

Asociación del virus de la hepatitis C y las células mononucleares periféricas. Influencia de la coinfección con HIV. Revisión de trabajos realizados en grupo de pacientes con hemofilia

Hepatitis C virus and its association with peripheral blood mononuclear cells. Influence of HIV coinfection. Studies in a group of patients with hemophilia

Patricia Baré*

Recibido: Aceptado:

RESUMEN

Palabras clave: HCV, células mononucleares periféricas, replicación extrahepática, coinfección HIV-HCV, persistencia viral.

Si bien el virus de la hepatitis C es fundamentalmente hepatotropo, su presencia en células linfoides ha sido extensamente analizada. A pesar de su indiscutible relevancia desde el punto de vista biológico y clínico, el verdadero rol de esta asociación no ha sido aún esclarecido y las publicaciones continúan siendo discrepantes, probablemente, debido a la baja tasa de replicación del virus en este tipo celular. En el contexto de pacientes coinfectados HIV/HCV, existe un probado impacto de una infección sobre la otra. El esclarecimiento de los mecanismos involucrados en la interacción viral es de gran interés ya que los mismos son aún inciertos.

Nuestros estudios son realizados en un grupo de pacientes hemofílicos infectados crónicamente con HCV, con y sin coinfección con HIV. Gracias a una técnica de cultivo de células mononucleares, se recuperó el genoma de HCV por tiempos prolongados. Para demostrar su presencia y replicación en células linfoides se abordaron distintas técnicas. Las observaciones realizadas a lo largo de nuestros experimentos en los cultivos celulares, señalan que la presencia paralela de infección con HIV tiene un impacto en los siguientes aspectos: 1- mayor frecuencia de positividad de HCV en las células linfoides, 2- mayor persistencia del genoma en las mismas, 3- difícil erradicación completa del virus en este reservorio y 4- posibilidad de albergar genotipos adicionales ocultos de HCV. La posibilidad de contar con un sistema que albergue ambos virus permitirá dilucidar los mecanismos directos o indirectos que implica la presencia de ambas infecciones en un mismo individuo.

ABSTRACT

Key words: HCV, peripheral blood mononuclear cells, extra-hepatic replication, HIV-HCV coinfection, viral persistence.

Although hepatocytes are the primary site of HCV replication, it has been shown that HCV can infect lymphoid cells. The biologic and clinical implications are relevant while the role of this association is still under debate and reports remain discordant, probably due to the low viral replication level in these cells.

In HIV-HCV coinfection setting, the impact between infections has been demonstrated but the mechanisms of viral interactions have not been elucidated yet and they are the focus of a lot of interest.

Our studies are performed in a group of hemophilic patients that are HCV-chronically infected, with or without HIV coinfection. Using a particular lymphoid cell culture system, HCV genome was recovered for prolonged periods of time and different techniques were used to demonstrate its presence and replication in mononuclear cells.

Our observations revealed that concomitant HIV infection increased HCV frequency in lymphoid cells, augmented HCV genome persistence in cell culture, hampered complete viral eradication from this reservoir, and allowed the carriage of additional occult genotypes. The use of a culture system where both viruses can replicate will contribute to the elucidation of direct or indirect viral interaction mechanisms that are present in coinfecting individuals.

*Laboratorio de Virología del Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina. Investigador adjunto CONICET. Dirección para correspondencia: Pacheco de Melo 3081 (C1425AUM). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. pbare@hematologia.anm.edu.ar

El virus de la hepatitis C es fundamentalmente hepatotrópico pero su presencia en sitios extrahepáticos ha sido ampliamente documentada y se calcula que la contribución de los compartimientos extrahepáticos es responsable de alrededor del 3,1% del virus circulante (1). En particular, las células linfoides han constituido el sitio extrahepático más extensamente analizado.

La infección de células mononucleares por HCV fue sugerida por primera vez, en el año 1985, desde el éxito en la transmisión de Hepatitis noA noB (como se la denominaba en esa época) a un chimpancé, por infusión de células de sangre periférica purificadas de un paciente con Hemofilia A politransfundido (2). A partir de entonces, diversas publicaciones demuestran, mediante infecciones experimentales sobre macrófagos, linfocitos B y T, que el virus puede replicar en células linfoides. Asimismo, detectan la presencia del intermediario replicativo o cadena de RNA de polaridad negativa en estas células, que es considerado una evidencia directa de replicación del HCV.

El verdadero rol del linfotropismo en la infección por HCV no ha sido aún esclarecido y las publicaciones de los distintos grupos de investigación continúan siendo discrepantes. Puntualmente, la contribución de este sitio extrahepático en la evolución de la enfermedad, su papel como reservorio del virus y la relevancia de la persistencia viral en pacientes con respuesta viral sostenida o erradicación viral espontánea (en cuyos plasmas el virus no es detectable) son puntos que se mantienen aún en debate.

Características de la infección de células mononucleares periféricas. Causas de la discordancia en resultados

La inconsistencia de algunos hallazgos en torno a la asociación de HCV con células mononucleares periféricas (CMP) contribuye a mantener esta polémica.

Algunos estudios demostraron que la replicación de HCV en las células linfoides ocurre a bajos niveles y que la cantidad de genoma de HCV intracelular es el resultado de un proceso dinámico relacionado a factores virológicos e inmunológicos específicos de cada individuo (3,4). La baja carga viral presente en las CMP puede ser la causa y justificaría el hallazgo de resultados discordantes entre los distintos grupos.

Por otro lado, fue demostrado que en pacientes con aparente erradicación viral espontánea o terapéutica, el virus de la hepatitis C puede persistir a bajos niveles en el suero y en las células mononucleares periféricas (5). Radkowski y colaboradores sugirieron que en pacientes con respuesta viral sostenida pueden persistir pequeñas

cantidades de virus por períodos prolongados, en el hígado o en células linfoides (6). Estos descubrimientos no solo explicarían el fenómeno de la presencia de la inmunidad humoral y celular por varios años luego de la supuesta erradicación, sino que también podrían constituir un riesgo potencial en la transmisión y reactivación de la enfermedad (5,6).

Asimismo fue demostrada la persistencia de HCV en hígado y células mononucleares de personas sanas, con la presencia de anticuerpos contra HCV, ausencia de genoma viral en suero y con valores de aminotransferasas persistentemente normales (7). Su completa erradicación parece ser un hecho poco probable. Ante circunstancias especiales de inmunosupresión, terapia inmunomoduladora o coinfección con otro virus, la presencia del virus en las células linfoides podría constituir una fuente de recurrencia del virus.

Contrariamente, otros grupos minimizan la importancia de este potencial reservorio (8,9). La baja replicación en células linfoides y la ausencia de genoma de HCV en poblaciones de individuos avirémicos sugieren que la expresión e infección del virus en este sitio es de baja relevancia para la replicación sistémica y la persistencia del mismo (3,10).

Importancia de la infección de células linfoides por HCV

La evidencia de replicación de HCV en CMP es relevante desde el punto de vista biológico y clínico. Por un lado, la interacción entre el HCV y el sistema inmune ha demostrado tener importantes consecuencias clínicas ya que el virus es capaz de evadir la respuesta inmune alcanzando tasas de cronicidad del 85%. Por otro lado, la infección ha sido asociada a múltiples manifestaciones extrahepáticas relacionadas con el sistema inmunológico. Los posibles mecanismos aún no han sido descritos pero el virus podría afectar directamente la función inmune de estas células contribuyendo a la inmunotolerancia y favoreciendo su persistencia (11). Particularmente en nódulos linfáticos, la replicación de HCV en células T podría comprometer a las células Th1 (disfunción o respuesta disminuida) en individuos con infección persistente (12).

Alternativamente, el tropismo preferencial de HCV por los linfocitos B podría provocar la resistencia a la inducción de los mecanismos de muerte celular, producto de la estimulación antigénica crónica. Los defectos en el control de la homeostasis de los sistemas inmunes por apoptosis son importantes en la patogenia de los desórdenes autoinmunes o linfoproliferativos. Entre otros, Gisbert JP y colaboradores demostraron que la prevalencia de infección por

HCV en pacientes con linfoma no-Hodgkin B alcanzaba el 15% (porcentaje significativamente superior al valor en población normal) (13).

La posibilidad de constituir un posible reservorio de HCV en los individuos infectados también le otorgaría a las células linfoides un papel importante en la historia natural de la patología, ya que la recurrencia de la infección a partir de cepas virales presentes en células mononucleares periféricas podría definir el fracaso de la terapéutica, la reinfección luego de un trasplante o simplemente, la reactivación de la enfermedad luego de un período de latencia clínica de la misma.

Coinfección

En pacientes coinfectados HCV/HIV, se modifican tanto la historia natural como la respuesta al tratamiento de la infección por HCV (14). Las interacciones entre ambas infecciones son múltiples y diversas. Aunque sus mecanismos son aún inciertos, es ampliamente reconocido que en el contexto de pacientes coinfectados con HIV se observan cargas virales de HCV más elevadas (15,16), se evidencia una progresión más rápida de la enfermedad hepática (17) y la tasa de respuesta al tratamiento para HCV es menor (18,19). Asimismo, la tasa de erradicación espontánea de HCV disminuye en los pacientes coinfectados, pudiendo ocurrir en un 5 a 10% de los casos (15,20,21).

En lo que concierne al HCV y su asociación con células mononucleares periféricas en el contexto de la coinfección con HIV, la presencia del genoma de HCV fue observada más frecuentemente (4,22). Los mecanismos a través de los cuales el HIV ejerce este aumento de la replicación de HCV en este sitio siguen siendo especulativos. Una causa posible se relaciona al efecto de la inmunosupresión general en estos pacientes. Como fue demostrado, la remoción de células T CD8+ resultó en un aumento de la replicación del HCV en cultivo de CMP que probaría que el sistema inmune adaptativo ejerce algún tipo de control sobre la replicación extrahepática (23). Por otra parte, otros estudios realizados mediante infecciones *in vitro* de CMP de donantes normales demostraron que la coinfección con HIV facilita la replicación de HCV, por contribuir a que las células tengan mayor susceptibilidad a la infección o por provocar directamente el aumento de la replicación de HCV (24).

Nuestros estudios han sido realizados en un grupo de pacientes hemofílicos infectados crónicamente con HCV, con y sin coinfección con HIV. El análisis de los efectos ocasionados por la presencia del HIV puede contribuir a dilucidar los mecanismos a través de los cuales interactúan ambos virus en infecciones concomitantes.

Revisión de trabajos realizados en un grupo de pacientes hemofílicos. Impacto de la coinfección HCV/HIV

Gracias a la técnica de cultivo de células mononucleares que se realiza en nuestro laboratorio, fue posible recuperar el genoma de HCV en el sobrenadante de estos cultivos por tiempos prolongados. Para demostrar la presencia del virus y su capacidad de replicación en las células, se abordaron distintas técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la medición de carga viral del virus en el tiempo, la inmunofluorescencia para la detección de proteínas del virus, la genotipificación del virus, la secuenciación y el estudio de la capacidad infectiva de las cepas virales recuperadas (25).

Breve descripción de la técnica de cultivo celular:

El cultivo de células mononucleares se lleva a cabo a partir de sangre entera del paciente. Las CMP se aíslan en un gradiente de densidad, por centrifugación de sangre anticoagulada con EDTA (etiléndiamino tetraacetato de sodio) sobre Ficoll-Hypaque y luego de los lavados correspondientes con solución fisiológica o PBS (buffer fosfato), se resuspenden a una concentración final de un millón de células por mililitro, en medio de cultivo RPMI-1640 (Hyclone) conteniendo 10% de suero fetal bovino inactivado (SFB) (GIBCO) y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina, 10 mg/ml).

El cultivo se realiza en tubos de poliestireno de fondo redondo de 5 ml. Para cada paciente se preparan 3 a 20 tubos diferentes, de acuerdo al rendimiento de CMP después del gradiente de Ficoll-Hypaque. Se incuban estos tubos en estufa gaseada con 5% CO₂, evitando alterar el contacto celular. A partir del día 5-6 se efectúa el recambio de la mitad del medio sobrenadante, sin centrifugación y sin disgregar el sedimento celular. A partir del cultivo de células de cada individuo se obtienen sobrenadantes de distintos tubos y a distintos tiempos a lo largo del período de cultivo (tubo A: días 5, 8, 12, 15, 19, 22; tubo B: día 5, 8, 12, 15, 19, 22; tubo C: días 5, 8, 12, 15, 19, 22; etc). Estos se conservan fraccionados a -80°C para su posterior análisis. Periódicamente, se examinan los sedimentos o pellets celulares por microscopía de fluorescencia para evaluar viabilidad y apoptosis celular.

Se realizó la detección por PCR de la presencia del genoma de HCV en los sobrenadantes de cultivo observando un porcentaje elevado de individuos con cultivos celulares productores de HCV. Cuando se realizó el análisis en un único cultivo por individuo, el 57% de los pacientes mono infectados y el 74% de los pacientes coinfectados HIV/HCV generaron cultivos HCV+. La diferencia observada entre los dos grupos no fue significativa (25).

Sin embargo, en estudios posteriores que involucraron más de un cultivo por paciente y a lo largo de distintos años de infección, el 100% de los pacientes coinfectados y el 97% de los mono infectados mostraron la posibilidad de generar cultivos HCV+. Por un lado, esto pone en evidencia que la infección por HCV de las células mononucleares periféricas en un individuo crónicamente infectado (mono infectado o coinfectado con HIV) es un hecho altamente frecuente. Sin embargo, la presencia de HIV no se asoció a una mayor posibilidad del HCV de invadir este tipo de células y la presencia de HCV en las células linfoides no fue exclusiva de los pacientes coinfectados.

En el cultivo, se analizaron distintas variables para estimar la cantidad de virus en las células y su capacidad de replicar en las mismas. La frecuencia de positividad de HCV en los sobrenadantes de cultivo fue uno de estos parámetros y se calculó analizando la proporción de sobrenadantes HCV+ obtenidos sobre el total de sobrenadantes estudiados por cultivo (alrededor de 16 sobrenadantes totales por cada cultivo, cosechados a distintos tiempos, para obtener valores comparables entre distintos cultivos del mismo paciente y entre distintos pacientes). La frecuencia de resultados HCV positivos fue variable entre pacientes, se comportó relativamente estable en el tiempo y fue característico de cada individuo mientras no existieran factores tales como tratamientos antivirales que pudieran contribuir al cambio en el equilibrio establecido. El grupo de pacientes mono infectados o coinfectados con HIV demostró frecuencias de positividad para HCV similares o con diferencias no significativas cuando se consideraron globalmente. Sin embargo, cuando se subdividió el grupo de coinfectados HIV/HCV con relación al número de células T CD4+ (mayor y menor de 300 céls/mm³) se observó una mayor frecuencia de producción de cultivos HCV+ asociada a un menor número de CD4+ ($p=0,02$) y a niveles detectables de RNA de HIV en plasma ($p=0,009$). Es decir que tanto el control inmunológico reflejado en el recuento de CD4+ como la presencia del HIV, tuvieron impacto sobre la posibilidad de obtener un cultivo productor de HCV. Por el contrario, la presencia de HCV en plasma no determinó mayor número de pacientes con cultivos HCV+.

Nuestros estudios actuales realizados con un mayor número de pacientes concuerdan con estos resultados previos y mantienen vigentes las observaciones de esta publicación (25).

La medición de carga viral de HCV durante los distintos días de cultivo permitió observar que la replicación ocurrió en un nivel relativamente bajo con un valor promedio de $3,39 \pm 0,34$ log (UI/ml) para el grupo HIV/HCV y $3,37 \pm 0,26$ log (UI/ml) para el grupo HCV. Esto explicó la intermitencia observada en los resultados de PCR. Los sobrenadantes pertenecientes a 10 pacientes productores

de HCV en cultivo del grupo HIV/HCV y de 5 pacientes del grupo HCV, fueron analizados secuencialmente. En este caso, pudo observarse que las diferencias cuantitativas no fueron significativas entre los 2 grupos ya que para que exista una diferencia significativa en términos de carga viral de HCV, debe existir un aumento o disminución de por lo menos 1 logaritmo. No obstante, se evidenció que en el grupo HCV, el nivel de HCV disminuyó haciéndose indetectable en la cuarta semana mientras que en el de HIV/HCV permaneció por más tiempo (más allá de la cuarta y quinta semana).

Otro parámetro que consideramos importante fue el análisis de la persistencia de HCV o la duración de la presencia del genoma viral en el cultivo, evaluando la cantidad de días que ese cultivo permanece positivo. Esto proporcionó una estimación de la carga viral existente, de la cantidad de células infectadas en el individuo y también de la capacidad del virus de persistir en las células. La duración de la presencia del genoma de HCV en los cultivos, derivados de pacientes con y sin coinfección con HIV, demostró que la infección concomitante con HIV extiende temporalmente la positividad de RNA de HCV en los cultivos. Se observó que el genoma de HCV se mantuvo detectable por un período más prolongado en los cultivos del grupo HIV/HCV (más allá del día 21 de cultivo) mientras que, en el grupo HCV, la detección de RNA HCV fue desapareciendo a lo largo de la tercera semana (25).

La infección concomitante con HIV en el grupo de individuos hemofílicos, permitió observar que la presencia del retrovirus influye y puede tener consecuencias en la replicación de HCV en estas células. De acuerdo con nuestros resultados y como fuera comentado previamente, otros grupos han descrito la influencia del HIV en la frecuencia de detección de replicación de HCV (22,26).

Ausencia de erradicación - Persistencia del virus en CMP en pacientes coinfectados

Los pacientes con erradicación del virus en plasma han sido objeto de nuestro análisis. Se demostró que las células linfoides tienen la capacidad para constituir un reservorio viral a partir del cual la infección por HCV podría perpetuarse (27). El hallazgo de HCV en cultivos de células mononucleares de pacientes coinfectados que habían mantenido viremias HCV no detectables por tiempo prolongado proporcionó una evidencia muy importante de la capacidad de estas células de actuar como reservorio del virus. Esta persistencia otorgaría al HCV la posibilidad de reaparecer desde ese sitio de replicación y volver a establecer una infección crónica en el hígado, en el caso de que las condiciones volvieran a resultarle favorables.

La persistencia viral en células linfoides durante y después del tratamiento antiviral ha sido observada en pacientes mono infectados y coinfectados pero la evaluación del impacto de esta falta de erradicación viral completa continúa siendo objeto de análisis.

Genotipos de HCV y coinfección

La ausencia de inmunidad protectora luego de la exposición inicial al virus posibilita las reinfecciones con otras cepas virales de HCV. En consecuencia, en poblaciones de individuos con mayor riesgo de exposición (drogadictos endovenosos, hemofílicos, pacientes en hemodiálisis) es frecuente observar infecciones mixtas de HCV o con múltiples genotipos del virus (28,29,30).

En presencia de infecciones mixtas, algunas cepas pueden prevalecer sobre otras y desplazarlas, resultando, estas últimas, indetectables por las técnicas utilizadas habitualmente en la genotipificación. Determinadas presiones de selección pueden traer como consecuencia el resurgimiento de la cepa desplazada, que puede influir en la respuesta a la terapia antiviral (28,29).

En consecuencia, la detección de infecciones con múltiples genotipos de HCV tiene relevancia clínica y puede ser importante para la elección de un régimen terapéutico adecuado, pues existe la posibilidad de que alguna cepa minoritaria de HCV que responda desfavorablemente a la terapéutica altere la respuesta al tratamiento. Como fue previamente descrito, los pacientes con hemofilia que recibieron concentrados de factores de coagulación no termotratados estuvieron expuestos recurrentemente a infecciones por HCV. Como consecuencia, en este grupo, es frecuente observar la coexistencia de diversos genotipos del virus (28,31).

Cuando analizamos comparativamente la presencia de genotipos de HCV en muestras de plasma y sobrenadantes de cultivo (incluyendo varias muestras correspondientes a distintas fechas del mismo paciente), pudimos observar genotipos de HCV adicionales en los cultivos celulares que no habían sido detectados en muestras de plasma (32). Estos experimentos contribuyeron con los estudios de compartimentalización del virus demostrando que diferentes poblaciones virales de HCV pueden hallarse en los distintos "compartimentos" de un mismo individuo.

En 288 individuos estudiados de nuestra población se observó la siguiente distribución de genotipos: el 72% de los pacientes demostró la presencia del genotipo 1, el 10%, genotipo 2, 12%, genotipo 3 y 2,5% genotipo 4, siendo esta distribución similar en el grupo de coinfectados y mono infectados. Tomando en cuenta solo diferencias entre genotipos y no entre subtipos, un 5,6% de los pacientes presentaron infecciones con más de un genotipo.

La proporción de infecciones mixtas aumentó cuando se consideraron también los genotipos adicionales detectados en los sobrenadantes del cultivo de células ya que en este caso el 62,5% (10/16) de los individuos analizados con esta metodología demostraron la presencia de infecciones con más de un genotipo (32). En aquellos pacientes que habían presentado genotipos adicionales en cultivo, se realizó un análisis exhaustivo sobre distintas muestras de plasma obtenidas a distintos tiempos para aumentar la posibilidad de encontrarlos. Sin embargo, éstos solo pudieron hallarse en 4 casos de pacientes coinfectados y particularmente, en muestras de plasma pertenecientes a etapas previas a la implementación del HAART.

La utilización de la técnica de cultivo posibilitó revelar un mayor número de infecciones mixtas que no habrían podido ser descubiertas a través del análisis exclusivo de los plasmas, aún considerando la toma de los mismos a distintos tiempos a lo largo de la infección. La relevancia clínica de este hallazgo y la posibilidad de recaídas, en pacientes con respuestas sostenidas, con el surgimiento de genotipos exclusivamente asociados al compartimiento de células linfoides está siendo evaluada.

Aún no fue posible demostrar que la coinfección con HIV predisponga a la presencia de infecciones multitípicas o con más de un genotipo pero existe una propensión en el grupo de pacientes coinfectados a presentar mayor número de infecciones mixtas (el 60% de los individuos coinfectados demostró la presencia en cultivo de múltiples genotipos y el 32% de los mono infectados, $p=0,08$, resultados no publicados). A pesar de que esta diferencia no alcanza aún niveles significativos, el aumento en el número de pacientes estudiados podría contribuir a confirmar esta tendencia.

Considerando las observaciones realizadas a lo largo de nuestros experimentos en los cultivos celulares, podemos concluir que, en el grupo de pacientes hemofílicos estudiado, la presencia paralela de infección con HIV tiene un impacto en los siguientes aspectos: 1) mayor frecuencia de positividad de HCV en las células linfoides, 2) mayor persistencia del genoma en las mismas, 3) difícil erradicación completa del virus en este reservorio y 4) posibilidad de albergar genotipos adicionales ocultos de HCV.

Si bien algunos de estos aspectos ya han sido ampliamente discutidos, el estudio de los mecanismos involucrados es desconocido. La interacción entre los dos virus, HIV y HCV, es el foco de interés de distintos grupos de investigación y la carencia, hasta el momento, de un sistema de estudio que combine la replicación de ambos dificulta su esclarecimiento.

Recientemente, un grupo de investigadores describió un sistema de cultivo a través del cual se lograron infecciones

exitosas con HIV de cepas macrófago- y linfotrópicas, en células derivadas de carcinoma hepatocelular (Huh7.5). Estas líneas pueden ser a su vez infectadas con la cepa JFH-1 de HCV (33). La utilización de este sistema podría contribuir a dilucidar, en un futuro cercano, algunos de los mecanismos involucrados en las interacciones entre ambos virus.

Bibliografía.

1. Dahari H, Feliu A, Garcia-Retortillo M, Fornis X, Neumann AU. Second hepatitis C replication compartment indicated by viral dynamics during liver transplantation. *J Hepatol.* 2005; 42:491-8.
2. Hellings JA, van der Veen-du Prie J, Snelting-van Densen R, Stute R. Preliminary results of transmission experiments of non-A, non-B hepatitis by mononuclear leucocytes from a chronic patient. *J Virol Methods.* 1985; 10(4):321-6.
3. Kaiser P, Niederost B, Joos B, von Wyl V, Opravil M, Weber R, Gunthard HF, Fischer M. Equal amounts of intracellular and virion-enclosed hepatitis C virus RNA are associated with peripheral blood mononuclear cells in vivo. *J Infect Dis.* 2006; 194:1713-23.
4. Laskus T, Operskalski EA, Radkowski M, Wilkinson J, Mack WJ, de Giacomo M et al. Negative-strand hepatitis C virus (HCV) RNA in peripheral blood mononuclear cells from anti-HCV-positive/HIV-infected women. *J Infect Dis.* 2007; 195:124-33.
5. Pham TN, MacParland SA, Mulrooney PM, Cooksley H, Naoumov NV and Michalak TI. Hepatitis C virus persistence after spontaneous or treatment-induced resolution of hepatitis C. *J Virol.* 2004; 78:5867-74.
6. Radkowski M, Gallegos-Orozco JF, Jablonska J, Colby TV, Walewska-Zielecka B, Kubicka J et al. Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2005; 41:106-14.
7. Carreño V, Pardo M, López-Alcorocho JM, Rodríguez-Iñigo E, Bartolomé J, Castillo I. Detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in the liver of healthy, anti-HCV antibody-positive, serum HCV RNA-negative patients with normal alanine aminotransferase levels. *J Infect Dis.* 2006; 194:53-60.
8. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Cianciara J, Vargas H, Rakela J. Hepatitis C virus negative strand RNA is not detected in peripheral blood mononuclear cells and viral sequences are identical to those in serum: a case against extrahepatic replication. *J Gen Virol.* 1997; 78:2747-50.
9. Mellor J, Haydon G, Blair C, Livingstone W, Simmonds P. Low level or absent in vivo replication of hepatitis C virus and hepatitis G virus/GB virus C in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol.* 1998; 79:705-14.
10. Bernardin F, Tobler L, Walsh I, Williams JD, Busch M, Delwart E. Clearance of hepatitis C virus RNA from the peripheral blood mononuclear cells of blood donors who spontaneously or therapeutically control their plasma viremia. *Hepatology.* 2008; 47:1446-52.
11. Pham TN, King D, Macparland SA, McGrath JS, Reddy SB, Bursey FR, Michalak TI. Hepatitis C virus replicates in the same immune cell subsets in chronic hepatitis C and occult infection. *Gastroenterology.* 2008; 134:812-22.
12. Kondo Y, Sung VM, Machida K, Liu M, Lai MM. Hepatitis C virus infects T cells and affects interferon-gamma signaling in T cell lines. *Virology.* 2007; 361:161-73.
13. Gisbert JP, García-Buey L, Pajares JM, Moreno-Otero R. Prevalence of hepatitis C virus infection in B-cell non-Hodgkin's lymphoma: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology.* 2003; 125:1723-32.
14. Cooper CL. An overview of HIV and chronic viral hepatitis co-infection. *Dig Dis Sci.* 2008; 53:899-904.
15. Thomas DL, Astemborski J, Rai RM, Anania FA, Schaeffer M, Galai N, et al. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. *JAMA.* 2000; 284:450-6.

16. Matthews-Greer JM, Caldito GC, Adley SD, Willis R, Mire AC, Jamison RM, et al. Comparison of hepatitis C viral loads in patients with or without human immunodeficiency virus. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001; 8:690-4.
17. Rosenthal E, Poiree M, Pradier C, Perronne C, Salmon-Ceron D, Geffray L, et al; GERMIVIC Joint Study Group. Mortality due to hepatitis C-related liver disease in HIV-infected patients in France (Mortavic 2001 study). *AIDS.* 2003; 17:1803-9.
18. Moreno L, Quereda C, Moreno A, Perez-Elias MJ, Antela A, Casado JL, et al. Pegylated interferon alpha2b plus ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C in HIV-infected patients. *AIDS.* 2004; 18:67-73.
19. Soriano V, Nunez M, Camino N, Maida I, Barreiro P, Romero M, et al. Hepatitis C virus-RNA clearance in HIV-coinfected patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon plus ribavirin. *Antivir Ther.* 2004; 9:505-9.
20. Villano SA, Vlahov D, Nelson KE, Cohn S, Thomas DL. Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. *Hepatology.* 1999; 29:908-14.
21. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med.* 1992; 327:1899-905.
22. Laskus T, Radkowski M, Piasek A, Nowicki M, Horban A, Cianciara J, et al. Hepatitis C virus in lymphoid cells of patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1: evidence of active replication in monocytes/macrophages and lymphocytes. *J Infect Dis.* 2000; 181:442-8.
23. Li Y, Wang X, Douglas SD, Metzger DS, Woody G, Zhang T, et al. CD8+ T cell depletion amplifies hepatitis C virus replication in peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis.* 2005; 192:1093-101.
24. Laskus T, Radkowski M, Jablonska J, Kibler K, Wilkinson J, Adair D, et al. Human immunodeficiency virus facilitates infection/replication of hepatitis C virus in native human macrophages. *Blood.* 2004; 103(10):3854-9.
25. Baré P, Massud I, Parodi C, Belmonte L, García G, Nebel MC, et al. Continuous release of hepatitis C virus (HCV) by peripheral blood mononuclear cells and B-lymphoblastoid cell-line cultures derived from HCV-infected patients. *J Gen Virol.* 2005; 86:1717-27.
26. Blackard JT, Smeaton L, Hiasa Y, Horiike N, Onji M, Jamieson DJ, et al. Detection of hepatitis C virus (HCV) in serum and peripheral-blood mononuclear cells from HCV-monoinfected and HIV/HCV-coinfected persons. *J Infect Dis.* 2005; 192:258-65.
27. Baré P, Massud I, Belmonte L, Corti M, et al. HCV recovery from peripheral blood mononuclear cell culture supernatants derived from HCV-HIV co-infected haemophilic patients with undetectable HCV viraemia. *Haemophilia.* 2003; 9:598-604.
28. Eyster ME, Sherman KE, Goedert JJ, Katsoulidou A, Hatzakis A. Prevalence and changes in hepatitis C virus genotypes among multitransfused persons with hemophilia. The Multicenter Hemophilia Cohort Study. *J Infect Dis.* 1999; 179(5):1062-9.
29. Schroter M, Feucht HH, Zollner B, Schafer P, Laufs R. Multiple infections with different HCV genotypes: prevalence and clinical impact. *J Clin Virol.* 2003; 27:200-4.
30. van Asten L, Prins M. Infection with concurrent multiple hepatitis C virus genotypes is associated with faster HIV disease progression. *AIDS* 2004; 18:2319-24.
31. Blackard JT and Sherman KE. Hepatitis C virus coinfection and superinfection. *J Infect Dis.* 2007; 195:519-24.
32. Parodi C, Culasso A, Aloisi N, García G, Bastón M, Corti M, et al. Evidence of occult HCV genotypes in haemophilic individuals with unapparent HCV mixed infections. *Haemophilia.* 2008; 14:816-22.
33. Zhang X, Daucher M, Kottlilil S. HIV enhances HCV replication by its interaction with MADCAM expressing hepatocellular carcinoma cells. The Liver Meeting 2009. Boston, USA. October 30- November 3, 2009 [abstract 1397].