones, que son las responsables de las

resistencias de los fármacos antivirales, por lo que un único AAD no puede evitar, por sí solo, la reproducción viral.

1.1.5.6.1. Inhibidores de la proteasa

1.1.5.6.1.1. Telaprevir

Es un fármaco inhibidor de la proteasa de primera generación. La pauta recomendada de tratamiento con telaprevir incluye 12 semanas de triple terapia, seguidas de 12 ó 36 semanas más de IFN-peg y RBV, según el grado de fibrosis, o si el paciente es naïve o experimentado a tratamientos previos.

La dosis recomendada es de 750 mg cada 8 horas y el fármaco está disponible en comprimidos de 375 mg. Por lo que con este tratamiento se añadirá 6 cápsulas al tratamiento combinado con IFN-peg y RBV. Se debe administrar junto a una ingesta calórica rica en grasas ya que, de esta forma, aumenta su absorción.

Su uso en combinación con el IFN-peg y RBV demuestra una mejoría en la tasa de RVS, alcanzando cifras del 75% en pacientes naïve, con regímenes de tratamiento de 12 semanas en triple terapia, seguidas de otras 12 ó 36 semanas con IFN-peg y RBV (108). En pacientes que recibieron tratamiento previo se consiguieron tasas de RVS del 26, 59 y 83% según su respuesta previa al tratamiento: respuesta nula, parcial o recaída respectivamente (109). Las tasas de respuesta fueron inferiores en pacientes con fibrosis avanzada o cirrosis, que en general se benefician de pautas más largas de tratamiento.

En el actual consenso del grupo español del tratamiento de la hepatitis C (90), no se recoge indicación para este fármaco, ya que ha sido desplazado por los nuevos agentes de segunda generación.

A los efectos secundarios de este fármaco en sí, hay que sumarle los de la terapia combinada con IFN-peg y RBV, ya descritos en los capítulos correspondientes (110). Los principales efectos secundarios a destacar son: la anemia, llegando a porcentajes de hasta un 36%, se puede tratar con fármacos estimulantes de la eritropoyesis siendo, en ocasiones, necesario el descenso de la dosis de la RBV; las erupciones cutáneas que pueden estar presentes hasta en un 56% de los casos y en algunos casos han obligado a la suspensión del tratamiento (111) y, por último, los síntomas anorrectales en un 29%, que son controlados con tratamiento sintomático.

1.1.5.6.1.2. Boceprevir

La combinación durante 24-44 semanas de boceprevir, interferón pegilado y ribavirina (BOC-IFN-peg/RBV) precedida de una fase de lead-in de 4 semanas de IFN-peg/RBV, alcanza tasas de RVS del 67% en pacientes naïve, con resultados superiores, en torno al 69-75%, en pacientes que presentaban recaída tras un tratamiento previo, con un régimen de más duración, 32-44 semanas, precedida del mismo periodo de lead-in, y tasas de RVS del 40-52% en pacientes con respuesta parcial a previos tratamientos (112-114).

Los pacientes con mayor grado de fibrosis presentaron una menor respuesta al tratamiento, por lo que se recomiendan pautas más largas de tratamiento.

El descenso en la carga viral de más de un logaritmo tras el periodo de 4 semanas de IFN-peg/RBV (lead-in) es un buen predictor de RVS, especialmente en pacientes no respondedores a un tratamiento previo, por lo que, la cinética viral durante esta fase es un factor de gran importancia a la hora de decidir el tratamiento.

El boceprevir está disponible en forma de cápsulas duras de 200 mg y la dosis aprobada es de 800 mg cada 8 horas combinado con IFN-peg/RBV, por lo que el tratamiento supone añadir 12 cápsulas al tratamiento habitual. La ingesta con alimentos aumenta la exposición al fármaco por lo que se recomienda tomar la medicación con algo de comida, pero a diferencia del telaprevir, no es necesario que sea una comida grasa.

Al igual que el otro inhibidor de la proteasa, no se contempla indicación actual en el último consenso del grupo español, para el tratamiento de la hepatitis C (90).

Los efectos adversos más frecuentes relacionados con el Boceprevir son la anemia, ya presente con la terapia de IFN-peg/RBV, pero que puede aumentar, al introducir este fármaco, hasta en un 50% de los casos (115) ; la disgeusia en un 44%, que puede calmar con la ingesta de otros alimentos; y la neutropenia hasta en un 25% de los casos y que puede requerir el descenso de la dosis de IFN-peg.

1.1.5.6.1.3. Simeprevir

Es un inhibidor específico de la proteasa NS3/4A, esencial para la replicación viral, utilizado en combinación con otros fármacos activos frente al VHC en función del genotipo(116, 117). Es activo frente a los genotipos 1, 4, 5 y

6 aunque su eficacia en los genotipos 5 y 6 no se ha estudiado, por lo que no se utiliza en estos pacientes.

Se presenta en cápsulas duras que contienen 150 mg de principio activo. La dosis recomendada es de 150 mg al día durante 12 semanas y debe tomarse con alimentos.

Las reacciones adversas más frecuentes son náuseas (22%), exantema y prurito (22%), disnea (11,8%), aumento de la bilirrubina sérica (7,4%) y reacción de fotosensibilidad (5%). En general es un fármaco con un perfil de seguridad mejor que telaprevir y boceprevir y buena tolerancia, con muy pocas interrupciones del tratamiento debidas a acontecimientos adversos, así como una incidencia baja de acontecimientos adversos graves.

1.1.5.6.1.4. Paritaprevir

Es un inhibidor de la proteasa de segunda generación que forma parte de una combinación farmacológica con otros dos agentes antivirales directos.

1.1.5.6.1.5. Ritonavir

El ritonavir es un antirretroviral inhibidor de la proteasa que se utiliza en la infección por el VIH, carece de actividad frente al virus C, pero, su función como inhibidor del citocromo CYP3A, hace que aumente la exposición de su sustrato, el paritaprevir, incrementado la concentración de este fármaco en sangre y aumentando su potencia (118).

1.1.5.6.2. Inhibidores de la polimerasa

1.1.5.6.2.1. Sofosbuvir

El sofosbuvir es un inhibidor nucleótido de la polimerasa NS5B utilizado en combinación con otros fármacos activos frente al VHC en función del genotipo (119). Es un profármaco que es fosforilado hasta la forma activa, el nucleósido trifosfato, que compite por la incorporación a la zona activa de la NS5B polimerasa del VHC. La síntesis del ARN viral se inhibe, tras la incorporación del metabolito fosforilado, a la cadena del ARN viral naciente producido por la ARN-polimerasa dependiente del ARN.

Se presenta en comprimidos recubiertos con película que contienen 400 mg del medicamento. La dosis recomendada es 400 mg al día y debe tomarse con alimentos.

La tolerabilidad de este fármaco es buena y no se han atribuido efectos secundarios específicos.

1.1.5.6.2.2. Dasabuvir

Es un inhibidor no nucleósido de la polimerasa NS5B. Se utiliza en combinación con otros 2 AAD (120) y cada comprimido contiene una dosis de 250 mg de este fármaco.

La insuficiencia hepática leve, moderada o grave afecta la concentración del fármaco, únicamente teniendo relevancia clínica la insuficiencia hepática grave, ya que aumenta su concentración en un 32.5%.

1.1.5.6.3. Inhibidores de la proteína NS5A

1.1.5.6.3.1. Daclatasvir

El daclatasvir es un antiviral de acción directa, inhibidor específico de la proteína NS5A, que es esencial para la replicación viral, utilizado en combinación con otros fármacos activos frente al VHC en función del genotipo.

In vitro, es activo frente a los genotipos 1, 2, 3 y 4, aunque en ficha técnica sólo se ha incluido régimen y duración recomendada para los genotipos 1, 3 y 4.

Se presenta en comprimidos recubiertos con película y contienen 30 mg ó 60 mg de principio activo. La dosis recomendada es de 60 mg una vez al día por vía oral con o sin alimentos.

Es un fármaco seguro que no parece empeorar el perfil de seguridad al combinarse con otros antivirales.

1.1.5.6.3.2. Ombitasvir

Es un inhibidor de la proteína NS5A, que es fundamental para la replicación del virus C. Se utiliza en combinación con otros 2 AAD (120). Según los resultados del modelo replicón, esta molécula pudiera haber sido útil en el tratamiento del genotipo 3 pero al sólo estar disponible en asociación con paritaprevir, el cual tiene una actividad significativamente reducida frente a este genotipo no se utiliza en el genotipo 3.

1.1.5.6.3.3. Ledipasvir

El ledipasvir es un inhibidor específico de la proteína NS5A, esencial tanto para la replicación del ARN, como para el ensamblaje de los viriones del VHC, utilizado en combinación con otros fármacos activos frente al VHC.

La seguridad clínica de ledipasvir ha sido estudiada fundamentalmente en combinación con sofosbuvir (121). Hasta la fecha, no se han notificado efectos secundarios específicos para los inhibidores de NS5A.

1.1.5.6.4. Combinaciones farmacológicas

Para facilitar la adhesión al tratamiento de estos fármacos se han comercializado varias combinaciones de AAD.

El preparado comercial compuesto por paritaprevir, ombitasvir y ritonavir, combina dos antivirales con distintos mecanismos de acción y perfiles de resistencia no solapados, actuando frente al ciclo replicativo del virus de la hepatitis C de los genotipos 1 y 4. Este efecto se ve potenciado por la asociación, en algunos pacientes, con dasabuvir. Cada comprimido está compuesto por paritaprevir (75 mg), ombitasvir (12,5 mg), y ritonavir (50 mg). La dosis recomendada es de 2 comprimidos, una vez al día, tomados junto a alimento.

La combinación de ledipasvir y sofosbuvir también se ha comercializado en un compuesto farmacológico que ha sido autorizado para el tratamiento de la hepatitis c crónica, en adultos, para el tratamiento de los genotipos 1,3 y 4. Se presenta en comprimidos recubiertos con película y contiene 90 mg de ledipasvir en combinación con 400 mg de sofosbuvir. La dosis recomendada es de 1 comprimido una vez al día por vía oral con o sin alimentos. El perfil de seguridad global se basa en datos de 1952 pacientes con infección crónica por el VHC que recibieron ledipasvir 400mg y sofosbuvir 90mg una vez al día con (n=1080) o sin RBV (n=834), en un total de 3 ensayos clínicos de fase III. La frecuencia de acontecimientos adversos de moderados o graves fue baja, de forma que el número de pacientes que discontinuaron el tratamiento debido a eventos

adversos, también fue muy baja, siendo los efectos secundarios más frecuentes la cefalea leve y la fatiga. Los efectos adversos fueron más frecuentes si se asociaba RBV, pero no fueron efectos adversos graves que obligaran a la suspensión del tratamiento.

1.1.5.7. Tratamiento en situaciones especiales

1.1.5.7.1. Tratamiento pre y post-trasplante hepático

En todos los pacientes en lista de trasplante hepático se recomienda iniciar el tratamiento antiviral. Debe priorizarse y se recomiendan regímenes de tratamientos libres de IFN, basados en sofosbuvir para minimizar el desarrollo de resistencias.

Las combinaciones sofosbuvir con simeprevir, daclatasvir y ledipasvir parecen seguras y eficaces en pacientes con cirrosis compensada, pero los estudios, a este respecto, son limitados o han sido realizados con un bajo número de pacientes.

Se recomienda que el paciente presente ARN del virus C de la hepatitis indetectable, al menos 1 mes previo al trasplante, para disminuir el riesgo de reinfección tras el trasplante.

Asimismo, el tratamiento de la hepatitis C post-trasplante se indica en todos los pacientes y debe ser un tratamiento libre de IFN. La pauta de elección en cirrosis descompensada es sofosbuvir, ledipasvir y RBV durante 12 semanas (90).

1.1.5.6.7.2. Tratamiento en coinfección por VIH

El tratamiento antirretroviral es una prioridad en los pacientes coinfectados VIH-VHC por lo que debe iniciarse en todos los pacientes de forma independiente del recuento de células CD4. Esto es debido al riesgo de mayor progresión de la enfermedad hepática en pacientes coinfectados con el VIH, no sólo por la inmunosupresión, sino por acción directa del propio VIH (122), que además puede favorecer la progresión de otras comorbilidades asociadas (123).

Asimismo, constituye una prioridad plantear el tratamiento para el virus de la hepatitis C en todos los pacientes con fibrosis significativa F2-F4 o que presenten manifestaciones extrahepáticas graves.

Se debe iniciar antes el tratamiento antirretroviral, por lo que el tratamiento de la hepatitis C aguda, en pacientes con VIH se debe individualizar. Si la persona con la infección presenta riesgo bajo de transmisión, éste se puede diferir e iniciar las pautas de la hepatitis crónica si se comprueba que la viremia persiste más de 6 meses. Si existe alto riesgo de transmisión y se comprueba que el ARN del VHC no desciende 2 logaritmos en el primer mes o continúa siendo detectable a las 12 semanas se puede ofrecer el tratamiento con IFN-peg/RBV según peso durante 24-48 semanas.

Las pautas de tratamiento de la hepatitis C crónica basadas en AAD, en pacientes coinfectados con VIH, son las mismas que en mono infectados, precisando algún ajuste de dosis al combinarlas con los antirretrovirales.

1.1.5.6.7.3. Tratamiento de manifestaciones extrahepáticas

La crioglobulinemia mixta que presenta manifestaciones extrahepáticas de vasculitis, asociada a hepatitis crónica C, es indicación de tratamiento libre de IFN.

El Linfoma no Hodgkin de células B, asociado a infección crónica por virus C, también es indicación de tratamiento antiviral libre de IFN, según las indicaciones generales descritas en el consenso español y dependiendo del genotipo.

Los pacientes con diabetes mellitus tipo 2, asociado a síndrome metabólico, o no diabéticos con resistencia insulínica, deben ser priorizados para iniciar tratamiento, ya que, la RVS mejora el trastorno metabólico y disminuye el riesgo cardiovascular.

En los pacientes con enfermedad renal crónica que vayan a ser valorados para trasplante renal o inicio de hemodiálisis, debe determinarse los anticuerpos anti-VHC y el ARN viral. Los pacientes con VHC positivo y con intención de trasplante renal deben ser valorados para tratamiento previo de la infección por VHC. Así, como si permanecen infectados después del trasplante, deben recibir tratamiento libre de IFN. Los pacientes con insuficiencia renal estadios IV y V tienen, como único tratamiento aprobado, la combinación IFN-peg/RBV con ajuste de dosis, con una dosis de RBV recomendada de 200 mg al día.

1.2. VITAMINA D

1.2.1. Historia de la vitamina D

La vitamina D es una hormona muy antigua en la evolución, ya desde hace más de 750 millones de años, en el océano Atlántico, se demostró que el

fitoplancton perteneciente a la especie *Emiliani huxleyi*, tenía la capacidad de producir vitamina D tras la exposición a la luz solar (124).

El descubrimiento de la vitamina D está íntimamente relacionado con el raquitismo y la osteomalacia. El primer tratado sobre raquitismo fue escrito por Francis Glisson, a mediados del siglo XVII y en él se describe, como un trastorno que se encuentra principalmente en niños, que habitan en los suburbios de las ciudades y que producía retraso del crecimiento, así como deformidades óseas graves. A partir del siglo XIX, durante la revolución industrial, se convirtió en una endemia en relación, tanto a la dieta precaria como a una exposición solar escasa, convirtiéndose, a finales de este siglo, en una enfermedad presente en un 80-90% de la población infantil, que habitaba las ciudades industrializadas de Europa y Estados Unidos.

En 1824, Scheutte, reconoció por primera vez la utilidad del aceite de hígado de bacalao en el tratamiento del raquitismo y un poco más tarde, en 1861, Trousseau, relacionó el raquitismo con una exposición solar insuficiente. En 1890, Palm sugirió que la luz solar tenía propiedades antirraquíticas y McCollum y Davis en 1913 describieron la existencia de un factor en el aceite de bacalao con capacidad para curar el raquitismo, introduciendo el concepto de vitamina (125). Tras todos estos descubrimientos, en 1919, el grupo investigador de Mellanby, realizó las primeras investigaciones encaminadas a determinar el papel de la nutrición como causa del raquitismo, poniendo de manifiesto la relación entre esta enfermedad y el déficit dietético, ya que la ingesta de determinadas grasas, en especial el aceite de hígado de bacalao, tenían un efecto preventivo y curativo. Coetáneamente, otro investigador, Huldschinsky, comprobó que la exposición a lámparas fotovoltaicas de mercurio también podía

prevenir o curar esta enfermedad. Por lo tanto, ambos investigadores relacionaron el tratamiento del raquitismo con nutrientes del aceite del hígado de bacalao y con la exposición solar.

Posteriormente, se descubrió la capacidad antirraquítica de algunos alimentos tras ser irradiados, hallazgo crucial para el aislamiento y la síntesis, como principio activo, de la vitamina D en el año 1930.

Actualmente, la vitamina D es considerada tanto una vitamina como una hormona. Se considera una vitamina, ya que si su aporte nutricional o si su síntesis cutánea endógena no son suficientes, los suplementos orales pueden corregir los niveles y, se considera una hormona esteroidea, ya que sus precursores son transformados a metabolitos activos, actuando realmente como una prohormona.

El término genérico vitamina D o calciferol hace referencia a los pseudoesteroides, que son un grupo de sustancias liposolubles relacionadas químicamente y que actúan previniendo o curando el raquitismo.

1.2.2. Metabolismo de la vitamina D

La vitamina D se encuentra en la naturaleza en dos formas: ergocalciferol o vitamina D₂ y colecalciferol o vitamina D₃.

En el hombre la mayoría de la vitamina proviene de la transformación cutánea del 7-dehidrocolesterol en colecalciferol en presencia de la luz solar. Durante la exposición a la luz ultravioleta de longitud de onda entre 290-330 nm, los fotones son absorbidos por el 7-dehidrocolesterol de la membrana celular de la epidermis y la dermis. La absorción de la radiación ultravioleta abre el anillo B

del 7-dehidrocolesterol, formando el precolecalciferol que es una sustancia inestable por lo que, rápidamente, se convierte en colecalciferol. A medida que la vitamina D₃ se sintetiza, se libera al espacio extracelular y penetra en el lecho vascular de la dermis. Unida a la proteína transportadora de vitamina D, el colecalciferol llega al hígado.

Además de la síntesis cutánea, la vitamina D puede obtenerse a partir de los alimentos, tanto de origen animal (colecalciferol) como de origen vegetal (ergocalciferol). Son sustancias liposolubles, por lo que precisan de las sales biliares para su absorción. Se absorben en el 80% de la dosis administrada, en el intestino delgado, principalmente, en el yeyuno y parte en el duodeno.

Tanto el ergocalciferol como el colecalciferol de la dieta llegan al hígado unidos a la proteína transportadora de vitamina D. Para ejercer sus funciones metabólicas necesita de dos hidroxilaciones. La primera hidroxilación se realiza en la posición 25 de la molécula, mediante la 25-hidroxilasa y tiene lugar en el hígado. La 25 hidroxí-vitamina D (25(OH)D) formada, pasa al torrente sanguíneo y unida a la proteína transportadora, llega al riñón. En el túbulo renal proximal se hidroxila en posición 1, mediante la 1-hidroxilasa, dando lugar a la vitamina activa, la 1,25 dihidroxí-vitamina D (1,25(OH)₂D) o calcitriol. También en el riñón se produce la 24,25 dihidroxí-vitamina D (24,25(OH)₂D), por la acción de la 24-hidroxilasa, que es menos activa que el calcitriol y su función biológica no está bien conocida. Una vez ejercida su acción, la vitamina D se inactiva en el hígado eliminándose finalmente por la vía biliar (126).

1.2.3. Fisiología de la vitamina D

La vitamina D ejerce múltiples acciones, actuando a través del receptor específico, el receptor de vitamina D (127), perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares hormonales (127, 128). Regula la transcripción génica por homodimerización y heterodimerización con el receptor X (RXR), que es un receptor específico del ácido 9-cis-retinoico. El elemento de respuesta al que se une el dímero VDR-RXR se denomina elemento de respuesta a vitamina D (VDRE). El complejo se une al ADN y regula la transcripción de diversos genes.

La acción fundamental de la vitamina D consiste en aumentar la absorción intestinal de calcio y fósforo. En el intestino, estimula el reclutamiento de los canales de calcio presintetizados hasta el borde en cepillo del enterocito. Además, induce la expresión de proteínas transportadoras de calcio o calbindinas, cuya función consiste en el paso del calcio a través del enterocito. Finalmente, facilita la entrada de calcio a la circulación, desde la zona basolateral de la célula del intestino, mediante una bomba ATP dependiente de vitamina D.

En el hueso estimula directamente, mediante su unión al receptor VDR, la diferenciación de osteoblastos y la producción de proteínas de unión al calcio óseo, como la osteocalcina y la osteopontina. También, induce la producción de citocinas y factores de crecimiento, que estimulan la actividad y la formación de los osteoclastos. Además, promueve la diferenciación de condrocitos. La vitamina D aumenta la actividad y el número de osteoclastos, movilizándolo el calcio óseo.

En el riñón aumenta la reabsorción de calcio por un mecanismo similar al intestinal. El calcitriol aumenta los niveles del transportador de membrana, así

como los niveles de calbindinas para el transporte transcelular, activando el paso de calcio a través de la membrana basolateral.

La producción hepática de 25(OH)D no está regulada hormonalmente sino que depende del sustrato, a diferencia de la síntesis de 1,25(OH)₂D que sí tiene control hormonal, siendo estimulada por la hormona paratiroidea (PTH), y por situaciones de hipocalcemia e hipofosfatemia. Además, las hormonas sexuales, la prolactina, la hormona de crecimiento (GH) y el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), aumentan la producción renal del metabolito activo. La hipocalcemia aumenta la producción de 1,25(OH)₂D inducida por PTH, para mantener los niveles de calcio plasmático dentro de la normalidad. Por el contrario, la hipercalcemia reduce la síntesis de la vitamina. Asimismo, la disminución de la fosfatemia aumenta la síntesis y su aumento reduce la producción de la vitamina (126).

1.2.4. Fuentes de vitamina D

Existen dos principales fuentes de vitamina D, la síntesis cutánea o fuente endógena, y el aporte alimentario o fuente exógena (129, 130).

1.2.4.1. Fuente endógena: síntesis cutánea.

La principal fuente de vitamina D es la piel de forma que, entre un 90-95% de los depósitos corporales de vitamina D, dependen de la síntesis cutánea y ésta, a su vez, de la exposición solar. Se estima que un adulto de raza blanca es capaz de producir 1 ng de colecalciferol tras exposición a la luz solar. La exposición solar de 5-15 minutos al día en cara y brazos, durante la primavera, verano y otoño es capaz de mantener los depósitos de la vitamina en niveles adecuados. La exposición prolongada o en grandes zonas del organismo no ha

demostrado la producción en exceso de colecalciferol a niveles capaces de causar intoxicación.

1.2.4.2. Fuente exógena: alimentos naturales, alimentos funcionales y suplementos

La cantidad de vitamina D que contienen los **alimentos naturales** es muy pobre, además de que muy pocos alimentos contienen vitamina D. La fuente más rica de colecalciferol la constituyen los ácidos grasos del pescado marino, siendo el salmón la fuente principal, ya que parece ser el más frecuentemente consumido. Los huevos, la mantequilla, el hígado y otras vísceras son también alimentos que contienen la vitamina, pero su consumo es escaso por su alto contenido en colesterol. La cantidad de vitamina D en los alimentos es estable y no se destruye por el calor, ni por los procesos tecnológicos; pero el contenido de vitamina D de los alimentos sí puede variar según la estación del año y las condiciones climatológicas (131).

En países en los que el consumo de alimentos ricos en vitamina D no es adecuado, la principal ingesta exógena de vitamina D se realiza a través de los **alimentos funcionales**, que son esos alimentos a los que la industria alimentaria les añade uno o más nutrientes esenciales, en este caso vitamina D, estén o no contenidos normalmente en ese alimento, con el propósito de prevenir o corregir una deficiencia demostrada de uno o más nutrientes en toda la población o en un grupo específico de la misma. Un ejemplo de estos alimentos sería la leche enriquecida con calcio y vitamina D.

Y por último, cabe citar el consumo de **suplementos farmacológicos**, existiendo varias fórmulas de vitamina D comercializadas por la industria

farmacéutica: vitamina natural en forma de colecalciferol, derivados hidroxilados en posición 1 α (calcitriol, alfacalcidol y paricalcitol) y derivados en posición 25 (calcifediol). Se presentan como suplementos de vitamina D sola o en asociación con calcio o con otras vitaminas y minerales(131).

1.2.5. Exposición a la luz solar

La incidencia de las radiaciones UV sobre la piel humana tiene consecuencias positivas como la síntesis de vitamina D, entre otras (132). Existen dos factores determinantes en esta síntesis: la cantidad de sustrato y la calidad, que está determinada por las características de la luz como la longitud de onda.

Como se comentó anteriormente, existen diferentes factores que influyen en la síntesis endógena de vitamina D secundaria a la exposición solar, entre ellos distinguimos: factores ambientales, difícilmente variables y factores que dependen del propio individuo.

En cuanto a los factores ambientales se debe tener en cuenta que la cantidad de radiación solar que llega a la tierra depende de varios factores:

- La latitud: en latitudes superiores a los 37° al norte y al sur del Ecuador, especialmente durante los meses de invierno, el número de fotones que alcanza la superficie terrestre es menor (133). En estas situaciones la síntesis de vitamina D en la piel es prácticamente nula.

- La estación del año: siendo mayor la cantidad de radiación solar en primavera y verano en comparación con otoño e invierno (133). Esto se explica debido a que, durante el invierno, los rayos solares entran en la tierra con un ángulo más oblicuo, por lo que gran cantidad de fotones son absorbidos por la capa de ozono.

- La hora del día: cuanto más vertical incida la radiación UV sobre la superficie terrestre, ésta será más intensa ya que tiene que atravesar menos cantidad de atmósfera, esto ocurre en las horas centrales del día (desde las 10:00 a las 15:00 h).
- La altitud: por la misma razón citada anteriormente, a mayor altitud, menos recorrido atmosférico tendrá la radiación UV, por lo que aumentará la cantidad de radiación solar (aumenta entre un 6-8% por cada 1000 metros de altura).
- Las condiciones climatológicas: por lo general, las nubes de mayor grosor disminuyen la cantidad de radiación solar que alcanza la superficie de la tierra.
- La reflexión: este factor dependerá del material sobre el que incidan los rayos solares, por ejemplo, la nieve reflejará casi un 80% de la radiación que recibe, mientras que la arena no refleja sino un 10%.
- La polución ambiental: a mayor polución, menor la cantidad de radiación solar existirá.

La síntesis cutánea de la vitamina D secundaria a la exposición solar, también está influenciada por factores humanos.

- Estado de nutrición: ya que se relaciona directamente con la cantidad de 7-dehidrocolesterol (provitamina D3) que existe en la piel. En situaciones de desnutrición hay un déficit de esta hormona, por lo que la síntesis endógena estará alterada (134).
- Edad: a partir de los 60 años la síntesis cutánea de vitamina D disminuye progresivamente, en probable relación con el déficit de 7-dehidrocolesterol que hay en la epidermis. Además, la progresión de la edad también se relaciona con la menor exposición solar (limitaciones motoras, institucionalización). Así, un

individuo mayor de 70 años expuesto a la misma cantidad de luz solar produce un 25% de la vitamina D que una persona de 20 años (135, 136).

- Pigmentación (cantidad de melanina) y queratinización de la piel: la síntesis de vitamina D está regulada por dos procesos: la pigmentación y la queratinización del estrato córneo. La melanina cutánea compite con la provitamina D3 por los fotones de luz UV, limitando así la producción de vitamina D3 en la piel. Por ello, las personas con mayor contenido de melanina (piel más oscura) requieren exposiciones más prolongadas al sol para sintetizar la misma cantidad de colecalciferol. Por otro lado, una hiperqueratinización provocaría un engrosamiento del estrato córneo. En función de estos dos procesos, se puede clasificar a las pieles en blancas (despigmentadas y desqueratinizadas), amarillas (principalmente queratinizadas) y negras (principalmente pigmentadas). Los distintos tipos de pieles son adaptaciones del estrato córneo, para maximizar la penetración de las radiaciones UV en las latitudes septentrionales, y minimizarlas en las latitudes cercanas al ecuador, manteniéndose así la síntesis de vitamina D dentro de los límites fisiológicos. Existe una correlación inversa entre la latitud y el color de la piel, la cual se vuelve más blanca a medida que se eleva la latitud mejorando la biosíntesis cutánea de vitamina D. El bronceado (pigmentación y queratinización) que aparece tras la exposición al sol, por ejemplo durante el verano, contribuye a reducir la síntesis de vitamina D (134, 137).

- Cremas protectoras: la mayoría de las cremas con protección solar están compuestas por un fotoprotector químico (que absorbe los rayos UV) y un fotoprotector físico inorgánico, dando así un amplio espectro de protección. Un factor de protección mayor de 8 reduce hasta un 95% la síntesis cutánea de

vitamina D3 y cremas con factor de protección de 15 reducen su capacidad en más del 98% (138).

- Ropa: a mayor área corporal expuesta mayor fotosíntesis. La ropa evita la fotosíntesis de la vitamina D3 y como es obvio, los tejidos con fibras más gruesas son las que más limitan la producción endógena de vitamina D.

La regulación de la síntesis endógena de la vitamina D es el principal condicionante de la dependencia exógena de vitamina D, así en determinados grupos de riesgo (ancianos, personas que habitan el latitudes septentrionales, personas de raza negra,...) la vitamina D se debería considerar un verdadero nutriente.

A pesar de los beneficios conocidos de la exposición solar sobre los depósitos corporales de vitamina D, en la actualidad, se recomienda prudencia a la hora de tomar el sol por el riesgo de cáncer de piel y de envejecimiento precoz.

1.2.6. Niveles adecuados de vitamina D

El nivel de 25(OH)D es el mejor indicador del estado global de vitamina D, ya que refleja el total de vitamina D obtenido, tanto de la ingesta, como de la exposición solar y de la conversión de los depósitos adiposos del hígado (139). Sin embargo, existe controversia sobre las concentraciones séricas de 25(OH)D que se asocian al déficit de vitamina D, sin haber determinado unos niveles consensuados específicos. En la mayoría de las publicaciones, el punto de corte para establecer un nivel óptimo, es de 30 ng/ml, definiendo valores de déficit relativo hasta 20 ng/ml (50nmol/l), además, concluyen que niveles de 25(OH)D de 20 ng/ml son suficientes para cubrir los requerimientos del 97,5% de la

población, siendo éste el punto de corte válido en la práctica diaria para definir déficit de vitamina D. En cuanto a niveles máximos de vitamina D, se recomienda no superar niveles de 50 ng/ml para prevenir la aparición de efectos adversos. Estableciendo la cantidad diaria recomendada (CDR) de vitamina D en las siguientes cifras (140):

- 400 UI/día para menores de 1 año
- 600 UI/día para edades comprendidas entre 1 y 70 años (incluidos embarazo y lactancia).
- 800 UI/día para adultos mayores de 70 años

Además de la exposición solar existen otros factores que pueden alterar los niveles de vitamina D.

Las enfermedades asociadas con malabsorción de las grasas como la celiaquía, la enfermedad inflamatoria intestinal, la insuficiencia pancreática, la fibrosis quística o la colestasis hepática se asocian con concentraciones séricas bajas de vitamina D (141). Las enfermedades hepática y renal pueden impedir la adecuada hidroxilación de la vitamina D a sus formas activas y causar déficit de vitamina D.

La administración de determinados fármacos como los antiepilépticos, rifampicina, antirretrovirales o corticoides a largo plazo, se ha asociado también a niveles bajos de 25(OH)D. Debido a que la vitamina D es liposoluble, el orlistat y la colestiramina pueden reducir su absorción, por lo que no se recomienda su administración conjunta (142).

1.2.7. Déficit de vitamina D. Efectos esqueléticos

1.2.7.1. Efectos óseos y sobre las caídas

Son bien conocidas las funciones esqueléticas de la vitamina D, por lo que su déficit se relaciona con el raquitismo y la osteomalacia, así como con la disminución de la absorción de calcio, con el consiguiente hiperparatiroidismo secundario, que si persiste en el tiempo producirá osteoporosis. Existen estudios que asocian el déficit de vitamina D con un elevado riesgo de fractura (139, 143).

Además, la deficiencia de vitamina D causa debilidad muscular lo que también influye en el riesgo de caídas. Niveles séricos de 25(OH)D inferiores a 16 ng/ml se han asociado a una función disminuida de las extremidades inferiores, mientras que niveles mayores de aproximadamente 35 ng/ml se han asociado con una función correcta. El riesgo relativo de caídas se reduce un 20% si las concentraciones de 25(OH)D son de al menos 20 ng/ml.

Muchos trabajos han sugerido que una suplementación adecuada, de vitamina D y calcio, es efectiva en reducir fracturas y caídas en personas ancianas institucionalizadas, que presentan con frecuencia niveles de vitamina D inferiores a 20 ng/ml (139, 144).

1.2.8. Déficit de vitamina D. Efectos no esqueléticos

La vitamina D regula de manera directa o indirecta la expresión de más de 200 genes, implicados en angiogénesis, apoptosis, proliferación, diferenciación e inmunomodulación. Los efectos biológicos de la vitamina D son mediados a través del receptor de la vitamina D (127) que se expresa en más de 30 tejidos, incluidos las células de los islotes pancreáticos y las células del sistema inmune. Por tanto, su deficiencia podría afectar a numerosos procesos

entre los que se incluyen el cáncer, diabetes mellitus, enfermedades inflamatorias, cardiovasculares y autoinmunes (145).

1.2.8.1. Vitamina D. Función autoinmune y antiinflamatoria

Existe una gran evidencia, *in vitro* y *ex vivo* sobre el papel que juega la vitamina D en la modulación de monocitos que expresan el receptor de la vitamina D (127), macrófagos, células dendríticas y linfocitos, que intervienen en el control de la inmunidad innata y la adaptativa. Además, estas células del sistema inmune, expresan las enzimas CYP27A1 y/o CYP27B1, y por tanto son capaces de metabolizar la 25(OH)D a calcitriol, para que este actúe a su vez de forma autocrina o paracrina (146).

La vitamina D suprime las citocinas proinflamatorias e incrementa las citocinas antiinflamatorias, aumenta la producción de IL10, y disminuye la producción de IL6, IL12, interferón γ y del TNF- α (145).

Estas propiedades le confieren a la vitamina D un efecto inmunomodulador y antiinflamatorio relacionando, el déficit de esta hormona, con ciertas enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Los niveles bajos de vitamina D se han asociado con incremento del riesgo de desarrollar esclerosis múltiple, enfermedad de inflamatoria intestinal, artritis reumatoide y osteoartritis (139).

En la actualidad, la vitamina D o análogos del VDR, no se utilizan en la práctica habitual en este contexto, salvo en determinadas enfermedades como la psoriasis, en la que la aplicación tópica de un metabolito de la vitamina D ha mostrado efectos beneficiosos y seguros con una potenciación del efecto inmunomodulador, ya que se precisa la realización de estudios más amplios y controlados (147).

1.2.8.2. Vitamina D y enfermedades neuropsiquiátricas

El déficit de vitamina D se ha asociado con un incremento de la incidencia de esquizofrenia y depresión. Niveles adecuados de vitamina D durante el embarazo y la infancia son necesarios para el correcto desarrollo del cerebro y prevenir alteraciones neuropsiquiátricas en la edad adulta (144).

1.2.8.3. Síndrome metabólico, obesidad y diabetes mellitus

Niveles séricos bajos de vitamina D se han relacionado con la fisiopatología del síndrome metabólico y la presencia de obesidad y diabetes mellitus.

Los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 pueden tener riesgo de presentar alteraciones del metabolismo del calcio, de la vitamina D y, asociado a todo ello, una disminución de la masa ósea. Además, la hiperglucemia podría incrementar la fragilidad del hueso. La pérdida de masa ósea está presente ya al comienzo de la enfermedad, y se incrementa durante las fases tempranas de la misma, alcanzándose posteriormente un estado de equilibrio en el que no hay mayor pérdida de masa ósea. Existen estudios que demuestran que los suplementos de vitamina D reducen, en hasta un 29%, el desarrollo de diabetes en niños (148).

Además, se ha relacionado el descenso de la vitamina D con una disminución en la producción y secreción de insulina, con aumento de la resistencia a la insulina (149) y por tanto con la diabetes mellitus, sobre todo la tipo 2. También se ha asociado el déficit de vitamina D con la disfunción endotelial observada en estos pacientes.

En cuanto al síndrome metabólico y la obesidad, se ha relacionado el déficit de vitamina D con elevación de las cifras de triglicéridos. La 25(OH)D se correlaciona positivamente con los niveles de HDL e inversamente con el colesterol LDL (150). En un estudio con pacientes que presentan enfermedad cardíaca isquémica aguda, al añadir al tratamiento atorvastatina conseguían disminuir los niveles de colesterol LDL, los triglicéridos y aumentar los niveles de colesterol HDL y de 25(OH)D durante un año de seguimiento, siendo esas diferencias estadísticamente significativas. Además los niveles de vitamina D están disminuidos en los pacientes con obesidad en relación con el secuestro en el tejido adiposo. El mecanismo por el cual la atorvastatina (y otras estatinas) incrementa los niveles de vitamina D quizás sea por la inhibición de la HMG-CoA reductasa, al tener el colesterol y la vitamina D el mismo precursor, el 7-dehidrocolesterol (151).

1.2.8.4. Vitamina D y enfermedad renal

Los pacientes con insuficiencia renal crónica que se someten a hemodiálisis o diálisis peritoneal presentan una mortalidad cardiovascular de 10 a 20 veces superior a la población general y esto parece estar relacionado con el déficit de la vitamina D, debido a una reducción de la producción renal de calcitriol que aumenta los niveles de PTH en los estadios iniciales de la enfermedad renal, lo que constituye un factor de riesgo en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular. De hecho, en pacientes que reciben hemodiálisis, se ha observado que la administración de un análogo de la vitamina D (paricalcitol) reduce el riesgo de mortalidad cardiovascular (152).

La enfermedad renal terminal también se asocia con calcificación vascular. Una elevación del producto calcio-fósforo y unas concentraciones

elevadas del fósforo sérico con niveles superiores a 6,5 mg/dl se han asociado con complicaciones cardiovasculares y un incremento de la mortalidad (153). Hay estudios que correlacionan negativamente la concentración de calcitriol en suero con los niveles séricos de creatinina, y positivamente con el aclaramiento de creatinina (152).

Los pacientes con insuficiencia renal presentan calcificación coronaria, cambios en la morfología del ventrículo izquierdo y un descenso de la elasticidad arterial. Estos hechos se deben en parte por las alteraciones del metabolismo de la vitamina D, ya que tras el daño renal, disminuyen las concentraciones de calcitriol, la actividad de la 1α -hidroxilasa, aumenta el fosfato y desciende el número de nefronas viables.

1.2.8.5. Vitamina D y enfermedad cardiovascular

Hay que destacar que existe una variación geográfica y racial en cuanto a la presión arterial, incrementándose el riesgo desde el sur al norte en el hemisferio Norte. Este hecho se explica con la asociación entre la latitud y la exposición a la luz solar como protector, así como el efecto de la radiación UV sobre la vitamina D. En modelos experimentales se ha demostrado que la 1,25-dihidroxitamina D regula el sistema renina-angiotensina aldosterona (43). La deficiencia del receptor de la vitamina D, o la ausencia del gen del la 1α -hidroxilasa en ratones, produce el desarrollo de hipertensión arterial e hipertrofia cardiaca. Además, el endotelio vascular y las células musculares lisas responden a la exposición de 1,25- dihidroxivitamina D con un efecto cardioprotector.

Varios estudios han corroborado una mayor prevalencia de déficit de vitamina D, con niveles inferiores a 20-15 ng/ml, en pacientes con enfermedad coronaria (43, 154).

Los factores de riesgo más importantes para desarrollar una insuficiencia cardíaca son la hipertensión arterial, la cardiopatía isquémica y la enfermedad valvular. La hipertensión arterial como se ha comentado previamente se asocia con una estimulación inapropiada del sistema renina-angiotensina-aldosterona; la angiotensina II juega un papel importante en el inicio y perpetuación de la inflamación, que es la llave para el desarrollo y progresión de la aterosclerosis. Se sabe que el calcitriol es un inhibidor del sistema renina-angiotensina-aldosterona. El tratamiento con calcitriol reduce la actividad de la renina plasmática, disminuye los niveles de angiotensina II y la presión arterial (152). La vitamina D es un importante regulador del metabolismo intracelular, las células del músculo cardíaco se activan por canales de calcio voltaje-dependientes, por lo que la vitamina D también juega un papel importante en la contractilidad miocárdica (149). El exceso en los niveles de PTH, que está controlado por la concentración de 25(OH)D, aumenta la presión arterial y la contractilidad cardíaca produciendo hipertrofia del miocardio y fibrosis intersticial cardíaca, por lo que niveles elevados de PTH, están relacionados tanto con la hipertrofia ventricular izquierda como con la enfermedad coronaria.

La elevación de citocinas pro inflamatorias, también contribuye a la patogénesis de la insuficiencia cardíaca.

En resumen, hay 3 mecanismos por los cuales se puede explicar el efecto protector de la vitamina D en la insuficiencia cardíaca: la regulación de la

inflamación, el efecto en la hipertrofia y proliferación de las células del miocardio y la regulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona.

Los suplementos orales diarios de vitamina D son efectivos en mejorar los niveles de vitamina D en los pacientes con insuficiencia cardiaca, debiendo suplementar a los pacientes que tienen unos niveles inferiores a 20 ng/ml.

1.2.8.6. Vitamina D y cáncer

Debido a los efectos de la vitamina D en la proliferación y diferenciación celular, niveles bajos de vitamina D, se han asociado con un incremento del riesgo y mortalidad por multitud de tipos de cáncer. Varios estudios epidemiológicos han sugerido que, el déficit de vitamina D y calcio, puede aumentar el riesgo de algunos tipos de cánceres como el de colon, próstata y mama entre otros (155). El calcitriol disminuye la proliferación celular aumentando la diferenciación celular (138, 156).

Asimismo, se ha demostrado *in vitro* y *ex vivo*, que el tratamiento con calcitriol y análogos tiene acciones diferenciadoras y de inhibición del crecimiento en el cáncer (143, 144). En el caso del cáncer de mama, la presencia de receptores de calcitriol, está correlacionada a una supervivencia mayor. En el estudio epidemiológico de la compañía Western Electric el riesgo de mortalidad para el cáncer colorrectal era inversamente proporcional al aporte de vitamina D y calcio. De hecho, niveles de calcidiol superiores o iguales a 50 nmol/l estaban asociados a un riesgo tres veces menor de sufrir cáncer de colon (157).

No existe evidencia consistente de la relación entre la vitamina D y el cáncer, ya que la mayoría de los resultados provienen de estudios observacionales, de laboratorio o epidemiológicos, necesitando la realización de

estudios aleatorizados cuyo objetivo principal sea evaluar la relación entre el déficit de vitamina D y el cáncer. Sin embargo estudios de cultivos celulares *in vitro* y modelos experimentales *in vivo* sugieren que el 1,25(OH)₂D promueve la diferenciación celular, inhibe la proliferación de las células cancerígenas y posee propiedades antiinflamatorias, proapoptóticas y antiangiogénicas que pueden influir de alguna manera en la progresión del cáncer en general (158).

1.2.8.7. Vitamina D y mortalidad

Existen varios estudios que evalúan la relación entre el déficit de vitamina D y la mortalidad, observando una relación significativa entre los niveles bajos de vitamina D, inferiores a 20 ng/ml, por lo que parece que son un factor de riesgo independiente de mortalidad (159, 160). Asimismo, como ya se comentó anteriormente, también se ha estudiado la relación entre los niveles de calcitriol con la enfermedad coronaria, el síndrome metabólico y los factores de riesgo vascular, evaluando la supervivencia global en estos pacientes y concluyendo que los niveles bajos calcitriol, inferiores a 25 ng/ml, son un predictor de mortalidad a medio plazo (153).

1.3. VITAMINA D Y ENFERMEDAD HEPÁTICA

La vitamina D juega un papel clave, bien conocido, en la homeostasis del calcio en los huesos, sin embargo, se sabe que esta hormona no sólo posee funciones esqueléticas ya que las recientes evidencias destacan sus potentes propiedades antifibróticas, inmunomoduladoras y antiinflamatorias (145, 161). De hecho, los últimos estudios relacionan los niveles bajos de vitamina D con el riesgo de presentar hepatitis C crónica y cirrosis hepática (162-164) lo que sugiere que la deficiencia de vitamina D puede estar implicada en la progresión de la enfermedad hepática crónica (165-167).

La prevalencia de niveles subóptimos de vitamina D, insuficiencia o déficit, a nivel mundial, es elevado y se estima en aproximadamente un billón de personas (168). En Estados Unidos entre el 25 y 50% de la población general presenta déficit de vitamina D. La prevalencia de dicho déficit en las enfermedades hepáticas crónicas es prácticamente universal. Hasta el 93% de los pacientes con enfermedad hepática crónica presentan niveles insuficientes de vitamina D, de los que un 33% presentan déficit severo (164).

1.3.1. Cirrosis hepática de etiología alcohólica

La mayoría de la enfermedad hepática crónica en España se relaciona con el consumo de alcohol o con la presencia de hepatitis virales. De hecho, el alcohol constituye la causa del 65% de las cirrosis que se diagnostican en España. Al igual que en la mayoría de las enfermedades hepáticas, en la cirrosis de etiología alcohólica también existe una alta prevalencia del déficit de vitamina D, según algunos estudios, aproximadamente en torno a un 85% presenta niveles de vitamina D inferiores a 20 ng/ml y en un 55% niveles inferiores a 10 ng/ml. Se desconoce con claridad el mecanismo de esta deficiencia entre estos pacientes, pero parece que el alcohol juega un papel en la inhibición parcial de la absorción de la vitamina D e impide la síntesis de la forma activa de vitamina D (169). La vitamina D modula la respuesta inmune precoz a través de la regulación de los linfocitos T, así como interviene en la regulación de los genes necesarios en el metabolismo alcohólico. Por este hecho, niveles subóptimos de vitamina D permiten un anormal catabolismo del alcohol y una excesiva acumulación de triglicéridos en el hígado, participando en la progresión de la enfermedad hepática (170).

1.3.2. Enfermedad hepática por depósito de grasa

La enfermedad hepática por depósito de grasa (EHDG) puede aparecer en el contexto de múltiples afecciones. Está principalmente asociada con el síndrome metabólico, siendo la principal asociación etiológica la resistencia a la insulina. Es probable que esta enfermedad represente el componente hepático de un síndrome metabólico que, en su expresión fenotípica completa, estaría caracterizado por la presencia de obesidad, diabetes mellitus tipo 2, dislipemia, hipertensión arterial y resistencia insulínica (171).

Los mecanismos que producen esteatosis hepática y los fenómenos inflamatorios secundarios no están claros, observando un origen multifactorial subyacente. Inicialmente, se produce un incremento de los ácidos grasos en suero secundarios a una liberación desde los tejidos adiposos y a la resistencia insulínica. Además, existe un excesivo aporte de ácidos grasos al tejido hepático que excede las necesidades fisiológicas y fenómenos de peroxidación lipídica, generación de radicales libres de oxígeno, liberación de citocinas y adipocinas que, finalmente, dan lugar a la fibrosis hepática.

La vitamina D parece que juega un papel en el metabolismo de la glucosa, ya que acelera la conversión de proinsulina a insulina y su déficit se ha asociado con la disfunción de las células B pancreáticas, así como a una mayor prevalencia de diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólico y resistencia insulínica (172-174).

Además, el déficit de vitamina D estimula la PTH, que se ha relacionado a su vez con la resistencia insulínica y con el aumento de reactantes de fase aguda (175). De acuerdo con esta hipótesis, algunos estudios han demostrado que la administración de vitamina D mejora la secreción de insulina (176) y que

su utilización disminuye la resistencia insulínica en pacientes con insuficiencia renal terminal (177).

Por otro lado, polimorfismos del VDR se asocian a la resistencia insulínica e influyen en la secreción de insulina y en la concentración de glucosa en ayunas (178). Además, se ha confirmado en estudios previos que ratones knock-out para VDR desarrollaban esteatosis hepática (179).

Por último, se ha comprobado que la vitamina D activa en ratones el factor de crecimiento intestinal fibroblástico (Fgf), que interviene en la prevención de la resistencia insulínica y la obesidad inducida por una dieta rica en grasa al inhibir la CYP7A1, que es una enzima esencial en la fisiopatología de la dislipemia hepática (180).

Se puede deducir, por tanto, que podría existir una relación entre la vitamina D, el metabolismo de la glucosa, la resistencia insulínica y el desarrollo de EHDG.

Además, en un estudio clínico reciente, realizado en adultos con EHDG, se comprobó que los niveles de vitamina D influían no solo en la aparición de esteatosis hepática, sino también en la severidad de la lesión histológica. De hecho, objetivaron que los pacientes con más inflamación y fibrosis eran los que presentaban los niveles más bajos de vitamina D, de forma independiente de otros componentes del síndrome metabólico (181).

Los mecanismos implicados en la progresión de la EHDG no son bien conocidos. Los efectos de la vitamina D en el hígado no se ejercen directamente sobre los hepatocitos, ya que estas células prácticamente no expresan ARNm del VDR, al contrario, sí se expresa en las células sinusoidales, células de kuppfer, células estrelladas del hígado y en las células del sistema inmune. Por

tanto, el déficit de vitamina D afectaría a la actividad y expresión de los macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y B, favoreciendo el estrés oxidativo y la producción de citocinas pro inflamatorias que conducirían a una inflamación subclínica (127). Además, este déficit de vitamina D induciría fibrosis a través de la secreción del factor de crecimiento transformante beta (TGFb) o por el aumento de secreción del inhibidor de la matriz metaloproteinasa 9 (182). De hecho, en cultivos celulares se observa un efecto antiinflamatorio y antifibrótico de la vitamina D al actuar sobre las células estrelladas del hígado. En un estudio reciente, con ratas a las que se inducía experimentalmente EHDG, se comprobó que la exposición a rayos UV, disminuía la actividad de las células estrelladas del hígado, la síntesis de TGFb y estimulaba la producción de apolipoproteína E y de adiponectina. Todo ello, en conjunto, se traducía en un efecto beneficioso sobre la EHDG ya que se objetivaba una disminución en la resistencia insulínica, esteatosis, apoptosis, inflamación, fibrosis intrahepática (183).

Como conclusión, la fibrosis e inflamación se relacionan con señales extrahepáticas, en las que el eje vitamina D-receptor (127), juega un papel en el inicio y progresión de la EHDG.

1.3.3. Cirrosis biliar primaria

La vitamina D juega un importante papel en la modulación de la respuesta inmune, con la consecuente implicación en las enfermedades autoinmunes. De hecho, se ha observado un aumento de prevalencia en este tipo de enfermedades en las regiones de latitud norte, en relación a la baja síntesis exógena de vitamina D en estas áreas (184).

La cirrosis biliar primaria es una enfermedad hepática autoinmune, caracterizada por una progresiva respuesta inflamatoria por parte de los

linfocitos, que ocasiona la destrucción de los tractos ductales intrahepáticos produciendo colestasis, fibrosis hepática y eventualmente cirrosis. La etiología no está clara pero se sabe que coexisten factores genéticos y ambientales, demostrándose de forma consistente la presencia de polimorfismos del receptor de vitamina D (127), pudiendo ser un marcador genético de riesgo de cirrosis biliar primaria(185).

1.3.4. Hepatitis crónica por virus B

Varios estudios han relacionado la enfermedad hepática crónica y la progresión de la misma con niveles subóptimos de vitamina D. Además, niveles adecuados de vitamina D se han relacionado con el éxito en el tratamiento de las hepatitis virales. Un reciente estudio realizado en pacientes con hepatitis por virus B, excluyendo la coinfección con otros virus u otras enfermedades relacionadas con la progresión de la enfermedad hepática y el consumo de sustancias tóxicas como el alcohol demostró, que solo un 19% de los pacientes presentaban niveles de vitamina D dentro de la normalidad (superiores a 20 ng/ml) y que éste nivel sérico de vitamina D era menor en aquellos pacientes infectados con carga viral (VHB-DNA) superior a 2.000 UI/ml, con una media de vitamina D de 11 ng/ml, confirmando una asociación entre bajos niveles de vitamina D y altas tasas de carga viral en los infectados con hepatitis B (186).

1.3.5. Hepatitis crónica por virus C

Existen varios estudios epidemiológicos, como ya se ha citado previamente, que evidencian que el déficit de vitamina D puede conferir un aumento en el riesgo de adquirir infecciones virales como la gripe, el virus de la inmunodeficiencia humana (62) e infecciones respiratorias (187).

La vitamina D, como se ha comentado ya en varias ocasiones, mejora la sensibilidad a la insulina, inhibe la fibrosis y modula la respuesta inmune innata y adaptativa, aumentando la producción de catelicidina, beta-defensina e inhibiendo las citocinas pro inflamatorias ejerciendo, por tanto, una acción inmunomoduladora y antiinflamatoria (145, 161).

La vitamina D se ha relacionado con la respuesta al tratamiento de la hepatitis C crónica. Experimentos *in vitro* han mostrado que, tanto el colecalciferol como la vitamina D, inhiben la producción del virus de la hepatitis C en hepatocitos humanos, sugiriendo que poseen un efecto antiviral directo a través de la inducción de interferón beta y del gen estimulado por interferón (ISG) MxA, con distintas propiedades antivirales (188). Asimismo se observó un efecto sinérgico, al añadir vitamina D al tratamiento. Estos dos efectos, por tanto, apoyan la asociación entre la vitamina D y la respuesta al tratamiento antiviral, relacionando el déficit con la falta de respuesta al tratamiento y la suplementación con la potenciación de la respuesta al tratamiento antiviral (166, 189-191) .

Además, recientes estudios han encontrado una asociación entre los niveles de vitamina D y la intensidad de la actividad necroinflamatoria y de la fibrosis (163), sugiriendo que la deficiencia de la vitamina D puede estar involucrada en la progresión de la enfermedad hepática crónica. Sin embargo, existen estudios que no han corroborado estos hallazgos iniciales, atribuyéndolo principalmente a la discrepancia de los resultados, secundaria a sesgos metodológicos y a ciertas limitaciones, necesitando más evidencia en este tema (166).

Durante la pasada década la hepatitis C crónica se trató íntegramente con regímenes de interferón y ribavirina con una eficacia variable. Esta variabilidad en la respuesta al tratamiento, depende tanto de factores del propio virus como del paciente y afecta la probabilidad de alcanzar la RVR, que también predice la RVS (189).

La investigación de nuevos factores, capaces de predecir la respuesta al tratamiento, ha sido una constante en la era del interferón. La actual evidencia muestra, que factores como el polimorfismo IL28B, el genotipo, la fibrosis hepática y la carga viral basal, entre otros, constituyen sólidos factores independientes en la respuesta viral rápida y en la respuesta viral sostenida (189, 191). Sin embargo, otros de más reciente investigación como la vitamina D quedán por ser estudiados.

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICACIÓN

La infección por el VHC es una causa frecuente de enfermedad crónica hepática.

La moderada prevalencia, el curso de la enfermedad y principalmente las consecuencias en relación con su morbilidad y mortalidad obligan a su precoz diagnóstico y tratamiento.

En las últimas décadas, el tratamiento de elección disponible para la hepatitis C crónica, consistía en la combinación de interferón pegilado y ribavirina, consiguiendo una tasa de respuesta viral sostenida y curación del 50%. Sin embargo, la llegada de los nuevos antivirales de acción directa han supuesto un incremento en la tasa de respuesta superior, actualmente, al 80% (192) y suponen la terapia de elección de esta enfermedad (193).

Es conocido, que en la tasa de respuesta influyen múltiples factores, tanto dependientes del virus como son el genotipo y la carga viral, como factores que dependen del propio paciente. Varios de estos factores se han identificado como factores predictores de respuesta (194, 195).

Recientes publicaciones han estudiado el papel de la vitamina D tanto a nivel de la evolución de la enfermedad hepática, como en la respuesta al tratamiento (5, 6). La vitamina D se ha asociado a una mejor respuesta viral sostenida (196-198), aunque no todos los estudios confirman estos hallazgos (199, 200), en probable relación con sesgos metodológicos que incitan a ampliar la investigación en este campo.

Por otra parte, es sabido que los niveles de vitamina D fluctúan con el periodo del año y con las horas de luz (201). Hasta la fecha no se ha evaluado la influencia que puede tener el periodo de inicio del tratamiento antiviral con triple terapia; especialmente durante los primeros meses de tratamiento, que es cuando más se espera que baje la carga viral con importantes implicaciones pronósticas (202); sobre la respuesta al tratamiento.

2.2. HIPÓTESIS

La vitamina D influye en la respuesta al tratamiento, debido a su función inmunomoduladora, antiinflamatoria y antiviral directa.

En la hepatitis crónica por virus C, niveles óptimos de vitamina D se asocian a mejor respuesta viral al tratamiento.

La principal fuente de vitamina D es la exposición a la luz solar, de manera que el sol induce la síntesis endógena de vitamina D, estando ampliamente influenciada por la estación o periodo del año.

La estación de inicio del tratamiento de la hepatitis C puede influir en la cinética viral, que es un potente factor predictivo de respuesta y, por tanto, en la respuesta viral al tratamiento.

2.2. OBJETIVOS

El objetivo primario del estudio es evaluar el potencial predictivo que puede tener la estación en la que se inicia el tratamiento con triple terapia, sobre la respuesta viral rápida durante el tratamiento en los pacientes con infección por hepatitis C crónica.

Como objetivo secundario analizar el impacto de la estacionalidad sobre la respuesta viral en diferentes puntos del tratamiento de la hepatitis C crónica.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. PACIENTES

Los datos de esta investigación fueron obtenidos del registro HepatiC, que es un registro monitorizado, prospectivo y multicéntrico, promovido por la Asociación Española para el Estudio del Hígado.

Se incluyeron pacientes con infección crónica por hepatitis C genotipo 1, de los diferentes centros participantes, que fueron tratados con interferón pegilado y ribavirina en combinación con fármacos inhibidores de la proteasa de primera generación, telaprevir o boceprevir, desde junio de 2011 hasta julio de 2014.

Los pacientes fueron reclutados de diferentes áreas geográficas de España, clasificándolos en función de 3 áreas de procedencia: área norte, central y sur.

Se registró el mes de iniciación del tratamiento y según el mismo fueron clasificados en dos grupos, estación A, aquellos que comenzaron el tratamiento desde mayo hasta octubre y estación B, aquellos que lo iniciaron durante los meses de noviembre a abril. Esta clasificación se realizó teniendo en cuenta los meses de mayor y menor horas de luz, según un informe de climatología de 2013 del instituto nacional de estadística (203) (Figura1). Además, con el fin de evaluar el efecto de iniciar el tratamiento durante los meses de mayor y menor horas de luz, se realizó un análisis excluyendo los meses de exposición intermedia, agrupando a los pacientes en estación A' de julio a septiembre y estación B' de enero a marzo.

HORAS DE LUZ SOLAR		MESES												
		Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	
ÁREA GEOGRÁFICA	Norte	Asturias	79	101	204	83	182	126	158	230	155	184	91	85
		Cantabria	90	106	215	97	243	174	243	219	214	188	119	89
		Navarra	97	167	271	99	249	212	275	307	266	231	102	82
		Cataluña	185	226	278	178	202	220	227	308	274	236	129	144
							221.8 ± 46.1							
	137.8 ± 62													
	Centro	Toledo	230	263	291	225	336	371	417	376	329	279	151	178
		Segovia	155	165	274	107	313	324	401	351	279	263	128	142
		Madrid	221	243	273	179	301	348	410	359	305	263	107	181
		Ávila	145	177	277	153	295	311	353	327	253	213	118	159
						324 ± 51.6								
189.2 ± 57.8														
Sur	Murcia	225	255	284	258	344	359	370	330	296	251	138	217	
	Andalucía	252	290	280	237	342	376	411	375	302	300	198	218	
	Alicante	211	193	273	200	258	244	315	293	257	212	180	223	
	Canarias	216	247	284	237	341	329	342	310	294	245	154	203	
						312.3 ± 50.1								
228 ± 40.5														

Figura 1. Número de horas de luz por región, estación y mes en el año 2012. Los valores representan la media de las horas y la desviación estándar.

Los pacientes también fueron clasificados según el tipo de tratamiento que recibieron, telaprevir o boceprevir con o sin periodo de lead-in con interferon pegilado y ribavirina.

3.2. DATOS CLÍNICOS Y DE LABORATORIO

Se recogieron datos demográficos, antropométricos y clínicos de todos los pacientes incluidos.

El índice de masa corporal (IMC) se calculó según el peso en kilogramos y la altura en metros. Se estableció un punto de corte de 30 Kg/m² para agrupar a los pacientes, ya que la obesidad, definida como IMC superior a 30 Kg/m²,

parece ser un factor predictor negativo de respuesta en el tratamiento para el virus de la hepatitis C (204).

El grado de fibrosis se evaluó mediante biopsia hepática (clasificación de Metavir) o mediante elastografía hepática (Fibroscan) según disponibilidad de cada técnica. Según el grado de fibrosis los pacientes se agruparon en fibrosis no avanzada (F0, F1 y F2) y fibrosis avanzada (F3 y F4).

Se determinó el polimorfismo del gen IL28B y sus tres subtipos (el genotipo CC, que es el favorable y los no-CC: TT y CT) debido a su implicación en la respuesta al tratamiento de la hepatitis C.

Los pacientes presentaban todos genotipo 1, así que se evaluó el subtipo, clasificándose según pertenecían al subtipo 1a, 1b o indeterminado.

La utilización de tratamiento previo fue recogida clasificando al paciente según la respuesta que había tenido al mismo: no respondedor (respuesta nula o parcial), discontinuación precoz, recidivante o recaedor y los que presentaban un breakthrough virológico. Categorizándolos de forma general en naïve, si no habían recibido nunca tratamiento, o experimentados.

Los pacientes fueron divididos según la carga viral basal alta o baja. El punto de corte utilizado para definir alta carga viral basal fue un valor superior a 600,000 UI/mL (72, 73).

La viremia del virus de la hepatitis C fue determinado de forma cualitativa, cuantitativa y mediante el logaritmo del RNA del virus. Se evaluó de forma basal, en las semanas 4, 8 y 12, al final del tratamiento y 6 meses después de finalizarlo.

La respuesta viral se evaluó mediante la respuesta viral rápida (RVR), definida como la presencia de RNA del VHC indetectable en la semana 4 y mediante la respuesta viral sostenida (RVS), definida como la negativización del RNA 24 semanas tras completar el tratamiento. Adicionalmente, se registró aquellos pacientes que presentaban carga viral ≤ 15 UI/ml ($CV \leq 15$) en la semana 4.

3.3. NIVELES DE VITAMINA D

Las muestras de sangre extraídas en el inicio del tratamiento, solo estaban disponibles en un único centro del área Norte y se utilizaron para evaluar los niveles de vitamina D. La determinación se realizó mediante electroquimioluminiscencia. Los valores se expresaron en nmol/l.

3.4. FUNDAMENTOS ÉTICOS

El protocolo del estudio fue aprobado por el comité ético del promotor del registro. El consentimiento informado se obtuvo de todos los pacientes. El estudio se realizó de acuerdo con los principios éticos de la Declaración de Helsinki del año 1975.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables categóricas se expresan con frecuencias y porcentajes. Las variables continuas se expresan como medias y desviaciones estándar.

La asunción de normalidad se comprobó con la prueba Kolmogorov-Smirnov. Las comparaciones de variables continuas entre grupos se realizaron con la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney. Se utilizaron las pruebas de Chi cuadrado o el test exacto de Fisher para comparar proporciones, según el caso.

Se construyeron dos modelos de regresión logística múltiple bivariados. La variable dependiente fue RVR en el primer modelo y la carga viral (CV) ≤ 15 en el segundo. En ambos modelos, la estación de inicio del tratamiento fue la principal variable independiente; se controló por: carga viral, subtipo del genotipo 1 (1a ó 1b), el polimorfismo de IL28B, el grado de fibrosis, la edad, el tipo de tratamiento, la presencia de diabetes y la respuesta al tratamiento anterior. Los resultados de la regresión logística se expresan con odds ratios (OR) y los intervalos de confianza del 95% (IC).

Todos los valores de *P* inferiores a 0,05 se consideran estadísticamente significativos.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS versión de 17.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL).

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

El estudio incluyó a 930 pacientes consecutivos (66,8% varones; edad media 54 años, rango 15-81 años) tratados para el VHC con al menos 4 semanas de seguimiento. En cuanto al momento de inicio del tratamiento, el 45,3% de los pacientes (n=421) comenzó el tratamiento durante la estación A y el 54,7% (n=509) durante la estación B.

Al evaluar las características basales demográficas, clínicas y analíticas (Tabla 1), observamos que los grupos fueron comparables, sin encontrar diferencias significativas, en cuanto a las principales variables descritas, que influyen en la respuesta virológica al tratamiento. La edad media de ambos grupos fue de aproximadamente 54 años, por lo que 2/3 de los pacientes presentaban una edad superior a los 50 años. La mayoría eran varones, sin obesidad y sin diabetes mellitus. El genotipo predominante fue el 1b en ambos grupos. Un 74% y un 78% de los pacientes presentaban una carga viral superior a 600.000 UI según la estación A y B respectivamente. La fibrosis avanzada, es decir un grado F3 ó F4, representaba más del 80% de la fibrosis evaluada en los pacientes de cada grupo. Se observó polimorfismo IL28B favorable (CC) en un 49 y 51% de los pacientes de la estación A y B respectivamente. Asimismo no se observó diferencias en cuanto al grado de experiencia de los pacientes con respecto a si habían recibido o no tratamiento previo, aunque sí se observó que 2/3 de los pacientes de ambos grupos habían recibido tratamiento previo. Finalmente, sí se observó diferencias significativas en relación a la carga viral basal, observando una menor carga viral basal en el grupo de pacientes que iniciaban el tratamiento en la estación A.

	Estación A n=421	Estación B n=509	P valor
Edad, años, media±DS	58.8±9.4	54.4±8.3	0.45
Edad >50 años, n (%)	261 (62)	333 (65.4)	0.30
Género (hombre), n (%)	277 (65.8)	344 (67.5)	0.57
Índice de masa corporal*			
≤30 kg/m ²	119 (78.8)	143 (79)	0.10
>30 kg/m ²	32 (21.2)	38 (21)	
Diabetes Mellitus, n (%)	65 (12.8)	65 (15.4)	0.25
VHC genotipo			
1a, n (%)	89 (21.1)	118 (23.2)	0.68
1b, n (%)	283 (67.2)	347 (68.2)	
Otros, n (%)	49 (11.6)	44 (8.6)	
Carga viral baja (<600.000 UI), n (%)	109 (26.2)	111 (21.9)	0.14
Carga viral basal UI, media±DS	2.459.627±4.553.883	3.383.240±5.406.573	0.006
Log ARN, media±DS	6.06±0.60	6.18±0.65	0.007
Grado de fibrosis**			
≤F2, n (%)	67 (12)	66 (13)	0.22
≥F3-F4, n (%)	351 (84)	438 (87)	
IL28B rs polimorfismo CC, n (%)***	69 (49.3)	71 (50.7)	0.29
Tratamiento previo			
Naïve, n (%)	139 (33)	160 (31)	0.62
Experimentado, n (%)	282 (67)	349 (69)	
No respuesta	45 (16)	70 (20.1)	
Discontinuación precoz	13 (4.6)	17 (4.9)	
Respuesta desconocida	47 (16.7)	83 (23.8)	
Recidiva	122 (43.3)	120 (34.4)	
Respuesta parcial	50 (17.7)	48 (13.8)	
Breakthrough virológico	5 (1.8)	11 (3.2)	
AST, UI, media±DS	78±51	82±54	0.32
ALT, UI, media±DS	99±67	101±70	0.76
GGT, UI, media±DS	109±96	101±88	0.19

Tabla 1. Características de los pacientes de acuerdo con la estación de inicio del tratamiento del VHC.

* En un 64% de los pacientes no se calculó el índice de masa corporal.

** En 8 (0.86%) pacientes el grado de fibrosis no estaba disponible.

*** En 27% de los pacientes el gen del polimorfismo IL28B no estaba disponible.

También agrupamos los pacientes según el tratamiento que hubieran recibido, de tal forma que 481 pacientes no recibieron periodo lead-in y 449 sí lo recibieron. En nuestra cohorte, la mayoría de los 481 pacientes que no recibieron el régimen lead-in (51.7%) recibió tratamiento con telaprevir (n=473) y sólo 8 recibieron tratamiento con boceprevir. Del total de pacientes que sí recibieron

lead-in, 449 (48.3%), 310 recibieron boceprevir, 64 telaprevir y 75 suspendieron el tratamiento antes de recibir inhibidor de la proteasa, ya que no lograron un descenso en la carga viral en la semana 4, superior a 1 logaritmo.

Entre estos pacientes que abandonaron el tratamiento después de 4 semanas, 26 de 157 pacientes (14.2%) iniciaron el tratamiento durante la temporada A y 49 de 217 (18.4%) durante la temporada B ($P=0,240$).

Los pacientes fueron reclutados de diferentes zonas geográficas de España, y la estación de inicio del tratamiento se distribuyó por igual dentro de las regiones, a excepción de la zona sur (zona norte, 48.9 vs. 51.1%; zona central, 50.2 vs. 49.8%; zona sur, 61.8 vs. 38.2%, durante la estación A y B respectivamente; $P=0.003$) de forma estadísticamente significativa.

En la siguiente figura (Figura 2) podemos apreciar una representación esquemática de los pacientes incluidos en el estudio según el área geográfica. En cruces grises se muestran los pacientes que comenzaron el tratamiento durante la estación A (mayo-octubre) y en círculos rojos los pacientes que comenzaron el tratamiento durante la estación B (noviembre-abril).

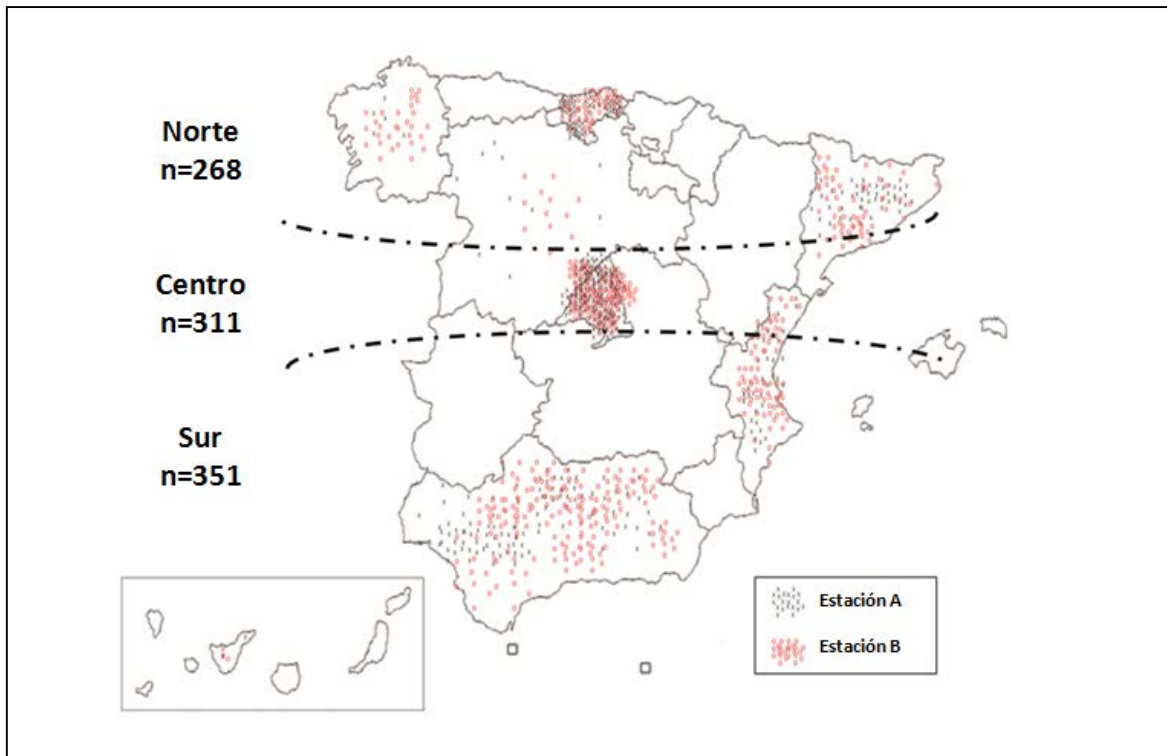


Figura 2. Representación esquemática según el área geográfica y la estación de inicio de tratamiento (Estación A: cruces grises; Estación B: círculos rojos).

4.2. RESPUESTA VIRAL AL TRATAMIENTO Y A LA ESTACIONALIDAD

Los pacientes sin periodo lead-in en el tratamiento, es decir, un 51.7% del total de los pacientes, lograron mayores tasas de RVR (35.1 vs. 2.7%, $P \leq 0.001$) y $CV \leq 15$ (79.2 vs. 6.8%, $P \leq 0.001$) en comparación con los pacientes que sí recibieron periodo de lead-in (48.3%) en la terapia.

Los pacientes con RVR lograron una mayor tasa de RVS (131 de 155, 84.5% frente a 337 de 545, 61.8%; $P \leq 0.001$). Del mismo modo, los pacientes con $CV \leq 15$ también lograron una mayor tasa de RVS (280 de 338, 82.8% frente a 185 de 355, 52.1%; $P \leq 0.001$).

En general, los pacientes que iniciaron el tratamiento durante la estación A mostraron mayores tasas de RVR (23.5 vs. 16.1%, $P=0.005$) y $CV\leq 15$ (51 vs. 38.6%, $P\leq 0.001$) que los que iniciaron el tratamiento durante la estación B.

Hubo también diferencia entre los pacientes que inician el tratamiento durante la estación A' (n=147) y los 290 pacientes tratados durante la estación B' (RVR, 25.2 vs. 18.3%, $P=0.104$; $CV\leq 15$, 53.3 vs. 38.2%, $P=0.004$).

Tras realizar el análisis de la respuesta viral, de acuerdo a la estacionalidad y al tipo de tratamiento recibido (lead-in sí o no), se observó que los pacientes tratados durante la estación A, con periodo de lead-in, presentaron una mayor tasa de respuesta viral, con una RVR de 4.3 frente a 1,5% ($P=0,07$) de los pacientes que iniciaron el tratamiento en la estación B, , así como de $CV\leq 15$, con porcentajes de 10.4 frente a 4.2 siendo las diferencias estadísticamente significativas ($P= 0,013$). Estos resultados se pueden observar en la tabla 2. La estacionalidad, en pacientes sin periodo lead-in, por ser una estrategia de tratamiento más eficaz en los primeras semanas tuvo menos impacto sobre la respuesta viral, aunque se siguió observando la misma tendencia.

El resto de los resultados que muestra la tabla, reflejan la cinética viral durante la mayor parte del tratamiento, ya que se encuentran representadas la tasa de respuesta viral en la semana 8, 12, y 24 semanas posteriores al fin del tratamiento . Al analizar estos resultados encontramos que, no se observan diferencias significativas a partir de la semana 4 de tratamiento entre los dos grupos establecidos, teniendo en cuenta el periodo del año y el tratamiento recibido.

	Sin lead-in		P valor	Lead-in		P valor
	EstaciónA	EstaciónB		EstaciónA	EstaciónB	
RVR, n(%)	91(38.2)	78(32)	0.18	8(4.3)	4(1.5)	0.07
CV≤15 UI 4 semana, n(%)	193(82.5)	81(76)	0.09	19(10.4)	11(4.2)	0.013
Respuesta viral 8 semana, n(%)	79(64)	5(58.2)	0.38	60(44.1)	87(44.6)	0.99
CV≤15 UI 8 semana, n(%)	119(97)	137(94)	0.39	95(70)	136(70)	0.99
Respuesta viral 12 semana, n(%)	151(66.6)	145(62)	0.83	94(56.3)	126(54)	0.74
CV≤15 UI 12 semana, n(%)	215(94)	213(91.4)	0.48	135(81)	200(85.5)	0.86
RVS, n(%)	147(74.2)	147(72)	0.57	78(60)	96(57.5)	0.72

Tabla 2. Respuesta viral de acuerdo con el tratamiento recibido y la estación de inicio del tratamiento de la hepatitis C crónica.

La tabla 3 muestra los resultados del análisis de regresión logística en el que se incluyeron las siguientes variables, que habían resultado predictoras independientes para alcanzar la RVR y la CV≤15:

- estación de inicio de tratamiento (A vs. B), tipo de tratamiento recibido en cuanto al periodo de lead-in (lead-in sí vs. no),
- el ARN del VHC (con valores \leq o $>$ a 600.000 UI/ml),
- el polimorfismo de IL28B (CC vs. no-CC)

En el análisis multivariado de regresión logística también se analizó el tratamiento previo recibido (naïve vs. experimentado), el subtipo del genotipo 1, la presencia de diabetes, la edad y la fibrosis, sin observar diferencias estadísticamente significativas tanto al evaluar la RVR como la CV≤15.

La estación es un predictor independiente de RVR ($P=0.003$) y de CV indetectable o ≤ 15 UI ($P=0.014$), controlando por las variables que se muestran en la tabla 3.

	<i>Respuesta viral rápida</i>			<i>CV Indetectable o ≤15 UI</i>		
	<i>OR</i>	<i>IC 95%</i>	<i>P</i>	<i>OR</i>	<i>IC 95%</i>	<i>P</i>
Estación A vs. B (inicio del tratamiento)	2.03	1.27-3.25	0.003	1.93	1.14-3.29	0.014
Tipo de tratamiento (lead-in no vs. sí)	23.70	10.66-52.69	<0.001	90.1	46.54-174.61	<0.0001
VHC RNA (≤600.000 vs. >600.000 UI/mL)	2.14	1.29-3.55	0.003	4.66	2.36-9.17	<0.0001
Polimorfismo ILB28 (CC vs. no-CC)	1.94	1.14-3.30	0.014	2.24	1.17-4.29	0.015
Naïve vs. experimentado	1.55	0.91-2.63	0.10	0.74	0.41-1.31	0.30
Genotipo (1b vs. 1a)	1.32	0.73-2.40	0.35	0.71	0.37-1.36	0.30
Diabetes Mellitus (no vs. sí)	1.28	0.63-2.61	0.49	1.42	0.66-3.05	0.36
Edad (≥ 50 vs. < 50 años)	0.92	0.55-1.52	0.75	1.01	0.58-1.78	0.95
Fibrosis (≥F3 vs <F3)	0.92	0.51-1.66	0.79	1.63	0.80-3.30	0.17

Tabla 3. Análisis de regresión logística.

La respuesta viral no fue estadísticamente diferente entre los pacientes que iniciaron el tratamiento en la estación A, comparado con los pacientes que lo iniciaron en la estación B, evaluada cuando la carga viral estaba disponible en las distintas fases del tratamiento:

- en la semana 8 (n=262 en la estación A, n=341 en la estación B; CV≤15, 43.8 vs. 56.2%, $P=0.703$),
- en la semana 12 (n=395 en la estación A, n=465 en la estación B; CV≤15, 45.9 vs. 54.1%, $P=0.923$),
- al final del tratamiento (n=163 en la estación A, n=200 en la estación B; VHC ARN indetectable, 46 vs 54%, $P=0.437$) y
- SVR (n=328 en la estación A, n=372 en la estación B; VHC ARN indetectable, 48.1 vs. 51.9%, $P=0.358$).

4.3. NIVELES DE VITAMINA D Y ESTACIONALIDAD

Al analizar los niveles de vitamina D, del centro en el que estaban disponibles, observamos que dichos niveles oscilaban según los meses del año dependiendo de la estación, sin embargo no se observaron diferencias significativas entre la estación A y la estación B.

En la siguiente figura (Figura 3) podemos apreciar la oscilación de los niveles de vitamina D.

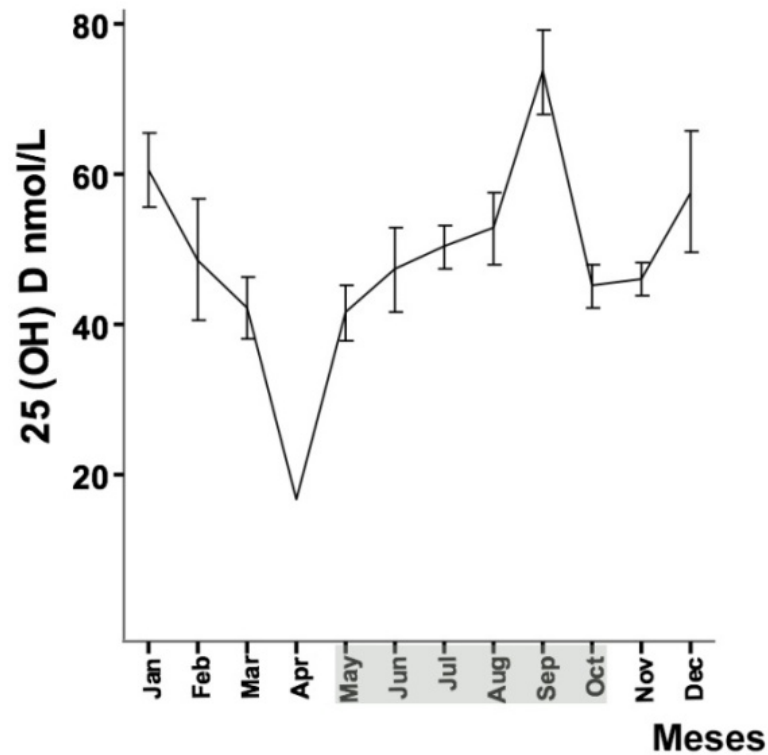


Figura 3. Variación estacional de vitamina D. Los meses de la estación A (may-oct) se encuentran sombreados en gris.

5. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio que establece un vínculo entre la estación del año en la que se inicia la terapia basada en interferón y ribavirina para la hepatitis C crónica y la respuesta al tratamiento antiviral. Los resultados de nuestro estudio sugieren que, la respuesta viral al tratamiento del VHC, está influenciada por las horas de luz solar, sugiriendo que los niveles de vitamina D son determinantes en la respuesta al tratamiento.

El hallazgo más sorprendente en nuestra cohorte, formada por pacientes procedentes de áreas con distintas latitudes, fue la diferente respuesta viral observada de acuerdo con la estación de inicio del tratamiento antiviral, basado en IFN-peg y RBV. De hecho, el grupo de pacientes que inició el tratamiento durante la estación con mayor número de horas al día de sol, según la Agencia Estatal de Meteorología (203), mostró la mayor tasa de RVR.

Creemos que nuestros hallazgos son coherentes por diferentes razones. En primer lugar, la mayor diferencia en cuanto a la tasa de respuesta viral se objetivó en el grupo de pacientes que recibieron el tratamiento menos eficaz, en cuanto a disminución de carga viral en las primeras 4 semanas se refiere (grupo que recibió periodo lead-in), comparado con los pacientes que recibieron agentes antivirales de acción directa desde el principio. En segundo lugar, el análisis multivariado ajustado por las variables que influyen en la respuesta viral, reveló claramente que la estacionalidad es un predictor independiente de respuesta viral. Además, esto se observó de forma independiente del valor de corte de la carga viral, indetectable ó RVR, ≤ 15 UI o ambos. Asimismo, se comprobó que las otras variables que habían demostrado tener, en diferentes estudios previos, influencia en la RVR, como carga viral basal superior a 600.000

UI/ml o el polimorfismo del gen IL28B (72, 189, 205), también aparecieron como factores independientes de respuesta en nuestra cohorte de pacientes. Por último, en el sub-análisis en el que se evaluó únicamente los meses de mayor horas de luz solar (julio, agosto y septiembre) frente a los de menor horas de exposición solar (enero, febrero y marzo) también confirmó los resultados, a favor de una mayor tasa de RVR y $CV \leq 15UI$ en los pacientes que iniciaron tratamiento durante los meses de mayor exposición solar, aunque con un tamaño de muestra más pequeño, pero reforzando los resultados generales.

Nuestros datos son de considerable importancia debido a que la RVR está altamente correlacionada con la RVS en los regímenes basados en IFN-peg y RBV (15,20,21). De hecho, en nuestra cohorte de pacientes la RVR se asoció con la RVS. Además, nuestros resultados pueden ser considerados como prueba de que los niveles de vitamina D pueden influir en la respuesta al tratamiento para el VHC.

Desde la primera observación publicada por Petta y colaboradores en 2010 sobre el déficit de vitamina D sérica y su relación con la mala respuesta a la terapia basada en IFN-peg y RBV, en pacientes con cirrosis hepática por virus C genotipo 1 (163), varios estudios han apoyado la asociación de la vitamina D y la respuesta viral al tratamiento (191, 200, 206, 207), atribuyendo esta relación a su papel regulador de la respuesta inmune.

En los últimos años ha habido un creciente interés en el papel de la vitamina D, no sólo en términos de homeostasis ósea, sino en la función que desempeña en diferentes tejidos y el papel relacionado con los efectos no esqueléticos (145, 161). La vitamina D se encuentra involucrada, de forma

importante, en el sistema inmunológico ya que muchas células que intervienen en la inmunidad poseen receptores de vitamina D, lo que sugiere un papel regulador para la vitamina D en la respuesta inmune innata y adaptativa (208, 209).

Estos argumentos ponen de manifiesto la justificación de la administración de suplementos de vitamina D, para mejorar la respuesta viral en los regímenes basados en IFN-peg y RBV, antes de la disponibilidad de agentes antivirales de acción directa. Varios estudios han demostrado que los suplementos de vitamina D mejoran significativamente la tasa de RVR, respuesta viral temprana y RVS (210-213). Por el contrario, otros estudios no han confirmado mejores resultados de la terapia antiviral después de la administración de suplementos de vitamina D (214, 215) o no han observado correlación entre los niveles de vitamina D y la respuesta viral (216). Esta discrepancia puede deberse a la existencia de sesgos metodológicos en relación con la medición de la vitamina D en suero, que pueden provocar resultados heterogéneos. También, a diferencias en cuanto a la cantidad de vitamina D circulante unida a proteínas (217) o en la discordancia existente a la hora de establecer un punto de corte que defina los niveles relevantes desde el punto de vista clínico (218, 219), o la exactitud en la medición de la vitamina D en los diferentes ensayos (220). Estas y otras limitaciones pueden dificultar la obtención de conclusiones, aún siendo real la relación que existe entre los niveles de vitamina D y su papel en la respuesta antiviral.

Los beneficios de los suplementos de vitamina D pueden ir más allá de la respuesta al tratamiento de la hepatitis C. En este sentido, los niveles óptimos de vitamina D se han asociado con una menor inflamación y fibrosis hepática en pacientes con infección crónica por virus C (163, 166). De hecho, los niveles

adecuados de vitamina D producen una reducción del estrés oxidativo, influyendo en la migración, proliferación y la expresión génica de los fibroblastos, así como en la disminución de la actividad fibrogénica de las células estrelladas del hígado (163). Asimismo, un reciente estudio realizado por Eltayeb y colaboradores apoya la idea de que, la suplementación con vitamina D , mejora significativamente la respuesta viral y ayuda a prevenir otros problemas secundarios, como el riesgo de fractura ósea en los niños infectados con hepatitis C, en tratamiento con INF-peg y RBV (212).

Cabe destacar que un correcto nivel de vitamina D, sea secundario a la suplementación oral o no, puede ser capaz de prevenir o reducir la anemia inducida por la RBV, que es uno de los efectos secundarios más frecuentes de este fármaco (221), que además se continúa usando en la mayoría de los regímenes de tratamiento en combinación con los AAD.

Por último, los resultados de un reciente meta-análisis de ensayos controlados y aleatorizados, han sugerido una reducción en la mortalidad por cualquier causa con suplementos de vitamina D (222).

Varios estudios han demostrado que los cambios estacionales y la exposición a la luz ultravioleta se correlacionan con los niveles de vitamina D, debido a que la luz del sol es la principal fuente de vitamina D, especialmente en países soleados como España (133, 139, 223, 224). No es sorprendente que, en nuestro estudio, se observara una asociación consistente entre los niveles de vitamina D y la variación estacional, aunque los niveles de vitamina D sólo estuvieran disponibles en una minoría, de nuestra gran cohorte de pacientes.

Además, diferentes estudios han sugerido que, tras una exposición moderada a la luz ultravioleta se disminuyen los riesgos y la gravedad de diferentes enfermedades de origen autoinmune, neurológico, endocrino, cardiovascular así como oncológicas. Por lo tanto, es razonable asumir una correlación entre los niveles de vitamina D y la exposición al sol (225-228). Por el contrario, se ha observado una peor evolución e incremento de las tasas de hospitalización de ciertas enfermedades inflamatorias, como la enfermedad inflamatoria intestinal (229) o enfermedades infecciosas graves (230, 231), en relación a una baja exposición al sol.

No hubo diferencias en las características basales entre los pacientes agrupados según la estación. Sin embargo, la carga viral basal entre las dos estaciones consideradas, fue significativamente diferente. Aunque la diferencia fue clínicamente irrelevante y se ajustó en el análisis multivariado, el hallazgo merece ser comentado. Aunque especulativo, es razonable pensar que es lógico que la carga viral sea más baja durante los meses de mayor exposición solar (y de vitamina D) por cuanto la vitamina D ha demostrado tener *per se* capacidad antiviral (188, 232). Además, este efecto antiviral no sólo se ha observado en la hepatitis C, así es importante señalar, que existen varios estudios en los que se ha comunicado que en la hepatitis B existe que una relación inversa entre los niveles de vitamina D y la carga viral (186, 233).

Aunque en nuestro estudio observamos una asociación entre la estacionalidad y la RVR, al evaluar la respuesta viral en distintos puntos a medida que avanza el tratamiento, incluyendo la evaluación de la RVS, no se encontró relación con la estación de inicio del tratamiento. Esto no es sorprendente, ya que los inhibidores de proteasa NS3 de acción directa son fármacos muy

eficaces, por lo que los predictores conocidos de RVS dejan de tener su valor predictivo (216, 234-236). Del mismo modo, tampoco se ha observado una asociación entre los niveles de vitamina D y la RVS en pacientes fáciles de tratar, tales como aquellos con genotipo 2 y 3 (166).

Es importante resaltar que nuestro estudio tiene ciertas limitaciones. En primer lugar, existe una falta de información sobre los medicamentos que tomaban los enfermos y que interfieren con los niveles de vitamina D, o la toma de suplementos y la ingesta alimentaria. Asimismo tampoco estaban disponibles, ya que no se evaluó, los datos sobre la mutación del gen CYP27B1, (207), que afecta a los niveles de vitamina D. Por último, no se dispuso de la exposición individual a la luz solar, por lo que los pacientes se agruparon de acuerdo a las estaciones definidas acorde a informes meteorológicos disponibles en la Agencia Estatal de Meteorología, y que hacen mención al número de horas de luz según los meses del año (203) .

6. CONCLUSIÓN

Los resultados del presente estudio permiten concluir que:

- La estacionalidad y por ello las horas de exposición solar, se asocian a una mayor tasa de respuesta viral rápida en pacientes con hepatitis C en tratamiento con IFN-peg y RBV.

- Nuestros resultados apoyan los distintos trabajos que apuntan a que la vitamina D influye en la respuesta viral al tratamiento.

- Se necesitan más estudios clínicos que investiguen el papel de la vitamina D en el seno de los tratamientos con nuevos fármacos antivirales de acción directa, basados en INF-peg y RBV.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. - Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. - *Lancet* 2012 Dec 15;380(9859):2095-2128
2. Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. - Epidemiology and natural history of HCV infection. - *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013 Sep;10(9):553-562.
3. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, et al. - The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. - *N Engl J Med* 1999 Aug 19;341(8):556-562.
4. Garcia CL, Ordobas GM, Sanz Moreno JC, Ramos BB, Gutierrez RA, Astray MJ, et al. - Prevalence of hepatitis C antibodies in the population aged 16-80 years in the Community of Madrid 2008-2009. - *J Med Virol* 2015 Oct;87(10):1697-701.
5. Ascione A, Bruno S, Coppola C, Mangia A, Orlandini A, Schmitz M, et al. - Treatment Outcomes and Predictors of Response in Treatment-Naive HCV Patients Treated with Peginterferon Alfa/Ribavirin in Real-World Italian Clinics: Sub-Analysis from the PROPHECY Cohort. - *Hepatology* 2014 Jun;61(132):1094-106.
6. Petta S, Camma C, Scazzone C, Tripodo C, Di M, V, Bono A, et al. - Low vitamin D serum level is related to severe fibrosis and low responsiveness to interferon-based therapy in genotype 1 chronic hepatitis C. - *Hepatology* 2010 Apr;51(4):1158-67.
7. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. - Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. - *Science* 1989 Apr 21;244(4902):359-62.
8. Lauer GM, Walker BD. - Hepatitis C virus infection. - *N Engl J Med* 2001 Jul 5;345(1):41-52.
9. Wong DK, Dudley DD, Dohrenwend PB, Lauer GM, Chung RT, Thomas DL, et al. - Detection of diverse hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes in peripheral blood of infected persons by screening for responses to all translated proteins of HCV. - *J Virol* 2001 Feb;75(3):1229-35.
10. Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, et al. - Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. - *Arch Virol* 1998;143(12):2493-503.
11. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, et al. - Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. - *Hepatology* 2005 Oct;42(4):962-73.
12. Simmonds P. - Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. - *J Gen Virol* 2004 Nov;85(Pt 11):3173-88.

13. Alter MJ. - Epidemiology of hepatitis C. - *Hepatology* 1997 Sep;26(3 Suppl 1):62S-65S.
14. Seeff LB, Hoofnagle JH. - National Institutes of Health Consensus Development Conference: management of hepatitis C: 2002. - *Hepatology* 2002 Nov;36(5 Suppl 1):S1-2.
15. Perez MA, Blanco Coronado MA, Graus MJ, Rodero Vazquez de CR, Perez MC, de Vicente Bach JL, et al. - [Chronic hepatitis C. Epidemiology and therapeutic results in 255 cases]. - *An Med Interna* 2006 Jun;23(6):257-9.
16. Sulkowski MS, Ray SC, Thomas DL. - Needlestick transmission of hepatitis C. - *Jama* 2002 May 8;287(18):2406-13.
17. Macias J, Palacios RB, Claro E, Vargas J, Vergara S, Mira JA, et al. - High prevalence of hepatitis C virus infection among noninjecting drug users: association with sharing the inhalation implements of crack. - *Liver Int* 2008 Jul;28(6):781-6.
18. Vrieling H, Reesink HW, van den Burg PJ, Zaaijer HL, Cuypers HT, Lelie PN, et al. - Performance of three generations of anti-hepatitis C virus enzyme-linked immunosorbent assays in donors and patients. - *Transfusion* 1997 Aug;37(8):845-849.
19. Pena MJ, Molina L, Hortal L, Gallego R, Rodriguez JL, Perez MC, et al. - [Epidemiologic study of infection by hepatitis C virus in a hemodialysis unit]. - *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2000 Dec;18(10):496-9.
20. Pereira BJ, Milford EL, Kirkman RL, Quan S, Sayre KR, Johnson PJ, et al. - Prevalence of hepatitis C virus RNA in organ donors positive for hepatitis C antibody and in the recipients of their organs. - *N Engl J Med* 1992 Sep 24;327(13):910-5.
21. Hernandez ME, Bruguera M, Puyuelo T, Barrera JM, Sanchez Tapias JM, Rodes J. - Risk of needle-stick injuries in the transmission of hepatitis C virus in hospital personnel. - *J Hepatol* 1992 Sep;16(1-2):56-58.
22. Martinez-Bauer E, Fornis X, Armelles M, Planas R, Sola R, Vergara M, et al. - Hospital admission is a relevant source of hepatitis C virus acquisition in Spain. - *J Hepatol* 2008 Jan;48(1):20-7.
23. Esteban JI, Gomez J, Martell M, Cabot B, Quer J, Camps J, et al. - Transmission of hepatitis C virus by a cardiac surgeon. - *N Engl J Med* 1996 Feb 29;334(9):555-60.
24. Tumminelli F, Marcellin P, Rizzo S, Barbera S, Corvino G, Furia P, et al. - Shaving as potential source of hepatitis C virus infection. - *Lancet* 1995 Mar 11;345(8950):658.
25. Alter MJ. - Prevention of spread of hepatitis C. - *Hepatology* 2002 Nov;36(5 Suppl 1):S93-8.
26. Hwang LY, Kramer JR, Troisi C, Bull L, Grimes CZ, Lyerla R, et al. - Relationship of cosmetic procedures and drug use to hepatitis C and hepatitis B virus infections in a low-risk population. - *Hepatology* 2006 Aug;44(2):341-51.
27. Terrault NA. - Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. - *Hepatology* 2002 Nov;36(5 Suppl 1):S99-105.

28. Dobosz S. - [The risk of vertical HCV transmission in children born to HIV infected mothers]. - *Przeegl Epidemiol* 2007;61(2):349-356.
29. Roberts EA, Yeung L. - Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. - *Hepatology* 2002 Nov;36(5 Suppl 1):S106-13.
30. Seeff LB. - Natural history of hepatitis C. - *Hepatology* 1997 Sep;26(3 Suppl 1):21S-28S.
31. Dienstag JL. - The natural history of chronic hepatitis C and what we should do about it. - *Gastroenterology* 1997 Feb;112(2):651-5.
32. Chu CM, Yeh CT, Liaw YF. - Fulminant hepatic failure in acute hepatitis C: increased risk in chronic carriers of hepatitis B virus. - *Gut* 1999 Oct;45(4):613-617.
33. 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 Mar;29(3):908-914.
34. Conry-Cantilena C, VanRaden M, Gobble 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 Jun 27;334(26):1691-6.
35. Haber MM, West AB, Haber AD, Reuben A. - Relationship of aminotransferases to liver histological status in chronic hepatitis C. - *Am J Gastroenterol* 1995 Aug;90(8):1250-7.
36. Hoofnagle JH. - Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. - *Hepatology* 1997 Sep;26(3 Suppl 1):15S-20S.
37. 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 Feb;112(2):463-72.
38. Planas R, Balleste B, Alvarez MA, Rivera M, Montoliu S, Galeras JA, et al. - Natural history of decompensated hepatitis C virus-related cirrhosis. A study of 200 patients. - *J Hepatol* 2004 May;40(5):823-30.
39. 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 Apr;29(4):1311-6.
40. Brechot C, Jaffredo F, Lagorce D, Gerken G, Meyer zum BK, Papakonstantinou A, et al. - Impact of HBV, HCV and GBV-C/HGV on hepatocellular carcinomas in Europe: results of a European concerted action. - *J Hepatol* 1998 Aug;29(2):173-83.
41. Liu PH, Hsu CY, Hsia CY, Lee YH, Su CW, Huang YH, et al. - Prognosis of Hepatocellular Carcinoma: Assessment of Eleven Staging Systems. - *J Hepatol* 2015 Nov 6 pii: S0168-8278(15)00730-8.
42. Gretch DR. - Diagnostic tests for hepatitis C. - *Hepatology* 1997 Sep;26(3 Suppl 1):43S-47S.
43. Makariou S, Liberopoulos EN, Elisaf M, Challa A. - Novel roles of vitamin D in disease: what is new in 2011? - *Eur J Intern Med* 2011 Aug;22(4):355-62.

44. Kuo G, Choo QL, 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 Apr 21;244(4902):362-364.
45. Pawlotsky JM. - Molecular diagnosis of viral hepatitis. - *Gastroenterology* 2002 May;122(6):1554-1568.
46. Morishima C, Gretch DR. - Clinical use of hepatitis C virus tests for diagnosis and monitoring during therapy. - *Clin Liver Dis* 1999 Nov;3(4):717-740.
47. Kitson MT, Dore GJ, George J, Button P, McCaughan GW, Crawford DH, et al. Vitamin D status does not predict sustained virologic response or fibrosis stage in chronic hepatitis C genotype 1 infection. *J Hepatol* 2013 Mar;58(3):467-472.
48. Ross RS, Viazov SO, Hoffmann S, Roggendorf M. - Performance characteristics of a transcription-mediated nucleic acid amplification assay for qualitative detection of hepatitis C virus RNA. - *J Clin Lab Anal* 2001;15(6):308-13.
49. Forns X, Bukh J. - The molecular biology of hepatitis C virus. Genotypes and quasispecies. - *Clin Liver Dis* 1999 Nov;3(4):693-716.
50. Lee JH, Roth WK, Zeuzem S. - Evaluation and comparison of different hepatitis C virus genotyping and serotyping assays. - *J Hepatol* 1997 May;26(5):1001-1009.
51. Kleiner DE. - The liver biopsy in chronic hepatitis C: a view from the other side of the microscope. - *Semin Liver Dis* 2005 Feb;25(1):52-64.
52. Dienstag JL. - The role of liver biopsy in chronic hepatitis C. - *Hepatology* 2002 Nov;36(5 Suppl 1):S152-60.
53. Gebo KA, Herlong HF, Torbenson MS, Jenckes MW, Chander G, Ghanem KG, et al. - Role of liver biopsy in management of chronic hepatitis C: a systematic review. - *Hepatology* 2002 Nov;36(5 Suppl 1):S161-72.
54. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, et al. - A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. - *Lancet* 2012 Dec 15;380(9859):2224-2260.
55. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, et al. - Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. - *Hepatology* 1981 Sep-Oct;1(5):431-435.
56. Lefkowitz JH. - Liver biopsy assessment in chronic hepatitis. - *Arch Med Res* 2007 Aug;38(6):634-643.
57. 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 Mar 22;349(9055):825-832.
58. Gomez-Dominguez E, Mendoza J, Rubio S, Moreno-Monteagudo JA, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R. - Transient elastography: a valid alternative to biopsy in patients with chronic liver disease. - *Aliment Pharmacol Ther* 2006 Aug 1;24(3):513-518.

59. Friedman SL. - Liver fibrosis -- from bench to bedside. - J Hepatol 2003;38 Suppl 1:S38-53.
60. Park GJ, Lin BP, Ngu MC, Jones DB, Katelaris PH. - Aspartate aminotransferase: alanine aminotransferase ratio in chronic hepatitis C infection: is it a useful predictor of cirrhosis? - J Gastroenterol Hepatol 2000 Apr;15(4):386-390.
61. Fornis X, Ampurdanes S, Llovet JM, Aponte J, Quinto L, Martinez-Bauer E, et al. - Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. - Hepatology 2002 Oct;36(4 Pt 1):986-92.
62. Avihingsanon A, Jitmitraparp S, Tangkijvanich P, Ramautarsing RA, Apornpong T, Jirajariyavej S, et al. Advanced liver fibrosis by transient elastography, fibrosis 4, and alanine aminotransferase/platelet ratio index among Asian hepatitis C with and without human immunodeficiency virus infection: role of vitamin D levels. J Gastroenterol Hepatol 2014 Sep;29(9):1706-1714.
63. Le CS, Thabut D, Messous D, Munteanu M, Ratziu V, Imbert-Bismut F, et al. - The predictive value of Fibrotest vs. APRI for the diagnosis of fibrosis in chronic hepatitis C. - Hepatology 2004 Mar;39(3):862-3.
64. Berenguer J, Bellon JM, Miralles P, Alvarez E, Sanchez-Conde M, Cosin J, et al. - Identification of liver fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients using a simple predictive model based on routine laboratory data. - J Viral Hepat 2007 Dec;14(12):859-69.
65. Ladero JM, Delkader J, Ortega L, Fernandez C, Devesa MJ, Lopez-Alonso G, et al. - Non-invasive evaluation of the fibrosis stage in chronic hepatitis C: a comparative analysis of nine scoring methods. - Scand J Gastroenterol 2010;45(1):51-9.
66. Foster GR. - Quality of life considerations for patients with chronic hepatitis C. - J Viral Hepat 2009 Sep;16(9):605-11.
67. Kamal SM, El Tawil AA, Nakano T, He Q, Rasenack J, Hakam SA, et al. - Peginterferon {alpha}-2b and ribavirin therapy in chronic hepatitis C genotype 4: impact of treatment duration and viral kinetics on sustained virological response. - Gut 2005 Jun;54(6):858-866.
68. Poynard T, McHutchison J, Davis GL, Esteban-Mur R, Goodman Z, Bedossa P, et al. - Impact of interferon alfa-2b and ribavirin on progression of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. - Hepatology 2000 Nov;32(5):1131-1137.
69. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Jr., et al. - Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. - N Engl J Med 2002 Sep 26;347(13):975-82.
70. Wedemeyer H, Jensen DM, Godofsky E, Mani N, Pawlotsky JM, Miller V. - Recommendations for standardized nomenclature and definitions of viral response in trials of hepatitis C virus investigational agents. - Hepatology 2012 Dec;56(6):2398-403.
71. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Jr., et al. - Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. - N Engl J Med 2002 Sep 26;347(13):975-82.

72. Zeuzem S, Buti M, Ferenci P, Sperl J, Horsmans Y, Cianciara J, et al. - Efficacy of 24 weeks treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C infected with genotype 1 and low pretreatment viremia. - *J Hepatol* 2006 Jan;44(1):97-103.
73. Lérias de Almeida PR, Alves de MA, Valle TC. - Sustained virological response according to the type of early virological response in HCV and HCV/HIV. - *Ann Hepatol* 2010 Apr-Jun;9(2):150-155.
74. Hepburn MJ, Hepburn LM, Cantu NS, Lapeer MG, Lawitz EJ. - Differences in treatment outcome for hepatitis C among ethnic groups. - *Am J Med* 2004 Aug 1;117(3):163-168.
75. Myers RP, Patel K, Pianko S, Poynard T, McHutchison JG. - The rate of fibrosis progression is an independent predictor of the response to antiviral therapy in chronic hepatitis C. - *J Viral Hepat* 2003 Jan;10(1):16-22.
76. Raptopoulou M, Tsantoulas D, Vafiadi I, Ketikoglou I, Paraskevas E, Vassiliadis T, et al. - The effect of adherence to therapy on sustained response in daily or three times a week interferon alpha-2b plus ribavirin treatment of naive and nonresponder chronic hepatitis C patients. - *J Viral Hepat* 2005 Jan;12(1):91-5.
77. - EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. - *J Hepatol* 2015 Jul;63(1):199-236.
78. Shea DO, Tuite H, Farrell G, Codd M, Mulcahy F, Norris S, et al. - Role of rapid virological response in prediction of sustained virological response to Peg-IFN plus ribavirin in HCV / HIV co-infected individuals. - *J Viral Hepat* 2008 Jul;15(7):482-9.
79. Hoofnagle JH, Seeff LB. - Peginterferon and ribavirin for chronic hepatitis C. - *N Engl J Med* 2006 Dec 7;355(23):2444-2451.
80. Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB, Rustgi V, Di BA, Peters M, et al. - Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. - *N Engl J Med* 1986 Dec 18;315(25):1575-1578.
81. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, et al. - Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. - *N Engl J Med* 1998 Nov 19;339(21):1485-1492.
82. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, et al. - Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). - *Lancet* 1998 Oct 31;352(9138):1426-32.
83. Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong W, Lau JY, Hong Z, et al. - The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. - *Nat Med* 2000 Dec;6(12):1375-9.
84. Di Bisceglie AM, Conjeevaram HS, Fried MW, Sallie R, Park Y, Yurdaydin C, et al. - Ribavirin as therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. - *Ann Intern Med* 1995 Dec 15;123(12):897-903.

85. Perrillo R, Rothstein KD, Rubin R, Alam I, Imperial J, Harb G, et al. - Comparison of quality of life, work productivity and medical resource utilization of peginterferon alpha 2a vs the combination of interferon alpha 2b plus ribavirin as initial treatment in patients with chronic hepatitis C. - J Viral Hepat 2004 Mar;11(2):157-65.
86. Dienstag JL, McHutchison JG. - American Gastroenterological Association medical position statement on the management of hepatitis C. - Gastroenterology 2006 Jan;130(1):225-230.
87. Hadziyannis SJ, Sette H, Jr., Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, et al. - Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. - Ann Intern Med 2004 Mar 2;140(5):346-55.
88. Legrand-Abravanel F, Sandres-Saune K, Barange K, Alric L, Moreau J, Desmorat P, et al. - Hepatitis C virus genotype 5: epidemiological characteristics and sensitivity to combination therapy with interferon-alpha plus ribavirin. - J Infect Dis 2004 Apr 15;189(8):1397-400.
89. Yu ML, Dai CY, Huang JF, Chiu CF, Yang YH, Hou NJ, et al. - Rapid virological response and treatment duration for chronic hepatitis C genotype 1 patients: a randomized trial. - Hepatology 2008 Jun;47(6):1884-1893.
90. Documento del II Consenso español sobre el tratamiento de la hepatitis C. Disponible en: <http://aeeh.es/wp-content/uploads/2015/04/II-Conferencia-de-consenso-sobre-el-tratamiento-de-la-hepatitis-C-de-la-AEEH.pdf> .
91. Renault PF, Hoofnagle JH. - Side effects of alpha interferon. - Semin Liver Dis 1989 Nov;9(4):273-277.
92. Lopez Morante AJ, Saez-Royuela F, Casanova VF, Yuguero del ML, Martin Lorente JL, Ojeda GC. - Immune thrombocytopenia after alpha-interferon therapy in a patient with chronic hepatitis C. - Am J Gastroenterol 1992 Jun;87(6):809-10.
93. Pau AK, McLaughlin MM, Hu Z, Agyemang AF, Polis MA, Kottlil S. - Predictors for hematopoietic growth factors use in HIV/HCV-coinfected patients treated with peginterferon alfa 2b and ribavirin. - Aids Patient Care Stds 2006 Sep;20(9):612-619.
94. Marcellin P, Pouteau M, Renard P, Grynblat JM, Colas LN, Bardet P, et al. - Sustained hypothyroidism induced by recombinant alpha interferon in patients with chronic hepatitis C. - Gut 1992 Jun;33(6):855-6.
95. Dixit NM, Layden-Almer JE, Layden TJ, Perelson AS. - Modelling how ribavirin improves interferon response rates in hepatitis C virus infection. - Nature 2004 Dec 16;432(7019):922-4.
96. Bodenheimer HC, Jr., Lindsay KL, Davis GL, Lewis JH, Thung SN, Seeff LB. - Tolerance and efficacy of oral ribavirin treatment of chronic hepatitis C: a multicenter trial. - Hepatology 1997 Aug;26(2):473-7.
97. Pawlotsky JM, Dahari H, Neumann AU, Hezode C, Germanidis G, Lonjon I, et al. - Antiviral action of ribavirin in chronic hepatitis C. - Gastroenterology 2004 Mar;126(3):703-14.

98. Hoofnagle JH, Ghany MG, Kleiner DE, Doo E, Heller T, Promrat K, et al. - Maintenance therapy with ribavirin in patients with chronic hepatitis C who fail to respond to combination therapy with interferon alfa and ribavirin. - *Hepatology* 2003 Jul;38(1):66-74.
99. Jacobson IM, Brown RS, Jr., McCone J, Black M, Albert C, Dragutsky MS, et al. - Impact of weight-based ribavirin with peginterferon alfa-2b in African Americans with hepatitis C virus genotype 1. - *Hepatology* 2007 Oct;46(4):982-90.
100. Dusheiko G, Main J, Thomas H, Reichard O, Lee C, Dhillon A, et al. - Ribavirin treatment for patients with chronic hepatitis C: results of a placebo-controlled study. - *J Hepatol* 1996 Nov;25(5):591-8.
101. Snoeck E, Wade JR, Duff F, Lamb M, Jorga K. - Predicting sustained virological response and anaemia in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon alfa-2a (40KD) plus ribavirin. - *Br J Clin Pharmacol* 2006 Dec;62(6):699-709.
102. Del Rio RA, Post AB, Singer ME. - Cost-effectiveness of hematologic growth factors for anemia occurring during hepatitis C combination therapy. - *Hepatology* 2006 Dec;44(6):1598-606.
103. Schalm SW, Hansen BE, Chemello L, Bellobuono A, Brouwer JT, Weiland O, et al. - Ribavirin enhances the efficacy but not the adverse effects of interferon in chronic hepatitis C. Meta-analysis of individual patient data from European centers. - *J Hepatol* 1997 May;26(5):961-966.
104. Davis GL, Esteban-Mur R, Rustgi V, Hoefs J, Gordon SC, Trepo C, et al. - Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. - *N Engl J Med* 1998 Nov 19;339(21):1493-1499.
105. Berenguer M. - Treatment of chronic hepatitis C in hemodialysis patients. - *Hepatology* 2008 Nov;48(5):1690-9.
106. Pol S, Corouge M. - [Treatment of hepatitis C: current status and perspectives]. - *Rev Prat* 2014 May;64(5):605-612.
107. Bakulin I, Pasechnikov V, Varlamicheva A, Sannikova I. - NS3 protease inhibitors for treatment of chronic hepatitis C: Efficacy and safety. - *World J Hepatol* 2014 May 27;6(5):326-39.
108. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, et al. - Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. - *N Engl J Med* 2011 Jun 23;364(25):2405-16.
109. 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 Jun 23;364(25):2417-2428.
110. Salmeron J, Vinaixa C, Berenguer R, Pascasio JM, Sanchez Ruano JJ, Serra MA, et al. - Effectiveness and safety of first-generation protease inhibitors in clinical practice: Hepatitis C virus patients with advanced fibrosis. - *World J Gastroenterol* 2015 Aug 14;21(30):9163-74.

111. Shuster M, Do D, Nambudiri V. - Severe cutaneous adverse reaction to telaprevir. - *Dermatol Online J* 2015 Jan 15;21(1).
112. Poordad F, McCone J, Jr., Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, et al. - Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. - *N Engl J Med* 2011 Mar 31;364(13):1195-206.
113. 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 Mar 31;364(13):1207-17.
114. Kwo PY, Lawitz EJ, McCone J, Schiff ER, Vierling JM, Pound D, et al. - Efficacy of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-naive patients with genotype 1 hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial. - *Lancet* 2010 Aug 28;376(9742):705-16.
115. Romero-Gomez M, Berenguer M, Molina E, Calleja JL. - Management of anemia induced by triple therapy in patients with chronic hepatitis C: challenges, opportunities and recommendations. - *J Hepatol* 2013 Dec;59(6):1323-30.
116. Vaidya A, Perry CM. - Simeprevir: first global approval. - *Drugs* 2013 Dec;73(18):2093-106.
117. Zeuzem S, Berg T, Gane E, Ferenci P, Foster GR, Fried MW, et al. - Simeprevir increases rate of sustained virologic response among treatment-experienced patients with HCV genotype-1 infection: a phase IIb trial. - *Gastroenterology* 2014 Feb;146(2):430-441.
118. Brayer SW, Reddy KR. - Ritonavir-boosted protease inhibitor based therapy: a new strategy in chronic hepatitis C therapy. - *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2015 May;9(5):547-58.
119. Gane EJ, Stedman CA, Hyland RH, Ding X, Svarovskaia E, Symonds WT, et al. - Nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus ribavirin for hepatitis C. - *N Engl J Med* 2013 Jan 3;368(1):34-44.
120. Zeuzem S, Jacobson IM, Baykal T, Marinho RT, Poordad F, Bourliere M, et al. - Retreatment of HCV with ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with ribavirin. - *N Engl J Med* 2014 Apr 24;370(17):1604-14.
121. Fazel Y, Lam B, Golabi P, Younossi Z. - Safety analysis of sofosbuvir and ledipasvir for treating hepatitis C. - *Expert Opin Drug Saf* 2015 Aug;14(8):1317-26.
122. Pineda JA, Romero-Gomez M, Diaz-Garcia F, Giron-Gonzalez JA, Montero JL, Torre-Cisneros J, et al. - HIV coinfection shortens the survival of patients with hepatitis C virus-related decompensated cirrhosis. - *Hepatology* 2005 Apr;41(4):779-89.
123. Pineda JA, Garcia-Garcia JA, Aguilar-Guisado M, Rios-Villegas MJ, Ruiz-Morales J, Rivero A, et al. - Clinical progression of hepatitis C virus-related chronic liver disease in human immunodeficiency virus-infected patients undergoing highly active antiretroviral therapy. - *Hepatology* 2007 Sep;46(3):622-630.

124. Holick MF. - Evolution and function of vitamin D. - *Recent Results Cancer Res* 2003;164:3-28.
125. McCollum EV. - The paths to the discovery of vitamins A and D. - *J Nutr* 1967 Feb;91(2):Suppl 1:11-6.
126. Wasserman RH. - Metabolism, function and clinical aspects of vitamin D. - *Cornell Vet* 1975 Jan;65(1):3-25.
127. Garcia-Martin E, Agundez JA, Maestro ML, Suarez A, Vidaurreta M, Martinez C, et al. Influence of vitamin D-related gene polymorphisms (CYP27B and VDR) on the response to interferon/ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *PLoS One* 2013;8(9):e74764.
128. Kato S. - The function of vitamin D receptor in vitamin D action. - *J Biochem* 2000 May;127(5):717-22.
129. Adams JS, Clemens TL, Parrish JA, Holick MF. - Vitamin-D synthesis and metabolism after ultraviolet irradiation of normal and vitamin-D-deficient subjects. - *N Engl J Med* 1982 Mar 25;306(12):722-5.
130. Chen TC, Chimeh F, Lu Z, Mathieu J, Person KS, Zhang A, et al. - Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. - *Arch Biochem Biophys* 2007 Apr 15;460(2):213-217.
131. Calvo MS, Whiting SJ, Barton CN. - Vitamin D intake: a global perspective of current status. - *J Nutr* 2005 Feb;135(2):310-316.
132. Kimlin MG, Downs NJ, Parisi AV. - Comparison of human facial UV exposure at high and low latitudes and the potential impact on dermal vitamin D production. - *Photochem Photobiol Sci* 2003 Apr;2(4):370-375.
133. Webb AR, Kline L, Holick MF. - Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D3: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D3 synthesis in human skin. - *J Clin Endocrinol Metab* 1988 Aug;67(2):373-8.
134. Holick MF. - Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. - *Am J Clin Nutr* 1995 Mar;61(3 Suppl):638S-645S.
135. MacLaughlin J, Holick MF. - Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3. - *J Clin Invest* 1985 Oct;76(4):1536-8.
136. van der Wielen RP, Lowik MR, van den Berg H, de Groot LC, Haller J, Moreiras O, et al. - Serum vitamin D concentrations among elderly people in Europe. - *Lancet* 1995 Jul 22;346(8969):207-10.
137. Loomis WF. - Skin-pigment regulation of vitamin-D biosynthesis in man. - *Science* 1967 Aug 4;157(3788):501-506.
138. Moloney FJ, Collins S, Murphy GM. - Sunscreens: safety, efficacy and appropriate use. - *Am J Clin Dermatol* 2002;3(3):185-91.

139. Rosen CJ. Clinical practice. Vitamin D insufficiency. *N Engl J Med* 2011 Jan 20;364(3):248-254.
140. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. - The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. - *J Clin Endocrinol Metab* 2011 Jan;96(1):53-8.
141. Lo CW, Paris PW, Clemens TL, Nolan J, Holick MF. - Vitamin D absorption in healthy subjects and in patients with intestinal malabsorption syndromes. - *Am J Clin Nutr* 1985 Oct;42(4):644-649.
142. Thompson WG, Thompson GR. - Effect of cholestyramine on the absorption of vitamin D3 and calcium. - *Gut* 1969 Sep;10(9):717-22.
143. Binkley N, Ramamurthy R, Krueger D. - Low vitamin D status: definition, prevalence, consequences, and correction. - *Rheum Dis Clin North Am* 2012 Feb;38(1):45-59.
144. Holick MF. - Vitamin D deficiency. - *N Engl J Med* 2007 Jul 19;357(3):266-81.
145. Rosen CJ, Adams JS, Bikle DD, Black DM, Demay MB, Manson JE, et al. The nonskeletal effects of vitamin D: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* 2012 Jun;33(3):456-492.
146. Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. - Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. - *Nat Rev Immunol* 2008 Sep;8(9):685-98.
147. Vojinovic J. - Vitamin D receptor agonists' anti-inflammatory properties. - *Ann N Y Acad Sci* 2014 May;1317:47-56.
148. Gonzalez-Molero I, Rojo-Martinez G, Morcillo S, Gutierrez-Repiso C, Rubio-Martin E, Almaraz MC, et al. - Vitamin D and incidence of diabetes: a prospective cohort study. - *Clin Nutr* 2012 Aug;31(4):571-573.
149. Zittermann A. - Vitamin D and disease prevention with special reference to cardiovascular disease. - *Prog Biophys Mol Biol* 2006 Sep;92(1):39-48.
150. Gonzalez-Molero I, Rojo G, Morcillo S, Perez-Valero V, Rubio-Martin E, Gutierrez-Repiso C, et al. - [Relationship between vitamin D deficiency and metabolic syndrome]. - *Med Clin (Barc)* 2014 Jun 6;142(11):473-7.
151. Perez-Castrillon JL, Vega G, Abad L, Sanz A, Chaves J, Hernandez G, et al. - Effects of Atorvastatin on vitamin D levels in patients with acute ischemic heart disease. - *Am J Cardiol* 2007 Apr 1;99(7):903-5.
152. Zittermann A, Schleithoff SS, Koerfer R. - Vitamin D insufficiency in congestive heart failure: why and what to do about it? - *Heart Fail Rev* 2006 Mar;11(1):25-33.
153. Zittermann A, Schleithoff SS, Frisch S, Gotting C, Kuhn J, Koertke H, et al. - Circulating calcitriol concentrations and total mortality. - *Clin Chem* 2009 Jun;55(6):1163-1170.
154. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, et al. - Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. - *Circulation* 2008 Jan 29;117(4):503-11.

155. Gupta D, Vashi PG, Trukova K, Lis CG, Lammersfeld CA. - Prevalence of serum vitamin D deficiency and insufficiency in cancer: Review of the epidemiological literature. - *Exp Ther Med* 2011 Mar;2(2):181-193.
156. Holick MF. - Sunlight, ultraviolet radiation, vitamin D and skin cancer: how much sunlight do we need? - *Adv Exp Med Biol* 2014;810:1-16.
157. Garland CF, Garland FC, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB, et al. - The role of vitamin D in cancer prevention. - *Am J Public Health* 2006 Feb;96(2):252-61.
158. Manson JE, Mayne ST, Clinton SK. - Vitamin D and prevention of cancer--ready for prime time? - *N Engl J Med* 2011 Apr 14;364(15):1385-7.
159. Kuroda T, Shiraki M, Tanaka S, Ohta H. - Contributions of 25-hydroxyvitamin D, comorbidities and bone mass to mortality in Japanese postmenopausal women. - *Bone* 2009 Jan;44(1):168-72.
160. Autier P, Boniol M, Pizot C, Mullie P. - Vitamin D status and ill health: a systematic review. - *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014 Jan;2(1):76-89.
161. Kitson MT, Roberts SK. D-livering the message: the importance of vitamin D status in chronic liver disease. *J Hepatol* 2012 Oct;57(4):897-909.
162. Lim LY, Chalasani N. Vitamin d deficiency in patients with chronic liver disease and cirrhosis. *Curr Gastroenterol Rep* 2012 Feb;14(1):67-73.
163. Petta S, Camma C, Scazzone C, Tripodo C, Di M, V, Bono A, et al. Low vitamin D serum level is related to severe fibrosis and low responsiveness to interferon-based therapy in genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology* 2010 Apr;51(4):1158-1167.
164. Arteh J, Narra S, Nair S. Prevalence of vitamin D deficiency in chronic liver disease. *Dig Dis Sci* 2010 Sep;55(9):2624-2628.
165. Iruzubieta P, Teran A, Crespo J, Fabrega E. Vitamin D deficiency in chronic liver disease. *World J Hepatol* 2014 Dec 27;6(12):901-915.
166. Garcia-Alvarez M, Pineda-Tenor D, Jimenez-Sousa MA, Fernandez-Rodriguez A, Guzman-Fulgencio M, Resino S. Relationship of vitamin D status with advanced liver fibrosis and response to hepatitis C virus therapy: a meta-analysis. *Hepatology* 2014 Nov;60(5):1541-1550.
167. Fernandez FN, Linares TP, Joao MD, Jorquera PF, Olcoz Goni JL. - [Vitamin D deficiency in chronic liver disease, clinical-epidemiological analysis and report after vitamin d supplementation]. - *Gastroenterol Hepatol* 2015 Nov 16 pii: S0210-5705(15)00245-9.
168. Looker AC, Dawson-Hughes B, Calvo MS, Gunter EW, Sahyoun NR. - Serum 25-hydroxyvitamin D status of adolescents and adults in two seasonal subpopulations from NHANES III. - *Bone* 2002 May;30(5):771-7.
169. Malham M, Jorgensen SP, Ott P, Agnholt J, Vilstrup H, Borre M, et al. - Vitamin D deficiency in cirrhosis relates to liver dysfunction rather than aetiology. - *World J Gastroenterol* 2011 Feb 21;17(7):922-5.

170. Han YP, Kong M, Zheng S, Ren Y, Zhu L, Shi H, et al. - Vitamin D in liver diseases: from mechanisms to clinical trials. - *J Gastroenterol Hepatol* 2013 Aug;28 Suppl 1:49-55.
171. Teran LA, Crespo GJ. - [Non-alcoholic fatty liver disease. How and who to screen]. - *Gastroenterol Hepatol* 2011 Apr;34(4):278-88.
172. Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad MF. - Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. - *Am J Clin Nutr* 2004 May;79(5):820-825.
173. Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. - The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. - *J Clin Endocrinol Metab* 2007 Jun;92(6):2017-2029.
174. Ford ES, Ajani UA, McGuire LC, Liu S. - Concentrations of serum vitamin D and the metabolic syndrome among U.S. adults. - *Diabetes Care* 2005 May;28(5):1228-30.
175. McCarty MF. - Secondary hyperparathyroidism promotes the acute phase response -- a rationale for supplemental vitamin D in prevention of vascular events in the elderly. - *Med Hypotheses* 2005;64(5):1022-6.
176. Borissova AM, Tankova T, Kirilov G, Dakovska L, Kovacheva R. - The effect of vitamin D3 on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. - *Int J Clin Pract* 2003 May;57(4):258-261.
177. Mak RH, Wong JH. - The vitamin D/parathyroid hormone axis in the pathogenesis of hypertension and insulin resistance in uremia. - *Miner Electrolyte Metab* 1992;18(2-5):156-9.
178. Hitman GA, Mannan N, McDermott MF, Aganna E, Ogunkolade BW, Hales CN, et al. - Vitamin D receptor gene polymorphisms influence insulin secretion in Bangladeshi Asians. - *Diabetes* 1998 Apr;47(4):688-90.
179. Zuniga S, Firrincieli D, Housset C, Chignard N. - Vitamin D and the vitamin D receptor in liver pathophysiology. - *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011 Apr;35(4):295-302.
180. Li T, Owsley E, Matozel M, Hsu P, Novak CM, Chiang JY. - Transgenic expression of cholesterol 7 α -hydroxylase in the liver prevents high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice. - *Hepatology* 2010 Aug;52(2):678-90.
181. Targher G, Bertolini L, Scala L, Cigolini M, Zenari L, Falezza G, et al. - Associations between serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. - *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007 Sep;17(7):517-24.
182. Timms PM, Mannan N, Hitman GA, Noonan K, Mills PG, Syndercombe-Court, et al. - Circulating MMP9, vitamin D and variation in the TIMP-1 response with VDR genotype: mechanisms for inflammatory damage in chronic disorders? - *Qjm* 2002 Dec;95(12):787-96.
183. Nakano T, Cheng YF, Lai CY, Hsu LW, Chang YC, Deng JY, et al. - Impact of artificial sunlight therapy on the progress of non-alcoholic fatty liver disease in rats. - *J Hepatol* 2011 Aug;55(2):415-25.

184. Purohit T, Cappell MS. - Primary biliary cirrhosis: Pathophysiology, clinical presentation and therapy. - *World J Hepatol* 2015 May 8;7(7):926-41.
185. Adorini L. - Vitamin D receptor polymorphisms in primary biliary cirrhosis: a functional connection? - *J Hepatol* 2009 Jun;50(6):1071-1073 .
186. Farnik H, Bojunga J, Berger A, Allwinn R, Waidmann O, Kronenberger B, et al. Low vitamin D serum concentration is associated with high levels of hepatitis B virus replication in chronically infected patients. *Hepatology* 2013 Oct;58(4):1270-1276.
187. Beard JA, Bearden A, Striker R. - Vitamin D and the anti-viral state. - *J Clin Virol* 2011 Mar;50(3):194-200.
188. Gal-Tanamy M, Bachmetov L, Ravid A, Koren R, Erman A, Tur-Kaspa R, et al. Vitamin D: an innate antiviral agent suppressing hepatitis C virus in human hepatocytes. *Hepatology* 2011 Nov;54(5):1570-1579.
189. Petta S, Ferraro D, Camma C, Cabibi D, Di CA, Di M, V, et al. Vitamin D levels and IL28B polymorphisms are related to rapid virological response to standard of care in genotype 1 chronic hepatitis C. *Antivir Ther* 2012;17(5):823-831.
190. Mizuno Y, Nakayama N, Inao M, Funyu J, Asabe S, Tomita K, et al. A Randomized Study Comparing Vitamin D3 and 1alpha (OH) D3 in Combination with Pegylated Interferon/Ribavirin Therapy for Chronic Hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2015 Mar 16.
191. Lange CM, Bibert S, Kutalik Z, Burgisser P, Cerny A, Dufour JF, et al. A genetic validation study reveals a role of vitamin D metabolism in the response to interferon-alfa-based therapy of chronic hepatitis C. *PLoS One* 2012;7(7):e40159.
192. Esteban R, Buti M. Triple therapy with boceprevir or telaprevir for treatment naive HCV patients. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2012 Aug;26(4):445-453.
193. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2014 Feb;60(2):392-420.
194. Kau A, Vermehren J, Sarrazin C. Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *J Hepatol* 2008 Oct;49(4):634-651.
195. Petta S, Craxi A. How to optimize HCV therapy in genotype 1 patients: predictors of response. *Liver Int* 2013 Feb;33 Suppl 1:23-29.
196. Petta S, Camma C, Scazzone C, Tripodo C, Di M, V, Bono A, et al. Low vitamin D serum level is related to severe fibrosis and low responsiveness to interferon-based therapy in genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology* 2010 Apr;51(4):1158-1167.
197. Falletti E, Bitetto D, Fabris C, Fattovich G, Cussigh A, Cmet S, et al. Vitamin D binding protein gene polymorphisms and baseline vitamin D levels as predictors of antiviral response in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2012 Nov;56(5):1641-1650.
198. Bitetto D, Fattovich G, Fabris C, Ceriani E, Falletti E, Fornasiere E, et al. Complementary role of vitamin D deficiency and the interleukin-28B rs12979860 C/T polymorphism in

- predicting antiviral response in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2011 Apr;53(4):1118-1126.
199. Grammatikos G, Lange C, Susser S, Schwendy S, Dikopoulos N, Buggisch P, et al. Vitamin D Levels Vary during Antiviral Treatment but Are Unable to Predict Treatment Outcome in HCV Genotype 1 Infected Patients. *PLoS One* 2014;9(2):e87974.
 200. Ladero JM, Torrejon MJ, Sanchez-Pobre P, Suarez A, Cuenca F, de IO, V, et al. Vitamin D deficiency and vitamin D therapy in chronic hepatitis C. *Ann Hepatol* 2013 Mar;12(2):199-204.
 201. Genzen JR, Gosselin JT, Wilson TC, Racila E, Krasowski MD. Analysis of vitamin D status at two academic medical centers and a national reference laboratory: result patterns vary by age, gender, season, and patient location. *BMC Endocr Disord* 2013;13(1):52.
 202. Berry L, Irving W. Predictors of hepatitis C treatment response: what's new? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014 Feb;12(2):183-191.
 203. Agencia Estatal de Meteorología. Calendario meteorológico 2013. Disponible desde: http://www.aemet.es/documentos_d/conocerlas/biblioteca/calendarios/cm-2013pdf.
 204. Bressler BL, Guindi M, Tomlinson G, Heathcote J. - High body mass index is an independent risk factor for nonresponse to antiviral treatment in chronic hepatitis C. - *Hepatology* 2003 Sep;38(3):639-44.
 205. Jensen DM, Morgan TR, Marcellin P, Pockros PJ, Reddy KR, Hadziyannis SJ, et al. Early identification of HCV genotype 1 patients responding to 24 weeks peginterferon alpha-2a (40 kd)/ribavirin therapy. *Hepatology* 2006 May;43(5):954-960.
 206. Omori-Mizuno Y, Nakayama N, Inao M, Funyu J, Asabe S, Tomita K, et al. - Randomized study comparing vitamin D3 and 1alpha-Hydroxyvitamin D3 in combination with pegylated interferon/ribavirin therapy for chronic hepatitis C. - *J Gastroenterol Hepatol* 2015 Sep;30(9):1384-90.
 207. Falletti E, Cmet S, Fabris C, Fattovich G, Cussigh A, Bitetto D, et al. - Genetic polymorphisms of vitamin D pathway predict antiviral treatment outcome in slow responder naive patients with chronic hepatitis C. - *PLoS One* 2013 Nov 14;8(11):e80764.
 208. Kikuta J, Ishii M. [Current Topics on Vitamin D. The effects of vitamin D on the immune system]. *Clin Calcium* 2015;25(3):359-365.
 209. Chun RF, Liu PT, Modlin RL, Adams JS, Hewison M. Impact of vitamin D on immune function: lessons learned from genome-wide analysis. *Front Physiol* 2014;5:151.
 210. Abu-Mouch S, Fireman Z, Jarchovsky J, Zeina AR, Assy N. Vitamin D supplementation improves sustained virologic response in chronic hepatitis C (genotype 1)-naive patients. *World J Gastroenterol* 2011 Dec 21;17(47):5184-5190.
 211. Nimer A, Mouch A. Vitamin D improves viral response in hepatitis C genotype 2-3 naive patients. *World J Gastroenterol* 2012 Feb 28;18(8):800-805.

212. Eltayeb AA, Abdou MA, Abdel-aal AM, Othman MH. Vitamin D status and viral response to therapy in hepatitis C infected children. *World J Gastroenterol* 2015 Jan 28;21(4):1284-1291.
213. Yokoyama S, Takahashi S, Kawakami Y, Hayes CN, Kohno H, Kohno H, et al. Effect of vitamin D supplementation on pegylated interferon/ribavirin therapy for chronic hepatitis C genotype 1b: a randomized controlled trial. *J Viral Hepat* 2014 May;21(5):348-356.
214. Kitson MT, Sarrazin C, Toniutto P, Eslick GD, Roberts SK. Vitamin D level and sustained virologic response to interferon-based antiviral therapy in chronic hepatitis C: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2014 Dec;61(6):1247-1252.
215. Esmat G, El RM, Elsharkawy A, Sabry D, Hassany M, Ahmed A, et al. - Impact of vitamin D supplementation on sustained virological response in chronic hepatitis C genotype 4 patients treated by pegylated interferon/ribavirin. - *J Interferon Cytokine Res* 2015 Jan;35(1):49-54.
216. Grammatikos G, Lange C, Susser S, Schwendy S, Dikopoulos N, Buggisch P, et al. Vitamin D levels vary during antiviral treatment but are unable to predict treatment outcome in HCV genotype 1 infected patients. *PLoS One* 2014;9(2):e87974.
217. Nimitphong H, Saetung S, Chanprasertyotin S, Chailurkit LO, Ongphiphadhanakul B. - Changes in circulating 25-hydroxyvitamin D according to vitamin D binding protein genotypes after vitamin D(3) or D(2)supplementation. - *Nutr J* 2013 Apr 4;12:39.
218. Stokes CS, Krawczyk M, Reichel C, Lammert F, Grunhage F. - Vitamin D deficiency is associated with mortality in patients with advanced liver cirrhosis. - *Eur J Clin Invest* 2014 Feb;44(2):176-183.
219. Bischoff-Ferrari HA. - Optimal serum 25-hydroxyvitamin D levels for multiple health outcomes. - *Adv Exp Med Biol* 2014;810:500-525.
220. Carter GD. - Accuracy of 25-hydroxyvitamin D assays: confronting the issues. - *Curr Drug Targets* 2011 Jan;12(1):19-28.
221. Refaat B, Ashour TH, El-Shemi AG. - Ribavirin induced anaemia: the effect of vitamin D supplementation on erythropoietin and erythrocyte indices in normal Wistar rat. - *Int J Clin Exp Med* 2014 Sep 15;7(9):2667-2676.
222. Zheng Y, Zhu J, Zhou M, Cui L, Yao W, Liu Y. Meta-analysis of long-term vitamin D supplementation on overall mortality. *PLoS One* 2013;8(12):e82109.
223. Kasahara AK, Singh RJ, Noymer A. - Vitamin D (25OHD) Serum Seasonality in the United States. - *PLoS One* 2013 Jun 21;8(6):e65785.
224. Andersen R, Brot C, Jakobsen J, Mejbom H, Molgaard C, Skovgaard LT, et al. - Seasonal changes in vitamin D status among Danish adolescent girls and elderly women: the influence of sun exposure and vitamin D intake. - *Eur J Clin Nutr* 2013 Mar;67(3):270-4.
225. Kriegel MA, Manson JE, Costenbader KH. Does vitamin D affect risk of developing autoimmune disease?: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 2011 Jun;40(6):512-531.

226. Hossein-nezhad A, Holick MF. Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clin Proc* 2013 Jul;88(7):720-755.
227. Grant WB. The effect of vitamin D supplementation on skeletal, vascular, or cancer outcomes. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014 May;2(5):364.
228. Grant WB, Wimalawansa SJ, Holick MF, Cannell JJ, Pludowski P, Lappe JM, et al. Emphasizing the health benefits of vitamin D for those with neurodevelopmental disorders and intellectual disabilities. *Nutrients* 2015 Mar;7(3):1538-1564.
229. Limketkai BN, Bayless TM, Brant SR, Hutfless SM. Lower regional and temporal ultraviolet exposure is associated with increased rates and severity of inflammatory bowel disease hospitalisation. *Aliment Pharmacol Ther* 2014 Sep;40(5):508-517.
230. Danai PA, Sinha S, Moss M, Haber MJ, Martin GS. - Seasonal variation in the epidemiology of sepsis. - *Crit Care Med* 2007 Feb;35(2):410-415.
231. Amrein K, Zajic P, Schnedl C, Waltensdorfer A, Fruhwald S, Holl A, et al. - Vitamin D status and its association with season, hospital and sepsis mortality in critical illness. - *Crit Care* 2014 Mar 24;18(2):R47.
232. Matsumura T, Kato T, Sugiyama N, Tasaka-Fujita M, Murayama A, Masaki T, et al. 25-Hydroxyvitamin D3 suppresses hepatitis C virus production. *Hepatology* 2012 Oct;56(4):1231-1239.
233. Chan HL, Elkhatab M, Trinh H, Tak WY, Ma X, Chuang WL, et al. - Association of baseline vitamin D levels with clinical parameters and treatment outcomes in chronic hepatitis B. - *J Hepatol* 2015 Nov;63(5):1086-1092.
234. Petta S, Craxi A. - How to optimize HCV therapy in genotype 1 patients: predictors of response. - *Liver Int* 2013 Feb;33 Suppl 1:23-9.
235. 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 Sep;143(3):608-618.
236. Shimada N, Toyoda H, Tsubota A, Ide T, Takaguchi K, Kato K, et al. - Baseline factors and very early viral response (week 1) for predicting sustained virological response in telaprevir-based triple combination therapy for Japanese genotype 1b chronic hepatitis C patients: a multicenter study. - *J Gastroenterol* 2014 Nov;49(11):1485-94.