

A mi padre,





**UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

***“INFLUENCIA DE LOS RECEPTORES KIRS SOBRE  
LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON  
INTERFERÓN PEGILADO Y RIBAVIRINA (IFN-  
PEG/RBV) EN PACIENTES CON HEPATITIS C  
CRÓNICA (HCC)”***

**AIDA SELFA MUÑOZ  
GRANADA 2011**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Aida Selfa Muñoz  
D.L.: GR 1711-2012  
ISBN: 978-84-9028-061-4



**Dr. FRANCISCO JAVIER SALMERÓN ESCOBAR,**  
CATEDRÁTICO DE DIGESTIVO DEL DEPARTAMENTO DE  
MEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA  
UNIVERSIDAD DE GRANADA

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal D<sup>a</sup> Aida Selfa Muñoz sobre el tema “Influencia de los receptores KIRs sobre la respuesta al tratamiento con Interferón Pegilado y Ribavirina (IFN-Peg/RBV) en pacientes con hepatitis C crónica (HCC)” ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica y científica de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, a 7 de diciembre de 2011

Fdo. Dr. Javier Salmerón Escobar



**Dra. PALOMA MUÑOZ DE RUEDA, TÉCNICO SUPERIOR DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIONES MÉDICAS MORA LARA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO SAN CECILIO DE GRANADA**

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal D<sup>a</sup> Aida Selfa Muñoz sobre el tema “Influencia de los receptores KIRs sobre la respuesta al tratamiento con Interferón Pegilado y Ribavirina (IFN-Peg/RBV) en pacientes con hepatitis C crónica (HCC)” ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica y científica de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, a 7 de diciembre de 2011

Fdo. Dra. Paloma Muñoz de Rueda



**Dra. ESTHER JOSÉ PAVÓN CASTILLERO**, INVESTIGADORA  
CONTRATADA “JUAN DE LA CIERVA” EN EL HOSPITAL  
UNIVERSITARIO SAN CECILIO

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal D<sup>a</sup> Aida Selfa Muñoz sobre el tema “Influencia de los receptores KIRs sobre la respuesta al tratamiento con Interferón Pegilado y Ribavirina (IFN-Peg/RBV) en pacientes con hepatitis C crónica (HCC)” ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica y científica de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, a 7 de diciembre de 2011

Fdo. Dra. Esther José Pavón Castellero



# **AGRADECIMIENTOS**



En primer lugar quería agradecerles a Javier, Paloma y Esther, mis directores, su dedicación, porque sin ellos este proyecto no habría salido adelante. A Javier, por la idea y puesta en marcha de este trabajo. A Esther, por su inestimable ayuda en todo lo relacionado con el laboratorio. A tí Paloma, por tu gran esfuerzo, por tantas horas dedicadas a mi, unas lectivas y otras no, por tu paciencia y por estar ahí siempre que te he necesitado.

Muchas gracias a todos los residentes y adjuntos de la Unidad Clínica de Aparato Digestivo del Hospital Universitario San Cecilio de Granada, por vuestro ejemplo y apoyo diarios.

A Jose por su cariño y por todos esos días que hemos dejado de estar juntos para que yo pudiera dedicarme a escribir la tesis. Especialmente: a mi hermano por su ayuda "técnica", a mi madre por su infinita paciencia conmigo y su constante ayuda, y a mi padre, que me apoya desde ahí arriba.

A los miembros del Equipo de Investigación CTS-277 del HUSC de Granada, en especial a Ana Gila por su colaboración en la recogida de datos, José Antonio Muñoz en la metodología y a Jorge Casado y Pablo Palomares por sus trabajos previos sobre HLA.

Y a Carolina, gracias por haber sido mi amiga.



# ÍNDICE



## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS</b> .....	7
<b>GLOSARIO DE FIGURAS Y TABLAS</b> .....	9
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>1.1 VIRUS DE LA HEPATITIS C</b> .....	15
<b>1.2 EPIDEMIOLOGÍA Y VÍAS DE TRANSMISIÓN</b> .....	18
<b>1.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS E HISTORIA NATURAL</b> .....	19
<b>1.4 DIAGNÓSTICO</b> .....	21
<b>1.5 TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS CRÓNICA C</b> .....	22
<b>1.5.1 CANDIDATOS AL TRATAMIENTO</b> .....	23
<b>1.5.2 INTERFERÓN PEGILADO</b> .....	24
<b>1.5.3 RIBAVIRINA</b> .....	26
<b>1.5.4 RESPUESTA AL TRATAMIENTO</b> .....	28
<b>1.5.5 NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPEÚTICAS</b> .....	32
<b>1.6 FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTIVIRAL</b> .....	33
<b>1.6.1 RELACIONADOS CON EL VIRUS</b> .....	33
<b>1.6.2 RELACIONADOS CON EL TIPO DE TRATAMIENTO</b> .....	34
<b>1.6.3 RELACIONADOS CON EL PACIENTE Y LA ENFERMEDAD</b> .....	36
1.6.3.1 Edad, sexo, etnia .....	36
1.6.3.2 Síndrome metabólico .....	37
1.6.3.3 Fibrosis .....	37
1.6.3.4 Sistema inmune .....	37
1.6.3.5 Factores genéticos del hospedador .....	40

<b>A) MOLÉCULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD</b> .....	40
GENÉTICA Y ESTRUCTURA .....	40
POLIMORFISMOS DE HLA .....	42
RELACIÓN ENTRE HLA Y VHC .....	43
<b>B) RECEPTORES KIRS</b> .....	44
GENÉTICA KIRS .....	44
NOMENCLATURA .....	46
ACCIÓN .....	46
LIGANDOS .....	48
HAPLOTIPOS .....	49
GENOTIPOS KIRS Y ENFERMEDAD .....	49
RELACIÓN ENTRE KIRS Y VHC .....	51
<b>C) IL28B Y GENES DEL INTERFERÓN</b> .....	52
<b>2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO</b> .....	55
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	59
<b>4. PACIENTES Y MÉTODOS</b> .....	63
<b>4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO</b> .....	65
<b>4.2 SUJETOS Y ÁMBITO DE ESTUDIO</b> .....	65
<b>4.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN</b> .....	65
<b>4.4 TRATAMIENTO</b> .....	66
<b>4.5 VARIABLES DEL ESTUDIO</b> .....	67
<b>4.6 RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS</b> .....	67
<b>4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	68
<b>4.8 METODOLOGÍA: CARGA VIRAL, ESTUDIO HISTOLÓGICO, TIPAJE KIR, HLA E IL28B</b> .....	68

<b>5. RESULTADOS</b> .....	73
<b>5.1 CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES</b> .....	75
<b>5.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DE LA RVP Y RVS</b> .....	77
<b>5.3 ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA ALÉLICA HLA E IL28B, Y SU ASOCIACIÓN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO</b> .....	80
<b>5.4 DISTRIBUCIÓN DE LOS GENOTIPOS KIRS EN LA COHORTE DE ESTUDIO Y SU RELACIÓN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO</b> .....	81
<b>5.5 DISTRIBUCIÓN DE LOS ALELOS HLA-Cw, HLA-Bw4 EN LA COHORTE DE ESTUDIO Y SU RELACIÓN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO</b> .....	84
<b>5.6 INFLUENCIA DE LAS UNIONES KIRS-HLA EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO</b> .....	86
<b>5.7 FRECUENCIA DE LOS HAPLOTIPOS: AA, AB, BB</b> .....	89
<b>5.8 ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LOS FACTORES GENÉTICOS Y AJUSTANDO POR LOS FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA</b> .....	90
<b>5.9 ESTUDIO DE SINERGISMO DE LOS FACTORES INMUNOGENÉTICOS</b> .....	91
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	95
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	103
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	107



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Anti-VHC	Anticuerpos frente al VHC
APC	Células presentadoras de antígeno
CHC	Carcinoma hepatocelular
CV	Carga viral
EIA	Inmunoanálisis enzimático
GGT	Gammaglutamiltransferasa
GOT	Aspartato aminotransferasa
GPT	Alanina aminotransferasa
GTP	Guanosina trifosfato
HCC	Hepatitis crónica C
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
IMPDH	Iosina monofosfato deshidrogenasa
INF-Peg	Interferón Pegilado
ISDR	<i>Interferon-sensitivity-determining region</i>
ISGs	<i>Interferon-stimulated genes</i>
ITAM	Motivos de activación del inmunorreceptor basados en tirosina
ITIM	Motivos de inhibición del inmunorreceptor basados en tirosina
KIRs	<i>Killer cell Ig-like receptors</i>
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NR	Respondedores nulos
OR	Odds ratio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKR	Proteína kinasa R

## **ÍNDICE DE ABREVIATURAS**

PKRBD	<i>RNA-activated protein kinase binding domain</i>
RBV	Ribavirina
RNA	Ácido ribonucleico
RVP	Respuesta virológica precoz
RVR	Respuesta virológica rápida
RVS	Respuesta virológica sostenida
SAPE	Estreptavidina conjugada con r-ficoeritrina
Tc	Linfocitos T citotóxicos
Th1	Linfocitos T helper-1
Th2	Linfocitos T helper-2
TMA	Amplificación mediada por la transcripción
UTR	Regiones no traducidas
VHC	Virus de la hepatitis C

## **GLOSARIO DE FIGURAS Y TABLAS**

- **Figura 1.** Organización genómica del VHC ..... 16
- **Figura 2.** Historia natural de la infección por el VHC ..... 20
- **Figura 3.** Mecanismos de acción propuestos del INF alfa contra el VHC ..... 25
- **Figura 4.** Tasas de RVS con INF-Peg alfa-2a o alfa-2b y RBV en función del genotipo viral ..... 26
- **Figura 5.** Mecanismos de acción propuestos de la RBV frente al VHC ..... 28
- **Figura 6.** Disminución bifásica del RNA-VHC al inicio del tratamiento ..... 29
- **Figura 7.** Resumen de las fechas clave en el seguimiento del tratamiento antiviral ..... 31
- **Figura 8.** Representación de la diferente distribución de los genotipos de la IL28B según la raza y tasas de respuesta de cada uno de ellos ..... 36
- **Figura 9.** Activación del sistema inmune tras una infección viral ..... 38
- **Figura 10.** Genética del complejo principal de histocompatibilidad ..... 40
- **Figura 11.** Estructura de las moléculas HLA clase I y II ..... 41
- **Figura 12.** Estructura proteica de KIRs y sus ligandos ..... 47
- **Figura 13.** Frecuencia de los distintos KIRs en la muestra ..... 81
- **Figura 14.** Frecuencia de los distintos KIRs en pacientes con RVS y no-RVS ..... 82
- **Figura 15.** Frecuencias de KIR2DL2 y KIR2DL3 en la muestra y respecto a la respuesta al tratamiento ..... 83
- **Figura 16.** Frecuencias de KIR3DL1 y KIR3DS1 en la muestra y respecto a la respuesta al tratamiento ..... 84
- **Figura 17.** Sinergismo entre genes de la inmunidad innata respecto a la respuesta virológica sostenida ..... 93

## GLOSARIO DE FIGURAS Y TABLAS

- **Tabla 1.** Función de las proteínas estructurales y no estructurales del VHC ..... 17
- **Tabla 2.** Manifestaciones extrahepáticas de la hepatitis C ..... 21
- **Tabla 3.** Tipos de genes KIRs y sus ligandos HLA clase I ..... 45
- **Tabla 4.** Tipos de respuestas al tratamiento antiviral en pacientes con HCC ..... 66
- **Tabla 5.** Índice de actividad necroinflamatoria ..... 69
- **Tabla 6.** Características clínicas y virológicas basales de la población en estudio ..... 76
- **Tabla 7.** Características de los pacientes en función de la respuesta virológica precoz ..... 78
- **Tabla 8.** Características de los pacientes en función de la respuesta virológica sostenida ..... 79
- **Tabla 9.** Alelos HLA clase I y II con valor de  $P \leq 0.05$  antes de la corrección mediante el método de Bonferroni y genotipo rs12979869 respecto a la respuesta virológica sostenida ..... 80
- **Tabla 10.** Frecuencia de los distintos HLA-Cw y HLA-Bw4 en la muestra y su asociación con la respuesta al tratamiento ..... 85
- **Tabla 11.** Frecuencia de los grupos C1C1 y C2C2 en función de los alelos en el total de la muestra y su asociación con la respuesta ..... 86
- **Tabla 12.** Frecuencia de los pares receptor-ligando de KIRs y HLA en la muestra y según la respuesta al tratamiento ..... 87
- **Tabla 13.** Comparación de las frecuencias de las combinaciones KIRs (2DL2, 2DL3) y HLA-C (grupo C1 y/o C2) en la muestra y estratificado según la respuesta al tratamiento ..... 88
- **Tabla 14.** Comparación de las frecuencias de las combinaciones KIR3DL1-3DS1 y HLA-Bw4 en la muestra y estratificado según la respuesta al tratamiento ..... 89

- **Tabla 15.** Haplotipos de los genes KIRs en la muestra y según la respuesta al tratamiento ..... 89
- **Tabla 16.** Análisis bivariante y multivariante de los factores genéticos respecto a la respuesta virológica sostenida ..... 90
- **Tabla 17.** Análisis multivariante de los factores virales y del huésped respecto a la respuesta virológica sostenida ..... 91
- **Tabla 18.** Clasificación de los pacientes dependiendo de la presencia o ausencia de los factores inmunogenéticos ..... 92
- **Tabla 19.** Sinergismo entre genes de la inmunidad innata respecto a la respuesta virológica sostenida ..... 92



# **INTRODUCCIÓN**



## 1. INTRODUCCIÓN

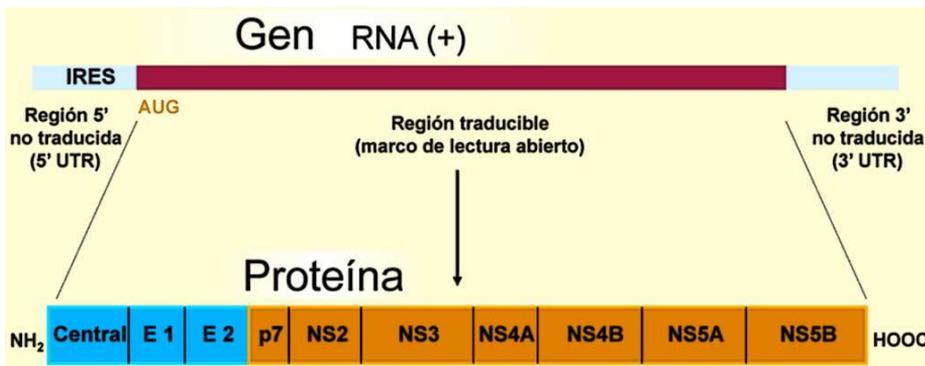
### 1.1 VIRUS DE LA HEPATITIS C

El virus de la hepatitis C (VHC) pertenece a la familia *Flaviviridae* y es el único miembro del género *Hepacivirus*. Fue identificado en 1989 (Choo y cols., 1989).

La infección por el VHC es una enfermedad crónica común que afecta sobre 170 millones de personas en el mundo. En torno al 80% de estos individuos evolucionarán a una infección crónica, 10-20% desarrollarán cirrosis en un periodo de 20 años y anualmente el 2% progresa a carcinoma hepatocelular (CHC) (Wong y cols., 2006), siendo la indicación más común para el trasplante hepático (Lauer y cols., 2001).

Se trata de un virus recubierto y con un diámetro aproximado de 55-60 nanómetros. Está compuesto por una cadena de ácido ribonucleico (RNA) que contiene alrededor de 9600 nucleótidos, capaz de codificar el precursor de un gran polipéptido vírico de 3010 a 3033 aminoácidos con regiones en los extremos 5' y 3' que no se traducen (UTR, regiones no traducidas). La división de este polipéptido vírico por la acción de proteasas de la célula y del propio virus produce una serie de proteínas estructurales y no estructurales. La cadena de RNA está rodeada por el core (nucleocápside icosaédrica o C) que, a su vez, está cubierta por dos proteínas de la envoltura (E1 y E2) con función de anclaje de membrana (Reed y cols., 2000) (**Figura 1**).

El grupo de las proteínas no estructurales está formado por seis integrantes (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) y están separadas de las proteínas estructurales (C, E1 y E2) por un corto péptido de membrana (p7), que parece ser una proteína que interviene en la maduración y liberación de la partícula vírica (Tedbury y cols., 2011) (**Figura 1**).



**Figura 1.** Organización genómica del VHC. La región 5' UTR contiene cuatro dominios altamente estructurados y la región de unión al ribosoma (IRES). La región 3' UTR contiene una región estable. La zona intermedia es la que codifica una poliproteína que tras la acción de proteasas dará lugar a las proteínas estructurales (en azul) y no estructurales (en naranja).

Las funciones de las proteínas no estructurales no han sido aún totalmente aclaradas (**Tabla 1**). Por ejemplo, la NS5A se ha implicado en la modulación de la respuesta antiviral del huésped al tratamiento antiviral con Interferón Pegilado (IFN-Peg) y Ribavirina (RBV) (kitamura y cols., 2010). En concreto, se ha observado que la acumulación de mutaciones en una determinada región de NS5A, la conocida como ISDR (*Interferon-sensitivity-determining region*) se relaciona con una mejor respuesta al tratamiento en pacientes infectados por el genotipo 1b del VHC (Enomoto y cols., 1996; Lee y cols., 2011). Además, la presencia de mutaciones en la región PKRBD (*RNA-activated protein kinase binding domain*) se ha relacionado con una buena respuesta al tratamiento (Muñoz de Rueda y cols., 2008).

**Tabla 1.** *Función de las proteínas estructurales y no estructurales del VHC.*

<b>Proteína</b>	<b>Peso molecular (kDa)</b>	<b>Función</b>
<b>C</b>	21	Proteína de la nucleocápside
<b>E1</b>	31-35 (21 sin N-glicosilación)	Proteína de la envoltura del virión
<b>E2</b>	68-72 (36 sin N-glicosilación)	Proteína de la envoltura del virión
<b>P7</b>	7	Viroporina (interviene en la maduración y liberación de la partícula vírica)
<b>NS2</b>	23	Componente de la proteasa NS2-3
<b>NS3</b>	70	Componente de la proteasa NS2-3, serín-proteasa, NTPasa y helicasa
<b>NS4A</b>	8	Cofactor para la serín-proteasa NS3
<b>NS4B</b>	27	Desconocida
<b>NS5A</b>	58	Parece intervenir en la patogenia de la lesión hepática, de la esteatosis, del CHC y en la resistencia al IFN
<b>NS5B</b>	68	RNA-polimerasa RNA dependiente (RdRp)

El genotipo del VHC es el factor predictivo basal más importante para la respuesta al tratamiento basado en IFN alfa. Se han descrito seis genotipos mayores (del 1 al 6) y más de 50 subtipos (Ej.: 1a, 1b, 2a...) del VHC. El genotipo 1 es el más común en el mundo occidental, representando un 70-80% de los casos. Los más frecuentes en Estados Unidos y Europa occidental son el 1a y 1b, seguidos del genotipo 2 y 3.

Una de las características más importantes del VHC es la gran variabilidad genética que presenta, es decir, el alto grado de heterogeneidad en sus secuencias genómicas. Esto da lugar a diferentes poblaciones genómicas conocidas como "cuasiespecies". Esta característica tiene implicaciones en la patogenia y persistencia del virus, diseño de vacunas, selección de mutantes resistentes durante el tratamiento, y diseño e

## **Introducción**

---

interpretación de los métodos diagnósticos (Salmerón y cols., 2006; Salmerón y cols., 2008).

La aparición de mutaciones en el genoma viral surge como consecuencia de varios procesos (Farci y cols., 2000; Le Guillou-Guillemette y cols., 2007):

- La rapidez de la replicación viral y la incapacidad de la RNA polimerasa viral para corregir errores introducidos en el genoma del VHC. De forma que el VHC circula en forma de cuasiespecies, parte de las cuales pierden su capacidad de replicación (“catástrofe de error”), pero el resto transmite la nueva información genética a su progenie.
- La presión inmunológica del paciente también provoca la aparición de distintas poblaciones virales dentro de un mismo individuo, lo que condiciona que la enfermedad evolucione hacia la cronicidad. Este proceso suele ocurrir en los primeros estadios de la infección, esto es antes de comenzar con el tratamiento antiviral.
- La presión de la terapia antiviral induce la aparición de mutaciones. Por un lado, favoreciendo la aparición de cuasiespecies resistentes al tratamiento y, por otro, como mecanismo para impedir la replicación viral. De hecho una de las hipótesis del mecanismo de acción de la RBV es que actúa como un factor mutagénico de RNA, provocando la llamada “catástrofe de error” en las partículas virales (Lau y cols., 2002; Chung y cols., 2008).

### **1.2 EPIDEMIOLOGÍA Y VÍAS DE TRANSMISIÓN**

Se calcula que la prevalencia de la infección por VHC es del 3% de la población mundial y que existen unos 170-240 millones de personas portadoras de este virus. Hay una considerable variación geográfica y temporal de la incidencia y prevalencia del VHC y se pueden establecer tres patrones de transmisión. En los países con el primer patrón (EEUU, Australia) la mayoría de las infecciones se encuentran entre las personas de 30 a 49 años lo que indica que el riesgo de infección fue mayor en el pasado reciente (10-30 años). En el segundo patrón (Japón, Italia) la prevalencia es mayor en personas de edad más avanzada en consonancia con que el riesgo

de transmisión del virus fue mayor en una época más remota (más de 30 años). En los países con el tercer patrón (Egipto) las altas tasas de infección se observan en todas las edades, lo que significa un riesgo de contagio del VHC permanente. En los países con el primer patrón el uso de drogas inyectables ha sido el factor de riesgo predominante para la infección por el virus, mientras que en aquellos con el segundo o tercer patrón lo ha sido la utilización de inyecciones y material contaminado (Wasley y cols., 2000).

En España la prevalencia se sitúa entre el 1.6-2.6%, lo que permite una estimación de 480.000-760.000 infectados crónicos por el VHC (Bruguera y cols., 2006a). La principal vía de transmisión es la parenteral siendo los riesgos más importantes para la transmisión la transfusión de sangre antes de 1990 (cuando se instaura el cribado anti-VHC [anticuerpos frente al VHC] de los donantes), el uso de drogas por vía intravenosa y las actividades sexuales de alto riesgo (Terraul, 2002; Pomper y cols., 2003), mientras que la exposición ocupacional, la hemodiálisis, la exposición intrafamiliar, la transmisión vertical y el uso de cocaína intranasal entrañan un riesgo más bajo. Los trabajadores sanitarios constituyen un grupo de riesgo, pudiendo llegar al 10% la incidencia de infección tras un pinchazo accidental (Murphy y cols., 2000).

### **1.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS E HISTORIA NATURAL**

En la mayoría de los casos, la hepatitis C aguda es asintomática y anictérica. Tan sólo en menos del 25% es clínicamente evidente y puede manifestarse en forma de ictericia o como síntomas inespecíficos, como astenia, náuseas, vómitos (Hoofnagle, 2002). La hepatitis C fulminante es poco frecuente.

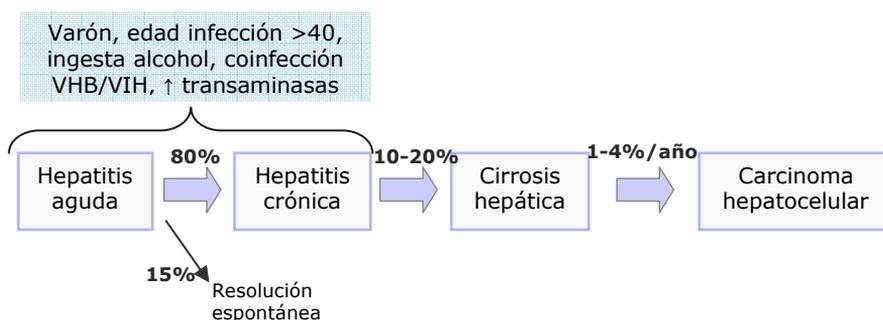
El período de incubación es por término medio de unas 8 semanas, pudiendo variar entre las 2 y las 28. En aproximadamente el 15% de los pacientes con hepatitis C la infección es autolimitada, definiéndose la resolución completa como la ausencia de RNA-VHC en suero y la normalización sérica de los niveles de transaminasas. Varios trabajos recientes están estudiando los factores que determinan esta eliminación del virus, la aparición de ictericia en la fase aguda y el sexo femenino son algunos

## Introducción

de los factores predictivos de curación tras una hepatitis aguda (Gerlach y cols., 2003; Micallef y cols., 2006).

En torno al 80% restante de estos individuos evolucionarán a una infección crónica, definida por la persistencia del RNA-VHC durante un periodo superior a 6 meses tras el comienzo de la infección. 10-20% desarrollarán cirrosis en un periodo de 20 años y anualmente el 2% progresa a CHC (Wong y cols., 2006).

Los factores asociados a la progresión de la hepatitis crónica C (HCC) son la edad en el momento de la infección (>40 años), el sexo masculino, el consumo de alcohol, el hierro, el trasplante hepático, factores metabólicos, coinfección con otros virus (VHB, VIH) así como el nivel elevado de transaminasas (Ghany y cols., 2003; Feld y cols., 2006) (**Figura 2**).



**Figura 2.** Historia natural de la infección por el VHC.

En cuanto a las manifestaciones extrahepáticas, éstas se resumen en la **tabla 2**.

**Tabla 2.** Manifestaciones extrahepáticas de la hepatitis C.

Afectación de la piel	Afectaciones neurológicas
Púrpura	Neuropatía sensorial
Fenómeno de Raynaud	Neuropatía motora
Vasculitis cutánea	
Liquen plano	<b>Otras</b>
Psoriasis	Hipertensión arterial
Porfirio cutánea tarda	Glomerulonefritis
Prurito	Grioglobulinemia mixta esencial
<b>Afectaciones reumatológicas</b>	Enfermedades tiroideas
Artralgia	Linfoma B no Hogdkin
Artritis reumatoide	Diabetes mellitus
Mialgias	Fatiga

## 1.4 DIAGNÓSTICO

Los métodos de diagnóstico disponibles en la actualidad son los análisis serológicos (anti-VHC, transaminasas), para el cribado y diagnóstico inicial; y los estudios virológicos para confirmar la infección y vigilar la respuesta al tratamiento (genotipo del VHC, RNA-VHC) (Pawlotsky, 2002).

El estudio de la infección se realiza inicialmente a través de la detección de anti-VHC mediante inmunoanálisis enzimático (EIA). Se han desarrollado tres generaciones de EIA de sensibilidad creciente y los de tercera generación son capaces de detectar anticuerpos frente a diferentes antígenos del virus 7-8 semanas después de la infección, con porcentajes de sensibilidad y especificidad del 99% (Takedai y cols., 2008). Aún así estos ensayos presentan limitaciones relacionadas con el agente y la condición del huésped:

- a)** No permite discriminar entre los sujetos con infección aguda, crónica o pasada porque los anticuerpos permanecen de por vida en los pacientes crónicos y más de 18-20 años en aquellos que se curan, ya sea de forma espontánea o tras tratamiento antiviral.

- b)** Seroconversión tardía, no permite la detección precoz de una infección aguda.
- c)** Falsos positivos en población sana de bajo riesgo como donantes de sangre y pacientes con autoinmunidad.
- d)** Falsos negativos en pacientes en hemodiálisis o con inmunodeficiencia (VIH, tratamiento inmunosupresor) (Kalantar-Zadeh y cols., 2005).
- e)** No discrimina entre una infección del recién nacido y los anticuerpos maternos.

La detección de RNA-VHC por amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o amplificación mediada por la transcripción (TMA), proporciona evidencia de infección activa por el VHC. Por lo tanto, el estudio del RNA por PCR estará indicado en todo sujeto anti-VHC positivo y en los casos de dudas diagnósticas anteriormente descritos. Además, por su alta sensibilidad (PCR detecta hasta 50 UI/ml y TMA 10 UI/ml) es de utilidad para la detección precoz de la infección (Chevaliez y cols., 2009).

La cuantificación del RNA-VHC es especialmente útil para el seguimiento de la respuesta al tratamiento antiviral. De manera que antes de comenzar la terapia se debe realizar la determinación del genotipo y del RNA-VHC, para evaluar mejor la probabilidad de respuesta (Scott y cols., 2007). Sin embargo esta determinación cuantitativa no tiene valor en cuanto al pronóstico ni a la evolución de la infección.

Hay varios métodos para determinar el genotipo del VHC, dos de ellos utilizan la amplificación con PCR de la región 5'UTR, permitiendo diferenciar los 6 genotipos (Pawlotsky, 2002).

### **1.5 TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS CRÓNICA C (HCC)**

La terapia más efectiva en la actualidad para el tratamiento de la infección crónica por VHC es INF-Peg más RBV. Ensayos controlados aleatorizados han demostrado tasas de respuesta virológica sostenida (RVS) de 54%-83% dependiendo del genotipo viral (Fried y cols., 2002).

### 1.5.1 CANDIDATOS AL TRATAMIENTO

La decisión de tratar a un paciente con HCC se basa en varios factores, incluyendo la historia natural de la enfermedad, el estadio de fibrosis y la eficacia y los efectos adversos relacionados con el tratamiento. La terapia generalmente se considera apropiada en pacientes (Ghany y cols., 2009):

- Edad 18 años o más.
- RNA-VHC detectable en suero.
- Biopsia hepática con hepatitis crónica y fibrosis significativa.
- Enfermedad hepática compensada: bilirrubina total suero <1.5 g/dl, INR <1.5, albúmina >3.4 g/dl, plaquetas >75.000 células/mm<sup>3</sup>, y sin encefalopatía ni ascitis.
- Índices hematológicos y bioquímicos aceptables: hemoglobina >13 g/dl (hombres) y >12 g/dl (mujeres), neutrófilos >1.500 células/mm<sup>3</sup>, creatinina <1.5 mg/dL.
- Aceptan el tratamiento y se ajustan a los requisitos.
- No tienen contraindicaciones para el tratamiento.

Factores adicionales tales como el consumo de alcohol o de drogas, la enfermedad renal crónica o el trasplante hepático previo, se deben de tener en cuenta a la hora de decidir si se inicia la terapia antiviral. El tratamiento también puede ser considerado en pacientes que no responden o con recaída tras recibir IFN estándar (con o sin RBV) o IFN-Peg en monoterapia, biopsia hepática sin fibrosis o sólo con fibrosis leve, hepatitis C aguda, etc (Bruguera y cols., 2006b).

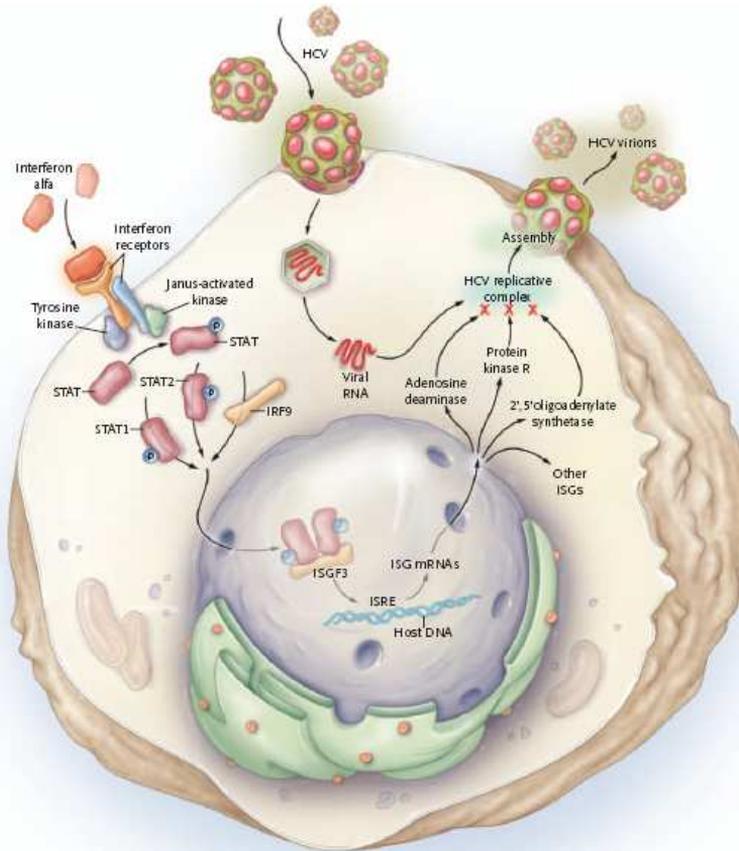
En general como criterios de exclusión: depresión grave no controlada, trasplante de riñón, corazón o pulmón, hepatitis autoinmune, patología tiroidea no tratada, enfermedad grave concomitante (como hipertensión grave, insuficiencia cardíaca, enfermedad arterial coronaria, diabetes mal controlada, enfermedad pulmonar obstructiva), hipersensibilidad conocida a INF y/o RBV, menores de dos años y mujeres embarazadas (la RBV posee efectos teratogénicos y embriotóxicos) (Seef y cols., 2002).

### 1.5.2 INTERFERÓN PEGILADO (IFN-PEG)

Los IFNs son proteínas ó glicoproteínas producidas por distintos tipos celulares como respuesta a un estímulo, sobre todo a una infección vírica. El INF alfa es un polipéptido no glicosilado producido por monocitos, leucocitos y linfocitos B como respuesta a infecciones víricas. Es una parte importante de la respuesta inmune antiviral innata y también juega un papel relevante en la respuesta inmune adaptativa (Hoofnagle y cols., 2006).

El INF alfa tiene una potente actividad antiviral directa (**Figura 3**), ya que se une a receptores de la superficie celular activando una cascada de respuestas que culmina en la expresión de múltiples genes denominados ISGs (*interferon-stimulated genes*), algunos de los cuales bloquean la síntesis de proteínas virales, inhibiendo la replicación viral. En esta ruta intervienen de manera acoplada las proteínas JAK-1 (*Janus-activated kinase-1*) y Tyk2 (*tyrosine kinase-2*). La acción de las kinasas fosforiladas resulta en la activación de proteínas STAT-1 y STAT-2 que son trasladadas al núcleo y ejercen su acción incrementando la transcripción de ISGs que codifican proteínas con actividad antiviral (adenosin deaminasa, PKR [proteína kinasa R] y 2'5' oligoadenilato sintetasa). También produce una desestabilización del RNA viral (Gale, 2003; Ji y cols., 2003).

Además de sus efectos sobre el sistema inmune innato, el INF alfa interactúa con el sistema inmune adaptativo. Los INF Tipo-1 promueven la proliferación de células T memoria, previenen la apoptosis de las células T, estimulan la activación de las células *Natural Killer* (NK) y la maduración de células dendríticas. También aumentan la producción del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I y de clase II y quizás promuevan un fenotipo T-helper-1 (Th1) en lugar de un fenotipo T-helper-2 (Th2). Todas estas acciones contribuyen a prevenir el "agotamiento" inmunológico y favorecen que haya una respuesta inmune adaptativa específica contra el VHC (Tilg, 1997; Feld y cols., 2005).



**Figura 3.** Mecanismos de acción propuestos del INF alfa contra el VHC. (Imagen de Hoofnagle y cols., *Hepatology* 2002).

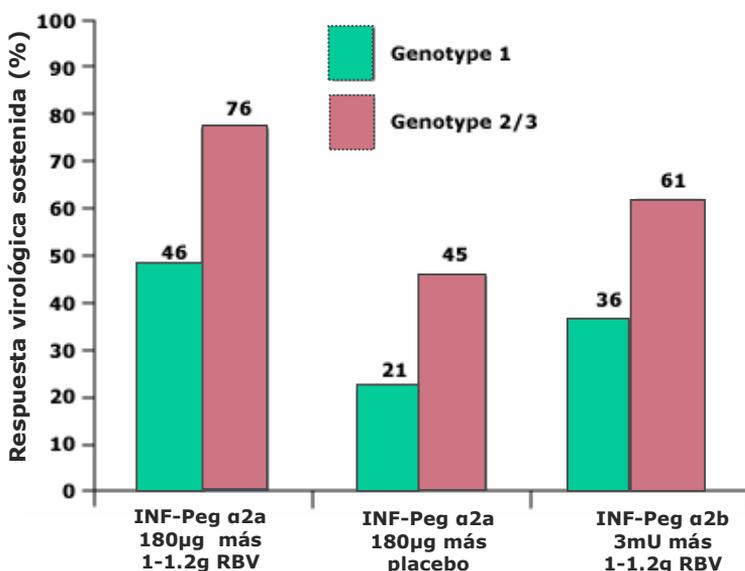
Un avance reciente en el tratamiento de la hepatitis C fue el desarrollo de un INF de acción prolongada, el INF-Peg que tiene la ventaja de que se administra una vez a la semana. Está producido por la unión covalente de polietilenglicol a la molécula de INF, lo cual reduce su velocidad de absorción tras su administración subcutánea, reduce el aclaramiento renal y celular, y disminuye la inmunogenicidad de la proteína (Shiffman, 2001).

Hoy en día hay dos formulaciones de INF-Peg aprobadas para el tratamiento de la HCC: alfa-2a (*Pegasys*<sup>®</sup>, de Roche) y alfa-2b (*Peg-intron*, de Schering-Plough). Han sido varios los estudios que comparan la eficacia de ambos combinados con RBV. Uno sistemático realizado por Cochrane sobre ensayos clínicos aleatorizados en los que se comparaban los dos tipos de INF-Peg con respecto a las tasas de RVS, confirmó las ventajas del alfa-2a,

## Introducción

mientras que el tipo e incidencia de efectos adversos fueron muy parecidos en ambas pautas de tratamiento (Awad y cols., 2009; Ascione y cols., 2010) (**Figura 4**).

Además de las formulaciones de INF-Peg alfa, una formulación de INF lambda se ha desarrollado y está siendo estudiada en pacientes con VHC. Debido a que el receptor INF lambda-1 tiene una distribución más limitada que el alfa, quizás tenga menos efectos adversos (Muir y cols., 2010).



**Figura 4.** Tasas de RVS con INF-Peg alfa-2a o alfa-2b y RBV en función del genotipo viral.

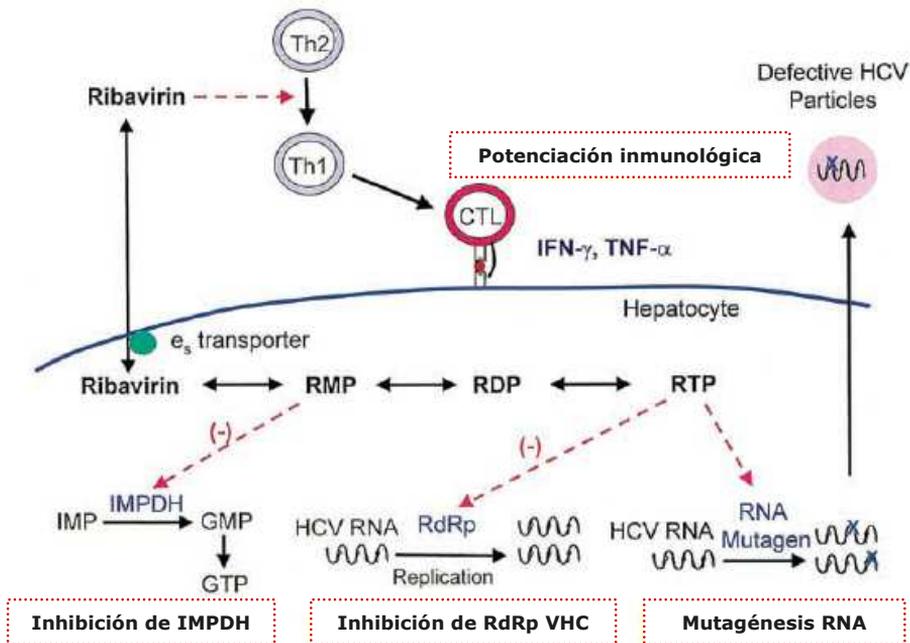
### 1.5.3 RIBAVIRINA (RBV)

La RBV es un análogo de nucleósido (guanosina) que se administra por vía oral variando la dosis en función del peso. La RBV, que no reduce significativamente la carga viral (CV) del VHC cuando se usa en monoterapia, es capaz de aumentar las tasas de RVS cuando se combina con IFN-Peg y además reduce la inflamación hepática (Jain y cols., 2010).

Los mecanismos propuestos para explicar el efecto sinérgico de RBV cuando se administra con INF son (Lau y cols., 2002; Chung y cols., 2008) **(Figura 5)**:

- a)** Potenciación de la inmunidad celular del huésped frente a las infecciones víricas.
- b)** Efecto antiproliferativo de la RBV sobre los linfocitos gracias a la inhibición de la enzima iosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) del huésped que limita la síntesis de guanosina trifosfato (GTP), lo cual disminuye la síntesis de ácidos nucleicos (Mori y cols., 2011).
- c)** Inhibición directa de la replicación del VHC, gracias a que produce una síntesis anormal del extremo 5´ del ARN que altera la transcripción viral y suprime la actividad de la polimerasa viral.
- d)** Acción mutágena para el RNA-VHC que empuja al VHC a la "catástrofe de error", ya que la alta tasa de mutación reduce su infectividad.

Sin embargo, en los estudios clínicos, aunque normaliza los niveles de alanina aminotransferasa (GPT), no modifica la viremia, por lo que se postula que pudiera actuar mediante un mecanismo inmunomodulador. Este efecto también se ha comprobado "in vitro", ya que favorece la inmunidad del huésped frente al VHC potenciando una respuesta Th1 frente a Th2 con aumento de citoquinas (IFN-gamma, TNF-alfa, IL-29) que aumentan la lisis de los hepatocitos infectados y reduce la producción de viriones (Feld y cols., 2005).



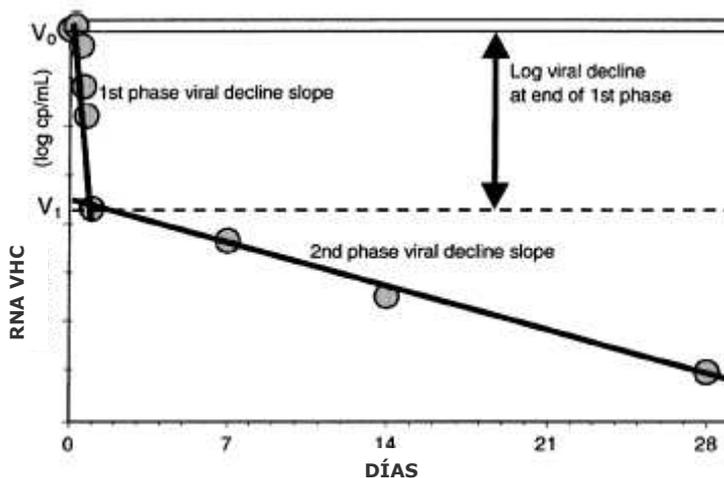
**Figura 5.** Mecanismos de acción propuestos de la RBV frente al VHC. GMP monofosfato de guanosa; GTP, guanosa trifosfato; IMPDH, inosina monofosfato deshidrogenada; RDP, difosfato de RBV; RdRp, RNA-polimerasa RNA dependiente; RMP, monofosfato de RBV; RTP, trifosfato de RBV; Th1, T helper 1 y Th2, T helper 2.

### 1.5.4 RESPUESTA AL TRATAMIENTO

El tratamiento con IFN produce una disminución bifásica de la CV (Layden-Almer y cols., 2003; Layden-Almer y cols., 2006) (**Figura 6**):

- En una **primera fase**, durante las primeras 24 horas tras la administración del INF, se observa una rápida disminución de la CV que es dosis dependiente (Guo y cols., 2001). Es debida a la inhibición directa del IFN de la replicación viral. Esta disminución se observa tanto en los pacientes que al final del tratamiento conseguirán una RVS como en los que no (Swain y cols., 2007).

- La **segunda fase** se inicia 24-48 horas después del inicio del tratamiento y en ella el descenso de la CV es más lento. Está determinada tanto por la tasa de mortalidad de las células infectadas (mediante la acción de la respuesta inmune específica) como por la capacidad del IFN de inhibir la replicación viral (Frese y cols., 2001).



**Figura 6.** Disminución bifásica del RNA-VHC al inicio del tratamiento. Con una primera fase de descenso rápido de la CV en las 24 horas iniciales, seguido de una segunda fase más lenta y mantenida.

La forma de evaluar la efectividad del tratamiento del VHC es viendo la respuesta virológica a la terapia, esto es la determinación en suero del RNA-VHC. La predicción de la RVS ofrece numerosas ventajas, ya que ayuda a seleccionar los pacientes e individualizar los regímenes de tratamiento, lo que permite optimizar resultados y reducir costes. Es por ello por lo que a la hora de iniciar un tratamiento antiviral es preciso elaborar una estrategia terapéutica en función de una serie de factores, algunos de los cuales dependen del propio virus (como el genotipo y la CV) y otros exclusivamente del paciente (estado de la fibrosis, estado inmunitario, edad, raza y factores asociados con el síndrome metabólico).

Hay que tener en cuenta el genotipo, ya que los pacientes con genotipos 2,3 reciben tratamiento durante 24 semanas y dosis de RBV de 800 mg/día, mientras que los genotipos 1,4 entre 1000-1200 mg/día de RBV

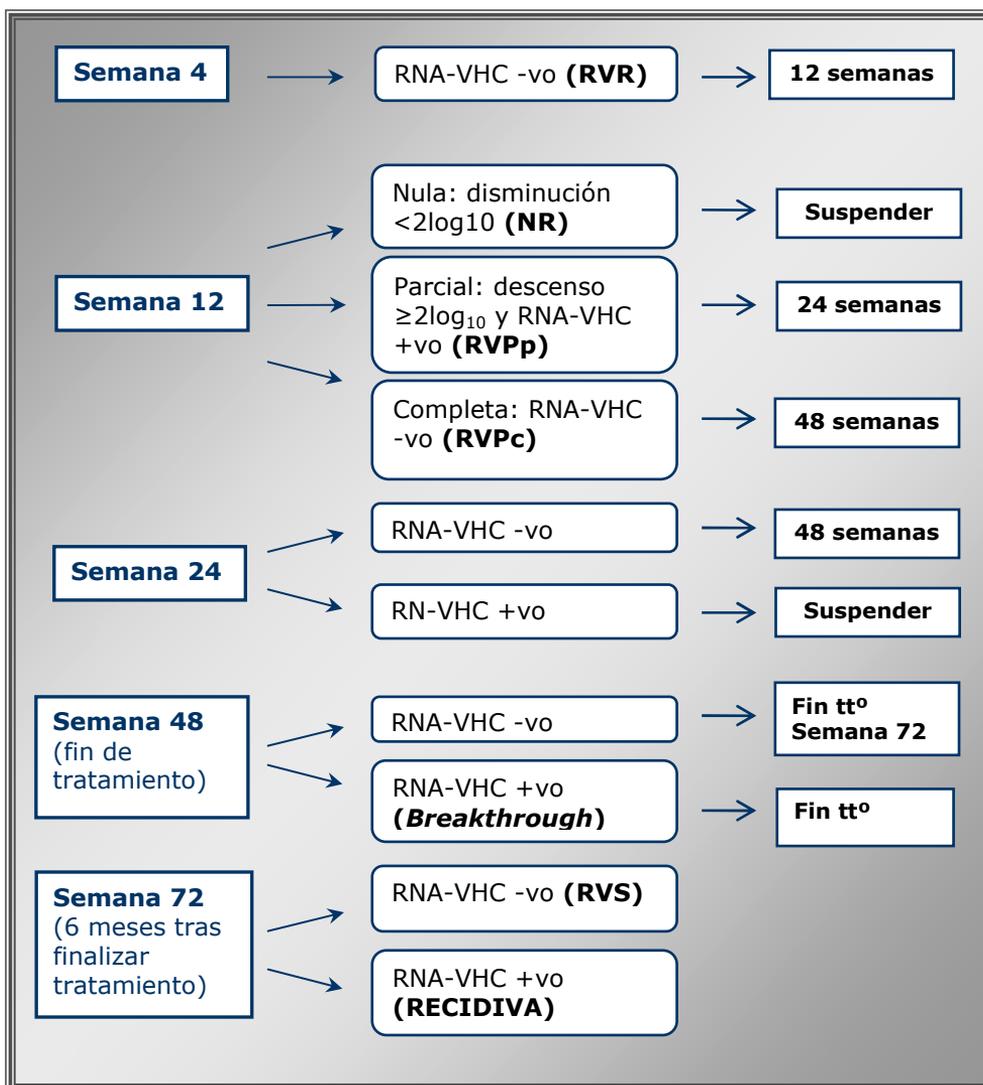
## Introducción

---

según peso (<75 kg: 1000 mg y >75 kg: 1200 mg) y la duración del tratamiento es de 48 semanas. Hay una serie de fechas clave en el seguimiento del tratamiento antiviral, aquí se exponen para los genotipos 1 ó 4 (**Figura 7**):

- **Evaluación de la respuesta tras 4 semanas de tratamiento:** la respuesta virológica rápida (RVR) a la semana 4 de tratamiento se ha reconocido como uno de los factores predictivos de RVS independientes más importantes (Herrmann y cols., 2003). Consiste en la negativización del RNA-VHC en este periodo del tratamiento.
- **Evaluación de la respuesta tras 12 semanas de tratamiento:** durante muchos años la respuesta virológica precoz (RVP) se ha utilizado como el principal factor para tomar decisiones acerca del tratamiento. Aquellos pacientes con descenso del RNA-VHC  $\geq 2 \log_{10}$  UI/ml (100 veces) del basal a la semana 12 de tratamiento se conocen como RVP parcial, se les reevalúa a la semana 24. RVP completa son aquellos con CV indetectable a la semana 12 y se les valorará a las 48 semanas. Por último los respondedores nulos (NR) son los que presentan una caída de menos de 2 logaritmos en los valores de RNA-VHC durante las 12 primeras semanas de tratamiento.
- **Evaluación de la respuesta tras 24 semanas de tratamiento.** Se suspende el tratamiento en los sujetos que presenten RNA-VHC detectable.
- **Evaluación de la respuesta a las 48 semanas de tratamiento.** *Breakthrough* aquellos con RNA-VHC indetectable a las 12 semanas de tratamiento con un RNA-VHC detectable antes de finalizar el mismo.
- **Evaluación de la respuesta a los 6 meses de finalizar el tratamiento:** lograr una RVS (RNA-VHC negativo) es sinónimo de curación. La recidiva se define como la negativización de la CV al término del tratamiento con reaparición del RNA-VHC en el control semestral.

**Figura 7.** Resumen de las fechas clave en el seguimiento del tratamiento antiviral. -vo: CV indetectable; +vo: CV detectable. RVR, respuesta virológica rápida; RVP, respuesta virológica precoz; NR, respondedores nulos; respuesta virológica sostenida, RVS.



En el presente estudio se han tenido en cuenta a los pacientes que no responden finalmente al tratamiento (no-RVS), que incluyen: NR, *breakthrough* y recidivas.

En pacientes con el genotipo 1 previamente no tratados (*naive*), el tratamiento con IFN-Peg y RBV consigue una RVS del 50-55%. Los genotipos 2 y 3 alcanzan una RVS aproximadamente del 80% con menor tiempo de

tratamiento (Hadziyannis y cols., 2004). Los no respondedores al tratamiento con INF convencional en monoterapia o combinado con RBV presentan unas tasas de RVS al tratamiento estándar actual de un 28 y 12% respectivamente (Manns y cols., 2001). El cumplimiento terapéutico es fundamental en estos pacientes, ya que si no reciben al menos el 80% de la dosis inicial la tasa de RVS desciende de forma significativa. La tendencia actual es a individualizar el tratamiento, ya que el beneficio no solo es en el coste, sino también favorece la adherencia al tratamiento y la minimización de sus efectos adversos.

### 1.5.5 NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPEÚTICAS

En la actualidad se están desarrollando nuevos fármacos dirigidos a diferentes dianas moleculares del VHC a los que se les ha denominado antivirales directos. La mayoría se encuentran en diferentes fases de desarrollo clínico, pero dos de ellos pertenecientes al grupo de inhibidores de la serín-proteasa del VHC: boceprevir y telaprevir, ya han sido aprobados por la agencias reguladoras tanto en EEUU como en Europa para administrarse en combinación con INF-Peg y RBV en triple terapia. Puesto que los nuevos antivirales son activos únicamente frente al genotipo 1, los pacientes con genotipos 2, 3 y 4 continuarán siendo candidatos a tratamiento convencional con INF-Peg y RBV, también se podrá considerar esta opción en los de genotipo 1 con factores predictores de buena respuesta (IL28B CC, CV baja...) (Jensen, 2011).

El desarrollo clínico de telaprevir en fase III comprende tres estudios, dos en pacientes *naïve* ADVANCE e ILLUMINATE (Jacobson y cols., 2011; Sherman y cols., 2011) y el tercero REALIZE que incluye pacientes no respondedores (Zeuzem y cols., 2011). El fármaco se administra por vía oral, tres veces al día, recibiendo la triple terapia durante 8-12 semanas, con tasas de RVS 69-75% y recidivas en torno al 9%. Los estudios de fase III de boceprevir se diseñaron con una fase inicial de 4 semanas de *lead in* recibiendo en ella sólo INF-Peg y RBV, en pacientes *naïve* el estudio SPRINT-2 (Poordad y cols., 2011) y en no respondedores RESPOND-2 (Bacon y cols., 2011). El fármaco se administra también por vía oral, tres veces al día, con tasas de RVS 63-66% y recidivas en torno al 9%.

Los principales problemas de la triple terapia son una mayor tasa de efectos adversos, el riesgo de desarrollar resistencias (intra-grupo o con medicamentos de grupos moleculares distintos) y el elevado coste. Se necesitarán futuros estudios para aclarar todas estas cuestiones.

### **1.6 FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTIVIRAL**

Más de 30 índices se han propuesto como "predictores" de la respuesta al tratamiento con IFN (Shiratori y cols., 2000):

#### **1.6.1 RELACIONADOS CON EL VIRUS**

➤ **CARGA VIRAL (CV):** Aunque la cuantificación del RNA viral no ha demostrado ser un factor predictivo para el desarrollo de lesión hepática asociada al VHC o de progresión de la enfermedad, la evaluación de la CV antes, durante y tras el tratamiento es una importante herramienta para predecir los resultados del mismo. Una baja CV basal (<600000-800000 UI/ml) ha demostrado ser un factor predictivo de RVS independientemente del genotipo viral en numerosos estudios (Shiratori y cols., 1999; Ghany y cols., 2009).

➤ **GENOTIPO VIRAL:** En numerosos estudios el genotipo 1b del VHC se ha mostrado como factor de mal pronóstico respecto al resto de genotipos y se ha relacionado con una peor evolución de la infección (Ghany y cols., 2009). De hecho la tasa de RVS en los pacientes con genotipo 1 se estima en torno al 40-50%, mientras que para los genotipos 2 y 3 es, aproximadamente, del 80% (Fried y cols., 2002; Hadziyannis y cols., 2004; Zeuzem y cols., 2004).

El genotipo es el factor que más importancia tiene en el tratamiento, tanta que, aunque la dosis de IFN permanece fija, la duración del tratamiento y la dosis de RBV variarán en función del genotipo. Las indicaciones establecidas en cuanto a la dosis de RBV son: en aquellos pacientes con genotipo 1 ó 4 del VHC, entre 1000-1200 mg/día según peso ( $\leq 75$  kg,

1.000 mg y >75 kg, 1.200 mg), y 800 mg/día en los genotipos 2 ó 3. La duración del tratamiento es de 48 semanas en los pacientes con genotipo 1 ó 4 y de 24 semanas en aquellos con genotipo 2 ó 3.

Los motivos de esta diferente sensibilidad al IFN según los genotipos no se conoce bien. Se ha postulado que el genotipo 1 es distinto de los genotipos 2 y 3 en los sitios de corte de la ribonucleasa L, encargada de degradar el RNA viral. Además, existe una región de 12 aminoácidos de la proteína E2 del genotipo 1 que presenta una intensa homología con el factor de iniciación que permite la actividad antiviral de la proteína PKR, lo que haría que el genotipo 1 fuese más resistente al efecto antiviral del IFN que los genotipos 2 y 3 (Gale y cols., 2005).

➤ **CUASIESPECIES:** Se ha descrito que las mutaciones de varias regiones subgenómicas del VHC podrían influir en la respuesta al tratamiento con IFN. Secuencias dentro de las regiones PKRBD, ISDR y región variable 3 (V3) (Enomoto y cols., 1996; Sarrazin y cols., 2001; Macquillan y cols., 2004).

De hecho se ha demostrado que la presencia de más de 4 mutaciones en la región PKRBD es un factor predictivo de la RVS y RVP en pacientes con HCC genotipo 1 y que han recibido tratamiento combinado con IFN-Peg y RBV, aunque no lo es de la RVR (Muñoz de Rueda y cols., 2008).

### **1.6.2 RELACIONADOS CON EL TIPO DE TRATAMIENTO**

Aquí se incluyen la dosificación según el peso de la RBV, la dosis, duración y tipo de INF, los efectos secundarios y la adherencia al tratamiento.

➤ **ELECCIÓN DEL TRATAMIENTO:** el INF-Peg es superior al INF estándar para el tratamiento de la infección crónica por el VHC. De las dos formas disponibles los datos sugieren que las tasas de RVS son mayores en pacientes tratados con INF-Peg alfa-2a (Awad y cols., 2009; Ascione y cols., 2010). Además, el tratamiento combinado con INF-Peg y RBV es superior al INF-Peg en monoterapia.

➤ **DOSIS DE RIBAVIRINA (RBV):** ajustar la dosis según el peso del paciente mejora las tasas de respuesta. Esto fue probado mediante un ensayo clínico que incluyó 5.027 pacientes asignados al azar a recibir INF-Peg alfa-2b y RBV, como una dosis fija (800 mg/día) o según el peso (800 mg/día <65 kg, 1000 mg/día 65-85 kg, 1200 mg/día 85-105 kg y 1400 mg/día 105-125 kg (Shiffman y cols., 2007).

➤ **ADHERENCIA AL TRATAMIENTO:** el cumplimiento de las dosis prescritas de la terapia es un determinante importante de la RVS, especialmente en pacientes infectados con el genotipo 1.

Sin embargo, los datos sobre el impacto de la reducción/discontinuidad de las dosis de INF-Peg y RBV son contradictorios. Una limitación de los estudios que analizan el impacto de las reducciones de dosis en la RVS fue que se llevaron a cabo de forma retrospectiva con los datos de ensayos clínicos que no fueron diseñados para evaluar el impacto de la adhesión. Además, la mayoría de las "no-adherencias" fueron secundarias al protocolo de reducciones de dosis en respuesta a la presencia de eventos adversos. Puesto que esta información puede ser útil en el tratamiento de los pacientes que recibieron INF-Peg y RBV para el tratamiento de la HCC, las limitaciones de este tipo de análisis se deben tener en cuenta.

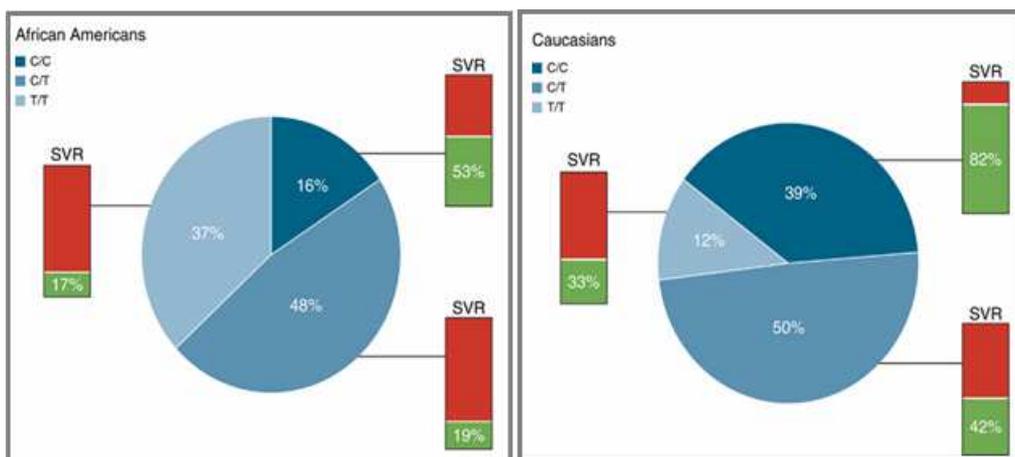
➤ **EFFECTOS SECUNDARIOS DEL TRATAMIENTO:** pacientes que desarrollan anemia durante el tratamiento parecen tener una mayor RVS. Sulkowski y cols. (2010) incluyeron 3.023 pacientes con genotipo 1 naive que recibieron terapia combinada, y observaron que aquellos en los que la hemoglobina se redujo más de 3 g/dL tenían más probabilidad de alcanzar una RVS que los pacientes cuya hemoglobina se redujo 3 g/dl o menos (44% vs 30%). Mayores tasas de respuesta también parecen relacionarse con el grado de reducción en el peso corporal y la disminución del recuento plaquetario y de glóbulos blancos durante el tratamiento (Lindsay y cols., 2008).

### 1.6.3 RELACIONADOS CON EL PACIENTE Y LA ENFERMEDAD

#### 1.6.3.1 Edad, sexo, etnia

Las características del paciente tales como mayor edad, sexo masculino y raza (Africano o Hispano frente Caucásico o Asiático) se han asociado con peores tasas de RVS.

La raza es un importante predictor de la respuesta al tratamiento. Los afroamericanos tienen menores tasas de respuesta que los blancos, y los latinos tienen menores tasas de respuesta de los blancos no latinos (Muir y cols., 2004; Rodríguez-Torres y cols., 2009). Estas diferencias pueden explicarse, al menos en parte, por las variaciones en el gen IL28B, ya que determinados polimorfismos de la IL28B están diferencialmente representados en los diversos grupos raciales. En un estudio de 1.137 pacientes tratados con INF-Peg+RBV, Ge y cols. (2009) encontraron que el polimorfismo de un único nucleótido rs12979860 fue el mayor factor predictivo de RVS, por tanto el polimorfismo de la IL28B además de explicar las diferencias en cuanto a la RVS dentro de un grupo de población, también lo hace entre grupos de poblaciones de diferentes etnias (**Figura 8**).



**Figura 8.** Representación de la diferente distribución de los genotipos de la IL28B según la raza y tasas de respuesta de cada uno de ellos. SVR, respuesta virológica sostenida. (Datos de Ge y cols., Nature 2009).

### 1.6.3.2 Síndrome metabólico

Al analizar la repercusión de los principales factores metabólicos implicados en la posibilidad de curación de la hepatitis C, se ha encontrado que el perímetro de cintura, la resistencia a la insulina, el índice de masa corporal, la esteatosis y la fibrosis hepática, así como la hipertensión arterial, eran más frecuentes en el grupo de no respondedores a la terapia antiviral (Tarantino y cols., 2006). Todo ello avala que el síndrome metabólico tiene un papel fundamental en las posibilidades de curación.

### 1.6.3.3 Fibrosis

La tasa de progresión de la fibrosis actúa como un predictor independiente de la respuesta en pacientes con HCC que reciben la terapia antiviral. De hecho se han demostrado mayores tasas de RVS en fibrosadores lentos que en los rápidos (Myers y cols., 2003).

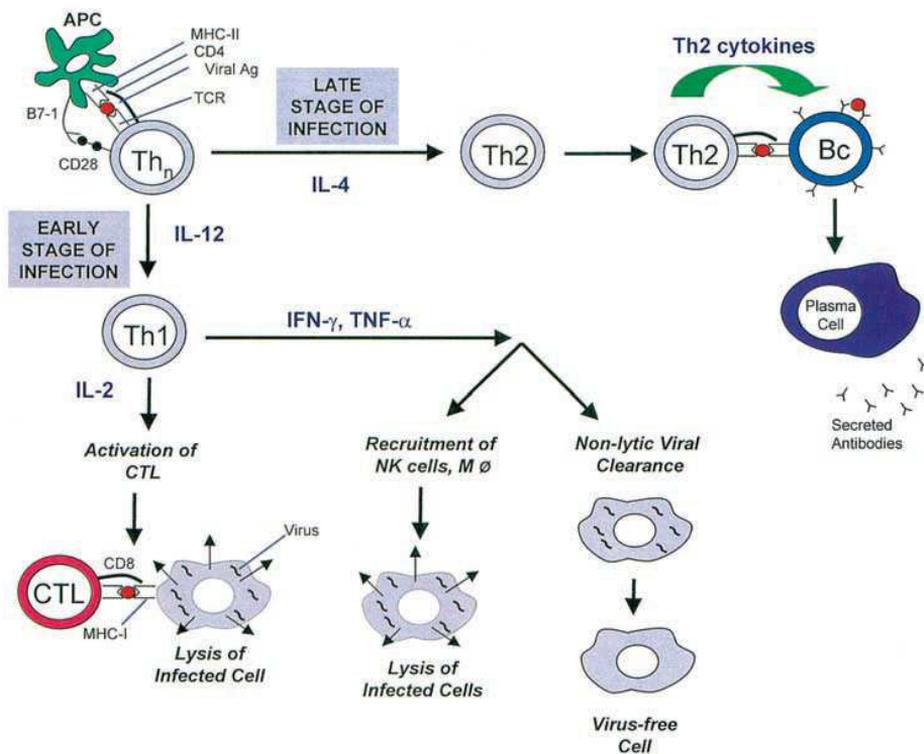
### 1.6.3.4 Sistema inmune

La posibilidad de que parámetros genéticos e inmunológicos puedan predecir la respuesta al tratamiento ha despertado un gran interés. La respuesta inmune a cualquier infección viral se compone de una respuesta a cargo de células NK, polimorfonucleares y macrófagos que se activan de forma no específica y que proporcionan el tiempo suficiente a las células presentadoras de antígeno (APC) para procesar las proteínas virales y presentarlas a las células B, linfocitos Th (CD4+) y T citotóxicos (Tc, CD8+). Los linfocitos Tc reconocen a los antígenos cuando están asociados con moléculas HLA (*Human leukocyte antigen*), genes que constituyen el MHC (localizado en humanos en el cromosoma 6, donde se codifican tres grandes grupos: HLA clase I, II y III).

Tras la activación de receptores específicos de los linfocitos Th, estos activan la diferenciación de células B y estimulan a los linfocitos Tc específicos contra el virus. Se distinguen dos tipos principales de células cooperadoras: Th1 y Th2. La presentación de los antígenos virales por las APC a los linfocitos

## Introducción

Th induce la diferenciación de los Th1 en la infección temprana (mediada por IL-12) y de las Th2 en la última etapa de la infección (mediada por IL-4). Las células Th1 activas secretan citoquinas como IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , que producen: (a) la activación de los linfocitos Tc, (b) el reclutamiento de células NK y macrófagos hacia el sitio de la infección, y (c) la eliminación no lítica del virus de las células infectadas. Las células Th2 activadas liberan citoquinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) que activan las células B antígeno específicas para proliferar y diferenciarse en células B memoria y células secretoras de anticuerpos específicos contra el virus (los anticuerpos específicos para VHC son detectables entre las siete u ocho semanas después de la infección) (Lau y cols., 2002) (**Figura 9**).



**Figura 9.** Activación del sistema inmune tras una infección viral. APC, células presentadoras de antígeno; Th<sub>n</sub>, células T helper CD4<sup>+</sup>; Bc, células B antígeno específicas; M $\phi$ , macrófagos; CTL, células T citotóxicas (Imagen de Lau y cols., Hepatology 2002).

Por tanto, una respuesta dominada por citoquinas de tipo Th1 favorece la inmunidad celular antiviral dirigida por las células Tc y NK, mientras que una respuesta en la que predominan citoquinas Th2 inhibe la respuesta Th1 y favorece la producción de anticuerpos por los linfocitos B. La función de estos anticuerpos ha sido cuestionada porque no previenen la reinfección, además varios estudios han puesto de manifiesto que el tipo de citoquinas secretadas por las células CD4+ específicas desempeñan un papel relevante en la evolución de la infección aguda. De manera que una respuesta CD4+ caracterizada por la secreción de citoquinas Th1 se asocia con la infección aguda autolimitada, mientras que la secreción de citoquinas Th2 se asocia con el curso a la cronicidad (Tsai y cols., 1997).

La respuesta innata es la primera línea de defensa contra los patógenos desempeñando un papel clave las células NK. Las NK son linfocitos derivados de la médula ósea que comparten un progenitor común con las células T, no expresan receptores específicos de antígenos en la superficie celular y constituyen el 10-15% de todos los linfocitos circulantes (Caligiuri, 2008). Mientras que los linfocitos T y B se activan gracias a la detección de antígenos como ya se ha comentado, las células NK están reguladas por un equilibrio de señales intracelulares gracias a la presencia de receptores activadores e inhibidores (MacFarlane y cols., 2006). Éstas actúan reconociendo las células anormales (tumoraes o infectadas por virus) e induciendo la apoptosis de la célula diana gracias a la secreción de gránulos citolíticos que contienen perforinas y granzimas, todo ello sin sensibilización previa. También producen citoquinas inflamatorias (como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos) capaces de inhibir la replicación de patógenos virales y activar la respuesta inmune adaptativa (Wu y cols., 2003; Smyth y cols., 2005).

Las células NK poseen una variedad de receptores cuya función es el reconocimiento e interacción con moléculas de clase I del MHC, también conocidas como moléculas HLA clase I. Hay tres tipos de receptores que reconocen moléculas HLA clase I (Torres-García y cols., 2008):

**1)** Heterodímeros formados por la asociación de dos moléculas con dominio lectina tipo C, como son **CD94** y **NKG2**, codificados por los genes del complejo de receptores de células NK en el cromosoma 12p13.1.

## Introducción

2) Pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, los **KIRs** (*killer cell Ig-like receptors*), también conocidos como CD158 y codificados por genes del complejo de receptores de leucocitos en el cromosoma humano 19q13.4

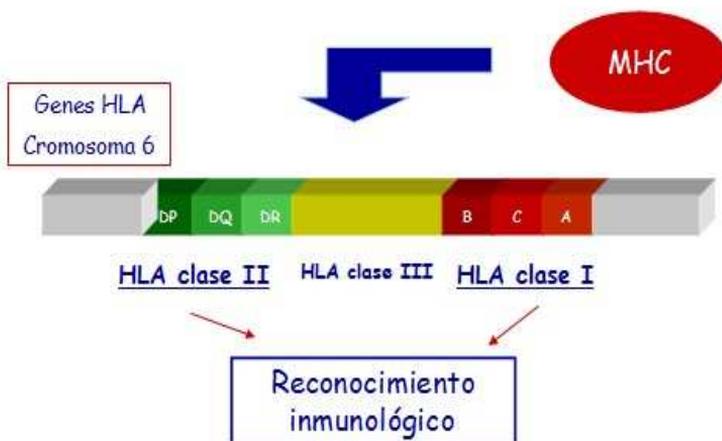
3) El tercer tipo también pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, los **ILTs** ó *immunoglobulin like transcripts*, codificados por genes del complejo de receptores de leucocitos.

### 1.6.3.5 Factores genéticos del hospedador

#### A) MOLÉCULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD

##### ➤ GENÉTICA Y ESTRUCTURA:

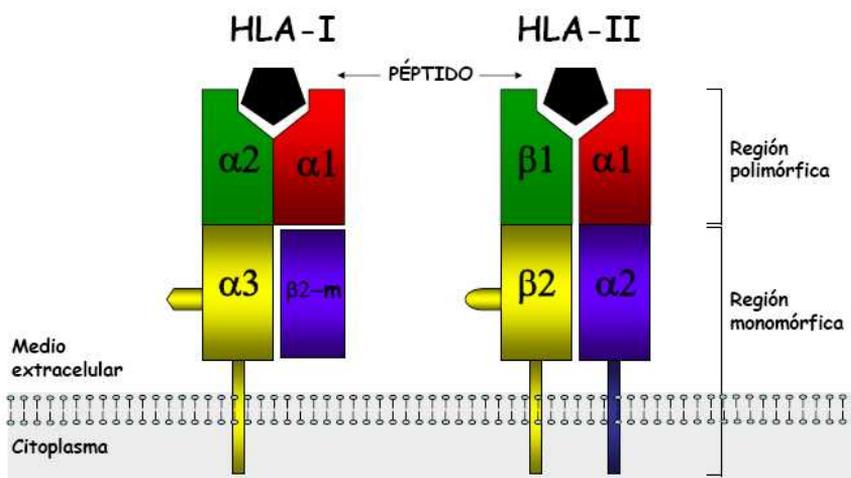
El MHC en humanos se localiza en el cromosoma 6, donde se hallan codificados tres grandes grupos: HLA clase I, II y III. Las moléculas de clase I y II intervienen en el reconocimiento inmunológico. A su vez los de clase I se disponen en tres subregiones clásicas: HLA-A, -B y -C y los de clase II en las subregiones -DP, -DQ y -DR. La región III contiene genes que codifican proteínas del complemento: factor B, C2 y C4 y el citocromo P-450 y la 21-hidroxilasa (**Figura 10**).



**Figura 10.** Genética del MHC. MHC, complejo principal de histocompatibilidad.

La región genética de un cromosoma que contiene todos los genes HLA (a excepción de los que codifican la beta-2-microglobulina) se denomina haplotipo. Así pues, un haplotipo HLA incluye los genes de clase I, clase II y otros loci que codifican moléculas implicadas en el procesamiento de péptidos y posterior presentación en la superficie celular.

Las moléculas HLA de clase I se hallan constituidas por dos cadenas polipeptídicas: una cadena pesada  $\alpha$ , de mayor tamaño, glicosilada, que se encuentra asociada mediante interacciones no covalentes a una cadena ligera, la  $\beta$ -2-microglobulina que es idéntica en todos los individuos de la misma especie y se expresa en el cromosoma 16, por tanto, no es polimórfica en el hombre. La cadena pesada  $\alpha$  es altamente variable entre individuos de la misma especie, siendo la responsable del polimorfismo de estas moléculas. En ella se distinguen tres zonas: una extracelular de mayor tamaño en la que se encuentran los determinantes antigénicos de la molécula, una pequeña región transmembrana, y una región intracitoplasmática. La zona extracelular se halla organizada en tres dominios denominados  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2 y  $\alpha$ -3 mantenidos por puentes intracatenarios. Los dominios  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 constituyen regiones de contenido variable en aminoácidos mientras que el dominio  $\alpha$ -3 es bastante constante (Hassan y cols., 2011) (**Figura 11**).



**Figura 11.** Estructura de las moléculas HLA clase I y II (Hassan y cols., 2011).

## **Introducción**

---

Las moléculas HLA de clase II son glicoproteínas que se encuentran en la superficie celular. Están formadas por dos cadenas denominadas cadena  $\alpha$  ó pesada y cadena  $\beta$  ó ligera, asociadas mediante interacciones de naturaleza no covalente. Están constituidas por dos dominios extracelulares,  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 y  $\beta$ -1 y  $\beta$ -2 en cada una de ellas, un dominio transmembrana y otro intracitoplasmático (**Figura 11**).

### ➤ **POLIMORFISMOS DE HLA:**

El MHC es poligénico y los genes que lo constituyen son codominantes y polimórficos, esto es que cada locus concreto del complejo MHC posee multitud de variantes alélicas dentro de las poblaciones naturales de cada especie.

Cada individuo hereda un juego de MHC del padre y otro de la madre, cada grupo completo de alelos heredado de un progenitor se denomina haplotipo, siendo los dos alelos de cada locus de expresión codominante. No obstante existen zonas conservadas que son casi idénticas en todos los individuos y otras altamente variables (Yunis y cols., 2003).

Se han descrito más de mil alelos para HLA de clase I y más de 500 para el de clase II. El polimorfismo se debe predominantemente a cambios aminoacídicos en los dominios  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 de la cadena pesada, ya que el  $\alpha$ -3 y la región transmembrana son menos polimórficas. Dicho polimorfismo alélico es muy importante ya que origina las diferencias de la respuesta inmune restringida por HLA I. Por ejemplo la sustitución de algunos aminoácidos es suficiente para alterar la serología y el reconocimiento de las células T, esto sugiere que las variaciones en las secuencias de aminoácidos de la zona de unión al antígeno son seleccionadas evolutivamente posiblemente porque confieren una ventaja funcional para la respuesta inmune (Strominger., 2002).

El polimorfismo de las moléculas HLA es el resultado de un largo proceso evolutivo ejercido por la presión de distintos agentes infecciosos que han contribuido a la creación de nuevos alelos. Algunos como resultado de mutaciones puntuales, mientras que otros proceden de la combinación de secuencias completas entre diferentes alelos bien mediante recombinación génica, o por un proceso denominado conversión génica según el cual una

secuencia es reemplazada por otra semejante de un gen homólogo (Shao y cols., 2004).

### ➤ **RELACIÓN ENTRE HLA Y VHC:**

La mayoría de las células infectadas por virus exhiben péptidos antigénicos en la superficie de sus membranas plasmáticas asociadas al HLA, que son reconocidos por las células Tc mediante su receptor TCR. De esta forma se ha podido demostrar en animales que las células Tc que reconocen un haplotipo HLA determinado son incapaces de lisar células que tienen un haplotipo diferente, aunque estén infectadas por el mismo virus. Este fenómeno se denomina citotoxicidad restringida por el haplotipo o restricción MHC.

No existen evidencias de que el VHC sea directamente citopático. Por el contrario, la patogénesis de la HCC está mediada por los linfocitos Tc CD8+ que reconocen el complejo "antígeno viral-molécula HLA de clase I" expresado en la superficie de la célula diana, activándose y posteriormente destruyendo las células infectadas por citólisis directa o mediante inducción de apoptosis.

Los genes HLA juegan un papel muy importante en la fisiopatología de la hepatitis C, ya que intervienen en la susceptibilidad a la enfermedad, en la progresión de las lesiones y en la respuesta al tratamiento (Harris y cols., 2008).

Hasta la fecha, lo más estudiado ha sido la correlación entre los alelos HLA y el aclaramiento espontáneo de la hepatitis aguda C siendo muchos los alelos HLA encontrados, en especial el DQB1\*0301 y el DRB1\*11. De hecho hay un metanálisis publicado en el año 2005 que demuestra que ambos alelos están relacionados con el aclaramiento viral espontáneo, siendo los más repetidos en distintas poblaciones (Hong y cols., 2005).

Se ha estudiado a nivel mundial si existe o no una asociación entre las moléculas HLA y la respuesta del tratamiento antiviral con IFN. No se ha encontrado hasta la fecha una asociación repetitiva y clara entre un determinado alelo HLA y la respuesta, como ocurría en el caso del aclaramiento viral espontáneo (DQB1\*0301 y DRB1\*11), y con resultados contradictorios dependiendo de la raza que se estudie (Singh y cols., 2007).

Por otro lado estos resultados varían en función de los genes evaluados y el método de genotipado. Únicamente el locus HLA-DR parece ser un factor inmunogenético relacionado con la respuesta al tratamiento (Singh y cols., 2007).

Ha sido publicado recientemente por nuestro grupo de investigación que el alelo HLA-DQB1\*0301 se asocia significativamente con la RVS en pacientes tratados con INF-Peg y RBV (Muñoz de Rueda y cols., 2011).

## **B) RECEPTORES KIRS**

### ➤ **GENÉTICA KIRS:**

Los receptores KIRs pueden ser inhibidores o activadores de las células NK y los genes que los codifican están situados en el cromosoma 19 (19q13.4).

Se han identificado 14 genes altamente polimórficos que codifican los receptores KIRs: 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5 y 3DS1, incluyendo dos pseudogenes: KIR2DP1 y KIR3DP1. Estos genes varían respecto a su presencia o ausencia entre los diferentes haplotipos KIR creando gran diversidad en el número de genotipos KIR de la población.

En ocasiones es compleja la distinción entre el número de genes KIR individuales y los alelos de un mismo gen, por ejemplo genes con nombres distintos: KIR3DL1 y KIR3DS1 ahora se consideran alelos; lo mismo ocurre con 2DL2 y 2DL3, por lo que es frecuente referirse a estos genes como 2DL2/3 y 3DL1/S1 (Middleton y cols., 2009; Campbell y cols., 2011) (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Tipos de genes KIRs y sus ligandos HLA clase I.

ACCIÓN	KIRs	Nº de alelos	GRUPO HLA	Gen conservado	Relacionado Con
Inhibidora	<b>2DL1</b>	26	C2		
Inhibidora	<b>2DL2</b>	15	C1, algunos C2 y B		
Inhibidora	<b>2DL3</b>	11	C1, algunos C2 y B		Aclaramiento viral espontáneo
Inhibidora/activadora	<b>2DL4</b>	27	G	SI****	
Inhibidora	<b>2DL5A*</b>	10	Desconocido		
Inhibidora	<b>2DL5B*</b>	21	Desconocido		
Activadora	<b>2DS1</b>	15	C2**		
Activadora	<b>2DS2</b>	20	C1**		
Activadora	<b>2DS3</b>	12	C1**		
Activadora	<b>2DS4</b>	30	Algunos C1,C2 y A*11**		
Activadora	<b>2DS5</b>	14	Desconocido		
Inhibidora	<b>3DL1</b>	59	Bw4, algunos A		
Inhibidora	<b>3DL2</b>	25	Algunos alotipos A	SI****	
Inhibidora	<b>3DL3</b>	56	Desconocido	SI****	
Activadora	<b>3DS1</b>	16	Bw4***		Protector CHC
-	<b>2DP1</b>				
-	<b>3DP1</b>			SI****	

\* El gen KIR2DL5 está duplicado y codificado por dos loci separados del grupo de genes del complejo de receptores de leucocitos. \*\* El receptor KIR se une a las moléculas HLA con baja afinidad. \*\*\* Hay estudios contradictorios sobre si el HLA-Bw4 es un ligando para 3DS1 (O'Connor y cols., 2007; Alter y cols., 2007). \*\*\*\* Gen conservado en la mayoría de los haplotipos.

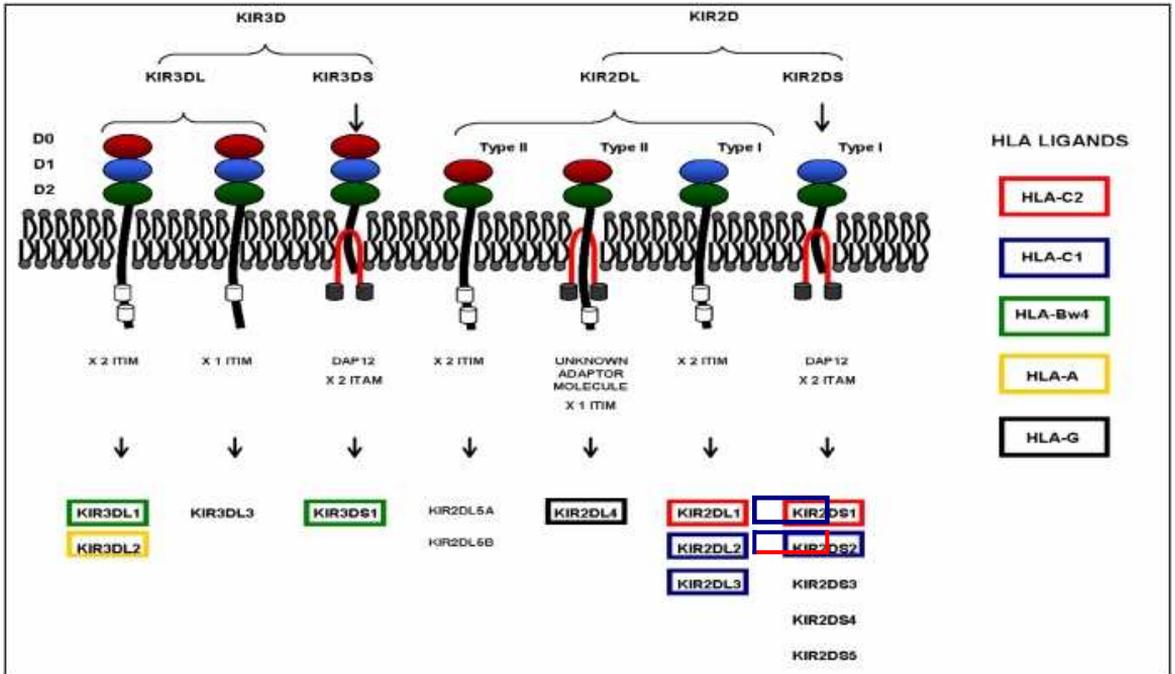
### ➤ **NOMENCLATURA:**

Los nombres dados a los genes KIR por un subcomité del Comité de Nomenclatura de la Organización Mundial de la Salud para los factores del sistema HLA, se basan en las estructuras de las moléculas que codifican (Marsh y cols., 2003). Se denominan añadiendo a la palabra **KIRs** un sufijo que indica el número de dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina que poseen: **2D** o **3D**, seguido de las letras **L** (*long*) o **S** (*short*) según que la cola citoplasmática de estas moléculas sea larga o corta y un último dígito que establece la diferencia entre estructuras similares codificadas por diferentes genes. Cuando dos o más genes tienen estructuras y secuencias muy similares, se les asigna el mismo número pero se distinguen por una letra final, por ejemplo, los genes KIR2DL5A y KIR2DL5B (Gómez-Lozano y cols., 2002).

En cuanto a los dígitos finales: los tres primeros distinguen alelos que difieren en las secuencias exón que llevan a cambios no sinónimos. Los siguientes dos dígitos indican alelos que difieren en las secuencias exón que conducen a cambios sinónimos y los dos últimos dígitos se utilizan para los alelos que sólo difieren en un intrón, promotor u otra región no codificante (Middleton y cols., 2009). *Ejemplo: KIR2DL1 \* 003 02 02*

### ➤ **ACCIÓN:**

Los KIRs con colas citoplasmáticas cortas (S) median la activación de las células NK y son: 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5 y 3DS1 (**Tabla 3, Figura 12**). Estos se asocian a una proteína adaptadora DAP12 (también llamada KARAP) a través de residuos cargados complementarios situados en sus membranas. DAP12 posee motivos de activación del inmunorreceptor basados en tirosina (ITAM), que le permiten fosforilar y reclutar tirosin kinasas de la familia Syk o ZAP-70 que conducen a la activación celular (MacFarlane y cols., 2006; Campbell y cols., 2011) (**Figura 12**).



**Figura 12.** Estructura proteica de KIRs y sus ligandos: los ligandos de cada KIRs se muestran con pequeños recuadros de diferentes colores (los ligandos para KIR3DL3, KIR2DL5A, KIR2DL5B y KIR2DS5 se desconocen).

Los KIRs con colas largas (L) transmiten señales inhibitorias de NK (Ahlenstiel y cols., 2005) y son: 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 3DL1, 3DL2 y 3DL3 (**Tabla 3, Figura 12**). Tienen motivos de inhibición del inmnoceptor basados en tirosina (ITIMs), que si se fosforilan reclutan tirosin fosfatasas (como SHP-1 y SHP-2) capaces de inhibir la actividad de las NK (MacFarlane y col., 2006; Campbell y cols., 2011) (**Figura 12**). Por otro lado la acción inhibitoria ejercida por los receptores después de reconocer a su ligando en la célula (HLA clase I) tiene una gran importancia fisiológica, pues previene la destrucción de las células normales del huésped.

La única excepción a esta regla de cola larga/corta es KIR2DL4, ya que se trata del único KIR activador con cola larga. Se asocia con el ITAM a través de un adaptador, FcεRI-γ, en lugar de DAP12 (Campbell y cols., 2011) (**Figura 12**).

## **Introducción**

---

Como ya se ha comentado es compleja la distinción entre el número de genes KIR individuales y los alelos de un mismo gen, de manera que genes nombres distintos: KIR3DL1 y KIR3DS1 ahora se consideran alelos de un mismo gen (Norman y cols., 2007; Middleton y cols., 2009). Lo mismo ocurre con 2DL2 y 2DL3, por lo que es frecuente referirse a estos genes como 2DL2/3 y 3DL1/S1.

Se han identificado dos pseudogenes KIR: el gen 2DP1 y 3DP1; se piensa que dichos pseudogenes son parte de genes KIR ancestrales. La región donde se encuentra el complejo génico está flanqueada por genes conservados (KIR3DL2, KIR3DL3, KIR3DP1 y KIR2DL4) cuya posición y permanencia en los haplotipos es prácticamente universal (Parham y cols., 2005) (**Tabla 3**).

### ➤ **LIGANDOS:**

Las moléculas HLA-Cw se han clasificado en dos grupos también conocidos como alotipos serológicos. La presencia de Serina en la posición 77 y Aspargina en la posición 80 determinan al grupo C1 y la presencia de Aspargina 77 y Lisina 80 determinan al grupo C2. Las moléculas KIR 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DS1 y 2DS4 interactúan con alotipos HLA-C de grupo C2 (tales como -Cw\*2, -Cw\*4, -Cw\*5, -Cw\*6, -Cw\*15, -Cw\*17 y -Cw\*18). Mientras que moléculas como 2DL2, 2DL3, 2DS2, 2DS3 y 2DS4 interactúan con alotipos del grupo C1 (-Cw\*1, -Cw\*3, -Cw\*7, -Cw\*8, -Cw\*12, -Cw\*13, -Cw\*14 y -Cw\*16) (Parham y cols., 2005) (**Tabla 3**).

El alotipo HLA-Bw4 (que incluye los alelos: B05, B5102, B5103, B13, B17, B27, B37, B38, B44, B47, B49, B51, B52, B53, B57, B58, B59, B63, B77, A09, A23, A24, A2403, A25, A32) sirve como ligando para KIR3DL1 y KIR3DS1, aunque hay estudios contradictorios sobre si el HLA-Bw4 es un ligando para 3DS1 (O'Connor y cols., 2007; Alter y cols., 2007). El alotipo HLA-G es el ligando de KIR2DL4 y el HLA-A para el KIR3DL1, KIR3DL2 y KIR2DS4, aunque este último con baja afinidad (Parham y cols., 2010; Campbell y cols., 2011) (**Tabla 3, Figura 12**).

### ➤ **HAPLOTIPOS:**

Los genotipos se pueden agrupar basándose en el contenido de genes KIR en dos haplotipos: A y B. La base de ambos son cuatro genes que se encuentran, con muy pocas excepciones, en todos los individuos: KIR2DL4, KIR3DL2, KIR3DL3 y KIR3DP1 (Wilson y cols., 2000; Parham y cols., 2005).

El **haplotipo A** suele no ser variable en la organización de genes, con un máximo de ocho: los cuatro de la estructura y KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DS4 y KIR3DL1. De hecho, el 95% de la población genotipada tiene un genotipo que consiste en dos haplotipos idénticos con los ocho genes (Martin y cols., 2000; Middleton y cols., 2009).

El **haplotipo B** se define por la presencia de uno o más de los genes que codifican la activación de KIRs: KIR2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5, KIR3DS1; y de los genes que codifican KIR inhibidores: KIR2DL5A/B y KIR2DL2 (Martin y cols., 2000; Middleton y cols., 2009). La variabilidad en el haplotipo B reside principalmente en la presencia o ausencia de genes y, en menor medida, en los alelos, mientras que en el haplotipo A es muy excepcional la variabilidad en el contenido de genes, pero hay mucha variabilidad de alelos. Consistente con esto es el hecho de que los genes inhibidores en general tienen más alelos que los activadores. De los 335 alelos publicados hasta la fecha, 243 son de genes inhibidores y 79 de activadores. Los 13 alelos restantes son aportados por los pseudogenes KIR2DP1 y KIR3DP1 (Robinson y cols., 2005). Además hay que resaltar que genes de los que normalmente se asocian con el haplotipo A pueden encontrarse en el B.

### ➤ **GENOTIPOS KIRS Y ENFERMEDAD:**

Como se ha mencionado los receptores de las NK son altamente especializados en el reconocimiento de MHC clase I (HLA-C, -B y -A, en orden de importancia). Numerosos estudios han demostrado la asociación entre la herencia de ciertas combinaciones de genes KIRs y HLA y la susceptibilidad a varias enfermedades, incluidas infecciones virales, patología autoinmune y cánceres. Además estas combinaciones pueden influir en el embarazo y en el

## **Introducción**

---

resultado del trasplante de células madre hematopoyéticas (Ruggeri y cols., 2002; Hiby y cols., 2004; Yawata y cols., 2006; Purdy y cols., 2009).

Una característica importante de los genes KIR es la falta de conservación entre las diferentes especies y su rápida evolución. Si la evolución de los genes KIR ha estado determinada por la presencia de ciertos patógenos, es de esperar que parte de su diversidad se correlacione con la resistencia o susceptibilidad a ciertas enfermedades infecciosas (Vilches y cols., 2002). En este contexto diversos estudios han demostrado la presencia de combinaciones específicas de genes KIR y sus ligandos HLA que parecen influir en el curso clínico de diferentes enfermedades (Rajagopalan y cols., 2005; Williams y cols., 2005; Khakoo y cols., 2006). Se han documentado asociaciones interesantes entre el KIR3DS1 y un subgrupo de alelos HLA-Bw4 con la progresión lenta de la infección por VIH (Martin y cols., 2002). También se han asociado con la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes. Como KIR2DS1 y/o KIR2DS2 y homocigotos para un grupo de HLA-C (C1C1 ó C2C2), lo cual favorece la susceptibilidad a artritis psoriásica (Nelson y cols., 2004). De manera similar, la combinación KIR2DS2 con HLA-C1, en ausencia de HLA-C2 y Bw4 determina susceptibilidad a diabetes tipo 1 en población caucásica (Van der Slik y cols., 2003).

Las combinaciones KIR-HLA que favorecen la activación de células T o de células NK evolutivamente han sido seleccionadas para mejorar la resistencia a infecciones virales y neoplasias, a pesar de aumentar el riesgo del desarrollo de autoinmunidad. De manera interesante, las combinaciones de genes KIR-HLA que favorecen la inhibición también han sido asociadas con preeclampsia, concretamente HLA-C2 expresado en trofoblastos fetales, KIR2DL1 en células maternas y la ausencia de genes KIR2DS activadores (Hiby y cols., 2004).

En los últimos años se ha hecho énfasis en la importancia de los genotipos KIR en el trasplante de órganos. Actualmente hay diferencias significativas en los resultados en relación con el uso de los genotipos KIR como marcadores que determinan, adicionalmente a los genes HLA, la viabilidad de los trasplantes. También se ha demostrado que la incidencia de enfermedad de injerto contra huésped es mayor en receptores que reciben médula ósea de donadores HLA-idénticos, pero que muestran diferencias en el

genotipo KIR (Ruggeri y cols., 2002; Gagne y cols., 2002). Adicionalmente, se ha encontrado una correlación entre menor supervivencia del trasplante de médula ósea y diferencias en los genes KIR3DL1 o KIR3DS1 entre individuos HLA-idénticos (Davies y cols., 2002). Por otro lado, la presencia de KIR3DL1 y su ligando Bw4 se asocia con menor mortalidad y la presencia de KIR2DS3 como protector para el desarrollo de enfermedad de injerto contra huésped (McQueen y cols., 2007).

### ➤ **RELACIÓN ENTRE KIRS Y VHC:**

Se ha demostrado que la infección crónica por el VHC afecta las funciones de las NK disminuyendo su frecuencia y además suprime la secreción de citoquinas, lo que contribuye al deterioro de la respuesta inmune celular y a la persistencia del virus; aunque no afecta a la citotoxicidad. Se comprobó que estos efectos revertían en los pacientes tratados con INF-Peg y RBV, pero no en aquellos resistentes al tratamiento (Dessouki y cols., 2010).

Por tanto, aunque las células CD8+ juegan un papel importante en el aclaramiento viral espontáneo (fase aguda) del VHC, en la fase crónica el virus puede persistir a pesar de la presencia de dichas células. Se han realizado estudios, como el de Neumann-Haefelin y cols. (2008) que demuestran una frecuencia sorprendentemente elevada de linfocitos Tc a nivel intrahepático en pacientes crónicamente infectados con el VHC, lo que sugiere que deben existir otros factores que contribuyan a su fracaso.

En el caso de la infección aguda por VHC hay varios estudios, como el de Khakoo y cols. (2004) que determinaron los genotipos KIR y HLA de 1.037 individuos que habían sido expuestos al VHC. Observando que los individuos con genotipo homocigótico KIR2DL3/HLA-C1 presentaban una mayor resolución a la infección por VHC que otros genotipos. Aunque esto parezca contradictorio, ya que esta unión inhibe las células NK, demuestra que determinadas acciones inhibitoras son más efectivas que otras, y que lo importante es que estén ausentes ciertas uniones KIRs con HLA clase I que son fuertemente inhibitoras. Esos resultados son opuestos a los de Montes-Cano y cols. (2005) que encuentran que en los pacientes con infección persistente esta aumentada la frecuencia del gen KIR2DL3 y disminuida la de

KIR2DL2 de forma significativa. En cambio Paladino y cols. (2007) demuestran que en pacientes que aclaran el virus predomina un descenso de 2DL2 y 2DS2 acompañado del aumento de 2DS5.

Otros estudios en infección por VHC sugieren que la presencia de genes HLA de clase II como el HLA-DRB1\*1201 y DQB1\*0501, importantes en la presentación de péptidos, influyen en la combinación KIR2DL3/2DL3 con HLA-C1/C1, aumentando la capacidad de control de la infección (Romero y cols., 2008).

Además la pérdida de actividad de las NK se correlaciona con la progresión de la infección hacia CHC. Esto ha sido demostrado recientemente en un trabajo de López-Vázquez y cols. (2005), que analiza si determinados genes KIR (3DL1, 3DS1, 2DL2, 2DL3 y 2DS2) y su interacción con los alelos HLA-B y HLA-C, influyen en la progresión de la infección por el VHC a CHC. Encontrando que la presencia del genotipo HLA-Bw\*4I80/KIR3DS1 es más frecuente en portadores del VHC que en pacientes con CHC.

Son escasos los trabajos que relacionan los polimorfismos genéticos KIRs-HLA con la respuesta al tratamiento con IFN-Peg y RBV en la HCC. Además, se ha estudiado el tipaje KIRs-HLA en relación con la HCC en muchos países y en distintas razas étnicas, pero son pocos los datos en España. Por tanto, en el presente estudio tratamos de confeccionar un "mapa" genético que permita conocer que tipo de pacientes responderán mejor al tratamiento con IFN-Peg y RBV.

### **C) IL28B Y GENES DEL INTERFERÓN**

#### ➤ **IL28B:**

Muy recientemente, un polimorfismo de un único nucleótido (SNP, *single nucleotide polymorphism*) en el cromosoma 19q13, rs12979860, se ha asociado fuertemente con la RVS al tratamiento con IFN-Peg y RBV en una cohorte de más de 1137 individuos con HCC genotipo 1 (Ge y cols., 2009). Esta variante genómica se localiza cerca del locus de la IL28B, que codifica los IFN- $\lambda$  o INF tipo III, y es un cambio de citosina por timina (C>T) en rs12979860. Estos datos han sido corroborados por otros autores (Thomas y cols., 2009; McCarthy y cols., 2010). De acuerdo con todos los resultados

obtenidos, se ha llegado a la conclusión de que el gen de la IL28B es el mejor marcador genético que predice la respuesta al tratamiento combinado IFN-Peg/RBV para el genotipo 1 del VHC, incluso mejorando a los factores virales ya conocidos (Muñoz de Rueda y cols., 2011).

### ➤ **GENES DEL INTERFERÓN:**

El IFN tipo I es una citoquina clave del sistema inmune innato producida por las células para combatir las infecciones virales. El reconocimiento de los rasgos distintivos de los ácidos nucleicos virales por los receptores celulares dará lugar a la producción de IFN. Y la liberación de INF induce la expresión de cientos de ISGs que activan procesos antivirales como ampliación de la señalización del INF, producción de citoquinas que activan la inmunidad adaptativa y otros factores que inhiben directamente al virus. Mientras que en algunos ISGs tales como la PKR, 2'5-oligoadenilato sintetasa y Mx GTPasas han sido bien descritos sus mecanismos antivirales, las funciones de la mayoría de los ISGs son poco conocidas (Liu y cols., 2011).

Por otro lado, la expresión de ISGs antes del tratamiento antiviral se ha comprobado que es un importante predictor de la RVS, independientemente del genotipo rs12979860 de la IL-28B. De hecho, la expresión elevada de ISGs en el hígado antes del tratamiento antiviral se ha asociado con el fracaso de la respuesta o de la erradicación del VHC, así como con la inducción escasa de ISGs durante el tratamiento combinado (López-Rodríguez y cols., 2011).



**JUSTIFICACIÓN E**

**HIPÓTESIS**



## **2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La infección por el VHC constituye un problema sociosanitario de ámbito universal. Tanto los factores virales (genotipo, CV) como los factores del hospedador (edad, sexo, consumo de alcohol, respuesta inmune) pueden alterar su historia natural y la respuesta terapéutica. Esta depende fundamentalmente del genotipo y la CV, sin embargo hay pacientes con el mismo genotipo y similar CV que presentan un tipo de respuesta diferente. La posibilidad de que parámetros genéticos e inmunológicos puedan predecir la respuesta al tratamiento ha despertado un gran interés

El INF-alfa además de tener un efecto antiviral directo, posee una actividad inmunomoduladora que puede aumentar la respuesta inmune antiviral del paciente (es capaz de aumentar la expresión del antígeno del MHC de clase I). La expresión del MHC clase I en la superficie celular da lugar a que las células diana sean reconocidas por los linfocitos Tc y las células NK, en este último caso a través de los receptores KIRs. Por tanto, variaciones en el genotipo KIR-HLA clase I pueden jugar un papel muy importante en la respuesta al tratamiento con IFN-Peg y RBV en pacientes con HCC.

En el caso de la infección aguda por VHC hay varios estudios, pero hasta la actualidad son escasos los trabajos que relacionan los polimorfismos genéticos KIRs-HLA con la respuesta al tratamiento antiviral en la HCC, y cada uno llega a conclusiones diferentes. Por tanto, en el presente estudio tratamos de confeccionar un "mapa" genético que permita conocer que tipo de pacientes responderán mejor al tratamiento combinado.

La hipótesis de este proyecto es que existe una asociación positiva o negativa entre determinados factores inmunogenéticos, especialmente KIRs-HLA, y la RVS al tratamiento con IFN-Peg y RBV en pacientes con HCC previamente no tratados.



# **OBJETIVOS**



### **3. OBJETIVOS**

**OBJETIVO PRINCIPAL:** valorar la influencia de los factores inmunogenéticos del paciente (KIRs-HLA clase I) en la respuesta al tratamiento con IFN-Peg y RBV mediante un estudio de cohorte retrospectivo.

**OBJETIVOS SECUNDARIOS:**

- 1.- Analizar los factores de resistencia al tratamiento (virales y no virales) en pacientes con HCC.
- 2.- Estudiar sinergismos entre las moléculas KIRs, HLA e IL28B.



**PACIENTES Y**

**MÉTODOS**



## 4. PACIENTES Y MÉTODOS

### 4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio de cohorte retrospectivo.

### 4.2 SUJETOS Y ÁMBITO DE ESTUDIO

Se incluyeron 428 pacientes *naive* de raza blanca, españoles, con HCC, tratados con INF-Peg y RBV. 167 diagnosticados en el Servicio de Digestivo del Hospital Universitario San Cecilio de Granada, 120 en el Hospital Nuestra Señora de Valme (Sevilla), 101 en el Hospital La Princesa (Madrid), y 40 en el Hospital General Universitario de Valencia. Todos estos pacientes fueron tratados entre los años 2001 y 2004.

El diagnóstico de HCC estaba basado en niveles aumentados de GPT al menos durante 6 meses y la detección permanente en suero de RNA-VHC. Los pacientes no tenían coinfección con VHB, VIH, alcoholismo ni enfermedad hepática autoinmune ni inducida por fármacos.

### 4.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

#### A) CRITERIOS INCLUSIÓN:

- Pacientes tratados con INF-Peg y RBV por primera vez durante los años 2001 a 2004.

#### B) CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Pacientes que abandonaron o suspendieron el tratamiento antiviral. Los excluimos del estudio por desconocer en ellos la respuesta al tratamiento.

- Ausencia de muestra sanguínea (necesaria para la realización del estudio genético).

### 4.4 TRATAMIENTO

Consistió en la administración de 180 µg de IFN-Peg alfa-2a (*Pegasys*<sup>®</sup>, de Roche) inyectado por vía subcutánea una vez por semana. Se administró RBV entre 1000-1200 mg/día según peso (<75 kg: 1000 mg y >75 kg: 1200 mg) en aquellos pacientes con genotipo 1 ó 4 del VHC y 800 mg/día en los que fueron genotipo 2 ó 3. La duración del tratamiento fue de 48 semanas en los pacientes con genotipo 1 ó 4 y de 24 semanas en aquellos que presentaban genotipo 2 ó 3.

Los criterios de respuesta fueron los establecidos en la práctica clínica habitual (**Tabla 4**):

**Tabla 4.** Tipos de respuestas al tratamiento antiviral en pacientes con HCC.

RESPUESTA	DEFINICIÓN
Respuesta virológica rápida (RVR)	RNA-VHC indetectable (<50 UI/ml) a la semana 4 de tratamiento
Respuesta virológica precoz (RVP)	Descenso del RNA-VHC $\geq 2 \log_{10}$ UI/ml (100 veces) del basal o indetectable a la semana 12 de tratamiento
Respondedores nulos (NR)	Descenso del RNA-VHC $< 2 \log_{10}$ UI/ml (100 veces) del basal a la semana 12 de tratamiento
<i>Breakthrough</i>	RNA-VHC indetectable a las 12 semanas de tratamiento con un RNA-VHC detectable antes de finalizar el mismo
Respuesta virológica sostenida (RVS)	RNA-VHC indetectable a los 6 meses de suspender el tratamiento
Recidiva	RNA-VHC detectable tras suspender el tratamiento con un RNA-VHC indetectable durante el mismo (recurrencia)

Aquellos pacientes con RVP se les continuó el tratamiento hasta las 24 ó 48 semanas según genotipo y a aquellos con no-RVP se les suspendió y se les consideró NR.

En el presente estudio se han tenido en cuenta los pacientes que no responden finalmente al tratamiento (no-RVS), que incluyen: NR, *breakthrough* y recidivas.

### 4.5 VARIABLES DEL ESTUDIO

En el estudio la variable dependiente ha sido el tipo de respuesta: RVS frente a no-RVS.

Las variables independientes han sido:

- Las características clínicas y biológicas del paciente
  - **Edad:**  $\leq 40$  años vs  $> 40$  años
  - **Sexo:** hombre vs mujer
  - **Actividad inflamatoria:** F0, F1-F2 vs F3-F4
  - **Estadio de fibrosis:** I0-I4 vs I5-I8
  - **Alanina aminotransferasa (GPT):**  $\leq 40$  vs  $> 40$
  - **Aspartato aminotransferasa (GOT):**  $\leq 40$  vs  $> 40$
  - **Gammaglutamiltransferasa (GGT):**  $\leq 37$  vs  $> 37$
- Las características inmunogenéticas del paciente
  - **HLA clase I:** presencia vs ausencia de HLA-A, HLA-B, HLA-C
  - **HLA clase II:** presencia vs ausencia de HLA-DQ, HLA-DR
  - **KIRs:** presencia vs ausencia de los siguientes receptores 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 3DS1, 2DP1 y 3DP1
  - **IL28B:** rs12979860 CC vs rs12979860 CT/TT
- Y los datos virológicos
  - **Carga viral (CV):**  $\leq 600000$  UI/ml vs  $> 600000$  UI/ml
  - **Genotipo viral:** genotipo 2,3 vs genotipo 1,4

### 4.6 RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS

Siguiendo la práctica clínica habitual para pacientes con HCC que se tratan con IFN-Peg y RBV, los datos epidemiológicos, bioquímicos, virológicos y de respuesta se fueron recogiendo en protocolos que posteriormente se han utilizado para el presente trabajo. Estos datos se incluyeron en una base de

datos que se fue completando con los resultados obtenidos en las determinaciones genéticas y que se usó posteriormente para el análisis estadístico. La aprobación previa para el estudio fue obtenida de los Comites de Ética correspondientes.

Para el presente estudio se han utilizado muestras de sangre total y de suero almacenadas en alícuotas de 1 ml a -80 °C de la muestra basal. Dichas alícuotas se han usado para el estudio inmunológico (HLA, IL28B y genotipos KIRs) y para la determinación de la CV (en caso de no tenerla).

### **4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para cubrir los objetivos del estudio se ha realizado un análisis estadístico consistente en:

1. Estadística descriptiva: los resultados de las variables cualitativas se han expresado en frecuencia absoluta y relativa (porcentaje).
2. Análisis bivariante: debido a que la variable dependiente es cualitativa, se ha aplicado el test estadístico Chi<sup>2</sup> o el test exacto de Fisher, así como regresión logística para conocer el grado de asociación (odds ratio cruda [ORc]).
2. Análisis multivariante: regresión logística usando odds ratio ajustadas (ORa).

Se ha considerado significación estadística valores de  $P \leq 0.05$ . En todos los casos se ha empleado el paquete SPSS 15.0.

### **4.8 METODOLOGÍA: CARGA VIRAL, ESTUDIO HISTOLÓGICO, TIPAJE KIR, HLA E IL28B**

#### **CARGA VIRAL (CV)**

Se realizó mediante el kit COBAS AMPLICOR MONITOR-HCV V2.0 (Roche Diagnostics).

**ESTUDIO HISTOLÓGICO: grado de fibrosis y actividad**

La toma de muestras de tejido hepático se realizó mediante punción-aspiración con control ecográfico, a través del octavo o noveno espacio intercostal derecho a nivel de la línea axilar media.

El estudio histológico se ha realizado conforme a la clasificación de Scheuer con modificaciones leves (Caballero y cols., 2001).

- **Grado de fibrosis:** F0 ausente, F1 fibrosis portal, F2 fibrosis periportal ± algunos puentes, F3 fibrosis periportal + puentes y F4 cirrosis.
- **Actividad necroinflamatoria:** de I0 a I8 y consiste en sumar (A) y (B) en la siguiente tabla (**Tabla 5**):

**Tabla 5.** El índice de actividad se determina sumando la puntuación de (A) + (B).

<b>(A) Porta-periportal</b>		<b>(B) Lobulillar</b>	
<b>0</b>	Ausente	<b>0</b>	Ausente
<b>1</b>	Inflamación portal	<b>1</b>	Focos inflamatorios
<b>2</b>	Inflamación periportal leve	<b>2</b>	Focos necroinflamatorios
<b>3</b>	Inflamación periportal moderada	<b>3</b>	Focos necrosis
<b>4</b>	Inflamación periportal severa	<b>4</b>	Necrosis en puentes

**TIPAJE KIR**

Se han estudiado los genes KIRs: KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR3DS1, KIR2PD1 y KIR3DP1. También se han estudiado según los haplotipos, el A tiene un máximo de ocho genes: los cuatro de la estructura (KIR2DL4, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR3PD1) y KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DS4 y KIR3DL1. El haplotipo B se define por la presencia de uno o más de los genes: KIR2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5, KIR3DS1, KIR2DL5A/B y KIR2DL2. De manera que un sujeto puede ser AA, AB ó BB.

En primer lugar se procedió a la extracción del DNA de la muestra de sangre total por el Kit "High Pure PCR Template Preparation" de Roche Diagnostics.

## **Pacientes y métodos**

---

Para el tipaje de los KIR se utilizó el kit "KIR SSO Genotyping Test" (*One Lambda, Inc.*). El DNA se amplificó por PCR usando tres set de *primers* específicos para los exones 3-4, 5 y 7-9. Cada producto de PCR fue biotilado, lo cual permitió su posterior detección usando estreptavidina conjugada con r-ficoeritrina (SAPE).

Cada muestra fue desnaturalizada y posteriormente se hibridó con el DNA que iba unido a unas microesferas fluorescentes (o *beads*). La detección se llevó a cabo mediante la tecnología xMAP de Luminex y la fluorescencia de las muestras con el software Luminex100 Integrated System 2.3. El análisis de los KIRs se realizó con el programa HLA Fusion 2.0.

### **TIPAJE HLA**

La determinación de HLA -DQ y -C se llevó a cabo en todos los pacientes (n=428), mientras que HLA -DR, -A y -B se ha genotipado sólo en 327 pacientes. En estos 327 pacientes se ha estudiado su pertenencia o no al alotipo HLA-Bw4.

El tipaje HLA genómico se hizo con el kit "LABType SSO Typing Tests" (*One Lambda, Inc.*). En primer lugar el DNA se amplificó por PCR utilizando *primers* específicos para cada locus HLA-B y HLA-C. El producto de PCR estaba biotilado lo que permitió su detección con SAPE. El producto de PCR se desnaturalizó y después se hibridó con sondas de DNA complementarias conjugadas con microesferas cifradas de forma fluorescente.

La detección de la fluorescencia de la ficoeritrina en cada microesfera se llevó a cabo con un analizador de flujo: LABScan™ 100. El tipaje de HLA se basó en el patrón de reacción comparado con patrones asociados a secuencias de genes HLA publicadas.

### **GENOTIPADO IL28B**

Se determinó el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) rs12979860 en 428 sujetos, por medio de un ensayo de discriminación alélica utilizando sondas Taqman (*Custom Assay Service*, Ref. AHI050J). Los oligonucleótidos cebadores utilizados fueron: oligo sentido 5'-GCCTGTCGTGTAACCA-3' y el antisentido 5'-GCGCGGAGTGCAATTCAAC-3'. Las secuencias de las sondas Taqman fueron: a) para la detección del polimorfismo C la sonda marcada con

el fluorocromo VIC 5'-TGGTTC**G**CGCCTTC-3' y b) para el polimorfismo T, la sonda 5'-CTGGTTC**A**CGCCTTC-3' etiquetada con el fluorocromo FAM. Las reacciones de amplificación por PCR fueron realizadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un equipo Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, con un volumen final de 4 µl, siguiendo el siguiente protocolo térmico: preincubación a 50 °C durante 2 min, incubación a 95 °C durante 10 min, seguidos de 40 ciclos formados por dos etapas, la primera de desnaturalización a 95 °C durante 15 s y la segunda de hibridación-elongación a 60 °C, 1 min. La intensidad de fluorescencia se analizó a tiempo final (transcurridos los 40 ciclos), y la determinación de los polimorfismos se realizó automáticamente mediante la utilización del software de discriminación alélica SDS 2.2.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).



# **RESULTADOS**



## **5. RESULTADOS**

### **5.1 CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES**

Las características clínicas y virales de los 428 pacientes incluidos en el estudio se muestran en la **Tabla 6**.

El 42% de los pacientes fueron mujeres y el 38% tenían una edad igual o menor a 40 años. En relación con el grado de actividad inflamatoria y necrosis, el 62% se encontraban en grado I0-I4. En cuanto a la fibrosis, el 77% presentaban una fibrosis estadio F0-F2, frente a los 62 pacientes (23%) en los que se objetivó un estadio F3-F4. Respecto a los niveles de transaminasas, sólo el 10% presentaban niveles de GPT  $\leq 40$  U/L, un 32% GOT  $\leq 40$  U/L y 47% GGT  $\leq 37$  U/L. En relación al genotipo y a la CV, el 88% de los pacientes eran genotipo 1 ó 4, y el 33% partía de cifras  $\leq 600000$  UI/ml (**Tabla 6**).

## Resultados

---

**Tabla 6.** Características clínicas y virológicas basales de la población en estudio.

CARACTERÍSTICAS	PACIENTES n=428 (%)
<i>Sexo</i>	
▪ Hombre	248 (58)
▪ Mujer	180 (42)
<i>Edad (años)</i>	
▪ ≤ 40	164 (38)
▪ > 40	264 (62)
<i>Actividad Inflamatoria (n=263)</i>	
▪ 10 a 14	164 (62)
▪ 15 a 18	99 (38)
<i>Estadio de fibrosis (n=271)</i>	
▪ F0, F1, F2	209 (77)
▪ F3, F4	62 (23)
<i>GPT, U/L (n=420)</i>	
▪ ≤ 40	44 (10)
▪ > 40	376 (90)
<i>GOT, U/L (n=420)</i>	
▪ ≤ 40	133 (32)
▪ > 40	287 (68)
<i>GGT, U/L (n=397)</i>	
▪ ≤ 37	186 (47)
▪ > 37	211 (53)
<i>Genotipo viral</i>	
▪ 2, 3	50 (12)
▪ 1, 4	378 (88)
<i>Carga viral, UI/ml</i>	
▪ ≤ 600000	141 (33)
▪ > 600000	287 (67)

---

Los resultados de las variables se han expresado en frecuencias absolutas y relativas (%). GPT, alanina aminotransferasa; GOT, aspartato aminotransferasa; GGT, gammaglutamiltransferasa.

## 5.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DE LA RESPUESTA VIROLÓGICA PRECOZ (RVP) Y RESPUESTA VIROLÓGICA SOSTENIDA (RVS)

Del total de pacientes incluidos (n=428), 340 (79%) presentaron una RVP a la 12 semana de tratamiento y 88 (21%) no la presentaron (no-RVP). Estos últimos (no-RVP) se consideraron NR y no continuaron con el tratamiento (**Tabla 7**). Los únicos factores relacionados con la RVP fueron niveles de GGT  $\leq 37$  U/L ( $P < 0.0001$ ) y genotipo 2,3 ( $P = 0.002$ ) (**Tabla 7**).

A los 6 meses de finalizar el tratamiento antiviral, 241 pacientes (56%) presentaban una RVS frente a 187 (44%) que no la tuvieron (no-RVS) (en este grupo se incluyen NR, breakthrough y recaídas) (**Tabla 8**). Observamos que la edad  $\leq 40$  años, GGT  $\leq 37$  U/L, genotipo 2,3 y CV  $\leq 600000$  UI/ml se relacionan de forma estadísticamente significativa ( $P \leq 0.05$ ) con la existencia de RVS.

## Resultados

**Tabla 7.** Características de los pacientes en función de la respuesta virológica precoz (semana 12) (RVP).

CARACTERÍSTICAS	No-RVP N=88 (21%)	RVP n=340 (79%)	OR* (IC 95%)	P
<i>Sexo</i>				
▪ Hombre	52 (21)	196 (79)		0.8
▪ Mujer	36 (20)	144 (80)		
<i>Edad (años)</i>				
▪ ≤ 40	28 (17)	136 (83)		0.1
▪ > 40	60 (23)	204 (77)		
<i>Actividad Inflamatoria (n=263)</i>				
▪ I0 a I4	32 (19)	132 (81)		0.3
▪ I5 a I8	14 (14)	85 (86)		
<i>Estadio de fibrosis (n=271)</i>				
▪ F0, F1, F2	38 (18)	171 (82)		0.9
▪ F3, F4	11 (18)	51 (82)		
<i>GPT, U/L (n=420)</i>				
▪ ≤ 40	8 (18)	36 (82)		0.7
▪ > 40	77 (20)	299 (80)		
<i>GOT, U/L (n=420)</i>				
▪ ≤ 40	25 (19)	108 (81)		0.6
▪ > 40	61 (21)	226 (79)		
<i>GGT, U/L (n=397)</i>				
▪ ≤ 37	19 (10)	167 (90)	4 (2.2-6.8)	<0.0001
▪ > 37	65 (31)	146 (69)	1	
<i>Genotipo viral</i>				
▪ 2, 3	2 (4)	48 (96)	7 (1.7-29.7)	0.002
▪ 1, 4	86 (23)	292 (77)	1	
<i>Carga viral, UI/ml</i>				
▪ ≤ 600000	24 (17)	117 (83)		0.2
▪ > 600000	64 (22)	223 (78)		

Los resultados de las variables se han expresado en frecuencias absolutas y relativas (%). Se ha aplicado el test de  $\chi^2$  o Fisher. RVP, respuesta virológica precoz; GPT, alanina aminotransferasa; GOT, aspartato aminotransferasa; GGT, gammaglutamiltransferasa. OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza. \*Regresión logística bivalente: La OR es la probabilidad de RVP.

**Tabla 8.** Características de los pacientes en función de la respuesta virológica sostenida (RVS).

CARACTERÍSTICAS	No-RVS N=187 (44%)	RVS n=241 (56%)	OR* (IC 95%)	P
<i>Sexo</i>				
▪ Hombre	102 (41)	146 (59)		0.2
▪ Mujer	85 (47)	95 (53)		
<i>Edad (años)</i>				
▪ ≤ 40	51 (31)	113 (69)	2.3 (1.6-3.5)	<0.0001
▪ > 40	136 (51)	128 (49)	1	
<i>Actividad Inflamatoria (n=263)</i>				
▪ I0 a I4	65 (40)	99 (60)		0.3
▪ I5 a I8	45 (45)	54 (55)		
<i>Estadio de fibrosis (n=271)</i>				
▪ F0, F1, F2	82 (39)	127 (61)		0.1
▪ F3, F4	31 (50)	31 (50)		
<i>GPT, U/L (n=420)</i>				
▪ ≤ 40	20 (46)	24 (54)		0.7
▪ > 40	162 (43)	214 (57)		
<i>GOT, U/L (n=420)</i>				
▪ ≤ 40	55 (41)	78 (59)		0.5
▪ > 40	128 (45)	159 (55)		
<i>GGT, U/L (n=397)</i>				
▪ ≤ 37	71 (38)	115 (62)	1.7 (1.2-2.6)	0.007
▪ > 37	109 (52)	102 (48)	1	
<i>Genotipo viral</i>				
▪ 2, 3	9 (18)	41 (82)	4.1 (1.9-8.6)	<0.0001
▪ 1, 4	178 (47)	200 (53)	1	
<i>Carga viral, UI/ml</i>				
▪ ≤ 600000	41 (29)	100 (71)	2.5 (1.6-3.9)	<0.0001
▪ > 600000	146 (51)	141 (49)	1	

Los resultados de las variables se han expresado en frecuencias absolutas y relativas (%). Se ha aplicado el test de Chi<sup>2</sup> o Fisher. RVS, respuesta virológica sostenida; GPT, alanina aminotransferasa; GOT, aspartato aminotransferasa; GGT, gammaglutamiltransferasa. OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza. \*Regresión logística bivalente: La OR es la probabilidad de RVS.

**5.3 ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA ALÉLICA HLA E IL28B, Y SU ASOCIACIÓN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO**

En la **tabla 9** se representan sólo aquéllos alelos HLA clase I y II que se asociaron de forma estadísticamente significativa con la respuesta al tratamiento antes de aplicar la corrección mediante el método de Bonferroni, así como el genotipo CC de la IL28B. Podemos apreciar que una vez que se aplica esta corrección, el único alelo HLA que se sigue asociando de forma significativa es el DQB1\*0301 (Pc=0.04). El genotipo CC de la IL28B también se asoció significativamente con la RVS (P<0.0001).

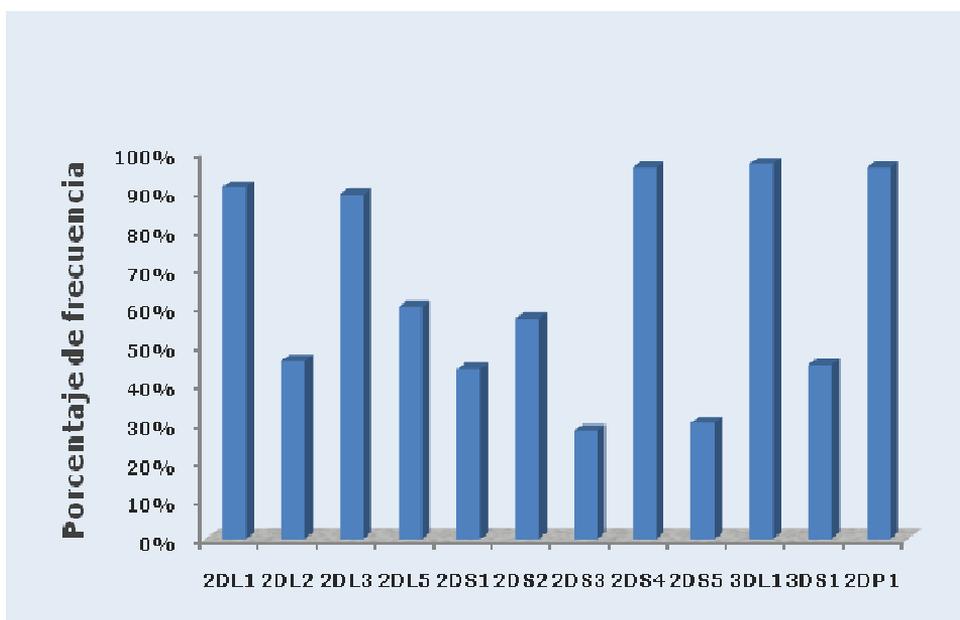
**Tabla 9.** Alelos HLA clase I y II con valor de  $P \leq 0.05$  antes de la corrección mediante el método de Bonferroni y genotipo rs12979869 respecto a la respuesta virológica sostenida (RVS).

	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>P</b>	<b>Pc</b>
<b>Alelos HLA clase I y II</b>			
A*0201 (+)	1.738 (1.1-2.74)	0.02	0.7
A*0301 (+)	0.533 (0.31-0.91)	0.02	0.7
B*4001 (+)	5.345 (1.2-23.78)	0.02	1.1
B*4402 (+)	2.472 (1.03-5.918)	0.03	1.7
Cw*0304 (+)	4.315 (1.25-14.96)	0.02	0.6
DRB1*0701 (+)	0.529 (0.33-0.84)	0.007	0.2
DRB1*1101 (+)	2.2 (1.02-4.9)	0.04	1.4
DRB1*0202 (+)	0.589 (0.37-0.94)	0.03	0.48
DQB1*0301 (+)	2.02 (1.3-3.3)	0.003	<b>0.04</b>
<b>IL28B</b>			
rs12979860 CC	3.84 (2.4-6.1)	<b>&lt;0.0001</b>	

IC, intervalo de confianza; OR, odds ratio; Pc, corrección de Bonferroni.

#### 5.4 DISTRIBUCIÓN DE LOS GENOTIPOS KIRS EN LA COHORTE DE ESTUDIO Y SU RELACIÓN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

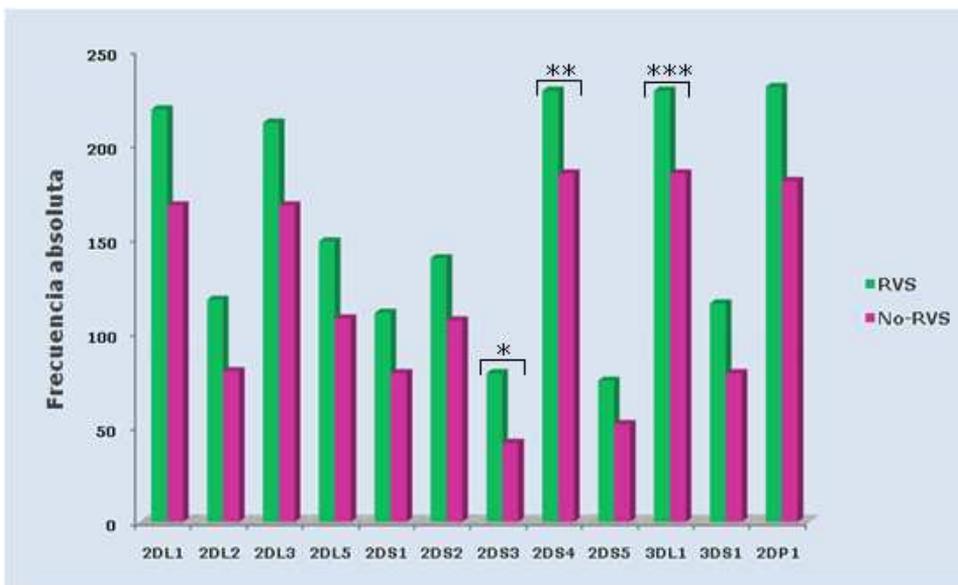
La distribución de los genotipos KIRs en la muestra se expresa en la **Figura 13**. El 100% de los pacientes presenta los alelos KIRs 2DL4, 3DL2, 3DL3 y 3DP1, ya que como ha sido descrito son genes altamente conservados en la mayoría de los haplotipos.



**Figura 13.** Frecuencia de los distintos KIRs en la muestra (n=428).

Al examinar la frecuencia de los diferentes alelos KIRs en pacientes con HCC según la respuesta al tratamiento antiviral (RVS vs no-RVS), se observa que la presencia de KIR2DS3 (OR=1.6, IC 95%: 1.1-2.6, P=0.02), la ausencia de KIR2DS4 (OR=5.3, IC 95%: 1.2-23.9, P=0.03) y la ausencia de KIR3DL1 (OR=5.3, IC 95%: 1.2-23.7, P=0.03) se asociaron con la RVS (**Figura 14**). Cabe destacar que aquellos pacientes que no tenían el KIR2DS4 eran los mismos que no tenían el KIR3DL1, excepto uno, de ahí que los valores en el análisis estadístico sean muy similares.

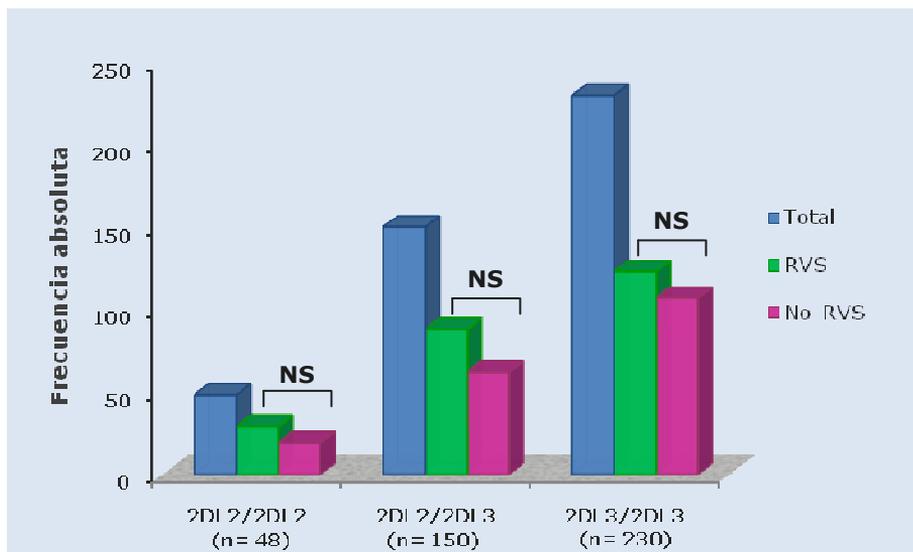
## Resultados



**Figura 14.** Frecuencia de los distintos KIRs en pacientes con RVS ( $n=241$ ) y no-RVS ( $n=187$ ). Se ha aplicado el test de  $\chi^2$ . \*  $P=0.022$ ; \*\*  $P=0.016$ ; \*\*\*  $P=0.017$ .

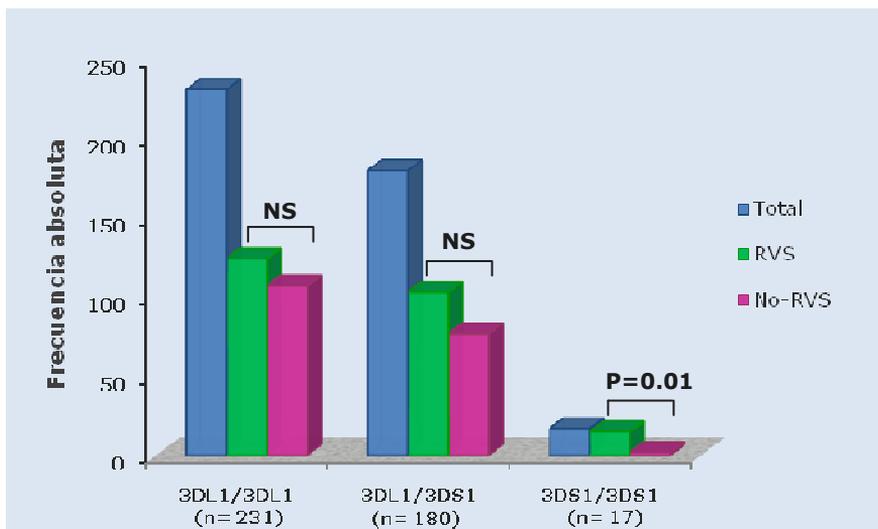
Al estratificar por genotipos observamos que estos genes se asocian con la respuesta sólo en el genotipo 1,4, pero no en el 2,3 [genotipo 1,4: 2DS3(+) OR=1.6, IC 95%: 1.07-2.5,  $P=0.04$ ; 2DS4(-) OR=5.2, IC 95%: 1.1-23.8,  $P=0.03$ ; 3DL1(-) OR=5.6, IC 95%: 1.2-25,  $P=0.02$ ].

Debido a que los alelos KIR2DL2 y KIR2DL3 se han relacionado con el aclaramiento viral espontáneo y se consideran alelos de un mismo gen, hemos querido comprobar si en nuestra muestra la presencia de dichos alelos (2DL2 y 2DL3) se relacionaba o no con la respuesta al tratamiento (**Figura 15**), no encontrando diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tres grupos estudiados, ni estratificando por genotipos.



**Figura 15.** Frecuencias de KIR2DL2 y KIR2DL3 en la muestra y respecto a la respuesta al tratamiento. Se ha aplicado el test de  $\chi^2$ . RVS, respuesta virológica sostenida; NS, no significativo.

También se han estudiado KIR3DS1 y 3DL1, alelos de un mismo gen, observando que los pacientes homocigóticos para KIR3DS1 (n=17) se asocian con la respuesta (OR=5.2, IC 95%: 1.1-23, P=0.01) (**Figura 16**). Al estratificar por genotipos vemos que esta asociación se debe a los pacientes con genotipo 1,4 (OR=5.6, IC 95%: 1.2-25, P=0.02), ya que en los que presentan genotipo 2,3 no se observa esta asociación (P=0.8).



**Figura 16.** Frecuencias de KIR3DL1 y KIR3DS1 en la muestra y respecto a la respuesta al tratamiento. Se ha aplicado el test de  $\chi^2$ . RVS, respuesta virológica sostenida; NS, no significativo.

### 5.5 DISTRIBUCIÓN DE LOS ALELOS HLA-Cw, HLA-Bw4 EN LA COHORTE DE ESTUDIO Y SU RELACIÓN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Al estudiar la distribución de los HLA-Cw (C1 y C2) respecto a la respuesta al tratamiento, ninguno se relacionó con ésta (**Tabla 10**). De la misma manera tampoco se asociaron con la respuesta los HLA-Bw4 (n=327) (**Tabla 10**). No obtuvimos diferencias estadísticamente significativas al estratificar por genotipos.

**Tabla 10.** Frecuencia de los distintos HLA-Cw y HLA-Bw4 en nuestra muestra (n=428) y su asociación con la respuesta al tratamiento.

	Total n=428	No-RVS n=187 (44%)	RVS n=241 (56%)	P
<b>Pacientes C1 +</b> (C1C1, C1C2)	345 (81)	154 (45)	191 (55)	0.4
<b>Pacientes C2 +</b> (C2C2, C1C2)	261 (61)	112 (43)	149 (57)	0.7
<b>Pacientes Cw:</b>				
▪ <b>C1C1</b>	167 (39)	75 (45)	92 (55)	0.7
▪ <b>C1C2</b>	178 (42)	79 (44)	99 (56)	
▪ <b>C2C2</b>	83 (19)	33 (40)	50 (60)	
<b>Pacientes HLA-Bw4 +</b>	247 (75)	98 (40)	149 (60)	0.8

Las variables se expresan en frecuencia absoluta y relativa (%). Se ha aplicado el test de Chi<sup>2</sup> o Fisher. RVS, respuesta virológica sostenida.

A continuación se estudió en pacientes homocigóticos para C1 (C1C1) si la presencia de alelos idénticos se asociaba con la respuesta antiviral, y de igual manera en los homocigóticos para C2 (C2C2), no obteniendo significación en el total de pacientes (**Tabla 11**), sin embargo al estratificar por genotipos, vemos que en los pacientes con genotipo 1,4, aquellos con idénticos alelos C2C2 (n=17, 23%) tienen menos probabilidad de responder (OR=0.2, IC 95%: 0.08-0.8, P=0.02) (**Tabla 11**).

## Resultados

**Tabla 11.** Frecuencia de los grupos C1C1 y C2C2 en función de los alelos en el total de la muestra y su asociación con la respuesta.

	Total	No-RVS	RVS	P
<b>C1C1 (n=167)</b>		<b>N=75</b>	<b>n=92</b>	
▪ Con idénticos alelos	45 (27)	20 (44)	25 (56)	0.9
▪ Con diferentes alelos	122 (73)	55 (45)	67 (55)	
<b>C2C2 (n=83)</b>		<b>N=33</b>	<b>n=50</b>	
▪ Con idénticos alelos	22 (27)	12 (55)	10 (45)	0.09*
▪ Con diferentes alelos	61 (73)	21 (34)	40 (66)	

Las variables se expresan en frecuencia absoluta y relativa (%). Se ha aplicado el test de Chi<sup>2</sup> o Fisher. RVS, respuesta virológica sostenida. \* Los genotipos 1,4 son significativos (P=0.02).

## 5.6 INFLUENCIA DE LAS UNIONES KIRS-HLA EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Ninguna unión receptor-ligando se asoció a la RVS (**Tabla 12**). Al estratificar por genotipos tampoco presentan asociación. Debido a que la presencia del KIR2DS3 se ha relacionado con la RVS, se ha estudiado con el grupo HLA C2 aunque este no sea su ligando, encontrando que aquellos pacientes con genotipo KIR2DS3-C2 se asocian con la respuesta al tratamiento (OR=1.7, IC 95%: 1.03-3.1, P=0.04).

**Tabla 12.** Frecuencia de los pares receptor-ligando de KIRs y HLA en la muestra (n=428) y según la respuesta al tratamiento.

	Total	No-RVS N=187 (44%)	RVS n=241 (56%)	P
<b>2DL1-C2</b>	231	100 (43)	131 (57)	0.7
<b>2DL2-C1</b>	152	64 (42)	88 (58)	0.6
<b>2DL3-C1</b>	298	135 (45)	163 (55)	0.4
<b>2DS1-C2</b>	110	46 (42)	64 (58)	0.8
<b>2DS2-C1</b>	195	86 (44)	109 (56)	0.5
<b>2DS3-C1</b>	97	34 (35)	63 (65)	0.9
<b>2DS4-C1</b>	327	150 (46)	177 (54)	0.5
<b>2DS4-C2</b>	0			
<b>3DL1-Bw4*</b>	237	96 (40)	141 (60)	0.7
<b>3DS1-Bw4*</b>	120	45 (37)	75 (63)	0.9

Las variables cualitativas se expresan en frecuencia absoluta y relativa (%). Se ha aplicado el test de Chi<sup>2</sup> o Fisher. RVS, respuesta virológica sostenida. \* HLA-Bw4 se ha genotipado en 327 pacientes dentro del total de la muestra.

Debido a la asociación que se ha descrito entre los alelos KIR2DL2 y KIR2DL3 con los alotipos del grupo HLA-Cw, hemos estudiado su asociación con la respuesta (**Tabla 13**), observando que ninguna de las interacciones son estadísticamente significativas. Tampoco obtuvimos diferencias estadísticamente significativas al estratificar por genotipos.

## Resultados

**Tabla 13.** Comparación de las frecuencias de las combinaciones KIRs (2DL2, 2DL3) y HLA-C (grupo C1 y/o C2) en la muestra y estratificado según la respuesta al tratamiento (no-RVS vs RVS).

	Total	No-RVS	RVS	P
<b>2DL2/2DL2</b>	<b>n=48</b>	<b>n=19</b>	<b>n=29</b>	
-C1C1	16 (34)	8 (50)	8 (50)	0.6
-C1C2	22 (45)	7 (33)	15 (67)	
-C2C2	10 (21)	4 (40)	6 (60)	
<b>2DL2/2DL3</b>	<b>N=150</b>	<b>n=62</b>	<b>n=88</b>	
-C1C1	62 (41)	27 (43)	35 (57)	0.8
-C1C2	57 (38)	24 (42)	33 (58)	
-C2C2	31 (21)	11 (37)	20 (63)	
<b>2DL3/2DL3</b>	<b>N=230</b>	<b>n=106</b>	<b>n=124</b>	
-C1C1	92 (40)	40 (44)	52 (56)	0.6
-C1C2	97 (42)	48 (50)	49 (50)	
-C2C2	41 (18)	18 (44)	23 (56)	

Los resultados de las variables se han expresado en frecuencia absoluta y relativa (%). Se ha aplicado el test de Chi<sup>2</sup>. RVS, respuesta virológica sostenida.

Del mismo modo analizamos las interacciones de los alelos KIR3DL1 y KIR3DS1 con el alotipo HLA-Bw4, para conocer su frecuencia y su asociación con la respuesta, no observando diferencias significativas (**Tabla 14**). Destacamos que los 17 pacientes que presentan homocigosis 3DS1/3DS1 son todos genotipo 1,4. Aunque al estratificar por genotipos tampoco presentan asociación.

**Tabla 14.** Comparación de las frecuencias de las combinaciones KIR3DL1-3DS1 y HLA-Bw4 en la muestra, y estratificado según la respuesta al tratamiento.

	<b>Total</b>	<b>No-RVS</b>	<b>RVS</b>	<b>P</b>
<b>3DL1/3DL1</b>	<b>N=231</b>	<b>n=97</b>	<b>n=134</b>	
<b>Bw4+</b>	166 (72)	68 (41)	98 (59)	0.6
<b>Bw4-</b>	65 (28)	29 (45)	36 (55)	
<b>3DL1/3DS1</b>	<b>N=180</b>	<b>n=72</b>	<b>n=108</b>	
<b>Bw4+</b>	144 (80)	58 (40)	86 (60)	0.9
<b>Bw4-</b>	36 (20)	14 (39)	22 (61)	
<b>3DS1/3DS1</b>	<b>n=17</b>	<b>n=3</b>	<b>n=14</b>	
<b>Bw4+</b>	13 (77)	3 (20)	10 (80)	1
<b>Bw4-</b>	4 (23)	0 (0)	4 (100)	

Los resultados de las variables se han expresado en frecuencia absoluta y relativa (%). Se ha aplicado el test de Chi<sup>2</sup> o Fisher. RVS, respuesta virológica sostenida.

## 5.7 FRECUENCIA DE LOS HAPLOTIPOS: AA, AB, BB

Al estudiar los haplotipos AA, AB y BB y su relación con la RVS, no encontramos diferencias estadísticamente significativas (**Tabla 15**). Tampoco al estratificar por genotipos. Destacamos que solamente dos pacientes presentan el haplotipo BB y los dos fueron respondedores (**Tabla 15**).

**Tabla 15.** Haplotipos de los genes KIRs en la muestra y según la respuesta al tratamiento.

	<b>Pacientes</b> <b>n=428</b>	<b>No-RVS</b> <b>n=187 (44%)</b>	<b>RVS</b> <b>n=241 (56%)</b>	<b>P</b>
<b>AA</b>	102 (24)	50 (49)	52 (51)	0.2
<b>AB</b>	324 (75)	137 (42)	187 (58)	
<b>BB</b>	2 (1)	0 (0)	2 (100)	

Los resultados de las variables se han expresado en frecuencia absoluta y relativa (%). Se ha aplicado el test de Chi<sup>2</sup>. RVS, respuesta virológica sostenida.

**5.8 ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LOS FACTORES GENÉTICOS Y AJUSTANDO POR LOS FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA**

Al realizar un análisis multivariante en el que incluimos todos los factores inmunogenéticos que se asociaron con la RVS, observamos que KIR2DS4 y KIR3DL1 pierden la significación, mientras que DQB1\*0301, IL28B CC y KIR2DS3 la mantienen (**Tabla 16**).

**Tabla 16.** *Análisis bivariante y multivariante de los factores genéticos respecto a la respuesta virológica sostenida (RVS).*

	Análisis bivariante		Análisis multivariante	
	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P
<b>HLA</b>				
DQB1*0301(+), (n=100)	2.02 (1.3-3.3)	0.003	2.23 (1.3-3.7)	0.002
<b>IL28B</b>				
Rs12979860 CC, (n=142)	3.84 (2.4-6.1)	<0.0001	4.21 (2.6-6.8)	<0.0001
<b>KIRs</b>				
KIR2DS3 (+), (n=120)	1.6 (1.1-2.6)	0.023	1.68 (1.1-2.7)	0.030
KIR2DS4 (-), (n=17)	5.3 (1.2-23.9)	0.03	4.15 (0.2-97.5)	0.377
KIR3DL1 (-), (n=13)	5.3 (1.2-23.7)	0.03	0.98 (0.04-23.2)	0.992

OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza. Regresión logística: La OR es la probabilidad de RVS.

Al ajustar los factores inmunogenéticos por los factores predictivos de respuesta ya conocidos (edad, genotipo, CV y GGT), observamos que el DQB1\*0301, la IL28B CC y el KIR2DS3 siguen siendo factores independientes asociados a la respuesta antiviral (**Tabla 17**).

**Tabla 17.** Análisis multivariante de los factores virales y del huésped respecto a la respuesta virológica sostenida (RVS).

	Análisis multivariante	
	OR (IC 95%)	P
<b>EDAD</b> ( $\leq 40$ años)	2.39 (1.5-3.8)	<0.0001
<b>GENOTIPO</b> (2,3)	3.24 (1.4-7.3)	0.004
<b>CARGA VIRAL</b> ( $\leq 600000$ UI/mL)	2.24 (1.4-3.6)	0.001
<b>DQB1*0301</b> (+)	2.03 (1.2-3.5)	0.01
<b>KIR2DS3</b> (+)	1.62 (1.04-2.6)	0.04
<b>IL28B</b> (rs12979860 CC)	4.37 (2.7-7.1)	<0.0001

OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza. Regresión logística: La OR es la probabilidad de RVS.

## 5.9 ESTUDIO DE SINERGISMO DE LOS FACTORES INMUNOGENÉTICOS

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, hemos hecho un estudio de sinergismo con los factores inmunogenéticos incluyendo todos los HLA clase I y II que fueron estadísticamente significativos antes de la corrección de Bonferroni. Para esto nos hemos basado en el modelo de Andersson y cols. (2005) que incluye tres medidas de interacción biológica que son: **RERI**, exceso de riesgo relativo debido a la interacción; **AP**, la proporción atribuible a la interacción; y **S**, índice de sinergia. El cálculo de estos tres parámetros se basa en un modelo de regresión logística, en el que la variable independiente es politómica con cuatro categorías. De manera que los pacientes se seleccionan dependiendo de la presencia o ausencia de dos factores inmunogenéticos en el caso de este estudio (**Tabla 18**).

## Resultados

**Tabla 18.** Clasificación de los pacientes dependiendo de la presencia o ausencia de los factores inmunogenéticos.

	Factor 1	Factor 2	OR
<b>Paciente ++</b>	+	+	OR <sub>++</sub>
<b>Paciente +-</b>	+	-	OR <sub>+-</sub>
<b>Paciente -+</b>	-	+	OR <sub>-+</sub>
<b>Paciente --</b>	-	-	1

+ Presencia del factor. - Ausencia del factor.

Estas medidas se definen:

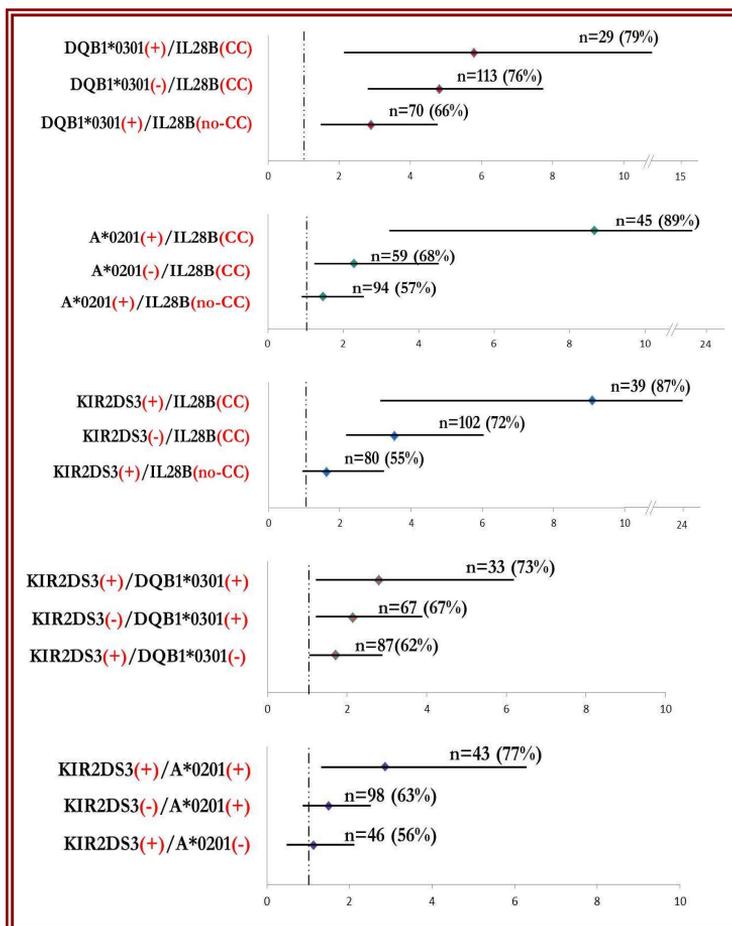
- **RERI:**  $OR_{++} - OR_{+-} - OR_{-+} + 1$
  - **AP:**  $RERI/OR_{++}$
  - **S:**  $[OR_{++} - 1] / [OR_{+-} - 1] + [OR_{-+} - 1]$
- } Cuando  $AP \leq 0$  y  $S \leq 1$ , nos indica que no hay sinergismo.

Hemos aplicado estas medidas de sinergia para DQB1\*0301, IL28B, A\*0201 y KIR2DS3, dos a dos (**Tabla 19, figura 17**). De manera que A\*0201(+)/IL28B CC, KIR2DS3(+)/IL28B CC y KIR2DS3(+)/A\*0201(+) se potencian entre sí para mejorar las tasas de RVS, independientemente de la acción que ejercen por separado (**Tabla 19, figura 17**).

**Tabla 19 y figura 17.** Sinergismo entre genes de la inmunidad innata respecto a la respuesta virológica sostenida (RVS).

	OR (IC 95%)	P	S	AP
<b>DQB1*0301(+)/IL28B(CC)</b> (n=29)	5.8 (2.3-14.8)	<0.0001	<1	<0
<b>A*0201(+)/IL28B(CC)</b> (n=45)	8.67 (3.2-23.4)	<0.0001	<b>4.75</b>	<b>68%</b>
<b>KIR2DS3(+)/IL28B(CC)</b> (n=39)	9.09 (3.4-24.2)	<0.0001	<b>2.58</b>	<b>66%</b>
<b>KIR2DS3(+)/DQB1*0301(+)</b> (n=33)	2.8 (1.25-6.3)	0.012	<1	<0
<b>KIR2DS3(+)/A*0201(+)</b> (n=43)	2.9 (1.3-6.2)	0.008	<b>3.6</b>	<b>46%</b>

OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza; AP, proporción atribuible a la interacción; S, índice de sinergia. Regresión logística: La OR es la probabilidad de RVS.  $AP \leq 0$ , y  $S \leq 1$ : no hay sinergismo.



Cabe destacar que aquellos pacientes que son:

- (1)** IL28B(CC) + DQB1\*0301(+) + KIR2DS3(+) (n=6; P=0.002)
- (2)** IL28B(CC) + DQB1\*0301(+) + KIR2DL3/2DL3:C1C1 (n=5; P<0.0001)
- (3)** IL28B(CC) + A\*0201(+) + KIR2DS3(+) (n=12; P=0.01)

Tienen el 100% de probabilidad de responder al tratamiento.



# **DISCUSIÓN**



## 6. DISCUSIÓN

Desde que se conoce que el IFN tiene un efecto antiviral directo y que la RBV promueve una respuesta Th1 con aumento de citoquinas que mejora la respuesta inmune antiviral, se piensa que puede existir una asociación entre las características inmunogenéticas del paciente con HCC y la respuesta al tratamiento antiviral. De manera que nuestra hipótesis fue que existe una asociación positiva o negativa entre determinados genotipos KIRs-HLA y la RVS al tratamiento con IFN-Peg y RBV en pacientes previamente no tratados.

Al igual que ya se ha descrito en otros muchos estudios (Foster y cols., 2007; Kau y cols., 2008), tanto el genotipo como los niveles de GGT se relacionaron con la RVP. Y la edad  $\leq 40$  años, GGT  $\leq 37$  U/L, genotipo 2,3 y CV  $\leq 600000$  UI/ml aumentan la probabilidad de RVS.

- **HLA**

Como se ha observado que algunos alelos HLA influyen claramente en la resolución de varias infecciones virales (Bailey y cols., 2007), las moléculas HLA han sido objeto de numerosos estudios para establecer posibles asociaciones con la persistencia o la eliminación del VHC (Singh y cols., 2007). Al revisar la literatura, cada vez son más los artículos en los que se estudia la **asociación entre alelos HLA y la RVS** al tratamiento combinado con INF-Peg+RBV durante una infección crónica por VHC. Rhodes y cols. (2008) observaron que los alelos HLA A\*02, B\*58 y DPB1\*1701 estaban asociados de una forma independiente a la RVS. El número de pacientes incluidos fue elevado ( $n=343$ ), pero se separaron en 2 razas: americanos blancos y afroamericanos, disminuyendo así el número de pacientes en cada grupo y siendo algunas de las frecuencias alélicas muy bajas en ciertos subgrupos, como por ejemplo el alelo B\*58 que fue sólo encontrado en un 1% de la americanos blancos. Además el valor de P no fue ajustado por el número de alelos encontrados en cada loci (corrección de Bonferroni), por lo que probablemente algunos de estos alelos HLA perderían su asociación con la RVS si estos valores de P hubiesen sido ajustados. De hecho, en datos previos de nuestro grupo (Muñoz de Rueda y cols., 2011) varios alelos se asociaron estadísticamente con la RVS, pero al corregir el valor de P por el método de

Bonferroni perdieron dicha significación, manteniéndola únicamente DQB1\*0301; alelo que hasta ahora se había relacionado con el aclaramiento viral (Hong y cols., 2005; Kuniholm y cols., 2010).

- **IL28B**

En el año 2009, tres estudios independientes GWAS (*genome-wide association study*) de screening del genoma asocian un SNP (rs12979860) con la respuesta al tratamiento con IFN-Peg+RBV en pacientes con genotipo 1 (Ge y cols., 2009; Suppiah y cols., 2009; Tanaka y cols., 2009). Del mismo modo en nuestra cohorte se demuestra la relación significativa del genotipo CC de la IL28B con la RVS ( $P < 0.0001$ ) (Muñoz de Rueda y cols., 2011). En el análisis multivariante al ajustar los factores inmunogenéticos, concretamente la IL28B CC, por los factores de confusión ésta sigue siendo un factor independiente asociado a la respuesta antiviral.

- **KIRs**

Los KIRs se han asociado tanto con el aclaramiento viral espontáneo del VHC como con la cronificación del mismo. Así en el caso de la **infección aguda por VHC** hay varios estudios, siendo uno de los más importantes el de Khakoo y cols. (2004) debido al elevado tamaño de la muestra, ya que determinaron diez genes KIRs (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5 and KIR3DS1) y HLA-B, HLA-C, de 1037 individuos que habían sido expuestos al VHC. Observaron que aquellos con genotipo homocigótico KIR2DL3/HLA-C1 presentaban una mayor resolución a la infección por VHC que otros genotipos. El hecho de que esta unión inhiba las células NK demuestra que determinadas acciones inhibitoras son más efectivas que otras, y que lo importante es que estén ausentes ciertas uniones KIRs con HLA clase I que son fuertemente inhibitoras. Esta misma asociación genotípica la encuentra Knapp en un artículo publicado en *Gastroenterology* (2011), de forma que los individuos expuestos al virus pero no infectados tenían una frecuencia significativamente mayor de homocigosis KIR2DL3-HLA-C1 que los infectados crónicos, hay que destacar que estos autores sólo estudian KIR2DL2, KIR2DL3 y HLA-C. Sin embargo, Montes-Cano

y cols. (2005) encuentran aumentada la frecuencia del gen KIR2DL3, y disminuida la de KIR2DL2, de forma significativa en los pacientes con infección persistente. Paladino y cols. (2007) demuestran que en aquellos que aclaran el virus predomina un descenso de KIR2DL2 y KIR2DS2 acompañado del aumento de KIR2DS5. Todo esto demuestra que son muy variables los resultados obtenidos por los distintos grupos respecto a genotipos KIRs y aclaramiento viral.

También se ha encontrado relación entre determinados genes KIRs y la **cronificación del VHC**, como el KIR2DS3 (Dring y cols., 2011).

En cuanto a la **respuesta al tratamiento combinado de la HCC** en relación a los genes KIRs y sus ligandos HLA, al revisar la bibliografía, son muy recientes los estudios que abordan este tema. Concretamente, las publicaciones más relevantes son del 2010 y 2011. En el presente estudio se ha analizado la influencia de los receptores KIRs en la respuesta al tratamiento combinado de la HCC (INF-Peg+RBV). Una ventaja de éste respecto a otros previos, es haber incluido un número importante de pacientes (n=428), lo cual es fundamental para el estudio de genes polimórficos, así como la homogeneidad de la misma.

Nuestro primer resultado ha sido demostrar que la presencia de KIR2DS3 y la ausencia de KIR2DS4 y KIR3DL1 se asocian de manera significativa con la RVS. El hecho de que existe una fuerte asociación entre el par de genes KIR3DL1 y KIR2DS4 ya había sido descrito previamente por otros autores (Taniguchi y cols., 2009), los cuales justifican una posible relación estructural ya que ambos son los únicos genes ubicados en una región telomérica del haplotipo A, por lo que se hipotetiza que, en base a esta relación estructural, KIR3DL1 sirva como un inhibidor de la activación KIR2DS4, lo que sugiere que el equilibrio entre inhibición/activación por la combinación de KIR3DL1 y KIR2DS4 podría constituir una pareja que hace contrapeso para determinar la eficiencia del sistema inmune de un individuo. Otro gen que se ha relacionado con la falta de respuesta al tratamiento es el KIR2DL5 con una frecuencia del 68.3% entre los no respondedores frente a los que presentaban una RVS (40.9%) (Carneiro y cols., 2010). En cuanto al KIR2DS3, como ya se ha comentado anteriormente, Dring y cols. (2011) asocian este KIR con la cronificación de la enfermedad, pero no determinan la

## Discusión

---

respuesta al tratamiento combinado por lo que sus datos no tienen porqué contradecir los nuestros. Cabe destacar que estos mismos autores encuentran una frecuencia del KIR2DS3 del 31% en pacientes crónicos y 19% en los que aclaran el virus, y en nuestra cohorte de pacientes con HCC esta frecuencia es del 28.1%, dato que coincide con el de Dring y cols. (2011).

En cuanto a las uniones receptor-ligando en nuestro grupo de enfermos con HCC hemos observado que sólo se asocia de forma significativa con la respuesta al tratamiento la unión KIR2DS3-HLA-C2, aunque este no sea su ligando. De nuevo nuestros datos coinciden con los de Dring y cols. (2011) ya que ellos concluyen que el genotipo KIR2DS3-C2 es más frecuente en pacientes con HCC que en aquellos que aclaran el virus. La unión KIR-HLA más asociada con la respuesta al tratamiento antiviral ha sido KIR2DL3/KIR2DL3-HLA-C1C1 (Vidal-Castiñeira y cols., 2010; Knapp y cols., 2010), la cual ya había sido descrita asociada al aclaramiento viral espontáneo (Khakoo y cols., 2004; Knapp y cols., 2011). En cuanto a la falta de respuesta, destaca el genotipo KIR2DL2/KIR2DL2-HLA-C1C2 en no respondedores en el estudio de Vidal-Castiñeira y cols. (2010), y el trabajo de Suppiah y cols. (2011) en el que demuestran que las personas con genotipo KIR2DL3/C2C2 son más propensas a no aclarar virus tras la terapia antiviral.

Mediante análisis multivariante hemos estudiado el grado de asociación de estos factores inmunogenéticos (KIRs, HLA, IL28B) con la respuesta al tratamiento combinado, encontrando que DQB1\*0301, IL28B CC y KIR2DS3 se asociaban de manera independiente con la RVS. Posteriormente al ajustar estos tres ítem por los factores predictivos de respuesta ya conocidos (edad, genotipo, CV y GGT) y por tanto posibles variables de confusión, observamos que DQB1\*0301, IL28B CC y KIR2DS3 siguen siendo factores independientes asociados a la respuesta antiviral.

En vista de estos resultados hemos hecho un estudio de sinergismo con los factores inmunogenéticos (KIRs, HLA, IL28B), incluyendo sólo aquellos alelos HLA clase I y II que fueron estadísticamente significativos antes de la corrección de Bonferroni (Tabla 9). Aplicando las medidas de sinergia de Andersson y cols. (2005), encontramos que A\*0201(+)/IL28B CC, KIR2DS3(+)/IL28B CC y KIR2DS3(+)/A\*0201(+) se potencian entre sí para mejorar las tasas de RVS, independientemente de la acción que ejercen por

separado. Dring y cols. (2011) vieron que existía sinergia entre KIR2DS3 y la IL28B TT, de manera que los pacientes con ambos alelos KIR2DS3(+)/IL28B T(+) presentaron un aumento significativo de la probabilidad de cronificación del VHC. Otros autores que estudian sinergismos respecto al aclaramiento/cronificación del virus son Knapp y cols. (2011) que no encuentran protección adicional en la combinación de la homocigosis KIR2DL3-HLA-C1 con la IL28B rs12979860-CC respecto a la que aporta cada factor de forma aislada, es decir que funcionan como factores independientes de protección genética. Por otro lado Suppiah y cols. (2011) encuentran sinergismo entre IL28B rs8099917 G\*/HLA-C2C2, de manera que la combinación de ambos aumenta la predicción de la falta de aclaramiento del virus en pacientes que han recibido tratamiento y en los que no. Estos mismos autores no encuentran sinergia entre las posibles combinaciones dos a dos entre el genotipo KIR, HLA-C2C2 y la IL28B G\*.

En cuanto al sinergismo entre tres factores genéticos, lo único que hay publicado al respecto es de Suppiah y cols. (2011) que examinan la relación entre la ausencia de KIR2DS1, HLA-C e IL28B y, aunque el coeficiente es significativo, el test de bondad de ajuste concluye que no se produce un ajuste significativamente mejor. En nuestro trabajo cabe destacar que aquellos pacientes que son: IL28B CC, DQB1\*0301(+) y KIR2DS3(+) ó IL28B CC, DQB1\*0301(+) y KIR2DL3/2DL3-C1C1 ó IL28B CC, A\*0201(+) y KIR2DS3(+) tienen el 100% de probabilidad de responder al tratamiento.

En conclusión, el balance de las señales de activación e inhibición de las células NK y linfocitos T CD8, que es modulada por el tratamiento y condicionado por la genética, ayuda a definir la respuesta antiviral. Por tanto el estudio de los receptores KIRs y sus ligandos HLA junto a la determinación de otros marcadores genéticos como el SNP rs12979860 de la IL28B es fundamental y puede que en el futuro nos permita identificar marcadores específicos de respuesta/no-respuesta, contribuyendo a seleccionar más activamente a los pacientes que van a recibir la terapia antiviral y por tanto a individualizar el tratamiento de la HCC.



# **CONCLUSIONES**



## 7. CONCLUSIONES

- 1) Los factores predictivos de RVS encontrados en nuestra cohorte de pacientes con HCC tratados de forma combinada con IFN-Peg y RBV son los ya conocidos en la práctica clínica habitual: edad  $\leq 40$  años, GGT  $\leq 37$  U/L, genotipo 2,3 y CV baja (cifras  $\leq 600000$  UI/mL).
- 2) Los factores inmunogenéticos asociados con la RVS fueron el alelo DQB1\*0301, la IL28B CC, KIR2DS3(+), KIR2DS4(-) y KIR3DL1(-). Sin embargo únicamente DQB1\*0301, IL28B CC y KIR2DS3 se asocian de manera independiente con la RVS ajustando por edad, CV, genotipo y GGT.
- 3) Existe un sinergismo entre los genes A\*0201/IL28B CC, KIR2DS3/IL28B CC y KIR2DS3/A\*0201, de forma que su asociación aumenta la probabilidad de respuesta al tratamiento.
- 4) Aquellos pacientes que presenten IL28B CC, DQB1\*0301(+) y KIR2DS3(+) ó IL28B CC, DQB1\*0301(+) y KIR2DL3/2DL3-C1C1 ó IL28B CC, A\*0201(+) y KIR2DS3(+), responden al tratamiento combinado con INF-Peg y RBV.

Por lo tanto podemos concluir que el tratamiento individualizado de pacientes con HCC está cada vez más cercano gracias al estudio de los factores genéticos del hospedador, ya que, como hemos demostrado, la asociación de varios de estos factores genéticos condiciona un sinergismo capaz de incrementar las probabilidades de RVS.



# **BIBLIOGRAFÍA**



## **8. BIBLIOGRAFÍA**

- Ahlenstiel G, Rehermann B. Hepatitis C virus and the threshold of natural killer cell inhibition. *Hepatology* 2005; 41(3):675-7.
- Alter G, Martin MP, Teigen N, et al. Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J Exp Med* 2007; 204:3027-36
- Andersson T, Alfredsson L, Källberg H, et al. Calculating measures of biological interaction. *Eur J Epidemiol* 2005; 20(7):575-9.
- Ascione A, De Luca M, Tartaglione MT, et al. Peginterferon alpha-2a plus ribavirin is more effective than peginterferon alpha-2b plus ribavirin for treating chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2010; 138:116-122.
- Awad T, Thorlund K, hauser G, et al. Cochrane Hepato-Biliary Group. Peginterferon alpha-2a may achieve higher sustained virological response than peginterferon alpha-2b in chronic hepatitis C: a Cochrane systematic review of randomized clinical trials. *Hepatology* 2009; 50(suppl):707-708A.
- Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, et al; HCV RESPOND-2 Investigators. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011; 364(13):1207-17.
- Bailey JR, Zhang H, Wegweiser BW, et al. Evolution of HIV-1 in an HLA-B\*57-positive patient during virologic escape. *J Infect Dis* 2007; 196:50-55.
- Bruguera M, Forns X. Hepatitis C en España. *Med Clin (Barc)* 2006a; 127:113-117.
- Bruguera M, Bañares R, Córdoba J, et al. Documento de consenso de la AEEH sobre el tratamiento de las infecciones por los virus de las hepatitis B y C. *Gastroenterol Hepatol*. 2006b; 29 Supl:216-30.

## **Bibliografía**

---

- Caballero T, Pérez-Milena A, Masseroli M, et al. Liver fibrosis assessment with semiquantitative indexes and image analysis quantification in sustained-responder and non-responder interferon-treated patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001; 34:740-747.
- Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood* 2008; 112:461-9.
- Campbell KS, Purdy AK. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology* 2011; 132(3):315-25
- Carneiro VL, Lemaire DC, Bendicho MT, et al. Natural killer cell receptor and HLA-C gene polymorphisms among patients with hepatitis C: a comparison between sustained virological responders and non-responders. *Liver Int* 2010; 30(4):567-73.
- Chevaliez S, Pawlotsky JM. How to use virological tools for optimal management of chronic hepatitis C. *Liver Int* 2009; 29 Suppl 1:9-14.
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244:359.
- Chung RT, Gale M Jr, Polyak SJ. Mechanisms of action of interferon and ribavirin in chronic hepatitis C: Summary of a workshop. *Hepatology* 2008; 47(1):306-20.
- Davies SM, Ruggieri L, DeFor T, et al. Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor. *Blood* 2002; 100:3825-3827
- Dessouki O, Kamiya Y, Nagahama H, et al. Chronic hepatitis C viral infection reduces NK cell frequency and suppresses cytokine secretion: Reversion by anti-viral treatment. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 393(2):331-7.

- Dring MM, Morrison MH, McSharry BP, et al. Innate immune genes synergize to predict increased risk of chronic disease in hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(14):5736-41.
- Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996; 334(2):77-81.
- Farci P, Shimoda A, Coiana A, et al. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 2000; 288(5464):339-44.
- Feld JJ, Hoofnagle JH. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis c. *Nature* 2005; 436:967-972.
- Feld JJ, Jake Liang T. Hepatitis C—Identifying patients with progressive liver injury. *Hepatology* 2006; 43:S194-S206.
- Foster GR, Fried MW, Hadziyannis SJ, et al. Prediction of sustained virological response in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon alfa-2a (40KD) and ribavirin. *Scand J Gastroenterol.* 2007 Feb; 42(2):247-55.
- Frese M, Pietschmann T, Moradpour D, et al. Interferon-alpha inhibits hepatitis C virus subgenomic RNA replication by an MxA-independent pathway. *J Gen Virol* 2001; 82:723–733.
- Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347:975-982.
- Gagne K, Brizard G, Gueglio B, et al. Relevance of KIR gene polymorphisms in bone marrow transplantation outcome. *Hum Immunol* 2002; 63:271-280.
- Gale M Jr. Effector genes of interferon action against hepatitis C virus. *Hepatology* 2003; 37:975-978.

## **Bibliografía**

---

- Gale M Jr, Foy EM. Evasión of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature*. 2005; 436:939-945
- Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; 461(7262):399-401.
- Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, et al. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology* 2003; 125(1):80-8.
- Ghany MG, Kleiner DE, Alter H, et al. Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2003; 124:97-104.
- Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 2009; 49:1335.
- Gómez-Lozano N, Gardiner CM, Parham P, et al. Some human KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B. *Immunogenetics* 2002; 54:314-9
- Guo JT, Bichko VV, Seeger C. Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon. *J Virol* 2001; 75:8516-8523.
- Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, et al. Peginterferon alfa-2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. A randomised study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004; 140:346-355.
- Harris RA, Sugimoto K, Kaplan DE, et al. Human leukocyte Antigen Class II associations with hepatitis C virus clearance and virus-specific CD4 T cell response among caucasians and african americans. *Hepatology* 2008; 48:70-79.
- Hassan MI, Ahmad F. Structural diversity of class I MHC-like molecules and its implications in binding specificities. *Adv Protein Chem Struct Biol* 2011; 83:223-70.

- Herrmann E, Lee JH, Marinos G, et al. Effect of ribavirin on hepatitis C viral kinetics in patients treated with pegylated interferon. *Hepatology* 2003; 37:1351-8.
- Hiby SE, Walker JJ, O'Shaughnessy KM, et al. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med* 2004; 200:957-65.
- Hong X, Yu RB, Sun NX, et al. Human leukocyte antigen class II DQB1\*0301, DRB1\*1101 alleles and spontaneous clearance of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2005; 11(46):7302-7.
- Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36(5Suppl.1):S21-9.
- Hoofnagle JH, Seef LB. Peginterferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 2006; 355:2444-2451
- Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, et al; ADVANCE Study Team. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2011; 364(25):2405-16.
- Jain MK, Zoellner C. Role of ribavirin in HCV treatment response: now and in the future. *Expert Opin Pharmacother* 2010; 11(4):673-83.
- Jensen DM. A new era of hepatitis C therapy begins. *N Engl J Med* 2011; 364(13):1272-4.
- Ji X, Cheung R, Cooper S, et al. Interferon alfa regulated gene expression in patients initiating interferon treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 37:610-621.
- Kalantar-Zadeh K, Miller LG, Daar ES. Diagnostic discordance for hepatitis C virus infection in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2005; 46(2):290-300.
- Kau A, Vermehren J, Sarrazin C. Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *J Hepatol* 2008; 49(4):634-51.

## **Bibliografía**

---

- Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 2004; 305:872-874.
- Khakoo SI, Carrington M. KIR and disease: a model system or system of models? *Immunol Rev* 2006; 214:186-201.
- Kitamura S, Tsuge M, Hatakeyama T, et al. Amino acid substitutions in core and NS5A regions of the HCV genome can predict virological decrease with pegylated interferon plus ribavirin therapy. *Antivir Ther* 2010; 15(8):1087-97.
- Knapp S, Warshow U, Hegazy D, et al. Consistent beneficial effects of killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL3 and group 1 human leukocyte antigen-C following exposure to hepatitis C virus. *Hepatology* 2010; 51(4):1168-75.
- Knapp S, Warshow U, Ho KM, et al. A polymorphism in IL28B distinguishes exposed, uninfected individuals from spontaneous resolvers of HCV infection. *Gastroenterology* 2011; 141(1):320-5, 325e1-2.
- Kuniholm MH, Kovacs A, Gao X, et al. Specific Human Leukocyte antigen Class I and II Alleles Associated with Hepatitis C Virus Viremia. *Hepatology* 2010; 51(5):1514-22.
- Lau JY, Tam RC, Liang TJ, et al. Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection. *Hepatology* 2002; 35(5):1002-9.
- Lauer GM, Walter BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001; 345(1):41-52.
- Layden-Almer JE, Layden TJ. Viral kinetics in hepatitis C virus: special patient populations. *Semin Liver Dis* 2003; 23(Suppl.1):29-33.
- Layden-Almer JE, Cotler SJ, Layden TJ. Viral kinetics in the treatment of chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2006; 13(8):499-504.

- Le Guillou-Guillemette H, Vallet S, Gaudy-Graffin C, et al. Genetic diversity of the hepatitis C virus: Impact and issues in the antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2007; 13(17):2416-2426.
- Lee CM, Yen YH, Hung CH, et al. Liver interleukin-8 messenger RNA expression and interferon sensitivity-determining region mutations relate to treatment response in hepatitis C 1b. *Antivir Ther* 2011; 16(6):825-32.
- Lindsay KL, Morishima C, Wright EC, et al. Blunted cytopenias and weight loss: new correlates of virologic null response to re-treatment of chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6:234.
- Liu SY, Sanchez DJ, Cheng G. New developments in the induction and antiviral effectors of type I interferon. *Curr Opin Immunol* 2011; 23(1):57-64.
- López-Rodríguez R, Trapero-Marugan M, Borque MJ, et al. Genetic variants of interferon-stimulated genes and IL-28B as host prognostic factors of response to combination treatment for chronic hepatitis C. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 90(5):712-21.
- López-Vázquez A, Rodrigo L, Martínez-Borra J, et al. Protective effect of the HLA-Bw4I80 epitope and the killer cell immunoglobulin-like receptor 3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. *The Journal of Infectious Diseases* 2005; 192:162-165.
- MacFarlane AW IV, Campbell KS. Signal transduction in natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 298:23-57.
- Macquillan GC, Niu X, Speers D, et al. Does sequencing the PKRBD of hepatitis C virus NS5A predict therapeutic response to combination therapy in an Australian population? *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19(5):551-7.

## **Bibliografía**

---

- Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, et al. Peginterferon alfa 2b plus ribavirin compared with interferon alfa2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised controlled trial. *Lancet* 2001; 358:958-65.
- Marsh SGE, Parham P, Dupont B, et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report 2002. *Hum Immunol* 2003; 64:648-54.
- Martin AM, Freitas EM, Witt CS, et al. The genomic organization and evolution of the natural killer immunoglobulinlike receptor (KIR) gene cluster. *Immunogenetics* 2000; 51:268-80.
- Martin MP, Gao X, Lee JH, et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 2002; 31:429-434.
- McCarthy JJ, Li JH, Thompson A, et al. Replicated Association between an IL28B Gene Variant and a Sustained Response to Pegylated Interferon and Ribavirin. *Gastroenterology* 2010; 138(7):2307-14.
- McQueen KL, Dorighi KM, Guethlein LA, et al. Donor-recipient combinations of group A and B KIR haplotypes and HLA class I ligand affect the outcome of HLA-matched, sibling donor hematopoietic cell transplantation. *Hum Immunol* 2007; 68:309-323.
- Micallef JM, Kaldor JM, Dore GJ. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *J Viral Hepat* 2006; 13:34-41.
- Middleton D, Gonzelez F. The extensive polymorphism of KIR genes. *Immunology* 2009; 129(1):8-19.
- Montes-Cano MA, Caro-Oleas JL, Romero-Gómez M, et al. HLA-C and KIR genes in hepatitis C virus infection. *Hum Immunol* 2005; 66(11):1106-9.

- Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, et al. Mechanism of action of ribavirin in a novel hepatitis C virus replication cell system. *Virus Res* 2011; 157(1):61-70.
- Muir AJ, Bornstein JD, Killenberg PG. Atlantic Coast Hepatitis Treatment Group. Peginterferon alfa-2b and ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C in blacks and non-Hispanic whites. *N Engl J Med* 2004; 350:2265.
- Muir AJ, Shiffman ML, Zaman A, et al. Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2010; 52:822.
- Muñoz de Rueda P, Casado J, Patón R, et al. Mutations in E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR, and NS5A-V3 of Hepatitis C Virus Genotype 1 and Their Relationships to Pegylated Interferon-Ribavirin Treatment Responses. *J Virol* 2008; 82(13):6644–6653.
- Muñoz de Rueda P, López-Nevot MA, Sáenz-López P, et al. Importance of Host Genetic Factors HLA and IL28B as Predictors of Response to Pegylated Interferon and Ribavirin. *Am J Gastroenterol* 2011; 106(7):1246-54.
- Murphy EL, Bryzman SM, Glynn SA, et al. Risk factors for hepatitis C virus infection in United States blood donors. NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study (REDS). *Hepatology* 2000; 31(3):756-62.
- Myers RP, Patel K, Pianko S, et al. The rate of fibrosis progression is an independent predictor of response to antiviral therapy in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2003; 10:16-22
- Nelson GW, Martin MP, Gladman D, et al. Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. *J Immunol* 2004; 173:4273-4276.

## **Bibliografía**

---

- Neumann-Haefelin C, Timm J, Spangenberg HC, et al. Virological and immunological determinants of intrahepatic virus-specific CD8+ T-cell failure in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2008; 47(6):1824-36.
- Norman PJ, Abi-Rached L, Gendzekhadze K, et al. Unusual selection on the KIR3DL1/S1 natural killer cell receptor in Africans. *Nat Genet* 2007; 39:1092-9.
- O'Connor GM, Guinan KJ, Cunningham RT, et al. Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells. *J Immunol* 2007; 178:235-41.
- Paladino N, Flores AC, Marcos CY, et al. Increased frequencies of activating natural killer receptors are associated with liver injury in individuals who do not eliminate hepatitis C virus. *Tissue Antigens* 2007; 69(Suppl.1):109-11.
- Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:201-214.
- Parham P, Abi-Rached L, Matevosyan L, et al. Primate-specific regulation of natural killer cells. *J Med Primatol* 2010; 39(4):194-212.
- Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology* 2002; 122(6):1554-68.
- Pomper GJ, Wu Y, Snyder EL. Risks of transfusion-transmitted infections: 2003. *Curr Opin Hematol* 2003; 10:412.
- Poordad F, McCone J Jr, Bacon BR, et al; SPRINT-2 Investigators. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011; 364(13):1195-206.
- Purdy AK, Campbell KS. Natural killer cells and cancer: regulation by the killer cell Igl like receptors (KIR). *Cancer Biol Ther* 2009; 8:2211-20.
- Rajagopalan S, Long EO. Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. *J Exp Med* 2005; 201:1025-1029.

- Reed KE, Rice CM. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 242:55-84.
- Rhodes SL, Erlich H, Im KA, et al. Associations between the human MHC and sustained virologic response in the treatment of chronic hepatitis C virus infection. *Genes Immun* 2008; 9:328–333.
- Robinson J, Waller MJ, Stoehr P, et al. IPD—the Immuno Polymorphism Database. *Nucleic Acids Res* 2005; 331:D523–6.
- Rodriguez-Torres M, Jeffers LJ, Sheikh MY, et al. Peginterferon alfa-2a and ribavirin in Latino and non-Latino whites with hepatitis C. *N Engl J Med* 2009; 360:257.
- Romero V, Azocar J, Zúñiga J, et al. Interaction of NK inhibitory receptor genes with HLA-C and MHC class II alleles in Hepatitis C virus infection outcome. *Mol Immunol* 2008; 45(9):2429-36.
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002; 295:2097–100.
- Salmerón J, Muñoz de Rueda P, Ruiz-Extremera A, et al. Quasispecies as predictive response factors for antiviral treatment in patients with chronic hepatitis C. *Digest Dis Sci* 2006; 51(5):960-7.
- Salmerón J, Casado J, Muñoz de Rueda P, et al. Quasispecies as predictive factor of rapid, early and sustained virological responses in chronic hepatitis C, genotype 1, treated with peginterferon-ribavirin. *J Clin Virol* 2008; 41(4):264-9.
- Sarrazin C, Bruckner M, Herrmann E, et al. Quasispecies heterogeneity of the carboxy-terminal part of the E2 gene including the PePHD and sensitivity of hepatitis C virus 1b isolates to antiviral therapy. *Virology* 2001; 289(1):150-63.
- Scott JD, Gretch DR. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: a systematic review. *JAMA* 2007; 297(7):724-32.

## **Bibliografía**

---

- Seef LB, Hoofnagle JH. National institutes of health consensus development conference: Management of hepatitis C: 2002. *Hepatology* 2002; (Suppl.1):S1.
- Shao W, Tang J, Dorak MT, et al. Molecular typing of human leukocyte antigen and related polymorphisms following whole genome amplification. *Tissue Antigens* 2004; 64:286–92.
- Sherman KE, Flamm SL, Afdhal NH, et al; ILLUMINATE Study Team. Response-guided telaprevir combination treatment for hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2011; 365(11):1014-24.
- Shiffman ML. Pegylated interferons: what role will they play in the treatment of chronic hepatitis C? *Curr Gastroenterol Rep* 2001; 3:30.
- Shiffman ML, Ghany MG, Morgan TR, et al. Impact of reducing peginterferon alfa-2a and ribavirin dose during retreatment in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2007; 132:103.
- Shiratori Y, Kato N, Yoshida H, et al. How soon can a virological sustained response be determined after withdrawal of interferon therapy in chronic hepatitis C? Tokyo-Chiba Hepatitis Research Group. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14(1):79-84.
- Shiratori Y, Omata M. Predictors of the efficacy of interferon therapy for patients with chronic hepatitis C before and during therapy: how does this modify the treatment course? *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15Suppl:E141-51.
- Singh R, Kaul R, Kaul A, et al. A comparative review of HLA associations with hepatitis B and C viral infections across global populations. *World J Gastroenterol* 2007; 13:1770–87.
- Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 2005; 42:501–10.
- Strominger JL. Human histocompatibility proteins. *Immunol Rev* 2002; 185:69-77.

- Sulkowski MS, Shiffman ML, Afdhal NH, et al. Hepatitis C virus treatment-related anemia is associated with higher sustained virologic response rate. *Gastroenterology* 2010; 139:1602.
- Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 2009; 41(10):1100-4.
- Suppiah V, Gaudieri S, Armstrong NJ, et al. IL28B, HLA-C, and KIR variants additively predict response to therapy in chronic hepatitis C virus infection in a European Cohort: a cross-sectional study. *PLoS Med* 2011; 8(9):e1001092.
- Swain MG, Lai MY, Shiffman ML, et al. Durable sustained virological response after treatment with peginterferon alpha- 2a (PEGASYS ®) alone or in combination with ribavirin (COPEGUS ®): 5-year-follow-up and the criteria of a cure. *J Hepatol* 2007; 46(Suppl.1):3A.
- Takedai M, Takatani A, Funato T, et al. HCV-RNA test in hepatitis C virus infection--a systematic review. *Rinsho Byori* 2008; 56(10):868-76.
- Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009; 41(10):1105-9.
- Taniguchi M, Kawabata M. KIR3DL1/S1 genotypes and KIR2DS4 allelic variants in the AB KIR genotypes are associated with Plasmodium-positive individuals in malaria infection. *Immunogenetics* 2009; 61(11-12):717-30.
- Tarantino G, Conca P, Sorrentino P, et al. Metabolic factors involved in the therapeutic response of patients with hepatitis C virus-related chronic hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21:1266-1268.
- Terraul NA. Sexual activity as risk factor for hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36:S99-S105.

## **Bibliografía**

---

- Tedbury P, Welbourn S, Pause A, et al. The subcellular localization of the hepatitis C virus non-structural protein NS2 is regulated by an ion channel-independent function of the p7 protein. *J Gen Virol* 2011; 92(Pt 4):819-30.
- Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009; 461:798-801.
- Tilg H. New insights into the mechanisms of interferon alfa: an immunoregulatory and anti-inflammatory cytokine. *Gastroenterology* 1997; 112:1017
- Torres-García D, Barquera R, Zúñiga J. Receptores de células NK (KIR): Estructura, función y relevancia en la susceptibilidad de enfermedades. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2008; 21(1):57-65.
- Tsai SL, Liaw YF, Chen MH, et al. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 1997; 25:449-458.
- Van der Slik AR, Koeleman BP, Verduijn W, et al. KIR in type 1 diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects. *Diabetes* 2003; 52:2639-2642.
- Vidal-Castiñeira JR, López-Vázquez A, Díaz-Peña R, et al. Effect of killer immunoglobulin-like receptors in the response to combined treatment in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2010; 84(1):475-81.
- Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:217-251.
- Wasley A, Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis* 2000; 20(1):1-16.
- Williams AP, Bateman AR, Khakoo SI. Hanging in the balance. KIR and their role in disease. *Mol Inter* 2005; 5:226-240.

- Wilson MJ, Torkar M, Haude A, et al. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:4778–83.
- Wong T, Lee S. Hepatitis C: a review for primary care physicians. *CMAJ* 2006; 174:649–659.
- Wu J, Lanier LL. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res* 2003; 90:127–56.
- Yawata M, Yawata N, Draghi M, et al. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med* 2006; 203:633-645.
- Yee HS, Currie SL, Darling JM, et al. Department of Veterans Affairs Hepatitis C Resource Center. Management and treatment of hepatitis C viral infection: recommendations from the Department of Veterans Affairs Hepatitis C Resource Center program and the National Hepatitis C Program office. *Am J Gastroenterol* 2006; 101(10):2360-78.
- Yunis EJ, Larsen CE, Fernandez-Viña M, et al. Inheritable variable sizes of DNA stretches in the human MHC: conserved extended haplotypes and their fragments or blocks. *Tissue Antigens* 2003; 62(1):1-20.
- Zeuzem S, Hultcrantz R, Bourliere M, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. *J Hepatol* 2004; 40:993.
- Zeuzem S, Andreone P, Pol S, et al; REALIZE Study Team. Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N Engl J Med* 2011; 364(25):2417-28.