



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

TESIS DOCTORAL

**PRODUCCIÓN Y POLIMORFISMOS DE LAS CITOQUINAS IL-10,
IL-6, TNF- α , IFN- γ Y TGF- β EN PACIENTES CON HEPATITIS
CRÓNICA C GENOTIPO 1 Y SU RELACIÓN CON LA IL-28B Y LA
RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTIVIRAL**

**ROSARIO DEL PILAR LÓPEZ SEGURA
GRANADA 2011**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Rosario del Pilar López Segura
D.L.: GR 1899-2012
ISBN: 978-84-9028-048-5

**Lo que sabemos es una
gota de agua, lo que
ignoramos es el océano**

Isaac Newton

**EL 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^a ROSARIO DEL PILAR LÓPEZ SEGURA sobre el tema “Producción y polimorfismos de las citoquinas IL-10, IL-6, TNF- α , IFN- γ y TGF- β en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 y su relación con la IL-28B y la respuesta al tratamiento antiviral” 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 9 de enero de 2011

Fdo. Dr. Javier Salmerón Escobar

**LA 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^a ROSARIO DEL PILAR LÓPEZ SEGURA sobre el tema “Producción y polimorfismos de las citoquinas IL-10, IL-6, TNF- α , IFN- γ y TGF- β en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 y su relación con la IL-28B y la respuesta al tratamiento antiviral” 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 9 de enero de 2011

Fdo. Dra. Esther José Pavón Castellero

LA 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^a ROSARIO DEL PILAR LÓPEZ SEGURA sobre el tema “Producción y polimorfismos de las citoquinas IL-10, IL-6, TNF- α , IFN- γ y TGF- β en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 y su relación con la IL-28B y la respuesta al tratamiento antiviral” 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 9 de enero de 2011

Fdo. Dra. Paloma Muñoz de Rueda

ARTÍCULOS, COMUNICACIONES Y PREMIOS

De este trabajo se han presentado los siguientes artículos y comunicaciones:

1. ARTÍCULOS

Pavón EJ, Muñoz de Rueda P, **López-Segura RP**, Gila A, Quiles R, Muñoz-Gámez JA, Carazo A, Martínez P, Ruiz-Extremera A, Salmerón J, *Importance of IL-10 and IL-6 during chronic hepatitis C genotype 1 treatment and their relation with IL-28B*. Que actualmente se encuentra enviada para su revisión y publicación en la revista *Journal of Virology*.

2. COMUNICACIONES

• MODALIDAD ORAL

Comportamiento de citoquinas Th1 y Th2 en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 tratados con interferón pegilado y ribavirina. Aceptada en la **XL Reunión de la Sociedad Andaluza de Patología Digestiva (SAPD)** celebrada en Granada del 22 al 24 de octubre de 2009.

• MODALIDAD PÓSTER CON PRESENTACIÓN ORAL

Influencia de la producción y polimorfismos de IL-10 e IL-6 en la respuesta al tratamiento con interferón pegilado (INFpeg) y ribavirina (RBV) en pacientes con hepatitis crónica C (HCC). Aceptada en el **Congreso Nacional de Patología Digestiva** celebrado en Sevilla del 11 al 14 de junio de 2011.

• MODALIDAD PÓSTER

*Estudio de la IL-6 y la IL-10 durante el tratamiento combinado en pacientes con hepatitis crónica C (HCC) genotipo 1 y su relación con la IL-28B y la respuesta virológica sostenida (RVS). Aceptada en el **XI Congreso Nacional de Virología (SEV)** celebrado en Granada del 29 Mayo al 1 de junio de 2011.*

*Estudio de la IL-6 y la IL-10 durante el tratamiento combinado en pacientes con hepatitis crónica C (HCC) genotipo 1 y su relación con la IL-28B y la respuesta virológica sostenida (RVS). Aceptada en el **XXXVI Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (A.E.E.H.)** celebrado en Madrid del 23 al 25 de febrero de 2011.*

*IL-10 decrease after Interferon pegilated and Rivabirin (pegIFN/RBV) treatment is associated with CC polymorphism of IL-28B and sustained virologic response (SVR) in patients with chronic hepatitis C (CHC) genotype 1. Aceptada en la **LXI American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)** celebrada en Boston (EE.UU.) del 29 de octubre al 2 de noviembre de 2010.*

*Comportamiento de citoquinas Th1 y Th2 y sus polimorfismos en pacientes con Hepatitis Crónica C (HCC) genotipo 1 tratados con Interferón Pegilado y Ribavirina. Aceptada en el **XXXV Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (A.E.E.H.)** celebrado en Madrid del 17 al 19 de febrero de 2010.*

3. PREMIOS

IL-10 decrease after interferon pegilated and ribavirin (pegINF/RBV) treatment is associated with CC polymorphism of IL-28B and sustained virologic

response (SVR) in patients with chronic hepatitis C (CHC), genotype 1. Trabajo de investigación premiado con el **PREMIO DE INVESTIGACIÓN AÑO 2011 del Departamento de Medicina de la Universidad de Granada.**

AGRADECIMIENTOS

Antes de comenzar, quisiera hacer lo más necesario de todo, recordar a aquellas personas sin las que todo esto hubiera sido mucho más difícil. Son aquellas personas que te demuestran que están ahí de forma incondicional y que te animan a seguir con su ejemplo, apoyándote, de las que aprendes si miras en su interior. Cuando la tesis finalice esas personas serán lo que haya hecho que valga la pena y que aprenda del esfuerzo realizado, a nivel científico y/o personal.

A mis directores de tesis: Al Dr. Javier Salmerón, por confiar en mí dándome la oportunidad de realizar esta tesis, por animarme siempre a trabajar duro y enseñarme la importancia de investigar. A la Dra. Paloma Muñoz de Rueda, por estar ahí siempre, sea lo que sea lo que necesites, por invertir su tiempo en los demás, por su dedicación en todo lo que hace demostrando día a día que disfruta con su trabajo, y por supuesto a la Dra. Esther José Pavón Castellero, que inició conmigo el camino y ha estado a mi lado todo este tiempo, por su amabilidad, por su comprensión, por sus consejos, por estar siempre disponible para resolver mis dudas con una sonrisa, por sus buenas ideas y en definitiva por enseñarme a escribir una tesis.

Al Departamento de Medicina de la Universidad de Granada y al personal de la Escuela de Postgrado por haberme ayudado en todo lo referente “al papeleo” de la tesis cuando había algún problema, en especial a Javier Gómez, a Montse, a María José y a Antonio Marín, por hacerlo todo tan fácil, por atenderte siempre con cariño y porque con ellos “todo tiene solución”.

A todos los miembros del Equipo de Investigación, por acogernos, por su simpatía, por su cariño, por su interés en nosotros y entre ellos a Ana Gila por su

colaboración en la recogida de datos, tan importante para la realización de la tesis.

A todos los pacientes que se han prestado de forma voluntaria a este estudio y sin los cuales esta tesis no hubiera tenido lugar.

A mis compañeros y amigos de la Unidad Clínica de Digestivo, en especial a Lola Quintero por ser mi desahogo en los momentos de agobio, por sus valiosos consejos, por escucharme, y por no solo escucharme, sino por preocuparse de verdad por mí, ella sabe por qué lo digo. A Pilar, a Elo y a Elena por sentir las cerca en los momentos más difíciles. A todos mis compañeros residentes, por el apoyo, por el ánimo, por la disponibilidad para cambiar guardias cuando no vienen bien. A Mónica por su alegría, por su templanza, a Andrés por las conversaciones en el “chino”, por su buen corazón, por su forma de ser. A Ali y a Luismi por su nobleza e interés por cómo te van las cosas, por su “estar ahí” siempre cuando uno los necesita para lo que sea (Ali, gracias por todo, por escucharme, por comprenderme, por aliviarme). A mi co-R por caminar juntas, porque el ritmo de la residencia, de la tesis, de las guardias...vivido al lado de otra persona con la que compartir se convierte en un camino entrañable, donde a cada paso se aprende algo difícil de olvidar.

Y a mi familia...sin los que no sé que hubiera hecho: A mi padre por su amor incondicional, por darlo todo por sus hijas, por su esfuerzo desde que lo conozco, y por el de antes de conocerlo, por el que lo admiro profundamente, por su ejemplo diario, por su nobleza, por las conversaciones al salir a andar por Almería o por Cabo de gata que tan entrañables son para mí. A mi madre, por su ternura, por su cariño, por sus consejos, por su ejemplo de honradez y esfuerzo, por escuchar mis problemas por teléfono con paciencia, que sé que es duro (te doy mil gracias), por estar siempre pendiente de lo que necesitamos y en definitiva por

su entrega incondicional. A mi hermana por los momentos de “hermanas”, las confidencias, los juegos, las risas, los días de playa, de feria... (te echo de menos). A mis abuelos, a la que vive y a los que están en el cielo. A Dolores y a Luis, que también forman parte de mi familia y de los que no podría olvidarme porque sé lo que me quieren. Fran, gracias a ti también, por animarme y por transmitirme tú visión positiva de las cosas, por estar conmigo siempre, en la distancia y en la cercanía, por entenderme y adaptarte a mí cuando lo necesito sin pedir nada a cambio, por escucharme cuando estoy bien y, lo más difícil, soportarme cuando estoy mal, porque haces que todo valga la pena. Y por último, gracias a Loli y a Paco, Juan, Juan abuelo e Isabel, Noelia y José Manuel por quererme y hacerme sentir como una más de su familia.

Gracias a todos

índice

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	23
1. VIRUS DE LA HEPATITIS C	25
1.1 Definición y estructura	25
1.2 Epidemiología y vías de transmisión	27
1.3 Patogenicidad: ciclo replicativo	30
1.4 Historia natural y manifestaciones clínicas	32
1.5 Diagnóstico	33
1.5a. Métodos indirectos.....	33
1.5b. Métodos directos.....	35
1.6 Tratamiento de la hepatitis crónica C	37
1.6a. Candidatos al tratamiento.....	37
1.6b. Tratamiento estándar.....	38
1.6c. Tipos de respuesta al tratamiento estándar.....	42
1.6d. Nuevas estrategias terapéuticas.....	45
2. VIRUS, PACIENTE, SISTEMA INMUNITARIO Y ENFERMEDAD	47
2.1 Tipos de factores predictivos de respuesta al Tratamiento antiviral	47
2.1a. Factores relacionados con el virus.....	48
2.1b. Factores relacionados con la adherencia.....	50
2.1c. Factores relacionados con la enfermedad.....	51
2.1d. Factores relacionados con el hospedador.....	51
2.2 Respuesta inmunitaria	55

3. CITOQUINAS.....	58
3.1 IL-10.....	62
3.2 IL-6.....	64
3.3 TNF- α	67
3.4 IFN- γ	68
3.5 TGF- β	70
4. IL-28B.....	72
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.....	73
OBJETIVOS.....	77
MATERIALES Y MÉTODOS.....	81
1. Diseño.....	83
2. Sujetos y ámbito de estudio.....	83
3. Criterios de inclusión y exclusión.....	83
4. Tratamiento y respuesta a la terapia.....	83
5. Variables de estudio.....	85
6. Recogida y análisis de datos.....	85
7. Análisis estadístico.....	86
8. Métodos.....	87
RESULTADOS.....	91
1. Características basales de los pacientes del estudio y su relación con la respuesta al tratamiento antiviral (factores predictivos de RVS).....	93

2. Características de las citoquinas en muestras basales, semana-12 y semana-72 y su relación con los distintos tipos de respuesta al tratamiento antiviral.....	96
3. Análisis multivariante de los factores de respuesta al tratamiento antiviral.....	99
4. Estudio de las citoquinas durante el tratamiento.....	101
4.1. Respuesta virológica precoz (semana-12).....	101
4.2. Respuesta virológica sostenida (semana-72).....	104
5. Citoquinas y su relación con el genotipo de la IL-28B.....	109
6. Polimorfismos.....	114
DISCUSIÓN.....	117
CONCLUSIONES.....	129
ABREVIATURAS.....	133
BIBLIOGRAFÍA.....	139

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. VIRUS DE LA HEPATITIS C

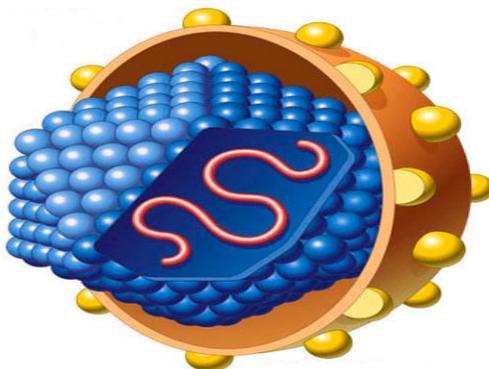
El virus de la hepatitis C (VHC) es un importante patógeno humano, no solo por su elevada prevalencia en todo el mundo, sino también por las complicaciones potencialmente graves de la infección persistente, de las que, además, se espera un aumento en un futuro próximo [1]. Se considera la principal causa de hepatitis crónica, cirrosis hepática (CH) y carcinoma hepatocelular (CHC), siendo la indicación más común para el trasplante hepático [2, 3]. A pesar de los importantes avances realizados respecto a la asistencia de los pacientes infectados y en el campo de la investigación, aún no se tiene un conocimiento preciso de los mecanismos de replicación y persistencia de este virus.

1.1. Definición y estructura

El VHC es un virus ARN monocatenario y de polaridad positiva que pertenece a la familia *Flaviviridae* y que se ha clasificado como el único miembro del género *Hepacivirus* [4, 5].

El conocimiento de su estructura es aún bastante incompleto. Sabemos que presenta un diámetro aproximado de 55-65 nm. El genoma del VHC contiene alrededor de 9400-9600 nucleótidos, rodeado por la nucleocápside o cápside (icosaédrica) que está compuesta por una estructura proteica denominada *Core*. Ésta, a su vez, se recubre por una membrana lipídica a la cual están ancladas las proteínas E1 y E2 responsables de la unión y entrada del virus a los hepatocitos [6] (*Figura 1*).

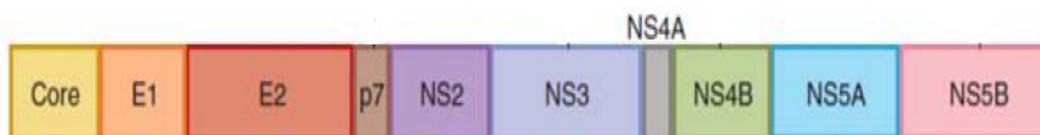
Figura 1



VHC

Existe un solo marco de lectura abierta (ORF, *Open Reading Frame*) capaz de codificar el precursor de un gran polipéptido vírico, de alrededor de 3000 aminoácidos, con longitud variable de unas cepas a otras, y regiones en los extremos 5' y 3' no traducidas (NTR, *Non Translated Regions* o UTR, *UnTranslated Regions*) [7]. La división de este polipéptido vírico por la acción de proteasas es la que genera tanto las proteínas estructurales previamente mencionadas (cápside [C] o p21, envoltura 1 [E1] o gp31, envoltura 2 [E2] o gp70) como las no estructurales (NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b) [6] que además de tener una participación importante en la morfogénesis del virus [8], (**Figura 2**), poseen actividades enzimáticas esenciales para su replicación y el procesamiento de la poliproteína [9].

Figura 2

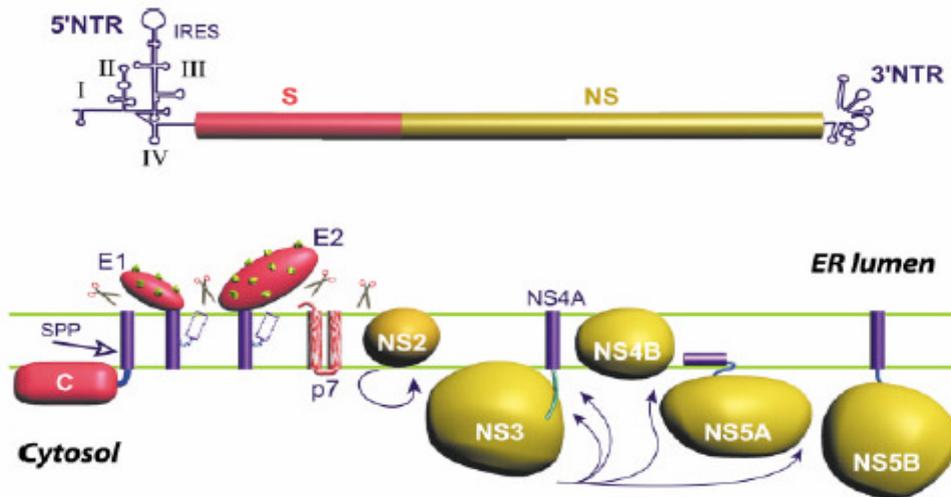


P7: péptido de unión

Proteínas estructurales y no estructurales del VHC

En la **Figura 3** se muestra, gráficamente, la organización genómica del VHC antes descrita.

Figura 3



Organización genómica del VHC (superior) y procesamiento en poliproteínas (inferior)

La región 5'NTR contiene cuatro dominios altamente estructurados y la región de unión al ribosoma (IRES). La región 3'NTR contiene una región estable. La zona intermedia codifica una poliproteína de alrededor de 3.000 aminoácidos según el genotipo. S y NS son las regiones que codifican las proteínas estructurales y no estructurales, respectivamente. Las tijeras representan el lugar de acción de las peptidasas y el punteado verde sobre E1 y E2 indica la glucosilación de las proteínas de la envoltura.

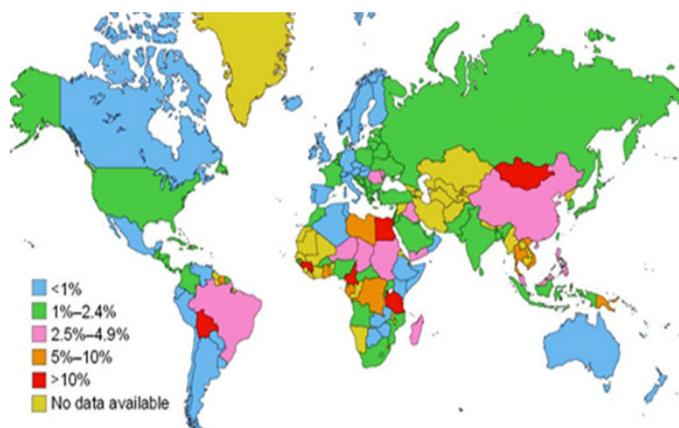
1.2. Epidemiología y vías de transmisión

La infección por el VHC constituye un problema socio-sanitario de ámbito universal. Es una de las causas principales de enfermedad hepática crónica, con aproximadamente 170-240 millones de personas infectadas por todo el mundo, lo que hace de esta infección una causa significativa de enfermedad y mortalidad [10]. Es por tanto, un problema social de salud por su prevalencia, que alcanza el 2-3%

de la población general, y un problema también para el sistema sanitario por las repercusiones de la enfermedad y su coste [11, 12].

Existen notables diferencias geográficas (**Figura 4**), con índices de prevalencia que varían entre el 0.4% y el 1.1% en EE.UU y Canadá, y entre el 9.6% y el 20% en el norte de África [13].

Figura 4



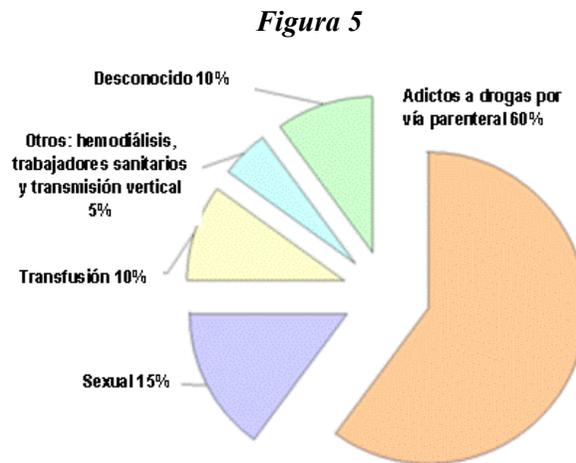
Prevalencia mundial del VHC

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 [5, 14].

La prevalencia es mayor en personas de 30 a 49 años que en las de edades superiores o inferiores. También es más alta en los varones que en mujeres (2.5% frente a 1.2%) y en determinados grupos étnicos, así los individuos de raza negra presentan una prevalencia del VHC (3.2%) superior a los de raza caucásica (1.5%) [14].

Los riesgos más importantes para la transmisión del VHC son la transfusión de sangre antes de 1992, el uso de drogas por vía intravenosa y las actividades

sexuales de alto riesgo, 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 grupo de riesgo ya que la incidencia de infección tras un pinchazo accidental es del 5-10%. La principal vía de transmisión en la actualidad es la parenteral, de forma que, las infecciones nuevas por el VHC se deben sobre todo al consumo de drogas intravenosas y, en menor medida, a las relaciones sexuales con personas infectadas [15] (*Figura 5*).



Vías de transmisión del VHC en la actualidad

Un gran porcentaje de las personas con infección crónica por el VHC permanecen asintomáticas sin ser diagnosticadas pero, probablemente, necesitarán atención médica en un futuro próximo por lo que se espera un incremento del cuádruple de personas diagnosticadas de infección crónica por el VHC hasta el año 2015 [16].

1.3. Patogenicidad: ciclo replicativo

La replicación del VHC se puede dividir en una serie de etapas [9] que se describen a continuación y se muestran en la *Figura 6* [17].

1) **Entrada a la célula huésped:** aunque se desconoce el mecanismo, se ha comprobado que las proteínas de la envoltura E1 y/o E2 interactúan con varios receptores celulares como CD81.

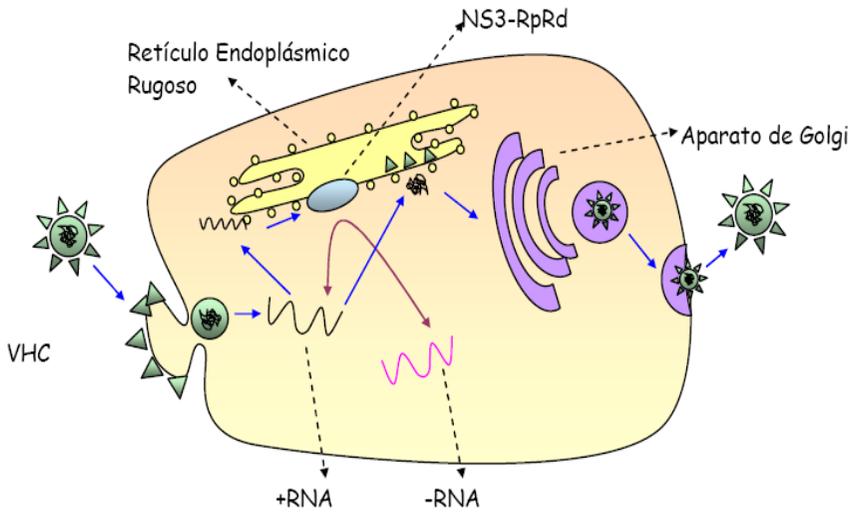
2) **Liberación del ARN viral** al citoplasma y **traducción** del mismo mediada por IRES de la región 5'NTR.

3) **Procesamiento de la poliproteína por proteasas celulares y virales:** Las proteínas virales no estructurales se quedan fuertemente unidas a membranas del retículo endoplásmico (RE) formando el complejo de replicación asociado a membranas.

4) **Replicación del ARN viral:** la cadena positiva de ARN-VHC es utilizada por la ARN-polimerasa ARN dependiente (RpRd) como molde para la síntesis de la cadena negativa, que servirá como molde para la síntesis de las nuevas cadenas positivas de ARN.

5) **Ensamblaje y encapsidación:** las nuevas cadenas positivas de ARN viral interactúan con las proteínas del *Core* formando la nucleocápside, que adquirirá su envoltura en la luz del RE.

6) **Maduración y liberación del virión:** se cree que los viriones son exportados fuera de la célula a través de los sistemas de excreción celulares.

Figura 6: Bartenschlager y cols., 2000.

Ciclo replicativo del VHC

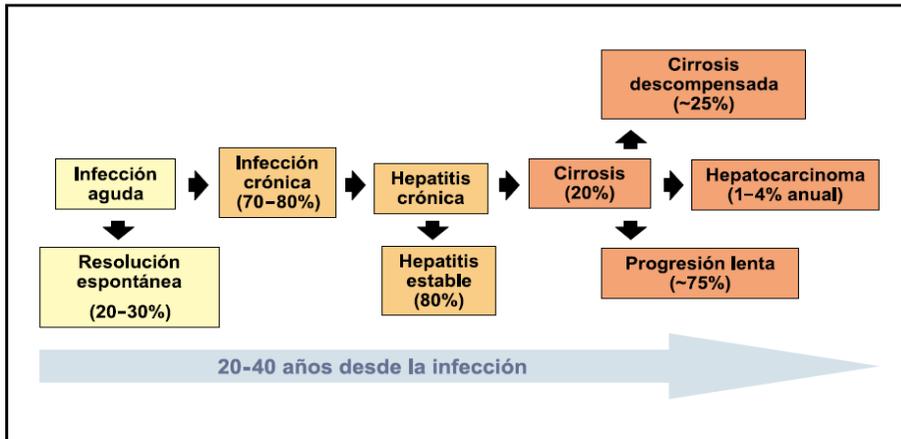
El genoma del VHC no se integra en el núcleo celular y todo su ciclo se realiza en el citoplasma del hepatocito. Este aspecto es de crucial importancia, ya que no presenta formas de reservorio estable de infección. Una de las consecuencias de este hecho es que la vida media de su ARN en la célula es muy corta, aproximadamente 1.5 horas, lo que obliga a que tenga una alta tasa de producción viral para poder mantener la infección de forma persistente. Por otro lado, la ausencia de reservorios estables, posibilita la erradicación total del virus si se utilizan terapias que produzcan una enérgica inhibición de su replicación. Sin embargo, aún así, no siempre se consigue. El mecanismo por el cual el VHC evade al sistema inmune, persiste, y causa inflamación crónica del hígado no se conoce completamente. Una de las hipótesis consiste en que la respuesta inmunitaria contra el VHC es incapaz de eliminar el virus de los hepatocitos infectados una vez que se ha establecido la infección [18]. Se piensa, hipotéticamente, que es debido a una insuficiente inducción de la respuesta inmunitaria primaria durante la infección

aguda [19, 20] y/o a la incapacidad para mantener altos niveles de la respuesta de linfocitos T en la fase crónica [21].

1.4. Historia natural y manifestaciones clínicas

El **período de incubación** del VHC suele ser aproximadamente de unas 8 semanas, pudiendo variar entre las 2 y las 28. En primer lugar, y tras el periodo de incubación, se produce una **hepatitis aguda** (HA) que se caracteriza por ser clínicamente silente. Tan sólo un 25% de las HA son sintomáticas y suelen manifestarse de forma inespecífica, con síntomas como astenia, anorexia, náuseas o ictericia. La infección aguda puede autolimitarse, desencadenar una hepatitis fulminante o bien evolucionar a hepatitis crónica. La **resolución completa**, está determinada por factores que no están claros (aparición de ictericia en la fase aguda, sexo femenino...), objeto de estudio y debate. Sólo un 20-30% de personas infectadas aclarará espontáneamente el virus [22], aunque hemos observado que esta última cifra puede variar algo de unas referencias a otras. La **forma fulminante**, que consistente en un deterioro importante de la función hepática, es infrecuente pero grave, ya que puede suponer un desenlace mortal para el enfermo. La enfermedad se hace **crónica** en aproximadamente el 70-80% de individuos infectados [23], definiéndose ésta como la persistencia del ARN-VHC durante un periodo superior a 6 meses tras el comienzo de la infección. Durante los 20-40 años siguientes a la infección, aproximadamente el 80% de los pacientes con hepatitis crónica C (HCC) experimentará una evolución **estable**, sin una progresión significativa pero habrá evolución a **cirrosis** en el 20% restante; de estos cirróticos alrededor de un 25% desarrollarán **descompensación** de su enfermedad hepática y, en algunos casos, **CHC** (riesgo del 1-4% anual) [24] (*Figura 7*).

Figura 7

*Historia natural de la infección por el VHC*

1.5. Diagnóstico

En la actualidad, no se dispone de un sistema celular que permita el cultivo del virus de una forma eficiente y útil para el diagnóstico de laboratorio. Por ello, se emplean **métodos indirectos** poniendo de manifiesto la respuesta serológica frente a diferentes proteínas del virus (anticuerpos frente al VHC) y **métodos directos** que permiten la detección y cuantificación del ARN viral en sangre [25].

1.5a. Métodos indirectos

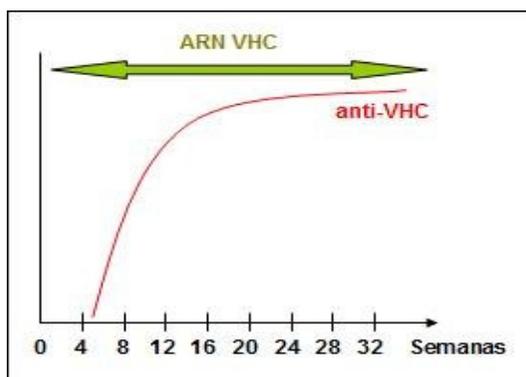
📖 Anticuerpos anti-VHC

En 1989 surgieron los primeros ensayos capaces de detectar anticuerpos frente al VHC. Desde entonces han evolucionado a lo largo de varias generaciones, mejorando progresivamente [26]. Actualmente, los métodos de enzimoimmunoanálisis (EIA) son los más utilizados por su gran sensibilidad y especificidad. Suelen utilizar antígenos sintéticos, recombinantes o la combinación

de ambos para evaluar la cantidad de inmunoglobulina G (IgG) específica contra el VHC que tiene la muestra.

Cuando se indica que un suero es reactivo se está afirmando que tiene anticuerpos frente a alguno o todos los antígenos empleados en la prueba. Tardan en aparecer entre 4 y 6 semanas, aunque pueden retrasarse más en casos puntuales. Durante este período de "ventana serológica", la detección de anticuerpos anti-VHC será negativa, por lo que la negatividad de esta prueba en una muestra única no descarta la infección [26] (*Figura 8*).

Figura 8



Presencia de anticuerpos y ARN viral en la infección por el VHC en función del tiempo

En pacientes con una respuesta humoral deficiente y en pacientes en hemodiálisis, la negatividad para anticuerpos anti-VHC no excluye totalmente la infección [26].

La presencia de anticuerpos anti-VHC en suero indica contacto previo con el virus, por lo que, no es suficiente para establecer el diagnóstico de infección crónica ya que puede indicar exposición pasada y curada.

Pruebas confirmatorias de anticuerpos

Estas pruebas se han de considerar como pruebas que confirman la presencia de anticuerpos y no necesariamente de infección activa.

Con carácter general, la presencia de reactividad frente a dos o más antígenos derivados de regiones diferentes del genoma vírico confirma la presencia de anticuerpos frente al virus, por el contrario, la ausencia total de reactividad en la prueba la descarta. La reactividad frente a antígenos derivados de una única región del genoma del virus no permite confirmar ni descartar la presencia de anticuerpos (resultado indeterminado). Durante el período de ventana serológica, se pueden observar algunos de estos patrones indeterminados en presencia de viremia detectable, lo que indica el inicio de la respuesta inmunitaria humoral [27].

Ocasionalmente, en pacientes inmunodeprimidos, pacientes en hemodiálisis y pacientes con crioglobulinemia mixta se obtienen falsos negativos en la determinación serológica y pueden requerir la determinación de ARN-VHC para el diagnóstico [28].

1.5b. Métodos directos

Determinación de ARN-VHC

La detección del ARN del virus se realiza mediante pruebas de amplificación genómica (RT-PCR o *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) entre otras y ofrece una medida de la viremia activa. Su positividad indica presencia de virus circulante y confirma infección en curso, aguda o crónica. Su negatividad en una muestra puntual no descarta la infección crónica, ya que la viremia es, en ocasiones, intermitente [29]. Su determinación puede ser cualitativa o cuantitativa.

Durante el período “ventana”, éstas u otras pruebas de detección directa del virus proporcionan el diagnóstico de la infección cuando las pruebas de detección de anticuerpos son aún negativas o arrojan resultados indeterminados. Además, acortan este período en varias semanas ya que el ARN-VHC se detecta trascurridas de una a dos semanas desde la exposición al virus. Por lo tanto, la utilización de estos métodos se considera hoy en día indispensable para el diagnóstico precoz de la HA [30].

Determinación del antígeno del *Core*

Para la determinación del antígeno del *Core* se suelen utilizar métodos de inmunoanálisis de micropartículas quimioluminiscentes (CMIA) o EIA con anticuerpos monoclonales. Éstos permiten detectar y cuantificar la viremia a través de la detección y cuantificación de este antígeno. Es un marcador que permite la identificación temprana de la infección por el VHC y, en comparación con los métodos serológicos vistos anteriormente, presenta mayor utilidad clínica en aquellos pacientes que tengan un período “ventana” alargado por un estado de inmunosupresión, como por ejemplo en pacientes en hemodiálisis [31].

Determinación del genotipo viral

Debido a la importancia que tiene la determinación del genotipo en la respuesta al tratamiento antiviral, ésta se ha convertido en una prueba rutinaria en la práctica clínica.

Las pruebas para su determinación se basan en la amplificación del genoma vírico mediante PCR seguida de hibridación inversa con sondas de oligonucleótidos inmovilizados en una tira (LiPA, *Line Probe Assay*) o de secuenciación del amplicón. Estas pruebas pueden llegar a permitir la discriminación entre los diferentes subtipos [32].

El genotipo del VHC también se puede determinar mediante métodos serológicos que resultan de interés principalmente en aquellos pacientes infectados con positividad confirmada para anticuerpos anti-VHC pero que cursan con ausencia persistente de viremia detectable [33].

1.6. Tratamiento de la hepatitis crónica C

Desde el descubrimiento del VHC y de su severidad, el tratamiento de la infección ha mejorado bastante [11, 34], siendo el más eficaz frente a la infección aquel en el que se utiliza interferón pegilado alfa 2a (IFNpeg- α 2a) en combinación con ribavirina (RBV) [35].

La tasa de respuesta virológica sostenida (RVS), o negativización de la carga viral (CV) del VHC a los 6 meses después de interrumpir el tratamiento, en los pacientes con HCC genotipo 1, tratados con IFNpeg/RBV alcanza el 54%. Es decir, que la mitad de los pacientes tratados no responden, siendo un tratamiento caro y no exento de efectos secundarios [11].

1.6a. Candidatos al tratamiento

El tratamiento actual, basado en la administración conjunta de IFNpeg/RBV, pretende reducir la mortalidad, evitando los fallecimientos causados por la CH descompensada y el CHC, así como la reducción de las manifestaciones extrahepáticas y de la propagación secundaria de la infección por el VHC [35].

En teoría, todos los pacientes con HCC que presenten transaminasas normales y/o elevadas, positividad del ARN-VHC en el suero y/o lesiones de hepatitis crónica en la biopsia hepática, deben ser tratados, ya que serán ellos los que tengan mayor riesgo de desarrollar CH. Se excluyen del tratamiento aquellos pacientes que no cumplan los parámetros anteriores, las mujeres embarazadas y las

que presenten una negativa a usar métodos anticonceptivos, debido a que el tratamiento es teratógeno en el embarazo [36].

A pesar de lo mencionado anteriormente, en la práctica, todo es más complejo. Existen diversas variables que influyen en la decisión de iniciar o no un tratamiento antiviral en pacientes con HCC. Muchas de estas variables no tienen relación directa con la probabilidad de respuesta al tratamiento. Así, no estaría indicado iniciar el tratamiento antiviral en un paciente de 65 años sin fibrosis hepática y con antecedentes de cardiopatía isquémica (CI), aunque las variables virológicas, genotipo y CV, fueran favorables. Muy distinta es la situación ante un paciente de edad similar con una biopsia hepática que demuestra la presencia de fibrosis en puentes. Otras variables, como ansiedad, profesión, etc. son solo contraindicaciones relativas pero pueden influir en la decisión de tratar. Así, en definitiva, como el tratamiento antiviral es aún imperfecto en lo que se refiere a la eficacia, pudiendo producir efectos adversos graves, los pacientes y sus respectivos médicos han de valorar con cuidado los posibles beneficios, el coste y los riesgos antes de iniciar el tratamiento [36].

1.6b. Tratamiento estándar

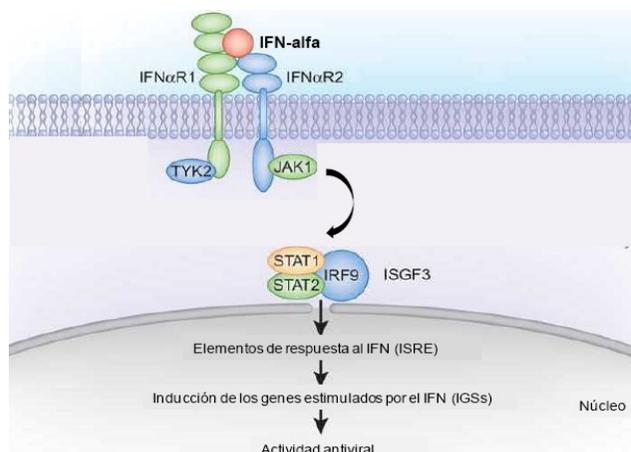
El tratamiento de la HCC ha experimentado cambios sustanciales desde mediados de los años noventa. Aunque la clave del tratamiento antivírico actual siguen siendo los protocolos en los que se utiliza IFN, los avances farmacológicos, entre los que se encuentra la adición de RBV como tratamiento complementario, el desarrollo de los IFNpeg, así como, más recientemente, la creación de los nuevos antivirales, han aumentado de manera significativa la eficacia del tratamiento [36, 37].

Interferón pegilado

El **IFN- α** es un polipéptido no glicosilado producido por monocitos, leucocitos y linfocitos B, como respuesta a infecciones víricas, con la función de mediar la respuesta inmunitaria inespecífica [35]. Posee dos **ACCIONES**, una directa o antiviral y otra indirecta o inmunomoduladora [38]:

1.- Directa o antiviral: Se manifiesta inhibiendo la replicación viral transmitiendo señales al interior de la célula a través de receptores situados en la superficie celular (IFN α R1 e IFN α R2). En esta ruta intervienen de manera acoplada las proteínas JAK1 (*Janus Activated Kinase-1*) y Tyk2 (*Tyrosine Kinase-2*). La acción de las quinasas fosforiladas resulta en una activación de las proteínas STAT-1 y STAT-2 que son traslocadas al núcleo y ejercen su acción incrementando la transcripción de genes estimulados por IFN (ISG) que codifican proteínas con actividad antiviral (adenosín-deaminasa, PKR y 2'5-oligoadenilato sintasa) (**Figura 9**) [39].

Figura 9



Actividad antiviral del IFN- α

2.- Indirecta o inmunomoduladora: Se manifiesta incrementando la expresión de moléculas de antígeno leucocitario humano (HLA) en la membrana de los hepatocitos y facilitando que los linfocitos T citotóxicos (Tc) reconozcan y eliminen las células infectadas, además de estimular la inmunidad innata (células NK) [40].

Clásicamente se han usado 4 tipos de IFN- α obtenidos mediante tecnología ADN recombinante, administrados tres veces por semana [36]. Actualmente, el IFN más utilizado es el **IFNpeg- α** . Mediante la pegilación de una proteína, que consiste en su unión a una molécula de polietilenglicol para disminuir su aclaramiento, se prolonga su permanencia tras su administración, obteniendo una mejoría considerable tanto en la farmacocinética como en la farmacodinámica. El IFNpeg- α tiene la ventaja de que se administra sólo una vez por semana, disminuyendo en frecuencia los efectos secundarios, además de conseguir una mayor y más eficaz supresión de la actividad antiviral en comparación con la administración del IFN clásico tres veces por semana. Hay dos tipos, el IFNpeg- α 2a y el 2b [35]. Aunque han sido varios los estudios que comparan la eficacia de ambos, combinados con RBV, un estudio sistemático realizado sobre ensayos clínicos aleatorizados en los que se comparaban los dos tipos con respecto a las tasas de RVS, confirmó las ventajas del 2a, mientras que el tipo de efectos adversos y la incidencia de los mismos fueron muy parecidos en ambas pautas de tratamiento [41].

Ribavirina

La RBV es un análogo de nucleósido (guanosina) así como un fármaco antiviral activo frente a virus ARN y ADN. Es un fármaco pleiotropo, es decir, con diversos mecanismos intrínsecos que pueden influir en sus propiedades antivirales globales. Se ha utilizado también en el tratamiento del virus de la

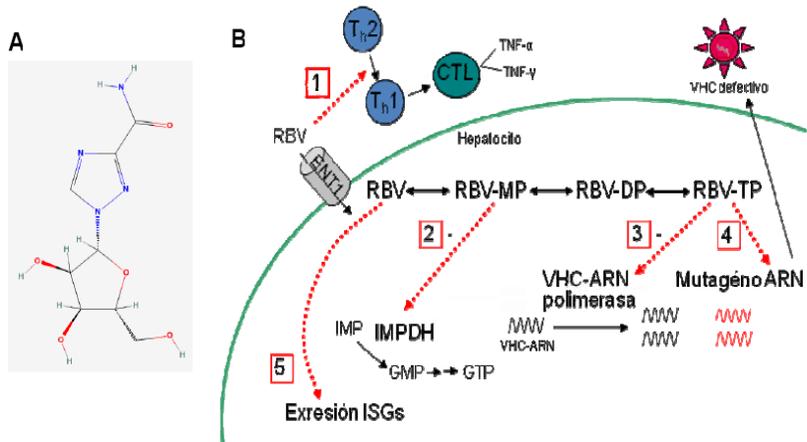
inmunodeficiencia humana (VIH). Se administra por vía oral variando en función del peso. No se utiliza en monoterapia. Su incorporación a la terapia frente al VHC mejoró sustancialmente los porcentajes de RVS en pacientes infectados, incrementando, por un lado, la proporción de casos que aclaraban el virus y disminuyendo, por otro, el número de recaídas [42].

Se podría pensar que la RBV es un adyuvante del IFN- α , ya que aparentemente no disminuye la CV. La realidad es que la RBV tiene un efecto sinérgico, y actúa cooperando y potenciando al IFN- α . Aunque su mecanismo de acción no se conoce con exactitud, recientemente se ha demostrado que tiene una leve acción sobre la replicación viral y que es un mutágeno del VHC [42]. El mecanismo de **ACCIÓN** antiviral propuesto para la RBV se desarrolla a varios niveles (*Figura 10*):

1.- “*In vitro*”: Es capaz de inhibir distintos virus ARN y ADN bloqueando la síntesis de guanosina-trifosfato y, por lo tanto, disminuyendo la síntesis de ácidos nucleicos. También actúa produciendo una síntesis anormal del extremo 5' del ARN, por lo tanto, alterando la transcripción viral y suprimiendo la actividad de la polimerasa viral, además de llevar a los nuevos viriones a un “error catastrófico” al incorporarse a modo de mutágeno dentro de los nuevos genomas [42].

2.- En estudios clínicos: Modifica los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) pero no modifica los niveles de viremia, por lo que se postula que pudiera actuar mediante un mecanismo inmunomodulador, favoreciendo la inmunidad del huésped frente al VHC, potenciando una respuesta del tipo Th1 frente a Th2 con aumento de citoquinas como IFN- γ , TNF- α e IL-2. Estas citoquinas aumentan la lisis de los hepatocitos infectados, reduciendo la producción de los viriones infecciosos que estos hepatocitos generan. Este efecto también se ha comprobado “in vitro” [42].

Figura 10



Estructura química de la RBV (A) y mecanismos de acción propuestos para su actividad antiviral (B)

3.- Efecto “cosmético”: Mecanismo no citolítico por el que actúa curando las células infectadas sin destruirlas. Recibe este nombre porque provoca la normalización de las transaminasas [42].

En definitiva, el IFN inhibe la producción del VHC, y la RBV introduce mutaciones dentro de su genoma e incrementa la producción de viriones no infecciosos que no tienen capacidad de atacar a los hepatocitos [43].

1.6b. Tipos de respuesta al tratamiento estándar

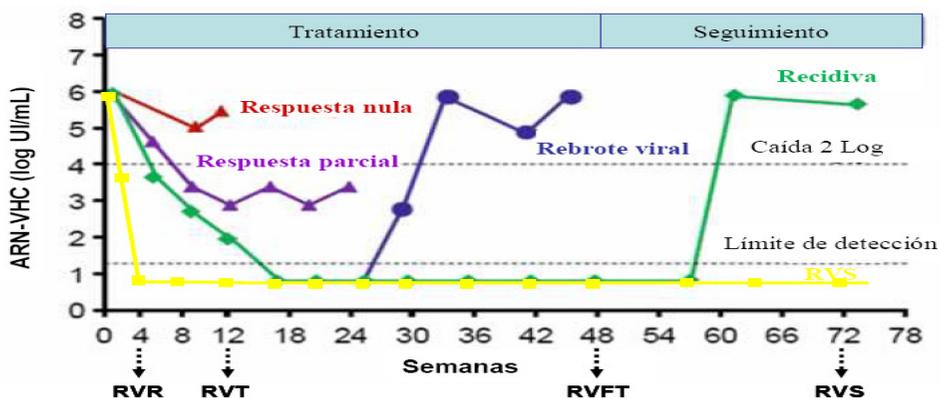
- **Respuesta virológica rápida (RVR):** ARN-VHC indetectable tras 4 semanas de tratamiento (*Figura 11*). Se ha reconocido como uno de los factores predictivos de RVS independientes más importante [44].
- **Respuesta virológica precoz o temprana (RVP o RVT):** ARN-VHC indetectable en la semana 12 de tratamiento o disminución de la CV > 2 logaritmos (Log), definidas como respuesta virológica completa y

parcial respectivamente (RVPc y RVPp). Se ha utilizado como el principal factor para tomar decisiones respecto al tratamiento (*Tabla 1*). Así, pacientes infectados con el genotipo 1 del VHC que presenta una RVPp, logran una RVS en un 17-29% de los casos, beneficiándose de una ampliación de la duración del tratamiento a 72 semanas [44].

RVP y ARN detectable en la semana 24: los pacientes que cumplen criterios de RVP pero que mantienen niveles de ARN viral detectables en la semana 24 no alcanzarán RVS y esto suele cumplirse en el 98-100% de los casos, por lo que se recomienda la interrupción del tratamiento en esta situación (*Tabla 1*) [45].

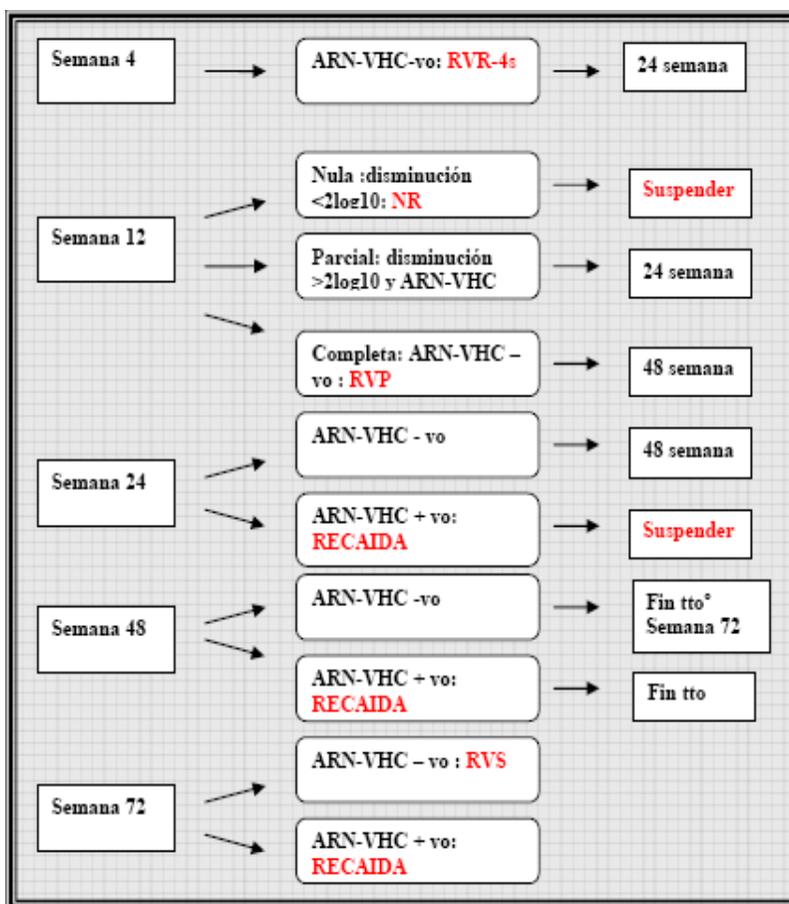
- **Respuesta virológica sostenida (RVS):** Ausencia de ARN-VHC a los 6 meses de haber finalizado el tratamiento y normalización de las transaminasas tanto al final del tratamiento como a los 6 meses de seguimiento (*Figura 11*). Lograr una RVS es sinónimo de curación, ya que se produce una mejoría paulatina de las lesiones hepáticas y desaparece el riesgo de desarrollar complicaciones relacionadas con el VHC [44].
- **Recidiva o recaída:** Normalización de los valores antes citados al término del tratamiento pero con reaparición de ARN-VHC en el control semestral (*Tabla 1*) [46].
- **No respondedores (NR):** Aquéllos que presentan una caída de ARN-VHC $< 2\text{Log}$ durante las 12 primeras semanas de tratamiento (respondedores nulos o R-Nulos) y/o la persistencia del mismo a partir de la semana 24 de tratamiento (*Tabla 1*).

Figura 11: Tipos de respuesta al tratamiento estándar



RVR: respuesta virológica rápida; RVT: respuesta virológica temprana; RVFT: respuesta virológica a fin de tratamiento; RVS: respuesta virológica sostenida.

Tabla 1: Seguimiento del tratamiento antiviral



Los pacientes que no han respondido a la terapia combinada con IFNpeg/RBV presentan unas tasas de RVS al tratamiento estándar actual de un 28 y 12% respectivamente [46].

1.6c. Nuevas estrategias terapéuticas

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 de estos fármacos, más de 30 en investigación, se encuentran en diferentes fases de desarrollo clínico pero dos de ellos, pertenecientes al grupo de los inhibidores de la serín-proteasa del VHC, *boceprevir (BOC)* y *telaprevir (TVR)*, ya han obtenido su aprobación por las agencias reguladoras, tanto en EE.UU. como en Europa, para administrarse en combinación con INFpeg/RBV (triple terapia). Estos dos fármacos, se han desarrollado para el tratamiento de los pacientes con genotipo 1, el más resistente al IFN, y por tanto el más difícil de curar.

El objetivo de estas nuevas terapias es mejorar la tasa de RVS y minimizar los efectos adversos, bien acortando la duración del tratamiento, bien con pautas de antivirales en combinación sin IFN.

Los principales problemas de la triple terapia son una mayor tasa de efectos adversos, el riesgo de desarrollar resistencias y su elevado coste. Así, los principales efectos adversos de este grupo de fármacos son el desarrollo de rash cutáneo, anemia, disgeusia, prurito anal, hemorroides, náuseas, diarrea e hipertransaminasemia. Los pacientes con mayor riesgo de desarrollar resistencias son los NR, particularmente aquellos R-Nulos, y los que tienen CV muy elevada [37].

Telaprevir

El TVR impide la acción de las proteínas virales encargadas del ensamblaje de las nuevas partículas virales, es decir, es un inhibidor de la NS3/4A proteasa [47]. Se administra por vía oral en dosis de 750 mg/8 horas (6 comprimidos al día, administrados con los alimentos).

El desarrollo clínico de TVR en fase III comprendió tres estudios: dos se llevaron a cabo en pacientes *naïve*, denominados, respectivamente, **ADVANCE** (n=1088) e **ILLUMINATE** (n=500) [48, 49] y el tercero, denominado **REALICE** (n=662), que incluyó pacientes NR [47]. Estos estudios introducen el concepto de *terapia guiada por la respuesta (RGT)* que establece la duración del tratamiento en función de la existencia o no de la *respuesta viral rápida extendida (eRVR)*, necesaria para monitorizar el tratamiento de los nuevos antivirales y definida por la persistencia en la semana 12 de la RVR alcanzada en la semana 4 de tratamiento.

Boceprevir:

BOC, al igual que TVR, es un inhibidor de la NS3/4A proteasa. Se administra también por vía oral a la dosis de 800 mg/8 horas (12 cápsulas diarias).

Los estudios en fase III con BOC se diseñaron con la fase de *lead in* de cuatro semanas iniciales con terapia estándar que tiene como objetivo evitar la monoterapia funcional, minimizando el riesgo de desarrollo de resistencias al disminuir la CV y conocer el tipo de respuesta a las cuatro semanas. Además permite identificar a los pacientes con resistencia al IFN (caída de ARN-VHC < 1 Log en la semana 4) [37]. Los dos estudios en fase III con BOC fueron el **SPRINT-2** [50] y el **RESPOND-2**, este último con un diseño parecido al SPRINT-2 pero con pacientes NR (incluyó únicamente recidivantes y respondedores parciales excluyendo a los R-Nulos) [51].

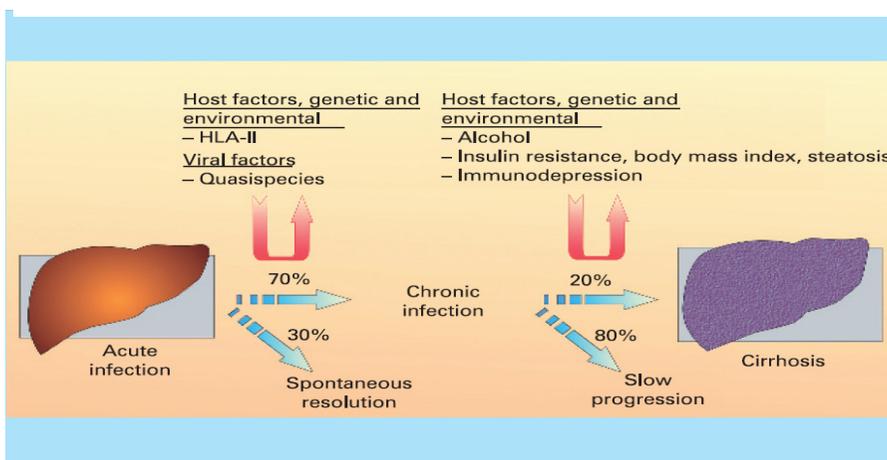
2. VIRUS, PACIENTE, SISTEMA INMUNITARIO Y ENFERMEDAD

2.1. Tipos de factores predictivos de respuesta al tratamiento antiviral

La respuesta al tratamiento antiviral depende fundamentalmente del genotipo del virus y de la CV, sin embargo, hay pacientes con el mismo genotipo y una CV parecida que presentan un tipo de respuesta diferente. Esto demuestra que existen otros factores, al menos tan importantes como los factores virales.

La historia natural de la infección y la respuesta terapéutica al VHC están influenciadas tanto por **factores virales**, como por **factores relacionados con la adherencia al tratamiento antiviral y con la enfermedad**, y por **factores relacionados con el hospedador** (*Figura 12*). Dentro de estos grupos destacaremos a continuación los aspectos más importantes de cada uno de ellos [52].

Figura 12: Asselah y cols, 2009.



Factores que pueden influenciar la historia natural y la respuesta terapéutica a la infección por el VHC

2.1a. Factores relacionados con el virus

Genotipos y cuasiespecies

En la actualidad se acepta la existencia de al menos 6 genotipos divididos, a su vez, en más de 84 subtipos. Pueden aparecer en cualquier parte del mundo, pero existen diferencias en cuanto a la distribución geográfica y también pueden existir diferencias, dentro de una misma región, según los diferentes grupos de población [53].

Durante muchos años se ha pensado que el genotipo es el factor que más influye en la respuesta al tratamiento antiviral, de ahí que, aunque la dosis de IFN permanece fija, la dosis de RBV y la duración del tratamiento variarán en función del mismo. Esto es debido a que los pacientes infectados con genotipos 2 y 3 responden más rápidamente al tratamiento y tienen tasas de RVS dos o tres veces superiores a la de los infectados por el genotipo 1, que presentan mayor resistencia al mismo [53]. Así, en pacientes con genotipo 1 previamente no tratados o *naïve*, el tratamiento combinado con IFNpeg/RBV consigue una tasa de RVS del 50 al 55% mientras que en los genotipos 2 y 3 se consiguen tasas de alrededor del 80% con menor tiempo de tratamiento [54]. Por este motivo, los genotipo 2 y el 3 se tratan durante 24 semanas y se utilizan 800 mg de RBV y para el genotipo 1 se ha establecido una duración de 48 semanas administrando dosis máximas de RBV según el peso (si pesa ≤ 75 kg se utilizan 1000 mg/día y si pesa > 75 kg se usan 1200 mg/día) [54].

La diferente sensibilidad al IFN según el genotipo podría quedar explicada por dos hallazgos. Se ha señalado, por un lado, la existencia de la **ribonucleasa L**, cuyos sitios de corte son diferentes según el genotipo, así como la existencia de una **región en la proteína E2** del genotipo 1, por otro, con una intensa homología con el factor de iniciación que permite la actividad antiviral de la proteína PKR.

El VHC es un virus muy heterogéneo, lo cual conlleva a largo plazo, la aparición de una población de variantes genómicas o **cuasiespecies**, que difieren de la secuencia original de nucleótidos entre un 1 y un 5% [55]. Esta heterogenicidad representa una ventaja adaptativa y tiene numerosas implicaciones biológicas, como el establecimiento de una infección persistente [11]. Las mutaciones surgen como consecuencia de varios procesos [55]:

1. Rapidez de replicación viral: Hace que la ARN-polimerasa viral sea incapaz de corregir errores introducidos en su genoma apareciendo mutaciones. Muchas de estas variantes virales pierden su capacidad de replicación (catástrofe de error), sin embargo, el resto transmite la nueva información genética (partículas infecciosas mejor adaptadas y seleccionadas en base a su capacidad de replicación) a su descendencia [56].

2. Inmunidad del paciente: La presión inmunológica del huesped también puede provocar la aparición de mutaciones, ya que el virus las utiliza para sobrevivir a esta presión, evolucionando así hacia la cronicidad. Esto ocurre en los primeros estadios de la enfermedad [56].

3. Tratamiento antiviral: La presión del tratamiento antiviral también induce aparición de mutaciones apareciendo cepas virales resistentes al mismo [57].

Carga viral

La CV se define como la cuantificación de los niveles de ARN -VHC. Se ha convertido en una herramienta muy importante en el manejo de pacientes con HCC ya que su valor se utiliza como un factor predictivo de respuesta al tratamiento

antiviral [58]. Una CV alta (> 600000 UI/mL) implica una peor respuesta al tratamiento [59].

2.1b. Factores relacionados con la adherencia

La adherencia al tratamiento antiviral es un factor clave en la respuesta al mismo. 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. Obviamente los pacientes que lo siguen correctamente tendrán más posibilidades de RVS y no siempre es sencillo [60]. Existen algunos factores que disminuyen la adherencia a los fármacos de forma general, como por ejemplo:

Alcohol

El consumo de alcohol influye en la posibilidad de curación [61] ya que entorpece la adherencia a cualquier tipo de tratamiento y además interfiere con la acción antiviral del IFN como veremos más adelante [62].

Efectos secundarios

El tratamiento para la HCC supone efectos secundarios, algunos de ellos muy frecuentes, como fiebre, astenia, irritabilidad, insomnio, caída del cabello, etc., que aparecen al inicio del tratamiento y pueden favorecer su abandono por parte del paciente o bien la modificación de su dosis por parte del médico. Otros efectos secundarios pueden ser incluso más graves y obligan, en ocasiones, a suspenderlo [60].

2.1c. Factores relacionados con la enfermedad

Duración

Presentar una duración más corta de la enfermedad al inicio del tratamiento se asocia a mejores tasas de RVS [11].

Fibrosis

La fibrosis es una variable independiente en la predicción de respuesta al tratamiento antiviral, desempeñando un papel importante en cuanto a las posibilidades de poder alcanzar una buena respuesta. A mayor grado de fibrosis menor posibilidad de alcanzar una RVS [63].

2.1d. Factores relacionados con el hospedador

Factores demográficos

- **Edad:** A mayor edad, mayor riesgo de progresión a fibrosis y menor respuesta al tratamiento antiviral. Se considera que una edad ≤ 40 años se asocia a mayor tasa de curación. La juventud, además, implica menor tasa de resistencia a la insulina y de obesidad, factores que también influyen en la respuesta al tratamiento antiviral [64].
- **Sexo:** El sexo masculino está relacionado con mayor riesgo de progresión a fibrosis y menor respuesta al tratamiento antiviral. Se considera que ser mujer se asocia a mayor tasa de curación, así como también está asociado con menores tasas de resistencia a la insulina y de obesidad [65].

- **Raza:** Algunos estudios han comparado poblaciones intentado que su único factor diferencial fuese la raza [66]. Así, se han estudiado caucásicos y afroamericanos, ambos con genotipo 1, siendo la tasa de RVS doble en los caucásicos [66, 67].

Factores ambientales

- **Consumo de alcohol:** Aumenta la gravedad de la evolución de la enfermedad por el VHC debido a que las células presentadores de antígenos (CPA) hepáticas parecen deteriorarse de forma sinérgica al hígado alcohólico [68]. A mayor ingesta alcohólica mayor riesgo de progresión a fibrosis y menor respuesta al tratamiento antiviral [64, 65].

El consumo de alcohol se ha asociado a sobrecarga férrica al igual que el sexo masculino. Ésta suele ser común en pacientes con HCC y podría implicar una mayor fibrosis e inflamación, aunque su papel no está suficientemente claro ya que, ni la realización de flebotomías previas al tratamiento antiviral ni la concentración de hierro en el hígado, se han relacionado con la posibilidad de curación. Sin embargo, aunque las flebotomías no reducen la CV, sí logran una reducción significativa de las transaminasas séricas [64].

Factores metabólicos

- **Síndrome metabólico:** Desempeña un papel fundamental en las posibilidades de curación [69]. La infección crónica por el VHC se asocia con un aumento de **resistencia a la insulina**. Se ha señalado

también que la **obesidad** podría hacer que empeorara la respuesta al tratamiento antiviral en pacientes infectados por el VHC [70].

Factores genéticos e inmunológicos

Se ha planteado en numerosos estudios que los parámetros genéticos e inmunológicos pueden predecir la respuesta al tratamiento antiviral. Esta posibilidad ha despertado un gran interés, puesto que la tolerancia al tratamiento combinado es relativamente pobre, siendo frecuentes los efectos adversos sin que, en ocasiones, todo esto vaya seguido de una respuesta al tratamiento antiviral [11].

A continuación, y debido a la importancia que supone su comprensión para este trabajo, desarrollaremos la respuesta inmunitaria más profundamente, si bien debido a su complejidad, en ocasiones sea necesario simplificar conceptos para poder exponerla.

2.2. Respuesta inmunitaria

La infección por el VHC y la evolución de la misma dependen del equilibrio entre la tasa y la rapidez de replicación del virus y la especificidad y eficacia de la respuesta inmunitaria del hospedador [71]. La replicación viral es tan rápida que no es reconocida por el sistema inmune por lo que, tras un intervalo corto, la CV se incrementa y persiste, en algunas ocasiones, dando lugar a una infección crónica [72].

La respuesta inmunitaria se compone de una respuesta inespecífica y otra específica. La **inmunidad innata** (inespecífica, primaria o natural) y **adquirida** (específica, secundaria o adaptativa), no implican mecanismos de defensa separados si no que están estrechamente interconectados [73]. La inmunidad innata, gracias a sus mecanismos efectores rápidos, precede a la inmunidad adquirida. Se

basa en una respuesta eficaz de células T (celular) que necesita para su desarrollo de tres a cinco días. La inmunidad adaptativa se basa principalmente en una respuesta de anticuerpos (humoral) y necesita más de una semana [73].

Así, las células **NK**, los polimorfonucleares (**PMN**) y los **MACRÓFAGOS**, que se activan de forma inespecífica (inmunidad innata), proporcionan tiempo a las CPA para procesar las proteínas virales y presentarlas a los linfocitos B y linfocitos T. Se sabe que existe un deterioro funcional de la circulación de los monocitos/macrófagos durante la infección por el VHC que dificulta su actividad [74].

Los **LINFOCITOS B**, en determinadas infecciones virales, producen **anticuerpos** (inmunidad adquirida) que pueden eliminar el virus de la circulación y proteger de una nueva posible infección. Los anticuerpos específicos para el VHC son, por lo común, detectables entre las siete u ocho semanas después de la infección. La función de estos anticuerpos ha sido cuestionada porque no previenen la reinfección y no se correlacionan con resultados favorables respecto a la resolución de la misma [75].

Los **LINFOCITOS T**, tras una infección viral, son estimulados para llevar a cabo su respuesta, donde entra en juego la secreción de **citoquinas** [11]. Existen dos tipos de linfocitos:

1. Linfocitos Th:

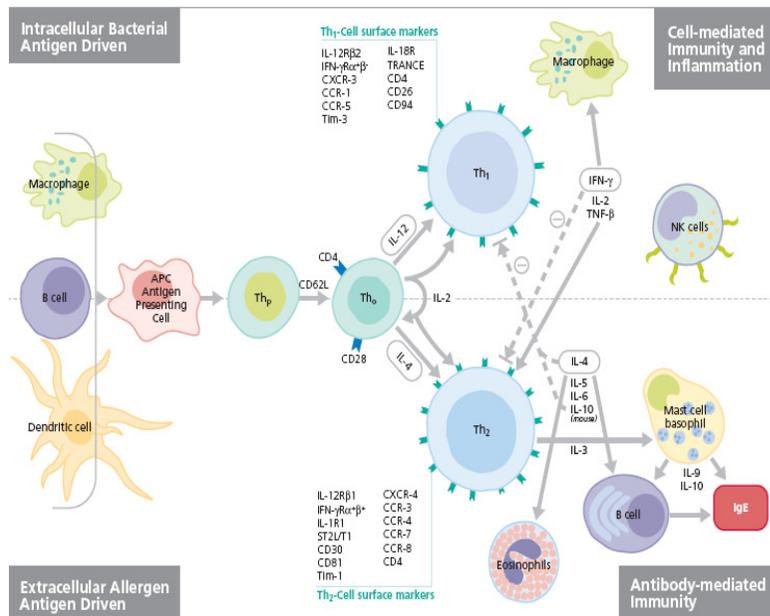
Reconocen péptidos virales, mediante receptores específicos situados sobre su superficie. Estos péptidos derivan de la fagocitosis y proteólisis llevada a cabo de forma previa y son presentados a través de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo II [75]. Tras la activación de los receptores específicos de los linfocitos T, éstos estimulan la diferenciación de linfocitos B a

células plasmáticas o linfocitos B memoria que activan a los linfocitos Tc específicos contra el virus.

Existen dos tipos principales de linfocitos Th: los Th1 y los Th2 [76, 77], que generan dos tipos de respuestas que se inhiben entre sí:

Los linfocitos **Th1** están caracterizados por la producción de citoquinas proinflamatorias principalmente, como IL-2, **IFN- γ** , **TNF- α** , β y γ . Estas citoquinas están involucradas en la respuesta inmune celular (innata), y estimulan la fagocitosis y la destrucción de patógenos microbianos. En la **Figura 13** se puede ver como cuando los linfocitos Th1 producen IFN- γ estimulan la producción de TNF por los macrófagos y formas tóxicas del oxígeno que destruyen los microorganismos dentro de los fagosomas y lisosomas.

Figura 13

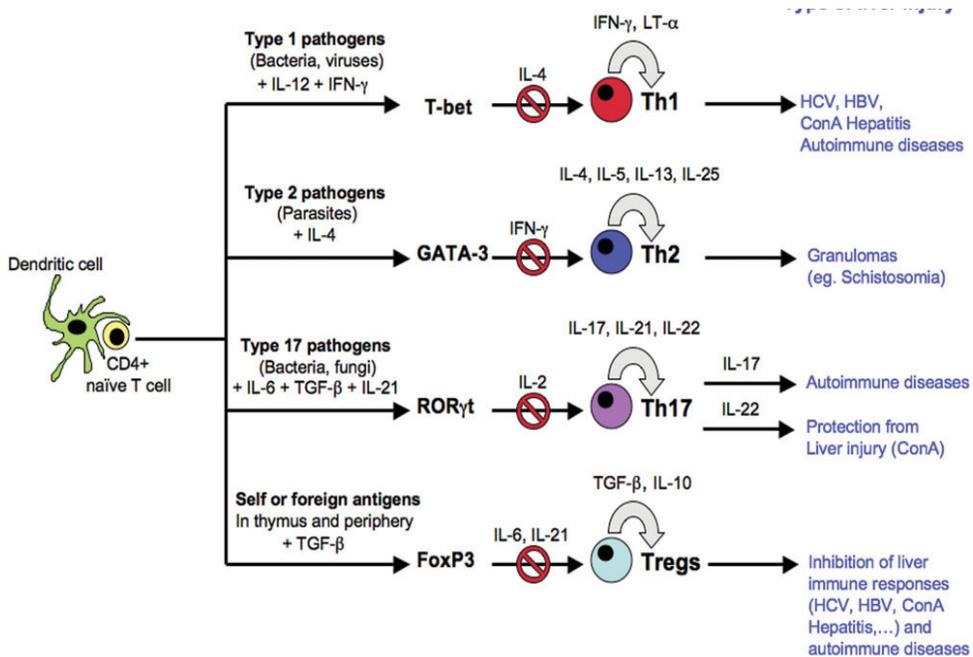


Respuesta inmunitaria

Los linfocitos **Th2** están caracterizados por la producción de IL-4, IL-5, **IL-6**, IL-9, **IL-10** e IL-13 que están involucradas en la respuesta inmune humoral (adquirida) o mediada por anticuerpos.

Varios estudios han puesto de manifiesto que el tipo de citoquinas secretadas por las células T CD4+ específicas desempeña un papel relevante en la evolución de la infección aguda por el VHC, de forma que, la secreción de un tipo u otro de citoquinas determinará la evolución hacia la curación o hacia la cronicidad. Esto es de crucial importancia para este trabajo ya que es la base en la que se fundamenta, como veremos más adelante. Así, una respuesta caracterizada por la secreción de citoquinas Th1 se ha asociado con infección aguda autolimitada, mientras que una secreción de tipo Th2 se asocia con el curso a la cronicidad [21, 77, 78]. En la **Figura 14** se pone de manifiesto la complejidad de estos mecanismos.

Figura 14: Zenewicz LA y cols., 2007.



Principales células T CD4+ y su asociación con la enfermedad

2. Linfocitos Tc:

Mediante las moléculas HLA de clase I, los linfocitos Tc CD8⁺ reconocen los péptidos virales que han sido procesados y sintetizados por las células infectadas. Este encuentro produce una respuesta específica consistente en la lisis de las células infectadas por el virus mediante varios mecanismos [79]:

- ▣ **Mecanismos citopáticos:** consistentes en la formación de poros en la membrana de las células diana mediante la secreción de perforinas y serín proteasas (citotoxicidad directa) ó liberando mediadores proapoptóticos como **TNF- α** (citotoxicidad indirecta).

- ▣ **Mecanismos no citopáticos:** consistentes en el incremento de las concentraciones de **citoquinas** antivirales.

En resumen, la progresión hacia la persistencia viral y los mecanismos de lesión hepática son consecuencia de múltiples interacciones entre el virus y el huésped. El presente estudio se centra en las **citoquinas** como factor inmunológico del hospedador que puede influenciar la respuesta al tratamiento antiviral, puesto que juegan un papel muy importante en la regulación de la respuesta inmunitaria. Así, una producción inadecuada de los niveles de estas citoquinas puede contribuir a la persistencia viral o afectar la respuesta al tratamiento antiviral. Se sabe también que ciertas mutaciones localizadas dentro de la región codificante y en regiones reguladoras de los genes que codifican determinadas citoquinas, están asociadas con una mayor o menor producción de las mismas, influenciando también, de esta forma, la respuesta al tratamiento [80].

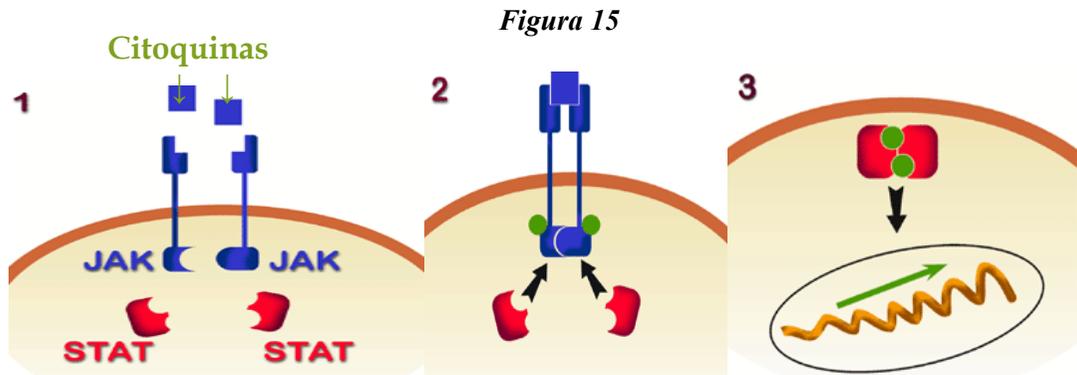
3. CITOQUINAS

Son un grupo de proteínas de bajo peso molecular, generalmente de menos de 30 KDa, esenciales para la comunicación intercelular [81]. Se conocen hasta 100 péptidos genética y estructuralmente diferentes. Están producidas por varios tipos celulares, principalmente por las células del sistema inmune [82-84].

Pueden controlar diversas **FUNCIONES** biológicas críticas, algunas de ellas mencionadas a continuación [81]:

- ▣ Activación de mecanismos de la **inmunidad innata**: macrófagos y otros fagocitos, células NK, eosinófilos, inducción de la síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado.
- ▣ Intervención en la **respuesta inmunitaria adquirida**: activación y proliferación de células B hasta su diferenciación a células plasmáticas secretoras de anticuerpos.
- ▣ Intervención en la **reacción de inflamación**, tanto aguda como crónica.
- ▣ Son estimuladoras del **crecimiento de los precursores hematopoyéticos** de la médula ósea.
- ▣ Participan en la **reparación** tisular y en mecanismos de **apoptosis**.

Los **RECEPTORES** de las citoquinas son glicoproteínas de membrana formadas por varias subunidades y cuya misión es la de transmitir la señal al interior de la célula. Generan un conjunto de reacciones en cascada donde intervienen proteínas, como las quinasas de la familia JAK, que reclutan y activan factores de transcripción de la familia STAT, transductores de señal y activadores de transcripción [85]. En consecuencia, se produce la inducción de varios genes, que son los que median las actividades biológicas de las citoquinas (**Figura 15**).



Representación esquemática de la reacción en cascada producida tras la unión de una citoquina a su receptor

1) Unión de la citoquina al receptor. 2) Dimerización del receptor y activación de las quinasas JAK, produciéndose la fosforilación del receptor. 3) Fosforilación y dimerización de STAT, activación de la transcripción de los genes-diana.

Además, en el suero se han detectado receptores solubles para las distintas citoquinas, semejantes a los de membrana. Estos se encuentran en grandes cantidades y probablemente tienen como misión regular la producción de las citoquinas actuando como antagonistas de los receptores de membrana [85].

La citoquinas presentan una serie de **CUALIDADES** entre las que mencionamos las más importantes [81]:

- ▣ **Pleiotropía:** múltiples efectos al actuar sobre diferentes células.
- ▣ **Redundancia:** varias citoquinas ejercen un mismo efecto.
- ▣ **Sinergismo:** dos o más citoquinas producen un efecto que se potencia mutuamente.
- ▣ **Antagonismo:** inhibición o bloqueo mutuo de sus efectos.

Estas cualidades hacen que sean muy difíciles de clasificar como veremos más adelante.

Según su lugar de **ACTUACIÓN** se definen tres grupos, mostrando cierta analogía con las hormonas [81]:

- ▣ **Autocrina:** actuando de forma local sobre la misma célula que las produce.
- ▣ **Paracrina:** actuando sobre las células vecinas.
- ▣ **Endocrina:** en rara ocasión suelen actuar sobre células y tejidos distantes de su producción, como ocurre principalmente con las hormonas.

Es difícil establecer una **CLASIFICACIÓN** única con grupos donde incluir a las citoquinas debido a su alto grado de pleiotropismo y redundancia, lo que hace que algunas de ellas puedan englobarse en más de un grupo. Por este motivo, existen muchas clasificaciones y algunas difieren entre sí. No obstante, aquí mostramos una clasificación general, donde se describen englobadas dentro de tres grupos (*Figura 16*).

Figura 16



Clasificación general de las citoquinas

La comprensión de la función de las citoquinas de forma individualizada es también complicada debido a que su papel puede variar dependiendo de la célula en la que son sintetizadas, el lugar en el que van a desarrollar su función y las fases de la respuesta inmunitaria. De hecho, numerosas citoquinas poseen potencial tanto proinflamatorio como antiinflamatorio ejerciendo una u otra función según el entorno en el que se encuentren [86].

En la mayoría de los tejidos, incluyendo el hígado, la producción de citoquinas está ausente o es más bien baja. Sin embargo, los estímulos fisiológicos y patológicos autocrinos, paracrinos y endocrinos activan su producción en las células, y a su vez, coordinan la respuesta del tejido al estímulo [82, 83].

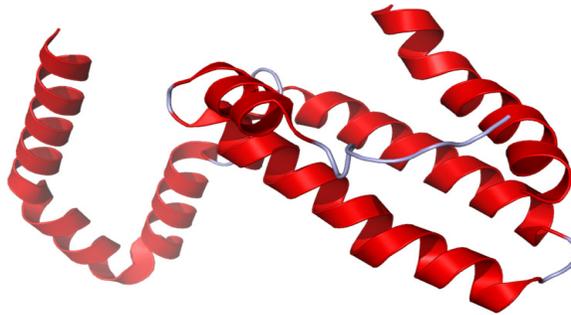
Cada vez hay más evidencias que apoyan el importante papel de algunas citoquinas en diversas enfermedades inflamatorias del tejido hepático y en su reparación [81]. Estas coordinan los procesos fisiológicos y patológicos que ocurren en el hígado durante la infección viral, comportándose como mediadoras de la inflamación hepática, la muerte celular del hígado, la colestasis y la fibrosis [87-90], pero paradójicamente, también participan en el control de la infección y la regeneración del hígado después de la lesión [91-94].

Algunas de las citoquinas que se han relacionado con el VHC, en estudios que muestran gran controversia respecto a sus resultados, son IL-10, IL-6, TNF- α , IFN- γ y TGF- β , y han sido, por ello, objeto de estudio en este trabajo.

3.1. Interleuquina 10 (IL-10)

La IL-10 (*Figura 17*) es una citoquina **antiinflamatoria** e **inmunosupresora**, que participa, principalmente, en la respuesta inmunitaria humoral o **Th2**. Es además una citoquina **antifibrogénica** [95].

Figura 17



IL-10: 17-21KDa

Tras la infección viral, la IL-10 puede ser secretada por varias poblaciones celulares incluyendo principalmente células T, monocitos y macrófagos, células dendríticas, células B y queratinocitos, y actuando sobre las CPA y las células T *naïve*, pueden alterar la actividad de las primeras y la activación y diferenciación de las segundas [95]. Así, podría influir sobre las propiedades y la diferenciación del desarrollo de células T efectoras (atenuando su función) y memoria (alterando su formación). Por otro lado, la IL-10 potencia la proliferación del mastocito inducida por la IL-3. También puede modular su propia expresión por un mecanismo de retroalimentación [96].

En general, es considerada como supresora de la respuesta inmunitaria porque inhibe la secreción de citoquinas proinflamatorias antivirales [97]. Suprime la inflamación por diversos mecanismos, incluyendo la reducción de la expresión de HLA de clase II y la disminución de la secreción de IL-2, IL-1 α , IL-1 β , TNF- α

e IL-8 [95]. Es por tanto, una citoquina que “regula a la baja” (*down-regulation*) mecanismos Th1 [98]. Estos hallazgos sugieren el importante papel de la IL-10 en la dirección de la respuesta inmunitaria antiviral, ya que su disminución temprana puede favorecer el cambio de una respuesta Th2 a una respuesta Th1 que ha demostrado estar asociada con evolución clínica más favorable y, a largo plazo, con la respuesta al tratamiento antiviral [99, 100]. Así, los niveles séricos de la IL-10 parecen incrementarse de forma significativa en pacientes con HCC. Esto sugiere la participación de citoquinas Th2 en la patogenia de la HCC y la gravedad de la enfermedad hepática [78, 100-102].

Los factores genéticos influyen considerablemente en la producción de citoquinas y un número importante de **POLIMORFISMOS** parece controlar el nivel de secreción de la IL-10 [103, 104]. De ahí, que muchos grupos de investigación han buscado una asociación entre polimorfismos génicos de la IL-10 y sensibilidad a la infección crónica por el VHC, algunos de ellos con resultados contradictorios [10]. La IL-10 presenta tres polimorfismos bialélicos confirmados en la región promotora génica: **-1082G/A**, **-819C/T**, y **-592C/A** [105].

Polimorfismo IL-10 -1082G/A

Varios estudios han investigado la asociación del polimorfismo IL-10 -1082G/A con la sensibilidad a la infección crónica por el VHC [106-109]. Algunos trabajos sugieren que el genotipo -1082GG podría estar asociado con sensibilidad a la infección crónica por el VHC [106, 110, 111], ya que se asocia con producción más alta de IL-10, incluso cantidades dobles cuando se compara con los genotipos AA o GA en la misma posición [10, 105, 112, 113] mientras que otros no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles [78, 107-109, 114]. Por el contrario, también se ha señalado, que el genotipo -1082GG podría estar asociado con la recuperación espontánea de la infección [22].

Otro genotipo, el -1082AA, se ha asociado con un mayor riesgo de infección persistente.

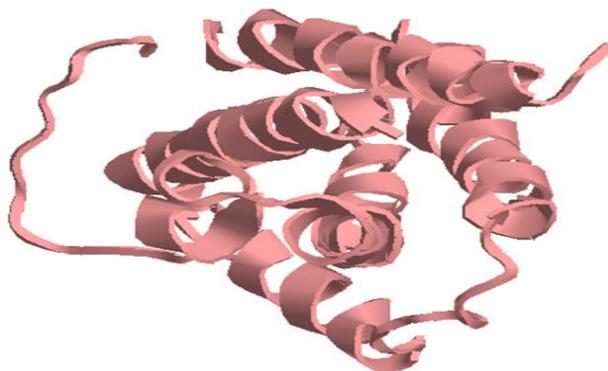
Polimorfismos IL-10 -819C/T y -592C/A

Un metanálisis reciente ha evaluado la asociación entre los polimorfismos IL-10 -819C/T e IL-10 -592C/A con la sensibilidad a infección crónica por el VHC, no encontrando ninguna diferencia significativa entre casos y controles [10] ya que parecen no tener ninguna influencia independiente sobre la producción de IL-10 [105, 112].

3.2 Interleuquina 6 (IL-6)

La IL-6 (*Figura 18*) es una citoquina **proinflamatoria** que se ha relacionado principalmente con la respuesta humoral o **Th2**, con implicación en gran variedad de funciones celulares. También puede presentar actividad antiinflamatoria [115].

Figura 18

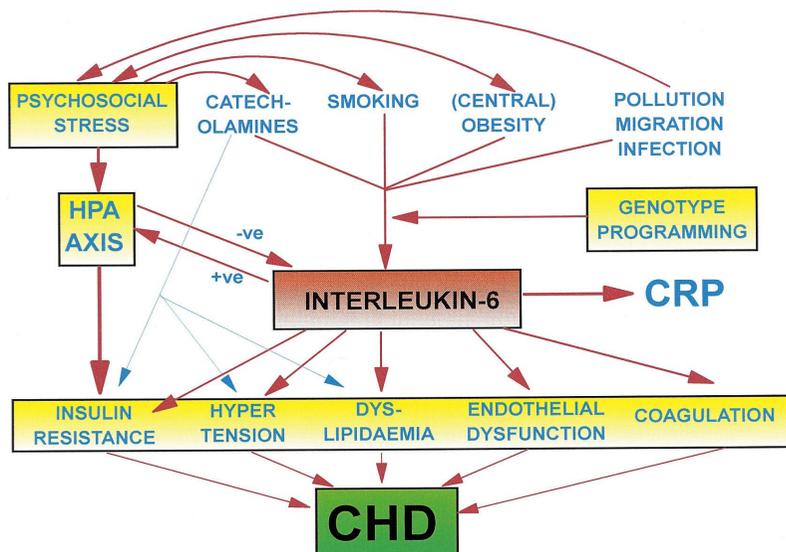


IL-6: 23-30 KDa

La IL-6 puede ser secretada por varias poblaciones de células incluyendo monocitos, células T y fibroblastos. Induce la diferenciación de eosinófilos y la producción de IgA. Hay que destacar, el papel que juega en el hígado de forma directa [115] pues también, al igual que la IL-10, se ha relacionado con la respuesta a la infección por el VHC a través de su producción y de sus polimorfismos [52]. Sin embargo, el efecto que sus polimorfismos pueden tener en la respuesta al tratamiento antiviral ha sido escasamente investigado.

La IL-6 estimula el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal, activación que se asocia con obesidad central, hipertensión y resistencia a la insulina. De esta forma, se ha relacionado con la patogénesis de la enfermedad coronaria a través de una combinación de mecanismos autocrinos, paracrinos y endocrinos, sin olvidar que estos factores, que forman parte del síndrome metabólico, pueden influenciar también la respuesta al tratamiento antiviral [69] (**Figura 19**).

Figura 19: Yudkin JS y cols., 2000.



HPA: hypothalamic–pituitary–adrenal axis; *CRP:* C-reactive protein;
CHD: coronary heart disease.

Papel y regulación de la IL-6

Los niveles en suero de la IL-6 parecen estar muy altos en pacientes que presentan HCC frente a controles sanos [116]. La IL-6 se ha asociado de forma significativa con la CH [117] y sus concentraciones séricas están elevadas en pacientes con CHC. Sus niveles están asociados a disfunción hepática y, en consecuencia, se podría utilizar como marcador de progresión de la enfermedad hepática en pacientes infectados con el VHC [117].

Existe un estudio que valora los niveles de la IL-6 en pacientes con el VHC infectados con crioglobulinemia mixta y afirma que son más altos que en pacientes sin crioglobulinemia asociada, además, estos niveles tendían a ser más altos todavía en presencia de vasculitis activa [118].

La IL-6 presenta una serie de **POLIMORFISMOS** bialélicos confirmados en la región promotora génica de entre los que destacamos los siguientes: **-174G/C**, **-572G/C** y **+2954G/C**.

Polimorfismo IL-6 -174G/C

De la IL-6 se ha destacado el polimorfismo génico -174G/C que se ha asociado con el aclaramiento del VHC [119, 120] y con RVS después de la terapia antiviral [120].

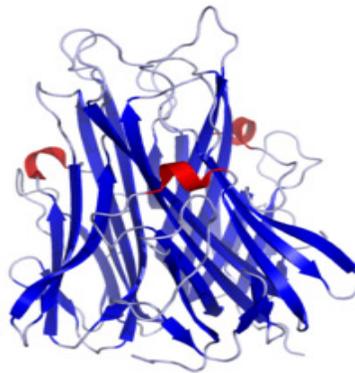
Polimorfismos IL-6 -572G/C y +2954G/C

Se conocen otros polimorfismos de la IL-6, -572G/C y +2954G/C, que modulan la progresión a fibrosis en pacientes con bioquímica hepática normal con infección crónica por el VHC. El grado de progresión se asoció de forma independiente con llevar el alelo G en el polimorfismo -174G/C al igual que con llevar el alelo C en el polimorfismo -572G/C [52]. Se ha destacado el papel protector, en enfermedad hepática crónica, de la vía IL-6/gp130 durante la progresión de la fibrosis [121].

3.3. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

El TNF- α (*Figura 20*) es una citoquina **proinflamatoria** y mediadora de la respuesta inmunitaria innata, implicada principalmente en respuestas celulares o **Th1**. Ejerce su efecto sobre células tumorales e inflamatorias. Presenta características de citoquina **fibrogénica**.

Figura 20



TNF- α : 17 KDa

Esta citoquina es secretada principalmente por macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y neutrófilos. Se sabe que el TNF- α secretado por los linfocitos Th de forma conjunta a IFN- γ e IL-10, aumentaría la capacidad citotóxica de los linfocitos Tc.

En la HCC se ha demostrado un incremento de la expresión del receptor TNF-R1, que se une preferentemente a TNF soluble, y a la vez una síntesis mayor de TNF- α por células mononucleares de sangre periférica [122]. Sin embargo, la expresión de TNF- α durante la terapia antiviral en pacientes con HCC es controvertida. La gran mayoría de los estudios se centran en medir el TNF- α en el

suelo de pacientes que reciben monoterapia con IFN- α y solo unos pocos lo hacen en pacientes con terapia combinada (IFNpeg- α /RBV) [123].

Se sabe que la hepatitis alcohólica es una enfermedad asociada a niveles elevados de TNF- α , ya que es un importante mediador de los trastornos circulatorios que tienen lugar en esta patología [124] siendo éste otra posible diana terapéutica. Es, además, un marcador útil para predecir la gravedad de la recurrencia tras el trasplante hepático [125].

Existe un estudio que valora los niveles de TNF- α en pacientes VHC infectados con crioglobulinemia mixta, ya mencionado para la IL-6, que afirma que son más altos que en pacientes sin crioglobulinemia asociada, además, estos niveles tienden a ser mayores todavía en presencia de vasculitis activa [126].

Destacamos un **POLIMORFISMOS** bialélico en el promotor del gen del TNF- α en relación con la infección por el VHC: **-308A/G**.

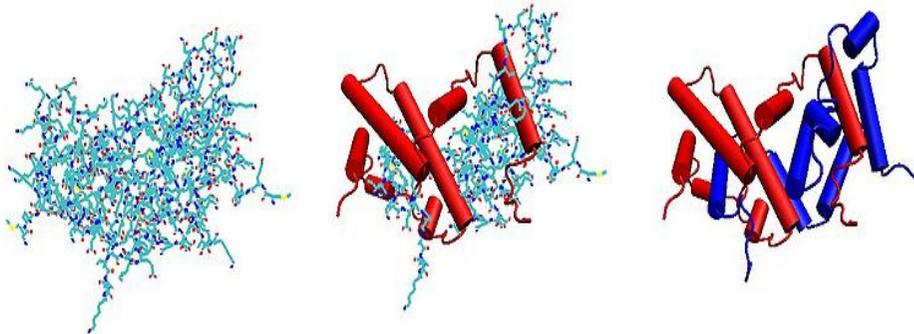
Polimorfismo TNF- α -308A/G

El polimorfismo -308AA induce aumento de la producción de TNF- α . La posición 308 parece estar asociada a fibrosis [127] aunque otros estudios afirman que no juega un papel directo [128].

3.4. Interferón gamma (IFN- γ)

El IFN- γ (*Figura 21*) es una citoquina **proinflamatoria** e **inmunorreguladora**, implicada principalmente en respuestas celulares o **Th1**. Posee efectos antivirales. Pertenece a los interferones tipo II.

Figura 21

*IFN- γ 20-25 KDa*

Esta citoquina es secretada principalmente por linfocitos Th, Tc, NK y células dendríticas. Es una citoquina quimiotáctica para monocitos y aumenta en ellos la expresión de HLA clase I. Su función más importante es la activación de los macrófagos, tanto en las respuestas inmunitarias innatas como en las adquiridas.

Son pocos los estudios que hacen referencia a esta citoquina. Un defecto en la producción de IFN- γ puede contribuir a la persistencia de la infección por el VHC [129]. La producción de IFN- γ disminuye en pacientes con infección por el VHC, siendo ésta menor en los pacientes con HCC con viremia, comparándola con sujetos que fueron capaces de eliminar el virus [102, 129]. El tratamiento con IFN- α disminuye la inflamación y la fibrosis hepática, aún cuando el paciente no responde al mismo. Por tanto, se puede pensar que de alguna forma el tratamiento de la HCC puede estar regulando la respuesta inmunitaria mediada por IFN- γ .

De esta citoquina destacamos dos **POLIMORFISMOS** bialélicos en la región promotora génica: **-847G/C**, **-746G/C** [130, 131].

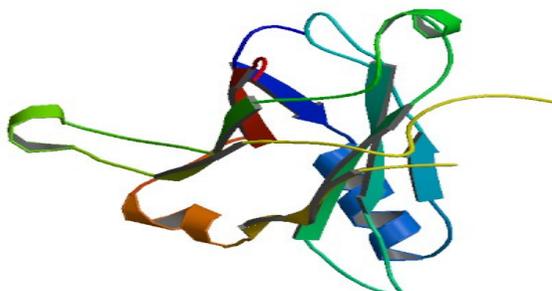
▣ Polimorfismos -847G/C Y -746G/C

El polimorfismo génico -847G/C se ha asociado con CH y CHC [130] y el -764G/C, con la eliminación del virus en pacientes infectados por el VHC con tratamiento antiviral y puede ser utilizado como marcador para predecir RVS [131].

3.5. Factor de crecimiento transformante β (TGF- β)

El TGF- β (*Figura 22*) es una citoquina **antiinflamatoria** e **inmunosupresora**, que participa principalmente en respuestas inmunitarias celulares o **Th1**.

Figura 22



TGF- β : 25 KDa

Esta citoquina es secretada principalmente por monocitos, fibroblastos y células endoteliales. Induce la proliferación de monocitos y la diferenciación celular. Es una citoquina **fibrogénica**. Aumenta la producción de proteínas de la matriz extracelular y sus receptores, e inhibe la síntesis de enzimas de degradación proteolítica. Parece que está más implicada en la fibrogénesis hepática relacionada con el virus de la hepatitis B (VHB) que en la del VHC, donde predominaría la

intervención de la IL-13. No obstante, los mecanismos subyacentes fibrogénicos siguen siendo poco conocidos [132].

Esta citoquina, que también se ha relacionado con el VHC como hemos visto, ha sido escasamente estudiada. Se considera que puede ser útil como marcador pronóstico de respuesta al tratamiento antiviral. En hepatocitos tumorales de ratón, se ha comprobado que el TGF- β puede servir como marcador del estadio de supresión o inhibición del crecimiento y de invasión. En este sentido, se ha afirmado que podría ser importante ayudando a la clasificación tumoral y a las predicciones pronósticas para los pacientes con CHC [133].

Destacamos dos **POLIMORFISMOS** confirmados en la región promotora génica: **TGF- β codón 10 T/C** y **codón 25 C/G** [134].

Polimorfismos TGF- β 1 codón 10 y codón 25

Se considera que estos polimorfismos podrían ser factores genéticos asociados con la susceptibilidad del huésped a la infección por el VHC [134].

Respecto a los fenotipos y haplotipos de estas citoquinas no existen datos concluyentes en la literatura siendo escasos los estudios dedicados al respecto.

4. IL-28B

En los últimos años, gran parte de las investigaciones relativas al estudio de la respuesta al tratamiento de la infección por el VHC, ha recaído sobre la IL-28 [135]. Un polimorfismo de nucleótido único (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*), o cambio de nucleótido simple (rs12979860 donde se cambia citosina por timina, C>T) en el cromosoma 19q13 de esta citoquina, se ha asociado fuertemente con la RVS al tratamiento con IFNpeg/RBV [136, 137]. Esta variante genómica está cerca del locus que codifica para los IFN- λ o interferones tipo III [138-140]. Se ha demostrado que el genotipo rs12979860 es un factor predictivo independiente de respuesta al tratamiento con IFN-Peg/RBV en pacientes con HCC [141].

De forma global, los estudios al respecto señalan a este polimorfismo como el factor predictivo de respuesta más importante del tratamiento antiviral [135].

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

JUSTIFICACIÓN

La posibilidad de que parámetros genéticos e inmunológicos puedan influir en la respuesta al tratamiento antiviral en pacientes con HCC supone un importante hallazgo. Aunque son muchos los estudios que relacionan el papel de ciertas citoquinas y sus polimorfismos con el control y aclaramiento del VHC durante la infección aguda, presentan conclusiones contradictorias y son escasos los trabajos y muy controvertidos, que las relacionan con la respuesta al tratamiento antiviral, de ahí lo novedoso de este trabajo. Todo esto nos permitiría contribuir a conocer mejor el efecto de los fármacos antivirales en pacientes infectados y lo que condiciona la respuesta a los mismos en busca de nuevas estrategias terapéuticas más eficaces que las actuales.

HIPÓTESIS

Tanto una producción inadecuada de ciertas citoquinas como una asociación positiva o negativa de sus niveles con determinados polimorfismos de la IL-28B, y con la RVS, pueden afectar a la respuesta al tratamiento antiviral en pacientes con HCC genotipo 1 que no han sido tratados previamente.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

- Analizar la relación entre la producción de las citoquinas IL-10, IL-6, TNF- α , IFN- γ y TGF- β y el tratamiento antiviral, valorando su producción antes de comenzar el tratamiento (basal), a los 3 meses (semana-12) y seis meses después de finalizar el mismo (semana-72).

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Estudiar si los factores predictivos de respuesta al tratamiento antiviral ya conocidos, tanto virológicos como del hospedador, se relacionan con la RVS.
- Estudiar la concentración de las citoquinas IL-10, IL-6, TNF- α , IFN- γ y TGF- β en los distintos genotipos de la IL-28B y en función de la RVS.
- Analizar si determinados polimorfismos en los genes que codifican dichas citoquinas pueden estar asociados a una mayor o menor producción de las mismas, y relacionarlo con la respuesta al tratamiento antiviral.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. DISEÑO

Estudio de cohorte retrospectivo.

2. SUJETOS Y ÁMBITO DE ESTUDIO

Se han incluido 138 pacientes de raza blanca, españoles, con HCC genotipo 1, tratados con IFNpeg/RBV por primera vez y diagnosticados en el Hospital Universitario San Cecilio (H.U.S.C) de Granada entre 2001 y 2004.

3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

- **Criterios de inclusión:** de una cohorte de 160 pacientes infectados por el VHC, *naïve*, y tratados con IFNpeg/RBV entre 2001 y 2004, se han incluido aquellos con genotipo 1 de los que se disponía de muestra de sangre basal, de la semana-12 y de la semana-72.
- **Criterios de exclusión:** evidencias de VHB, VIH, alcoholismo, autoinmunidad o daño hepático inducido por drogas.

4. TRATAMIENTO Y RESPUESTA A LA TERAPIA

- **Tratamiento:** 180 µg de IFNpeg-α 2a inyectado por vía subcutánea una vez por semana y RBV entre 1000/1200 mg/día según peso (< 75 kg, 1.000 mg y > 75 kg, 1.200 mg). La duración del tratamiento fue de 48 semanas. El paciente mantuvo controles periódicos hasta la semana-72.

📖 **Criterios de respuesta y de monitorización utilizados en este estudio:**

○ *Semana-12*

- **RVPc:** ARN-VHC negativo.
- **RVPp:** descenso del ARN-VHC mayor de 2 log UI/mL respecto al basal.
- **R-Nulos:** descenso del ARN-VHC menor de 2 log UI/mL respecto al basal.

○ *Semana-72*

- **RVS:** ARN-VHC indetectable a las 24 semanas después de finalizar el tratamiento.
- **no-RVS:**
 - **Recidiva:** ARN-VHC detectable tras suspender el tratamiento habiendo sido indetectable durante el mismo.
 - **NR:** ARN-VHC positivo durante todo el tratamiento.

En la *semana-12* a aquellos pacientes con RVP (RVPc y RVPp) se les continuó el tratamiento hasta la semana 48 y a los que fueron R-Nulos se les suspendió. En nuestra cohorte de pacientes con RVPp (n=14) ninguno negativizó el ARN-VHC en ningún momento del seguimiento. Por este motivo, en la *semana-72* tanto a los pacientes R-Nulos como a los RVPp se les consideró como NR y los pacientes recidivantes y NR se agruparon como no-RVS.

5. VARIABLES DEL ESTUDIO

Variables dependientes

RVPc/RVPP/R-Nulos

RVS/no-RVS

RVS/recidiva/NR

Variables independientes

-Citoquinas: IL-10, IL-6, TNF- α , IFN- γ , TGF- β (variables cuantitativas) y sus polimorfismos (variables cualitativas).

- CV: ≤ 600000 UI/mL *vs* > 600000 UI/mL.

- Edad: ≤ 40 años *vs* > 40 años.

- Sexo: mujer *vs* hombre.

- ALT: variable cuantitativa (media \pm error estándar).

- AST: variable cuantitativa (media \pm error estándar).

- GGT: variable cuantitativa (media \pm error estándar).

6. RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS

La recogida de los datos clínicos y epidemiológicos de los pacientes se realizó en la consulta de Hepatitis del H.U.S.C de Granada, gracias a los protocolos previamente rellenados, siguiendo la práctica clínica habitual para pacientes con HCC genotipo 1 que se tratan con IFNpeg/RBV. A medida que se fueron obteniendo datos, se incluyeron en una base de datos realizada expresamente para este trabajo, que se utilizó para el estudio estadístico final. Los datos que se incluyeron fueron:

 **Demográficos:** sexo y edad.

 **Bioquímicos:** ALT, AST y GGT.

📄 **Viroológicos:** CV.

📄 **Producción** de IL-10, IL-6, TNF- α , IFN- γ , TGF- β y determinación de los **polimorfismos** de los genes que las codifican, así como de la IL-28B.

Disponíamos de muestras de suero y sangre total de los pacientes congeladas a -80° C. Para el presente trabajo se utilizaron las muestras basales para el estudio de los polimorfismos de las citoquinas mencionadas, y las de la semana-12 y la semana-72 para el estudio inmunológico (determinación de las citoquinas mencionadas). En caso de no disponer de CV en alguna de las muestras, esta se realizó.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todo se realizó mediante el paquete estadístico SPSS (versión 15.01). El criterio para determinar la significación estadística fue $P \leq 0.05$.

- **Análisis descriptivo**

- Variables cualitativas:** frecuencia absoluta y relativa (%).

- Variables cuantitativas:** media \pm error estándar. Las variables IL-10, IL-6, TNF- α , IFN- γ , TGF- β , que no presentaban una distribución normal, se transformaron mediante la aplicación de logaritmos.

- **Análisis bivalente**

- Variables cualitativas:** test de la χ^2 .

- Variables cuantitativas:** Test de la t de Student o ANOVA. En el caso de 2 ó 3 medidas repetidas de las variables IL-10, IL-6, TNF- α , IFN- γ y TGF- β (basal/semana-12/semana-72)

se aplicó el test de la *t* de Student de medidas repetidas o ANOVA para medidas repetidas. En el caso de medidas repetidas comparando 2 grupos (RVS vs no-RVS) se aplicó ANOVA de medidas repetidas de un factor.

- **Análisis multivariante**

Se aplicó regresión logística multivariante con la determinación de la OR ajustada (aOR) y sus IC (95%).

8. MÉTODOS

Tanto la **CV** como el **genotipo** fueron realizados en el laboratorio de Microbiología del H.U.S.C. de Granada. Así mismo, la **bioquímica** se realizó en el laboratorio de Bioquímica y el **hemograma** en el laboratorio de Hematología del mismo hospital.

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 realizó conforme a la clasificación de Scheuer con modificaciones leves según Caballero y cols., 2001 [142].

📖 **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 1*):

Tabla 1: Actividad necroinflamatoria en tejido hepático

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

El índice de actividad se determina sumando la puntuación de (A) + (B)

La **determinación de la concentración en suero de las citoquinas** fue realizada de forma simultánea para la IL-10, IL-6, IFN- γ y TNF- α mediante la tecnología MILLIPLEX xMAP (*High Sensitivity Human Cytokine Panel, Millipore*) siguiendo las indicaciones especificadas en su protocolo. La sensibilidad del kit utilizado para cada una de ellas fue <0.15 pg/mL, <0.10 pg/mL, <0.29 pg/mL y 0.05 pg/mL, respectivamente. El sistema de detección fue *Streptavidin-HRP/TMB*. El volumen de muestra utilizado en cada caso fue de 50 μ L de suero.

La determinación del TGF- β se realizó en 100 μ l de suero mediante kits de ELISA (*Euroclone*) de 96 pocillos. La sensibilidad del kit utilizado fue de <5 pg/mL, y el sistema de detección utilizado fue *Streptavidin-HRP/TMB*.

El **genotipado de las citoquinas** se realizó mediante el método de PCR-SSP con *primers* específicos de determinadas secuencias. Para ello se realizó la extracción del ADN genómico de sangre total mediante el kit “*High pure PCR template preparation kit*” (versión diciembre 2008). En este tipo de técnicas por PCR los *primers* son diseñados para obtener una amplificación de un determinado

alelo o grupo de alelos. Este método se basa en el principio de que un *primer* totalmente coincidente con la secuencia a amplificar será más eficiente en la PCR que un *primer* con una o pocas coincidencias. Así, la asignación de los alelos se basó en la presencia o ausencia de producto amplificado detectado en una electroforesis en gel de agarosa. La detección de los polimorfismos de las citoquinas ya mencionadas, junto con un control interno de amplificación (gen beta-globina humana) se llevó a cabo mediante el kit comercial CYTOKINE GENOTYPING TRAY (*One Lambda, VH Bio Limited, UK; www.onelambda.com*), el cual incorpora todos los reactivos necesarios para la amplificación, incluyendo los *primers* específicos para cada alelo, exceptuando la encima Taq polimerasa. Las muestras se sometieron a una amplificación mediante PCR en un termociclador *Perkin-Elmer 9600*. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo durante 130 segundos (seg) a 96° C seguido de 60 seg a 63° C; 9 ciclos de 25 seg a 96° C seguido de 70 seg a 63° C; 20 ciclos de 25 seg a 96° C seguido de 60 seg a 59° C y 40 seg a 72° C (*Tabla 2*).

Tabla 2: Condiciones de amplificación

Nº CICLOS	Pasos	Temperatura (° C)	Tiempo (seg)
1	1	96	130
	2	63	60
9	1	96	25
	2	63	70
20	1	96	25
	2	59	60
	3	72	40
Final	1	4	---

One Lambda PCR Program (OLI-1)

Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se visualizaron con bromuro de etidio al exponerlo a luz UVA y captar la imagen mediante un *ChemiDoc XRS System*. La interpretación de los resultados se basó en la presencia del control interno junto con la presencia o ausencia de los fragmentos específicos amplificados mediante el programa *Quantity one 4.6.8 (Basic)*.

Para el **genotipado de la IL-28B (SNP-rs12979860)** se determinó el SNP-rs12979860 por medio de un ensayo de discriminación alélica utilizando sondas Taqman (*Custom Assay Service, Ref. AHI050J*). Los oligonucleótidos cebadores utilizados fueron: Oligo sentido 5' GCCTGTCGTGTACTGAACCA-3' y el antisentido 5' GCGCGGAGTGCAATTCAAC-3'. Las secuencias de las sondas Taqman fueron:

- para la detección del **polimorfismo C**: sonda marcada con el fluorocromo VIC 5'-TGGTTCGCGCCTTC-3'.
- para la detección del **polimorfismo T**: sonda 5' CTGGTTCACGCCTTC-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 4µl, siguiendo el siguiente protocolo térmico: preincubación a 50° C durante 2 minutos (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 seg 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

RESULTADOS

1. Características basales de los pacientes del estudio y su relación con la respuesta al tratamiento antiviral (factores predictivos de RVS)

En el total de pacientes (n=138), el 44% eran \leq de 40 años y el 42% eran mujeres. Respecto al estadio de fibrosis el 80% se encontraban en un nivel comprendido entre F0 a F2 y el 54% presentaba una actividad necroinflamatoria de grado comprendido entre I1 a I4. El 28% presentaba una CV \leq a 600000 UI/mL y el 28% tenían el genotipo CC de la IL-28B (*Tabla 1*). Las transaminasas (ALT, AST y GGT) fueron analizadas como variables continuas.

En lo referente a la respuesta al tratamiento antiviral, 77 pacientes (56%) alcanzaron una RVS y 61 (44%) presentaron no-RVS. En nuestro estudio, tanto la **edad \leq de 40 años** (P=0.016), los **niveles basales bajos de GGT** (P=0.011), la **CV \leq a 600000 UI/mL** (P=0.046) y el **genotipo CC de la IL-28B** (P=0.011) se asociaron de forma estadísticamente significativa con la RVS (*Tabla 1*). Para el resto de parámetros no se observó significación estadística.

TABLA 1: Características basales de los 138 pacientes en función de la respuesta al tratamiento antiviral (RVS vs no-RVS)

	Todos n=138 100%	RVS n=77 56%	no-RVS n=61 44%	P
Edad (años)^a				
≤40	61 (44)	41 (67)	20 (33)	0.016
>40	77 (56)	35 (46)	42(54)	
Sexo^a				
Mujer	58 (42)	30 (52)	28 (48)	ns
Hombre	80 (58)	47 (59)	33 (41)	
Estadio de fibrosis (n=103)^a				
F0-F2	82 (80)	46 (56)	36 (44)	ns
F3-F4	21 (20)	12 (57)	9 (43)	
Grado de actividad necroinflamatoria (n=103)^a				
I1-I4	56 (54)	31 (55)	25 (45)	ns
I5-I8	47 (45)	26 (55)	21 (45)	
Transaminasas (U/L)^b				
ALT	104±8	102±8	106±15	ns
AST	67±6	62±5	74±11	ns
GGT	64±6	50±4	81±13	0.011
CV (IU/mL)^a				
≤600000	39 (28)	27 (69)	12 (31)	0.046
>600000	99 (72)	50 (51)	49 (50)	
IL-28B^a				
CC	39 (28)	29 (74)	10 (26)	0.011
no-CC	99 (72)	48 (49)	51 (51)	

^aValores absolutos con porcentajes entre paréntesis o ^bmedia ± error estándar de la media. **RVS**, respuesta virológica sostenida; **ALT**, alanina aminotransferasa; **AST**, aspartato aminotransferasa; **GGT**, gamma glutamil transpeptidasa; **CV**, carga viral; **P**, significación estadística; **ns**, no significativo.

Análisis bivariante: El valor de P se obtuvo mediante el test de χ^2 para las variables cualitativas y el la t de Student para las cuantitativas.

Cuando dividimos al grupo con no-RVS en recidiva y NR, observamos que: de los 138 pacientes, 77 (56%) alcanzaron una RVS, 28 fueron recidivantes (20%) y 33 fueron NR (24%). Los factores que se asociaron de forma estadísticamente significativa a la RVS fueron la **edad ≤ 40 años** (P=0.03), los **niveles basales**

bajos de GGT (P=0.001), y el genotipo CC IL-28B (P=0.015) (Tabla 2). Para el resto de parámetros no se obtuvieron resultados significativos.

TABLA 2: Características basales de los 138 pacientes en función de la respuesta al tratamiento antiviral dividida en RVS, recidiva y NR

	Todos n=138 100%	RVS n=77 56%	Recidiva n=28 20%	NR n=33 24%	P
Edad (años)^a					
≤40	61 (44)	41 (67)	7 (12)	13 (22)	0.03
>40	77 (56)	36 (47)	21 (27)	20 (26)	
Sexo^a					
Mujer	58 (42)	30 (52)	12 (21)	16 (28)	ns
Hombre	80 (58)	47 (59)	16 (20)	17 (21)	
Estadio de fibrosis (n=103)^a					
F0-F2	82 (80)	46 (56)	17 (21)	19 (23)	ns
F3-F4	21 (20)	12 (57)	1 (5)	8 (38)	
Grado de actividad necroinflamatoria (n=103)^a					
I1-I4	56 (54)	31 (55)	10 (18)	15 (27)	ns
I5-I8	47 (46)	26 (55)	9 (19)	12 (26)	
Transaminasas (U/L)^b					
ALT	104±8	102±8	82±11	127±25	ns
AST	67±6	61±5	55±7	90±20	ns
GGT	64±6	50±6	56±16	103±18	0.001
CV (UI/mL)^a					
≤600000	39 (28)	27 (69)	5 (13)	7 (18)	ns
>600000	99 (72)	50 (51)	23 (23)	26 (26)	
IL-28B^a					
CC	39 (28)	29 (74)	7 (18)	3 (8)	0.015
no-CC	99 (72)	48 (49)	21 (21)	30 (30)	

^aValores absolutos con porcentajes entre paréntesis o ^bmedia ± error estándar de la media. RVS, respuesta virológica sostenida; NR, no respuesta; ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; GGT, gamma glutamil transpeptidasa; CV: carga viral; P, significación estadística; ns, no significativo. **Análisis bivariante:** El valor de P se obtuvo mediante el test de χ^2 para las variables cualitativas y ANOVA para las cuantitativas.

2. Características de las citoquinas en muestras basales, semana-12 y semana-72 y su relación con los distintos tipos de respuesta al tratamiento antiviral

Semana-12

Cuando analizamos la respuesta virológica en la semana-12 encontramos que de los 138 pacientes 105 (76%) alcanzaron RVPc, 14 (10%) tuvieron RVPp y 19 (14%) fueron R-Nulos (datos mostrados en las gráficas del apartado 4). Ninguna de las citoquinas estudiadas se asoció con la RVP (datos no significativos).

Basal y semana-72

La concentración de IL-10, IL-6 y TNF- α , se asoció de forma estadísticamente significativa con la respuesta al tratamiento antiviral en diferentes momentos del estudio (*Tabla 3*).

- **IL-10:** El Log IL-10 medido en la **semana-72** fue menor en pacientes que alcanzaron una RVS que en pacientes con no-RVS (P=0.03).

- **IL-6:** El Log IL-6 **basal** fue menor en pacientes que alcanzaron una RVS que en pacientes con no-RVS (P=0.04).

- **TNF- α :** El Log TNF- α fue menor en pacientes que alcanzaron una RVS que en pacientes con no-RVS tanto en la muestra **basal** (P=0.05) como en la muestra **postratamiento** (P=0.004).

Para el IFN- γ y el TGF- β no se observaron resultados estadísticamente significativos.

TABLA 3: Características de las citoquinas en muestras basales, semana-12 y semana-72, en función de la respuesta al tratamiento antiviral (RVS vs no-RVS)

	Todos n=138 100%	RVS n=77 56%	no-RVS n=61 44%	P
Log IL-10 (pg/mL)				
Basal	2.8±0.1	2.9±0.2	2.7±0.2	ns
Semana-12	3.1±0.1	3.1±0.1	3.2±0.1	ns
Semana-72	2.3±0.1	2.1±0.2	2.6±0.2	0.03
Log IL-6 (pg/mL)				
Basal	1.5±0.1	1.4±0.1	1.6±0.1	0.04
Semana-12	1.3±0.1	1.3±0.1	1.3±0.1	ns
Semana-72	1.6±0.1	1.5±0.1	1.7±0.1	ns
Log TNF-α (pg/mL)				
Basal	2.2±0.1	2.0±0.1	2.3±0.1	0.05
Semana-12	2.5±0.1	2.5±0.1	2.6±0.1	ns
Semana-72	2.3±0.1	2.0±0.1	2.4±0.1	0.004
Log IFN-γ (pg/mL)				
Basal	2.8±0.1	2.9±0.2	2.7±0.2	ns
Semana-12	0.5±0.1	0.5±0.1	0.6±0.1	ns
Semana-72	1.2±0.1	1.3±0.1	1.2±0.2	ns
Log TGF-β (pg/mL)				
Basal	9.9±0.04	9.9±0.1	10.0±0.1	ns
Semana-12	9.7±0.03	9.7±0.03	9.7±0.04	ns
Semana-72	9.8±0.04	9.9±0.04	9.8±0.1	ns

Valores expresados como media ± error estándar de la media.

RVS, respuesta virológica sostenida; **P**, significación estadística; **ns**, no significativo.

Análisis bivariante: El valor de *P* se obtuvo mediante el test de la *t* de Student.

Cuando dividimos al grupo con no-RVS en recidiva y NR, tan solo las concentraciones de IL-6 y de TNF- α , se asociaron de forma estadísticamente significativa con la respuesta en la semana-72 (P=0.043 y P=0.016 respectivamente) (Tabla 4).

TABLA 4: Características de las citoquinas, basales, en la semana-12 y en la semana-72, en función de la respuesta al tratamiento antiviral en pacientes con RVS, recidiva y NR

	Todos n=138 100%	RVS n=77 56%	Recidiva n=28 20%	NR n=33 24%	P
Log IL-10 (pg/mL)					
Basal	2.8±0.1	2.9±0.2	2.7±0.2	2.8±0.2	ns
Semana-12	3.1±0.1	3.1±0.1	3.3±0.2	3.1±0.2	ns
Semana-72	2.3±0.1	2.1±0.2	2.6±0.3	2.6±0.2	ns
Log IL-6 (pg/mL)					
Basal	1.5±0.1	1.4±0.1	1.7±0.2	1.6±0.1	ns
Semana-12	1.3±0.1	1.3±0.1	1.5±0.1	1.2±0.1	ns
Semana-72	1.6±0.1	1.5±0.1	1.9±0.1	1.5±0.1	0.043
Log TNF-α (pg/mL)					
Basal	2.1±0.1	2.0±0.1	2.2±0.2	2.4±0.1	ns
Semana-12	2.5±0.1	2.5±0.1	2.6±0.1	2.6±0.1	ns
Semana-72	2.2±0.1	2.0±0.1	2.3±0.2	2.4±0.1	0.016
Log IFN-γ (pg/mL)					
Basal	2.8±0.1	2.9±0.2	2.7±0.2	2.8±0.2	ns
Semana-12	0.5±0.1	0.5±0.1	0.5±0.2	0.6±0.2	ns
Semana-72	1.2±0.1	1.3±0.1	1.3±0.2	1.2±0.2	ns
Log TGF-β (pg/mL)					
Basal	9.9±0.04	9.9±0.1	9.9±0.1	10.0±0.1	ns
Semana-12	9.7±0.03	9.7±0.03	9.6±0.1	9.7±0.1	ns
Semana-72	9.8±0.04	9.9±0.04	9.8±0.1	9.8±0.1	ns

Valores expresados como media \pm error estándar de la media.

RVS, respuesta virológica sostenida; P, significación estadística; ns, no significativo.

Análisis bivariante: El valor de P se obtuvo mediante el test de ANOVA.

3. Análisis multivariante de los factores predictivos de respuesta al tratamiento antiviral

Como hemos visto en el punto 2, tanto la IL-6 como el TNF- α , se asociaron con la respuesta al tratamiento antiviral en el análisis bivariante, de manera que los pacientes con RVS tienen menos concentración de IL-6 y de TNF- α basal que aquellos con no-RVS (*Tabla 3*), por lo tanto, pueden utilizarse como factores predictivos de respuesta. Sin embargo, pierden su significación estadística al realizar el análisis multivariante, debido a que existe una correlación lineal entre ambas citoquinas antes del comienzo del tratamiento (correlación de Pearson=0.302, $R^2=0.09$, $P\leq 0.0001$). Por ello, hemos realizado un análisis multivariante para cada una de ellas por separado ajustando por el resto de factores predictivos de respuesta conocidos.

En ambos modelos las covariables que se incluyeron fueron: edad, IL-28B, CV, ALT y GGT. La CV se excluyó del modelo final de ambas citoquinas por no haber dado un resultado significativo.

En el modelo para la **IL-6** los factores relacionados independientemente con la RVS fueron: **edad ≤ 40 años** ($P=0.004$), polimorfismo **CC IL-28B** ($P=0.044$), **baja concentración basal de IL-6** ($P=0.038$) y **de GGT** ($P=0.028$) (*Tabla 5*).

TABLA 5: Análisis multivariante para IL-6 ajustando por los factores predictivos de respuesta

	aOR	IC (95%)	P
Edad (≤ 40 años)	3.687	1.521-8.941	0.004
IL-28 B (CC)	2.716	1.025-7.195	0.044
Log IL-6 basal	0.527	0.288-0.965	0.038
GGT basal	0.990	0.982-0.999	0.028

aOR, odd ratio ajustada; *IC*, intervalo de confianza; *P*, significación estadística; *GGT*, gamma glutamil transpeptidasa.

En el caso del **TNF- α** , los factores relacionados independientemente con la RVS fueron: **edad \leq 40 años** (P=0.003), polimorfismo **CC IL-28B** (P=0.047) y **concentración de GGT basal baja** (P=0.037). La **concentración basal baja de TNF- α** prácticamente alcanza la significación estadística (P=0.058) (*Tabla 6*).

TABLA 6: Análisis multivariante para TNF- α ajustando por los factores predictivos de respuesta

	aOR	IC (95%)	P
Edad (\leq 40 años)	3.768	1.561-9.098	0.003
IL-28 B (CC)	2.675	1.011-7.076	0.047
Log TNF-α basal	0.567	0.315-1.020	0.058
GGT basal	0.991	0.983-0.999	0.037

aOR, odd ratio ajustada; *IC*, intervalo de confianza; *P*, significación estadística; *GGT*, gamma glutamil transpeptidasa.

4. Estudio de las citoquinas durante el tratamiento

Hemos analizado como afecta el tratamiento antiviral a la producción de las citoquinas estudiadas tanto a la semana-12 como a la semana-72. En las gráficas de este apartado y del siguiente la terminología aparece en inglés pues se realizaron para el artículo que se ha enviado a publicar.

4.1. Respuesta virológica precoz (semana-12)

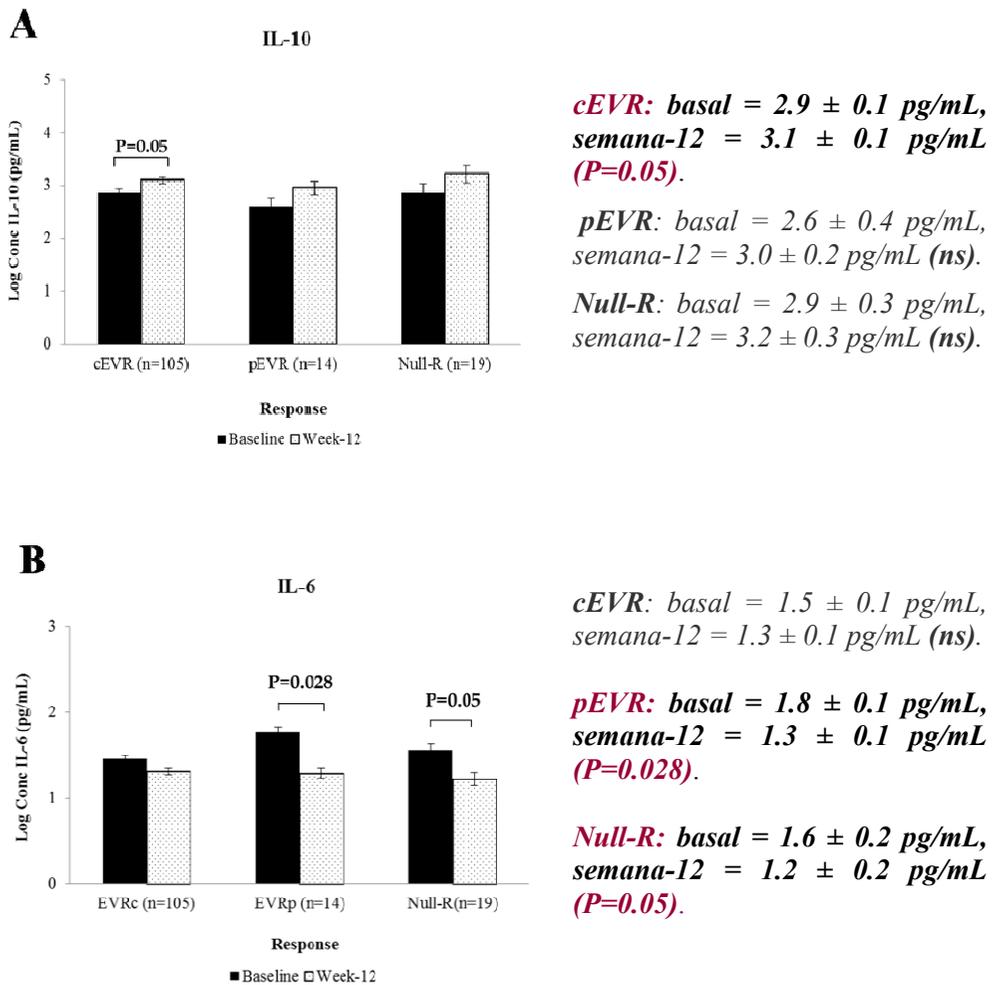
Cuando analizamos la respuesta virológica a la semana-12 encontramos que de los 138 pacientes 105 (76%) alcanzaron RVPc, 14 (10%), tuvieron RVPp y 19 (14%) fueron R-Nulos. El comportamiento de las citoquinas en este punto del tratamiento viene representado en la *Figura 1 (A-E)* y se resume a continuación:

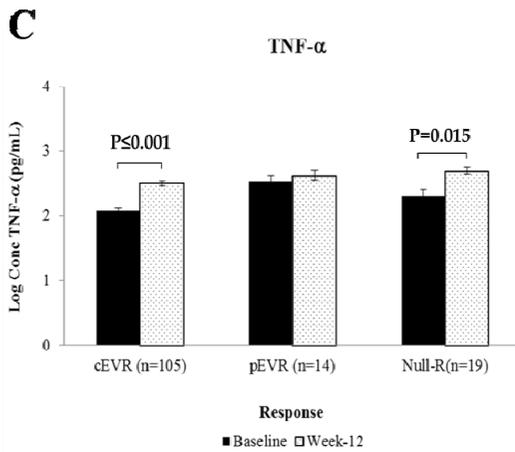
- **IL-10**: observamos un incremento de su concentración en los tres grupos de pacientes, siendo estadísticamente significativo en la RVPc ($P=0.05$) (*Figura 1A*).
- **IL-6**: se registró una disminución de su concentración en los tres grupos de pacientes, siendo estadísticamente significativo en la RVPp ($P=0.028$) y en R-Nulos ($P=0.05$) (*Figura 1B*).
- **TNF- α** : se observó un aumento de su concentración en los tres grupos de pacientes, siendo estadísticamente significativo en RVPc ($P\leq 0.001$) y en R-Nulos ($P=0.015$) (*Figura 1C*).
- **IFN- γ** : observamos una drástica disminución de su concentración estadísticamente significativa en la RVPc ($P\leq 0.001$), así como en la RVPp ($P\leq 0.001$) y en R-Nulos ($P\leq 0.001$) (*Figura 1D*).

- **TGF- β** : se registró una disminución de su concentración en los tres grupos de pacientes, siendo estadísticamente significativa en la RVPc ($P \leq 0.001$) y en R-Nulos ($P = 0.003$) (*Figura 1E*).

FIGURA 1: Comportamiento de las citoquinas IL-10, IL-6, TNF- α , IFN- γ y TGF- β en la semana-12 de tratamiento

cEVR, respuesta virológica precoz completa; *pEVR*, respuesta virológica precoz parcial; *Null-R*, respondedores nulos.

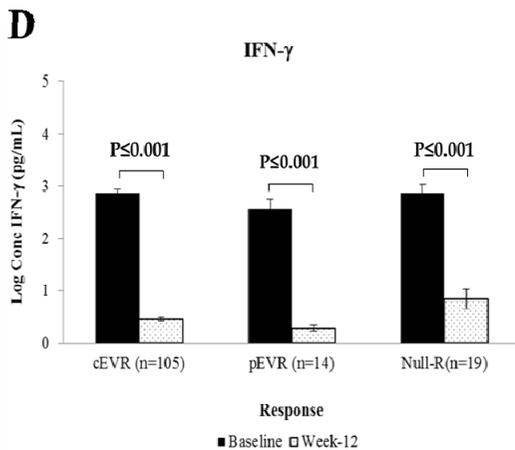




cEVR: basal = 2.1 ± 0.1 pg/mL, semana-12 = 2.5 ± 0.1 pg/mL (P ≤ 0.001).

pEVR: basal = 2.5 ± 0.2 pg/mL, semana-12 = 2.6 ± 0.1 pg/mL (ns).

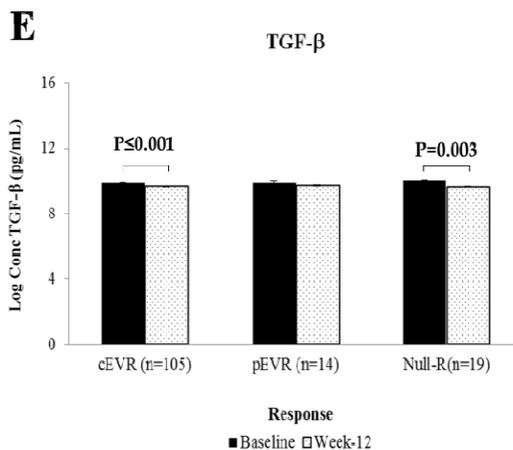
Null-R: basal = 2.3 ± 0.2 pg/mL, semana-12 = 2.7 ± 0.1 pg/mL (P = 0.015).



cEVR: basal = 2.9 ± 0.1 pg/mL, semana-12 = 0.5 ± 0.1 pg/mL (P ≤ 0.001).

pEVR: basal = 2.6 ± 0.4 pg/mL, semana-12 = 0.5 ± 0.2 pg/mL (P ≤ 0.001).

Null-R: basal = 2.9 ± 0.3 pg/mL, semana-12 = 0.8 ± 0.3 pg/mL (P ≤ 0.001).



cEVR: basal = 9.9 ± 0.04 pg/mL, semana-12 = 9.7 ± 0.03 pg/mL (P ≤ 0.001).

pEVR: basal = 9.9 ± 0.2 pg/mL, semana-12 = 9.7 ± 0.1 pg/mL (ns).

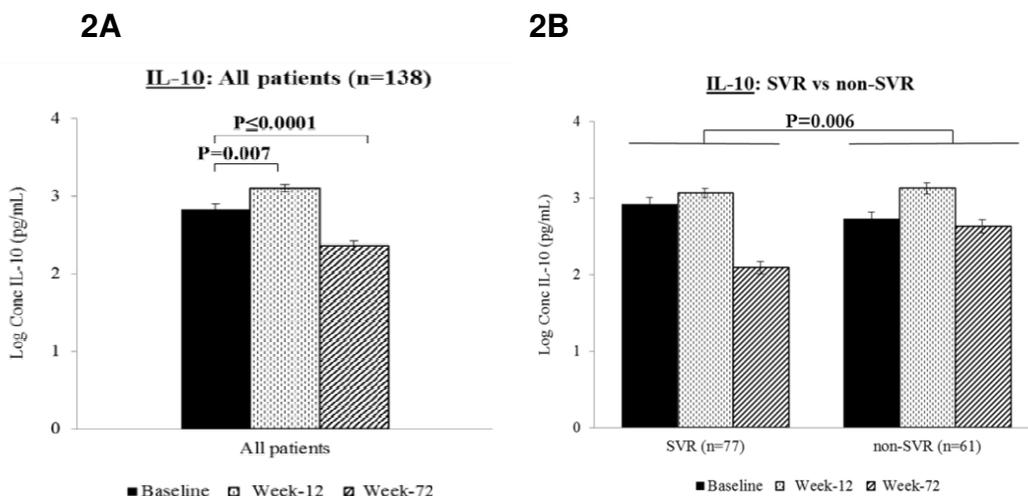
Null-R: basal = 10.1 ± 0.1 pg/mL, semana-12 = 9.7 ± 0.1 pg/mL (P = 0.003).

4.2 Respuesta virológica sostenida (semana-72)

IL-10

Debido al efecto del tratamiento antiviral, la concentración sérica de IL-10 aumentó de forma estadísticamente significativamente a la semana-12 ($P=0.007$). Sin embargo, a la semana-72, se redujo significativamente por debajo de su valor basal ($P\leq 0.0001$) (*Figura 2A*). Al estratificar por respuesta (RVS vs no-RVS), se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($P=0.006$), apreciándose que la disminución que sufría la IL-10 a la semana-72 se debía a los pacientes con RVS (*Figura 2B*).

FIGURA 2: Efecto del tratamiento antiviral sobre la IL-10 en el total de pacientes y en función de la respuesta



SVR, respuesta virológica sostenida, **non-SVR**, no respuesta virológica sostenida.

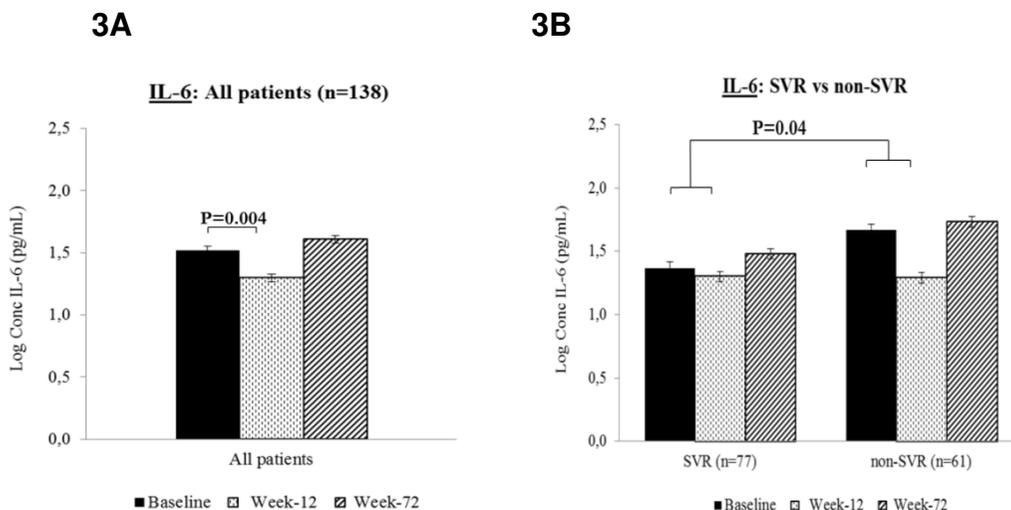
Niveles de IL-10 en el **total** de pacientes: basal = 2.8 ± 0.12 pg/mL, semana-12 = 3.1 ± 0.89 pg/mL y semana-72 = 2.3 ± 0.12 pg/mL; **basal vs semana-12**, $P=0.007$; **basal vs semana-72**, $P \leq 0.0001$ (A). En **RVS**: basal = 2.9 ± 0.17 pg/mL, semana-12 = 3.1 ± 0.11 pg/mL y semana-72 = 2.1 ± 0.16 pg/mL. En **no-RVS**: basal = 2.7 ± 0.16

pg/mL, semana-12 = 3.2 ± 0.14 pg/mL y semana-72 = 2.6 ± 0.17 pg/mL (B).

IL-6

Debido al efecto del tratamiento antiviral, la concentración sérica de IL-6 disminuyó de forma estadísticamente significativa a la semana-12 ($P=0.004$) (*Figura 3A*). Al estratificar por respuesta (RVS vs no-RVS), se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($P=0.04$), apreciándose que en pacientes con no-RVS los valores basales de IL-6 eran mayores y que su disminución, a la semana-12, era mayor que en pacientes con RVS (*Figura 3B*).

FIGURA 3: Efecto del tratamiento antiviral sobre la IL-6 en el total de pacientes y en función de la respuesta



SVR, respuesta virológica sostenida, **non-SVR**, no respuesta virológica sostenida.

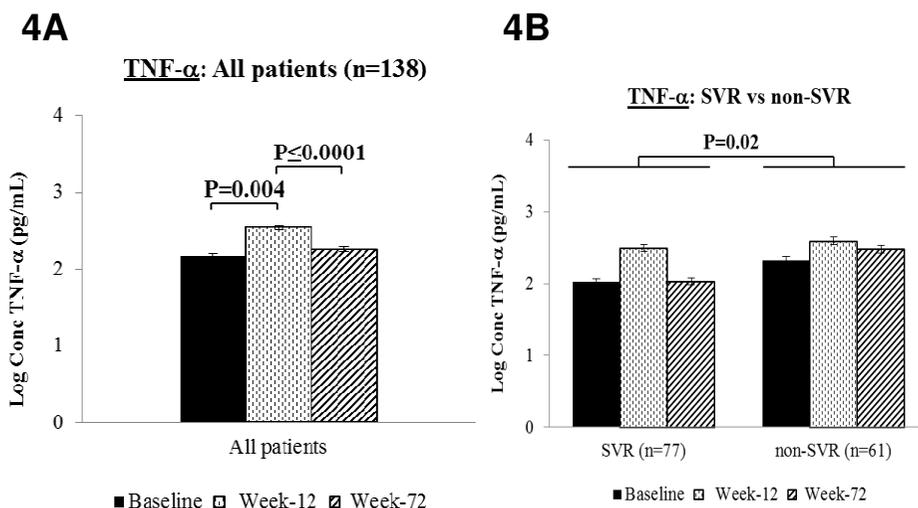
Niveles de IL-6 en el total de pacientes: basal = 1.5 ± 0.07 pg/mL, semana-12 = 1.3 ± 0.06 pg/mL y semana-72 = 1.6 ± 0.05 pg/mL; **basal vs semana-12, $P=0.004$** (A). En RVS: basal = 1.4 ± 0.09 pg/mL,

semana-12 = 1.3 ± 0.08 pg/mL, semana-72 = 1.5 ± 0.08 pg/mL. En **no-RVS**: basal = 1.6 ± 0.09 pg/mL, semana-12 = 1.3 ± 0.08 pg/mL y semana-72 = 1.7 ± 0.09 pg/mL (**B**).

TNF- α

Debido al efecto del tratamiento antiviral, la concentración sérica de TNF- α aumentó de forma estadísticamente significativa a la semana-12 ($P=0.004$). Sin embargo, a la semana-72, prácticamente regresó a sus valores basales ($P\leq 0.0001$) (**Figura 4A**). Al estratificar por respuesta (RVS vs no-RVS), se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($P=0.02$), ya que los valores basales y los de la semana-72, eran menores en los pacientes con RVS que en los no-RVS (**Figura 4B**).

FIGURA 4: Efecto del tratamiento antiviral sobre el TNF- α en el total de pacientes y en función de la repuesta.



SVR, respuesta virológica sostenida, **non-SVR**, no respuesta virológica sostenida

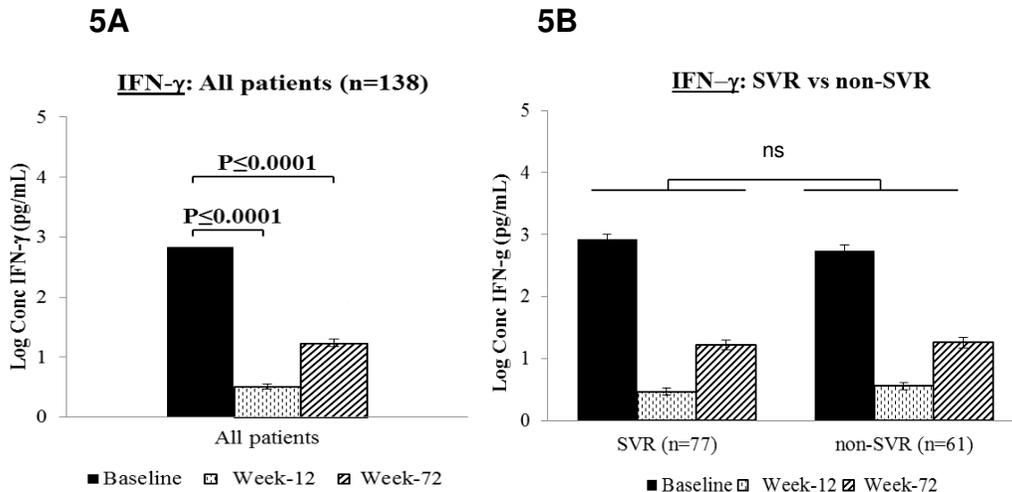
Niveles de TNF- α en el **total** de pacientes: basal = 2.1 ± 0.1 pg/mL, semana-12 = 2.6 ± 0.1 pg/mL y semana-72 = 2.2 ± 0.1 pg/mL; **basal**

vs semana-12, $P=0.004$; semana-12 vs semana-72, $P\leq 0.0001$ (A). En RVS: basal = 2.0 ± 0.1 pg/mL, semana-12 = 2.5 ± 0.1 pg/mL, semana-72 = 2.0 ± 0.1 pg/mL. En no-RVS: basal = 2.3 ± 0.1 pg/mL, semana-12 = 2.6 ± 0.1 pg/mL y semana-72 = 2.4 ± 0.1 pg/mL (B).

IFN- γ

Debido al efecto del tratamiento antiviral, la concentración sérica de IFN- γ disminuyó drásticamente a la semana-12 ($P\leq 0.0001$) aumentando a la semana-72 pero sin volver a los valores basales ($P\leq 0.0001$) (*Figura 5A*). Al estratificar por respuesta (RVS vs no-RVS) no se apreciaron resultados estadísticamente significativos entre ambos grupos (*Figura 5B*).

FIGURA 5: Efecto del tratamiento antiviral sobre el IFN- γ en el total de pacientes y en función de la respuesta



SVR, respuesta virológica sostenida, non-SVR, no respuesta virológica sostenida.

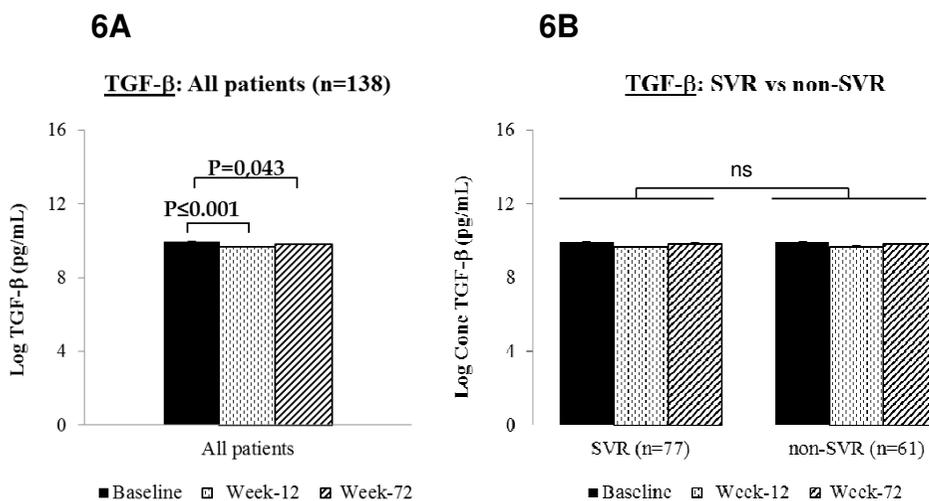
Niveles de IFN- γ en el total de pacientes: basal = 2.8 ± 0.1 pg/mL, semana-12 = 0.5 ± 0.1 pg/mL y semana-72 = 1.2 ± 0.1 pg/mL; basal vs semana-12, $P\leq 0.0001$; basal vs semana-72, $P\leq 0.0001$ (A). En

RVS: basal = 2.9 ± 0.2 pg/mL, semana-12 = 0.5 ± 0.1 pg/mL, semana-72 = 1.3 ± 0.1 pg/mL. En **no-RVS:** basal = 2.7 ± 0.2 pg/mL, semana-12 = 0.6 ± 0.1 pg/mL y semana-72 = 1.3 ± 0.2 pg/mL (**B**).

TGF-β

Debido al efecto del tratamiento antiviral, la concentración de TGF-β sufrió una disminución estadísticamente significativa a la semana-12 ($P \leq 0.001$) (**Figura 6A**) y a la semana-72 con respecto a la basal ($P=0.043$). Al estratificar por respuesta (RVS vs no-RVS), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (**Figura 6B**).

FIGURA 6: Efecto del tratamiento antiviral sobre el TGF-β en el total de pacientes y en función de la respuesta



SVR, respuesta virológica sostenida, **non-SVR**, no respuesta virológica sostenida.

Niveles de TGF-β en el **total** de pacientes: basal = 9.9 ± 0.04 pg/mL, semana-12 = 9.70 ± 0.03 pg/mL y semana-72 = 9.8 ± 0.04 pg/mL; **basal vs semana-12, $P \leq 0.001$; basal vs semana-72, $P=0.043$** (**A**). En **RVS:** basal = 9.9 ± 0.1 pg/mL, semana-12 = 9.7 ± 0.03 pg/mL, semana-72 = 9.9 ± 0.04 pg/mL. En **no-RVS:** basal = 10.0 ± 0.1 pg/mL, semana-12 = 9.7 ± 0.04 pg/mL y semana-72 = 9.8 ± 0.1 pg/mL (**B**).

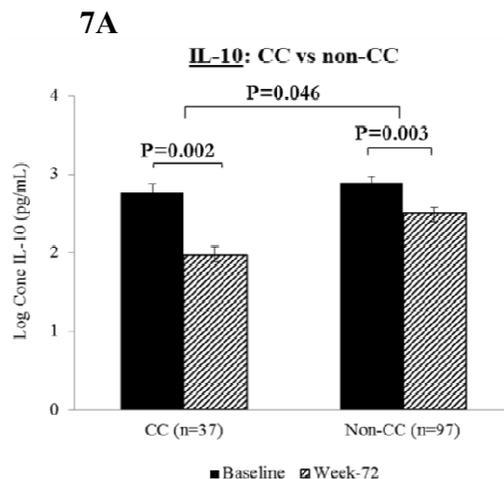
5. Citoquinas y su relación con el genotipo de la IL-28B

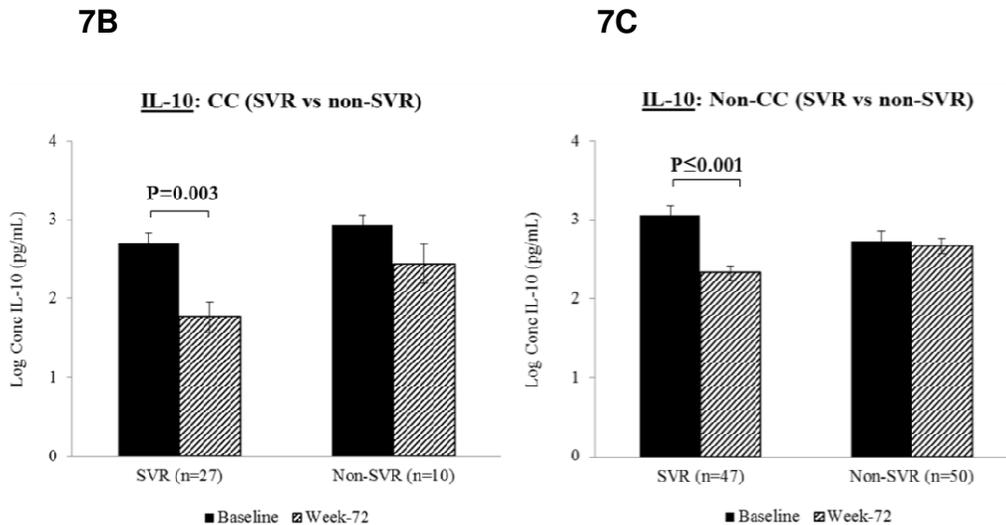
El genotipo de la IL-28B se pudo determinar en todos los casos excepto en cuatro individuos (n=134). Cuando se estratificó por genotipo de la IL-28B (CC vs no-CC), 37 (28%) pacientes presentaron genotipo CC y 97 (72%) tenían genotipo no-CC.

IL-10

La concentración sérica de IL-10 sufrió una disminución estadísticamente significativa a la semana-72, tanto en pacientes con genotipo CC (P=0.002) como en los no-CC (P=0.003), siendo mayor en el primer grupo (P=0.046) (*Figura 7A*). Al estratificar por respuesta (RVS vs no-RVS) se observó que esta disminución era debida a los pacientes con RVS tanto en el grupo CC (*Figura 7B*) como en el no-CC (*Figura 7C*).

FIGURA 7: Estudio de la concentración de la IL-10, y su relación con el genotipo de la IL-28B y la RVS





SVR, respuesta virológica sostenida. **Genotipos de la IL-28B:** CC y no-CC (en el no-CC se incluyen a los pacientes con genotipo CT y TT).

Niveles séricos de IL-10 en pacientes con genotipo **CC**: basal = 2.77 ± 0.22 pg/mL, semana-72 = 1.97 ± 0.23 pg/mL (**P=0.002**). En genotipo **no-CC**: basal = 3.1 ± 0.15 pg/mL, semana-72 = 2.5 ± 0.16 pg/mL (**P=0.003**) (A). Niveles séricos de IL-10 en pacientes con genotipo **CC**; RVS: basal = 2.70 ± 0.27 pg/mL, semana-72 = 1.8 ± 0.24 pg/mL (**P=0.003**) y no RVS: basal = 2.93 ± 0.38 pg/mL, semana-72 = 2.44 ± 0.49 pg/mL (ns) (B) y en los **no-CC**; RVS: basal = 3.06 ± 0.24 pg/mL, semana-72 = 2.32 ± 0.25 pg/mL (**P<0.001**) y no-RVS: basal = 2.73 ± 0.18 pg/mL, semana-72 = 2.67 ± 0.19 pg/mL (ns) (C).

IL-6

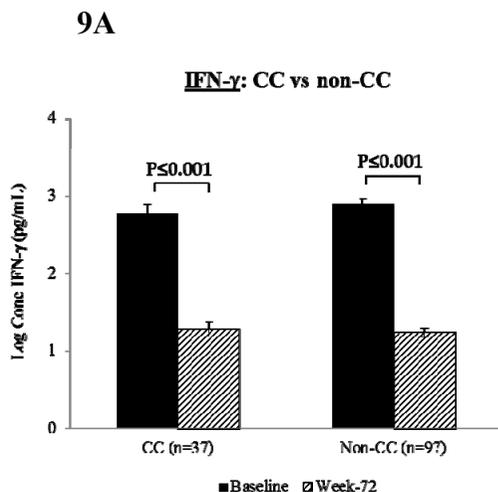
La concentración sérica de IL-6 sufrió un incremento estadísticamente significativo a la semana-72 únicamente en el grupo con genotipo CC (P=0.026) (Figura 8A), no encontrando diferencias estadísticamente significativas al estratificar por respuesta (RVS vs no-RVS) (Figuras 8B y 8C).

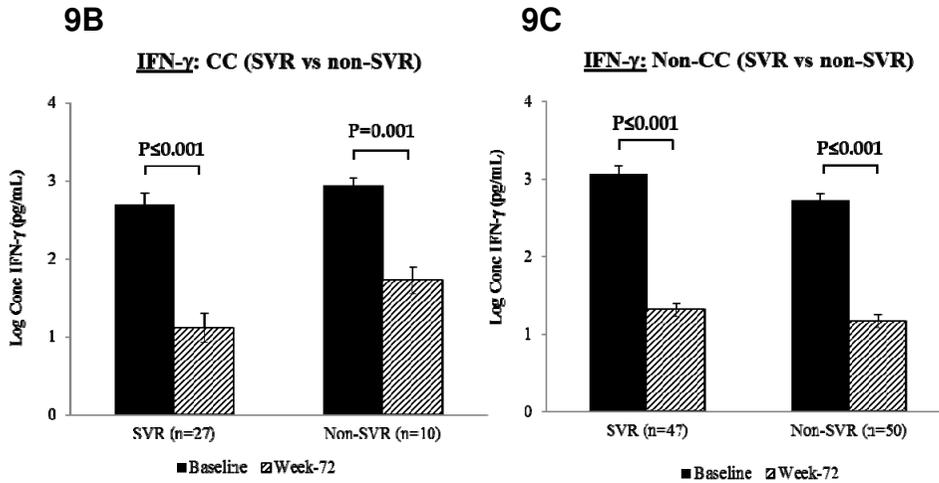
(ns) y *no-RVS*, basal = 1.85 ± 0.18 pg/mL, semana-72 = 2.15 ± 0.20 pg/mL (ns) (B), y en pacientes *no-CC*: *RVS*: basal = 1.31 ± 0.14 pg/mL, semana-72 = 1.39 ± 0.12 pg/mL (ns) y *no-RVS*: basal = 1.58 ± 0.09 pg/mL, semana-72 = 1.62 ± 0.09 pg/mL (ns) (C).

IFN- γ

La concentración sérica de IFN- γ sufrió una disminución a la semana-72, tanto en pacientes con genotipo CC como no-CC, siendo estadísticamente significativa en ambos ($P \leq 0.001$) (Figura 9A). Al estratificar según la respuesta (RVS vs no-RVS), en ambos grupos se apreció una disminución de la concentración de IFN- γ que fue estadísticamente significativa, manteniendo un comportamiento muy parecido en todos los casos. (Figura 9B y 9C).

FIGURA 9: Estudio de la concentración de IFN- γ , y su relación con el genotipo de la IL-28B y la RVS





SVR, respuesta virológica sostenida. **Genotipos de la IL-28B**: CC y no-CC (en el no-CC se incluyen a los pacientes con genotipo CT y TT).

Niveles séricos de IFN- γ en pacientes con genotipo **CC**: basal = 2.77 ± 0.22 pg/mL, semana-72 = 1.28 ± 0.19 pg/mL ($P \leq 0.001$) y en genotipo **no-CC**: basal = 2.89 ± 0.15 pg/mL, semana-72 = 1.24 ± 0.11 pg/mL ($P \leq 0.001$) (A). Niveles séricos de IFN- γ para pacientes con genotipo **CC**; *RVS*: basal = 2.70 ± 0.27 pg/mL; semana-72 = 1.11 ± 0.22 pg/mL ($P \leq 0.001$) y *no-RVS*: basal = 2.93 ± 0.38 pg/mL; semana-72 = 1.72 ± 0.34 pg/mL ($P = 0.001$) (B), y en **no-CC**; *RVS*: basal = 3.06 ± 0.24 pg/mL, semana-72 = 1.31 ± 0.16 pg/mL ($P \leq 0.001$) y *no-RVS*: basal = 2.73 ± 0.18 pg/mL, semana-72 = 1.17 ± 0.17 pg/mL ($P \leq 0.001$) (C).

Para el TNF- α y para el TGF- β no se han obtenido resultados estadísticamente significativos en ninguno de los casos.

6. Polimorfismos

Se ha realizado un estudio de los genotipos, fenotipos y haplotipos de las citoquinas de nuestro trabajo en los distintos tipos de respuesta al tratamiento antiviral: RVPc/RVPp/NR, RVS/no-RVS, RVS/recidiva/NR.

1. Dos polimorfismos génicos de IL-10 (-819 C/T, -592 C/A) se asociaron con la respuesta en la semana-12 cuando se estratificó en RVPc, RVPp y R-Nulos (P=0.031 en ambos casos) (**Tabla 7**).

2. Al dividir a los no-RVS en pacientes recidivantes y NR obtuvimos una asociación estadísticamente significativa con la respuesta al tratamiento antiviral para los fenotipos (P=0.017) (**Tabla 8**) y haplotipos (P=0.014) (**Tabla 9**) del TGF- β que se muestran en sus correspondientes tablas.

IL-10

TABLA 7: Genotipos de la IL-10 asociados a la respuesta al tratamiento antiviral en la semana-12.

GENOTIPO IL-10	Todos (n=133)	RVPc (n= 100)	RVPp (n=14)	R-Nulos (n=19)	P
-819 n(%)					
TT	9 (7)	4 (4)	2 (14)	3 (16)	0.031
TC	60 (45)	48 (48)	2 (14)	10 (52)	
CC	64 (48)	48 (48)	10 (72)	6 (32)	
-592 n(%)					
AC	60 (45)	48 (48)	2 (14)	10 (53)	0.031
CC	64 (48)	48 (48)	10 (72)	6 (32)	
AA	9 (7)	4 (4)	2 (14)	3 (15)	

RVPc, respuesta virológica precoz completa; RVPp, respuesta virológica precoz parcial; R-Nulos, respondedores nulos; P, significación estadística; ns, no significativo; n, tamaño de muestra.

TGF- β **TABLA 8:** Fenotipos de TGF- β asociados a la respuesta al tratamiento antiviral en la semana-72.

FENOTIPO TGF- β	Todos (n=131)	RVS (n= 71)	Recidiva (n=28)	NR (n= 32)	P
Low, n(%)	8 (6)	2 (3)	5 (18)	1 (3)	
High, n(%)	99 (76)	55 (77)	16 (57)	28 (88)	0.017
Intermediate, n(%)	24 (18)	14 (20)	7 (25)	3 (9)	

RVS, respuesta virológica sostenida; NR: no respuesta; P, significación estadística; ns, no significativo; n, tamaño de muestra.

TABLA 9: Haplotipos de TGF- β asociados a la respuesta al tratamiento antiviral en la semana-72.

HAPLOTIPO TGF- β	Todos (n=131)	RVS (n= 71)	Recidiva (n=28)	NR (n=32)	P
T/T G/G	51 (39)	24 (34)	10 (36)	17 (57)	
T/C G/G	48 (37)	31 (42)	6 (21)	11 (34)	
T/C G/C	6 (5)	3 (5)	2 (7)	1 (3)	
C/C G/G	18 (14)	11 (16)	5 (18)	2 (6)	0.014
C/C G/C	6 (3)	1 (1)	5 (18)	0 (0)	
C/C C/C	2 (2)	1 (2)	0 (0)	1 (0)	

RVS, respuesta virológica sostenida; NR: no respuesta; P, significación estadística; ns, no significativo; n, tamaño de muestra.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En una minoría de los pacientes con infección por el VHC, la enfermedad se autolimita, sin embargo la mayoría de los sujetos desarrollan una infección crónica [143, 144]. Entre los factores que influyen en la respuesta al tratamiento antiviral, actualmente, se está dando mayor énfasis a los factores genéticos o inmunológicos, como los HLA o la IL-28B, que a los factores virales, y por este motivo nos ha parecido interesante estudiar la producción y el efecto de las citoquinas IL-10, IL-6, TNF- α , IFN- γ y TGF- β , que ya se habían relacionado en estudios previos con esta respuesta con resultados contradictorios. Hemos estudiado a pacientes con HCC genotipo 1 para minimizar las diferencias en los factores relacionados con el virus y para asegurar que los grupos fueran similares.

Características basales de los pacientes asociadas a RVS

El presente estudio mostró, mediante un modelo de regresión logística multivariante, que la edad ≤ 40 años, el genotipo CC de la IL-28B y los niveles basales bajos de GGT son factores independientes asociados con una RVS. En todos los grandes estudios prospectivos sobre la respuesta a la terapia con IFNpeg/RBV, al igual que en nuestros resultados, estos factores se han asociado de forma independiente con esta respuesta [145-147]. Hemos realizado dos modelos de regresión logística multivariante, uno para la IL-6 y otro para el TNF- α , ajustando, en ambos modelos, por el resto de factores predictivos de respuesta antiviral conocidos. Esto se ha hecho ya que de forma conjunta se solapaban sus efectos y se perdía la significación estadística, debido a que son dos citoquinas que están fuertemente correlacionadas, como hemos mostrado en nuestros resultados. En el análisis paralelo de ambas citoquinas ha quedado demostrado que, tanto la IL-6 como el TNF- α , son factores independientes de respuesta.

Con respecto a la IL-6, se ha encontrado una menor concentración basal en pacientes que posteriormente alcanzaron RVS. Estos resultados no han sido corroborados por otros artículos, porque o bien no han relacionado la concentración basal de IL-6 en suero con la respuesta al tratamiento antiviral [121], o bien solamente han estudiado sus polimorfismos [5, 115, 148]. Con respecto al TNF- α , se ha observado también una menor concentración basal en pacientes que posteriormente alcanzaron RVS. Tampoco hemos encontrado en la literatura resultados que así lo sugieran.

Estudio de las citoquinas durante el tratamiento

Hemos centrado nuestro estudio, en el efecto del tratamiento antiviral sobre la producción de IL-10, IL-6, TNF- α , IFN- γ y TGF- β , durante y después del mismo. Las diferencias en la expresión de citoquinas observada en el curso del tratamiento podría indicar una interacción entre la respuesta inmunitaria y la actividad viral.

Dentro de la **respuesta Th2**, hemos querido estudiar dos citoquinas, la **IL-10** y la **IL-6**, debido a su efecto antagonista, ya que la primera es antiinflamatoria y la segunda proinflamatoria.

A la **semana-12**, se observó en el total de pacientes un aumento estadísticamente significativo de la concentración de **IL-10** que podría ser debido a la actividad antiinflamatoria requerida en ese momento de la infección. Otros estudios han confirmado que los IFNs de tipo I pueden regular la expresión de la IL-10 y la inducción de su actividad antiinflamatoria [38, 149] pudiendo contribuir a los efectos beneficiosos de IFNpeg/RBV en la HCC. Con respecto a la **IL-6**, se apreció también, en el total de pacientes, una disminución de sus niveles séricos a la semana-12 de tratamiento. Esto es coherente con el aumento de la concentración

de IL-10, debido a que tienen actividades antagónicas o debido al efecto inmunosupresor generado por parte de la IL-10. Wan y cols. [80] observaron que la IL-6 era mayor, de forma transitoria, en los pacientes que alcanzaban RVS en la primera fase de tratamiento con IFN.

A la **semana-72**, la **IL-10** disminuyó por debajo de sus valores basales sólo en los pacientes con RVS, hecho que coincide con los datos obtenidos previamente por otros estudios [1, 99]. Esto se podría deber a que al existir una desaparición de la inflamación, condicionada por la buena respuesta al tratamiento antiviral, no sería necesario seguir generando efecto antiinflamatorio. Por el contrario, en los pacientes con no-RVS se mantienen los niveles elevados incluso cuando finaliza el seguimiento postratamiento pues al no existir respuesta se sigue produciendo IL-10 por los altos niveles virales. La IL-10 no sólo puede disminuir la síntesis y secreción de factores inflamatorios inducidos por antígenos del VHC, sino también evitar la multiplicación y diferenciación de las células inflamatorias como linfocitos Tc y células NK, dando lugar a la disminución del efecto inmunorreactivo y al fracaso del tratamiento antiviral. En 1996, Cacciaralli y cols. [101] observaron que los niveles de IL-10 disminuyen después de un tratamiento exitoso durante 6 meses, aunque sólo se utilizaron 11 pacientes tratados con IFN. Más tarde, Brooks y cols. [150] llevaron a cabo experimentos “*in vivo*” en ratones infectados y asociaron la disminución de la IL-10 con la eliminación del virus, sugiriendo que la neutralización inicial de la IL-10 podría ayudar a prevenir la infección persistente. Recientemente, Díaz-Valdés y cols. [151] han desarrollado inhibidores de péptidos de IL-10 (p9 y p13) “*in vitro*”, produciéndose eficientes respuestas inmunitarias antivirales, lo que sugiere que la IL-10 podría tener importantes aplicaciones en inmunoterapia. Por otro lado, con respecto a los niveles séricos de la **IL-6** a la semana-72, se observó una tendencia a adoptar nuevamente sus valores basales sin obtener resultados estadísticamente significativos. Hay estudios que afirman que los niveles de IL-6 reflejan disfunción

hepática mejor que los parámetros de inflamación del hígado y, en consecuencia, opinan que se podría utilizar su determinación sérica como marcador de progresión de la enfermedad hepática en pacientes infectados con el VHC en lugar de técnicas invasivas, y que también podría ser un interesante blanco molecular para la terapia antiviral [117].

Dentro de la **respuesta Th1**, hemos estudiado tres citoquinas, **TNF- α** , **IFN- γ** y **TGF- β** , con actividad principalmente proinflamatoria las dos primeras, y antiinflamatoria, la última.

A la **semana-12**, el **TNF- α** experimentó un aumento estadísticamente significativo en el total de pacientes que podría ser debido a la producción de TNF- α llevada a cabo por los macrófagos para destruir a los microorganismos desencadenantes de la infección, recordemos que el TNF- α es un mediador proapoptótico que forma parte del mecanismo de citotoxicidad indirecta que se desencadena para combatir una infección [79]. Se ha demostrado una síntesis mayor de TNF- α por células mononucleares de sangre periférica en la HCC [122], así como, un incremento de la expresión del receptor TNF-R1 que se une preferentemente a TNF soluble. Cuando estratificamos por respuesta (RVS vs no-RVS) se apreció que el incremento de TNF- α a la semana-12 fue mayor en pacientes con RVS que en pacientes con no-RVS. En concordancia con nuestros resultados, algunos estudios han descrito una elevación persistente de su concentración en personas con HCC que posteriormente lograron RVS [152] mientras que en los recidivantes el TNF- α disminuyó [123]. Por el contrario, otros estudios afirman que concentraciones bajas de TNF- α pueden ayudar a establecer una respuesta inmunitaria efectiva y el aclaramiento espontáneo del VHC [153]. Existe mucha controversia al respecto. En cuanto a la siguiente citoquina, el **IFN- γ** , observamos que experimentó una disminución estadísticamente significativa a la semana-12 en el total de pacientes. Esto está condicionado posiblemente por su

administración exógena por el tratamiento con IFNpeg/RBV que determina que endógenamente disminuya su producción. Por último, a la semana-12, el **TGF- β** mostró una disminución de su concentración estadísticamente significativa en el total de pacientes, sin embargo al estratificar por respuesta (RVS vs no RVS) en los dos grupos se observó un comportamiento similar por lo que pensamos que esta citoquina no está muy relacionada con la respuesta al tratamiento antiviral.

A la **semana-72**, el registro de **TNF- α** se redujo significativamente pero no regresó a sus valores basales. Cuando estratificamos por respuesta (RVS vs no-RVS), se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Así, se observó que la concentración de TNF- α basal era menor en pacientes que luego alcanzaron RVS con respecto a los que no lo hicieron, por lo que pensamos que podría tratarse de un factor predictivo de RVS, al igual que la IL-6. Por otro lado, su concentración fue mayor a la semana-72 en los pacientes con no-RVS respecto a los pacientes con RVS donde regresó a su valor basal. Esto podría deberse a que al responder al tratamiento antiviral ya no se necesitaría generar mecanismos de citotoxicidad, que serían necesarios aún si no hubiese habido respuesta. Un ensayo controlado con *etanercept* (anti-TNF- α) demostró que podría suponer una mejoría en la HCC al administrarlo por vía subcutánea durante 24 semanas [94, 154, 155]. En otro estudio, se comparó la administración de citoquinas antiinflamatorias, como IL-10, con la de fármacos anti-TNF para neutralizar la actividad proinflamatoria, sin buenos resultados para las primeras, debido a que abarcan funciones muy complejas “*in vivo*”, prefiriéndose la neutralización directa mediante fármacos anti-TNF [94]. En cuanto a la siguiente citoquina, a la semana-72, las concentraciones séricas de **IFN- γ** aumentaron, sin volver a los valores basales. Esto puede deberse a que al finalizar el tratamiento antiviral y no administrarse IFN de forma exógena, éste se comienza a producir de forma endógena nuevamente. Al estratificar por respuesta (RVS vs no-RVS) no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, por lo

que no parece influir en la respuesta al tratamiento antiviral. En algunos estudios, se ha observado un aumento considerable de la expresión de IFN- γ en células mononucleares de sangre periférica en los pacientes respondedores al tratamiento combinado [123, 152]. Para finalizar con las citoquinas Th1 a la semana-72, nos queda decir que la concentración de **TGF- β** sérica, sufrió un aumento estadísticamente significativo hasta prácticamente su valor basal. Cuando estratificamos por respuesta (RVS vs no-RVS), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, por lo que, al igual que el TGF- β no parece influir en la respuesta al tratamiento antiviral. Por el contrario, en algunos estudios, en pacientes con HCC con respuesta al tratamiento, se observó una disminución estadísticamente significativa de sus niveles en suero [77, 156]. En pacientes no respondedores las concentraciones no variaron de manera significativa [156].

En general, se acepta que la respuesta Th1 está vinculada con RVS, mientras que la Th2 se relaciona con evolución hacia la cronicidad de la infección por el VHC. Se supone que la respuesta inmunitaria en los pacientes antes del tratamiento es principalmente de tipo Th2 [152, 157, 158]. Por lo tanto, aquellos pacientes que consiguen neutralizar esta respuesta, serán los que respondan, probablemente, debido a los cambios en la respuesta inmunitaria hacia Th1. No está claro si este patrón de respuesta está relacionado con la estimulación directa por el propio virus o por otros mecanismos del sistema inmunitario. Este cambio en el tipo de respuesta inmunitaria puede estar influenciado en gran parte por la disminución de la IL-10 durante el tratamiento como ocurre en nuestro estudio. La IL-10 es un importante marcador del efecto del tratamiento antiviral, y su inhibición podría potencialmente aumentar la eficacia de las respuestas antivirales. Creemos que en pacientes con factores predictivos de respuesta adversa, como edad > de 40 años, genotipo no-CC IL28-B, GGT o CV altas, sería importante obtener

una disminución de los niveles séricos de IL-10 durante el tratamiento y quizá así lograr la RVS. Por lo tanto, las futuras estrategias terapéuticas que neutralizan la actividad de IL-10 podrían conseguir con éxito la respuesta al tratamiento en estos pacientes difíciles de tratar.

Citoquinas y su relación con la IL-28B

La IL-28B pertenece a la superfamilia de la IL-10. Presenta varias características comunes con los IFNs de tipo I, como las actividades antivirales, antiproliferativas y antitumorales [86, 139]. Es importante destacar la asociación del genotipo CC y la RVS al tratamiento antiviral [136, 137], motivo por el cual hemos querido estudiar los polimorfismos de IL-28B y así comparar las concentraciones en suero de IL-10 e IL-6, TNF- α , IFN- γ y TGF- β y la RVS.

A la **semana-72**, la **IL-10** sufrió una disminución significativa respecto a sus valores basales tanto en pacientes CC como en no-CC. Cuando se estratificó por respuesta (RVS *vs* no-RVS) se observó que esta disminución se debía al grupo de pacientes con RVS. Así, la disminución de la concentración de IL-10 parece depender sólo de la RVS y no del genotipo IL-28B. Por lo tanto, nuestros resultados confirman que los pacientes que experimentan una disminución de la IL-10 al finalizar el tratamiento son los que consiguen una RVS, independientemente del genotipo IL-28B. En cuanto a la concentración de **IL-6**, aumentó significativamente sólo en los pacientes con el genotipo CC, pero cuando se estratificó por la respuesta, no se observaron cambios significativos entre ninguno de ellos. La concentración en suero de **IFN- γ** sufrió una disminución a la semana-72, tanto en pacientes CC como no-CC, siendo estadísticamente significativa en ambos casos. Al estratificar según la respuesta (RVS *vs* no-RVS), tanto en pacientes CC como en no-CC, se apreció una disminución de la concentración de IFN- γ que fue estadísticamente significativa, siendo el comportamiento muy

parecido en todos los casos. Con el **TNF- α** y con el **TGF- β** no hemos obtenido resultados estadísticamente significativos.

No hemos encontrado artículos donde se realicen estudios similares al de este apartado que nos sirvan para comparar nuestros resultados.

Polimorfismos

En nuestro estudio los genotipos, fenotipos y haplotipos de las citoquinas estudiadas no se asociaron de forma estadísticamente significativa con la RVS. Los artículos revisados, que realizan estudios al respecto, obtienen resultados muy dispares entre sí, afirmando unos que encuentran asociación estadísticamente significativa entre un determinado polimorfismo y la RVS mientras que otros dicen lo contrario. Uno de los motivos que puede dar explicación a estas contradicciones sería las diferencias étnicas que existen entre las poblaciones de los diferentes estudios [114].

Al estratificar en RVPc, RVPp y NR dos polimorfismos génicos de IL-10 (-819 C/T, -592 C/A) se asociaron con la respuesta al tratamiento antiviral, y al dividir a la población de pacientes con no-RVS en recidivantes y NR obtuvimos una asociación estadísticamente significativa con la respuesta al tratamiento antiviral para los fenotipos y los haplotipos del TGF- β estudiados. Sin embargo, esta significación estadística no se traduce en una significación clínica, ya que a veces un mismo polimorfismo es el más frecuente entre los que responde y entre los que no.

No hemos encontrado artículos para comparar estos resultados ya que siempre se han intentado relacionar únicamente con RVS o con no-RVS.

En resumen, los resultados de nuestro trabajo son concordantes con la posibilidad de que los perfiles de algunas citoquinas podrían ofrecer a los médicos

otra herramienta para predecir el resultado del tratamiento de la infección por el VHC, así como también podrían ser futuras dianas terapéuticas para combatir la infección persistente que tan prevalente es en nuestro medio, siendo causa de morbilidad y mortalidad, suponiendo así un avance hacia la erradicación de la HCC.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

◆ La edad, la GGT, la IL-28B y la concentración de IL-6 y de TNF- α basal, son factores independientes de respuesta al tratamiento antiviral.

◆ Debido al efecto del tratamiento antiviral a la semana-12 se produce un aumento de la concentración de IL-10, una disminución de IL-6 mayor en los pacientes con no-RVS y un aumento de TNF- α mayor en los que alcanzan RVS.

◆ Debido al efecto del tratamiento antiviral a la semana-72 se produce un descenso en la concentración de IL-10 y de TNF- α en pacientes que alcanzan RVS.

◆ El descenso de la IL-10 a la semana-72 se asocia a RVS independientemente del polimorfismo CC de la IL-28B.

◆ Para el resto de estudios realizados no se han obtenido resultados estadísticamente o clínicamente significativos.

Por tanto, como conclusión final, destacar que la **IL-10**, la **IL-6** y el **TNF- α** se asocian a la respuesta virológica al tratamiento antiviral como consecuencia de una estimulación del sistema inmune lo que sugiere que, los perfiles de algunas citoquinas, podrían formar parte de las herramientas para predecir el resultado del tratamiento antiviral y podrían ser futuras dianas terapéuticas.

ABBREVIATURAS

ABREVIATURAS

A

ADN: ácido desoxirribonucleico

ALT: alanina aminotransferasa

ARN: ácido ribonucleico

AST: aspartato aminotransferasa

B

BOC: Boceprevir

C

C: cápside

CH: cirrosis hepática

CHC: carcinoma hepatocelular

CI: cardiopatía isquémica

CMIA: inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscentes

CPA: célula presentadora de antígenos

CV: carga viral

E

E1: glicoproteína de la envoltura del VHC

E2: glicoproteína de la envoltura del VHC

EIA: enzimoimmunoanálisis

eRVR: respuesta viral rápida extendida

EVRc: complete early virological response

EVRp: partial early virological response

G

GGT: *gamma glutamil transpeptidasa*

H

HA: *hepatitis aguda*

HCC: *hepatitis crónica C*

HLA: *human leukocyte antigen*

HPA: *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*

I

IC: *intervalo de confianza*

IFN: *interferón*

IFNpeg: *interferón pegilado*

IFNpeg- α : *interferón pegilado alfa*

IgG: *inmunoglobulina G*

IL: *interleuquina*

IRES: *sitio interno de entrada al ribosoma de la región 5' del VHC*

J

JAK1: *Janus Activated Kinase-1*

L

LiPA: *line probe assay*

LT: *linfotoxina*

M

MHC: *complejo mayor de histocompatibilidad*

Min: *minutos*

N

NK: *natural killers*

NR: *no respondedores*

NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b: *proteínas no estructurales del VHC*

NTR: *non translated regions*

Null-R: *null responders*

O

ORa: *Odds Ratio ajustada*

ORF: *open reading frame*

P

PCR: *reacción en cadena de la polimerasa*

PMN: *polimorfonucleares neutrófilos*

R

RBV: *ribavirina*

RE: *retículo endoplásmico*

RGT: *terapia guiada por la respuesta*

R-Nulos: *respondedores nulos*

RT-PCR: *reverse transcription polymerase chain reaction*

RVP: *respuesta virológica precoz*

RVPc: *respuesta virológica precoz completa*

RVPp: *respuesta virológica precoz parcial*

RVR: *respuesta virológica rápida*

RVS: *respuesta virológica sostenida*

S

Seg: segundos

SNP: single nucleotide polymorphism

T

Tc: células T citotóxicas

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

Th: células T colaboradoras

TNF- α : tumor necrosis factor alfa

TVR: Telaprevir

Tyk2: Tyrosine kinase-2

U

UI/mL: Unidades Internacionales/mililitro

UTR: untranslated regions

V

VHB: virus de la hepatitis B

VHC: virus de la hepatitis C

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Yoneda, S., et al., *Association of serum cytokine levels with treatment response to pegylated interferon and ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C patients*. J Infect Dis, 2011. 203(8): p. 1087-95.
2. Lauer, G.M. and B.D. Walker, *Hepatitis C virus infection*. N Engl J Med, 2001. 345(1): p. 41-52.
3. Gomez, E.V., et al., *Antioxidant and immunomodulatory effects of Viusid in patients with chronic hepatitis C*. World J Gastroenterol, 2010. 16(21): p. 2638-47.
4. Robertson, B., et al., *Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization*. International Committee on Virus Taxonomy. Arch Virol, 1998. 143(12): p. 2493-503.
5. Cussigh, A., et al., *Interleukin 6 promoter polymorphisms influence the outcome of chronic hepatitis C*. Immunogenetics, 2011. 63(1): p. 33-41.
6. Reed, K.E. and C.M. Rice, *Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties*. Curr Top Microbiol Immunol, 2000. 242: p. 55-84.
7. Shi, S.T. and M.M. Lai, *Hepatitis C viral RNA: challenges and promises*. Cell Mol Life Sci, 2001. 58(9): p. 1276-95.
8. Drazen, K.E., *Molecular biology of hepatitis C infection*. Liver Transpl, 2000. 6(4): p. 396-406.
9. Penin, F., et al., *Structural biology of hepatitis C virus*. Hepatology, 2004. 39(1): p. 5-19.
10. Zhang, L.Z., et al., *Interleukin-10 gene polymorphisms in association with susceptibility to chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis study*. Arch Virol, 2010. 155(11): p. 1839-42.
11. Asselah, T., et al., *Gene expression and hepatitis C virus infection*. Gut, 2009. 58(6): p. 846-58.

12. Ishida, C., et al., *Functional gene polymorphisms of interleukin-10 are associated with liver disease progression in Japanese patients with hepatitis C virus infection*. Intern Med, 2011. 50(7): p. 659-66.
13. Wasley, A. and M.J. Alter, *Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends*. Semin Liver Dis, 2000. 20(1): p. 1-16.
14. Bruguera, M. and X. Forns, *Hepatitis C in Spain*. Med Clin (Barc), 2006. 127(3): p. 113-7.
15. Terrault, N.A., *Sexual activity as a risk factor for hepatitis C*. Hepatology, 2002. 36(5 Suppl 1): p. S99-105.
16. *National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C: 2002--June 10-12, 2002*. Hepatology, 2002. 36(5 Suppl 1): p. S3-20.
17. Bartenschlager, R. and V. Lohmann, *Replication of hepatitis C virus*. J Gen Virol, 2000. 81(Pt 7): p. 1631-48.
18. Gelderblom, H.C., et al., *Monocyte-derived dendritic cells from chronic HCV patients are not infected but show an immature phenotype and aberrant cytokine profile*. Liver Int, 2007. 27(7): p. 944-53.
19. Cooper, S., et al., *Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus*. Immunity, 1999. 10(4): p. 439-49.
20. Rigopoulou, E.I., et al., *Blocking of interleukin-10 receptor--a novel approach to stimulate T-helper cell type 1 responses to hepatitis C virus*. Clin Immunol, 2005. 117(1): p. 57-64.
21. Gerlach, J.T., et al., *Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C*. Gastroenterology, 1999. 117(4): p. 933-41.
22. Lio, D., et al., *IL-10 and TNF-alpha polymorphisms and the recovery from HCV infection*. Hum Immunol, 2003. 64(7): p. 674-80.
23. Boyer, N. and P. Marcellin, *Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C*. J Hepatol, 2000. 32(1 Suppl): p. 98-112.

24. Afdhal, N.H., *The natural history of hepatitis C*. Semin Liver Dis, 2004. 24 Suppl 2: p. 3-8.
25. Thio, C.L., et al., *Screening for hepatitis C virus in human immunodeficiency virus-infected individuals*. J Clin Microbiol, 2000. 38(2): p. 575-7.
26. Sookoian, S. and G. Castano, *Evaluation of a third generation anti-HCV assay in predicting viremia in patients with positive HCV antibodies*. Ann Hepatol, 2002. 1(4): p. 179-82.
27. Zachary, P., et al., *Immunoblot in the serological diagnosis of hepatitis C virus infection*. Pathol Biol (Paris), 2004. 52(9): p. 517-21.
28. Fabrizi, F., F.F. Poordad, and P. Martin, *Hepatitis C infection and the patient with end-stage renal disease*. Hepatology, 2002. 36(1): p. 3-10.
29. Mulligan, E.K., et al., *Detection and quantification of hepatitis C virus (HCV) by MultiCode-RTx real-time PCR targeting the HCV 3' untranslated region*. J Clin Microbiol, 2009. 47(8): p. 2635-8.
30. Ozaras, R. and V. Tahan, *Acute hepatitis C: prevention and treatment*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2009. 7(3): p. 351-61.
31. Medhi, S., et al., *Diagnostic utility of hepatitis C virus core antigen in hemodialysis patients*. Clin Biochem, 2008. 41(7-8): p. 447-52.
32. Verbeeck, J., et al., *Evaluation of Versant hepatitis C virus genotype assay (LiPA) 2.0*. J Clin Microbiol, 2008. 46(6): p. 1901-6.
33. Schroter, M., et al., *Comparison of three HCV genotyping assays: a serological method as a reliable and inexpensive alternative to PCR based assays*. J Clin Virol, 2001. 23(1-2): p. 57-63.
34. Calabrese, L.H., N. Zein, and D. Vassilopoulos, *Safety of antitumour necrosis factor (anti-TNF) therapy in patients with chronic viral infections: hepatitis C, hepatitis B, and HIV infection*. Ann Rheum Dis, 2004. 63 Suppl 2: p. ii18-ii24.
35. McHutchison, J.G., et al., *Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection*. N Engl J Med, 2009. 361(6): p. 580-93.

36. Strader, D.B., et al., *Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C*. Hepatology, 2004. 39(4): p. 1147-71.
37. Jensen, D.M., *A new era of hepatitis C therapy begins*. N Engl J Med, 2011. 364(13): p. 1272-4.
38. Ziegler-Heitbrock, L., et al., *IFN-alpha induces the human IL-10 gene by recruiting both IFN regulatory factor 1 and Stat3*. J Immunol, 2003. 171(1): p. 285-90.
39. Gale, M., Jr., *Effector genes of interferon action against hepatitis C virus*. Hepatology, 2003. 37(5): p. 975-8.
40. Gao, B., F. Hong, and S. Radaeva, *Host factors and failure of interferon-alpha treatment in hepatitis C virus*. Hepatology, 2004. 39(4): p. 880-90.
41. Ascione, A., et al., *Peginterferon alfa-2a plus ribavirin is more effective than peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treating chronic hepatitis C virus infection*. Gastroenterology, 2010. 138(1): p. 116-22.
42. Feld, J.J. and J.H. Hoofnagle, *Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C*. Nature, 2005. 436(7053): p. 967-72.
43. Hoofnagle, J.H. and L.B. Seeff, *Peginterferon and ribavirin for chronic hepatitis C*. N Engl J Med, 2006. 355(23): p. 2444-51.
44. Herrmann, E., et al., *Effect of ribavirin on hepatitis C viral kinetics in patients treated with pegylated interferon*. Hepatology, 2003. 37(6): p. 1351-8.
45. Davis, G.L., et al., *Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C*. Hepatology, 2003. 38(3): p. 645-52.
46. Shiffman, M.L., et al., *Peginterferon alfa-2a and ribavirin in patients with chronic hepatitis C who have failed prior treatment*. Gastroenterology, 2004. 126(4): p. 1015-23; discussion 947.
47. Zeuzem, S., et al., *Telaprevir for retreatment of HCV infection*. N Engl J Med, 2011. 364(25): p. 2417-28.

48. Jacobson, I.M., et al., *Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection*. N Engl J Med, 2011. 364(25): p. 2405-16.
49. Sherman, K.E., et al., *Response-guided telaprevir combination treatment for hepatitis C virus infection*. N Engl J Med, 2011. 365(11): p. 1014-24.
50. Poordad, F., et al., *Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection*. N Engl J Med, 2011. 364(13): p. 1195-206.
51. Bacon, B.R., et al., *Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection*. N Engl J Med, 2011. 364(13): p. 1207-17.
52. Falletti, E., et al., *Genetic polymorphisms of interleukin-6 modulate fibrosis progression in mild chronic hepatitis C*. Hum Immunol, 2010. 71(10): p. 999-1004.
53. Farci, P. and R.H. Purcell, *Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies*. Semin Liver Dis, 2000. 20(1): p. 103-26.
54. Hadziyannis, S.J., et al., *Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose*. Ann Intern Med, 2004. 140(5): p. 346-55.
55. Le Guillou-Guillemette, H., et al., *Genetic diversity of the hepatitis C virus: impact and issues in the antiviral therapy*. World J Gastroenterol, 2007. 13(17): p. 2416-26.
56. Farci, P., et al., *The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies*. Science, 2000. 288(5464): p. 339-44.
57. Lau, J.Y., et al., *Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection*. Hepatology, 2002. 35(5): p. 1002-9.
58. Fay, F.F. and A.G. Schijman, *HCV. Laboratory diagnostic aspects*. Acta Gastroenterol Latinoam, 2005. 35 Suppl 1: p. S21-3.
59. Mangia, A., et al., *Peginterferon alfa-2b and ribavirin for 12 vs. 24 weeks in HCV genotype 2 or 3*. N Engl J Med, 2005. 352(25): p. 2609-17.

60. McHutchison, J.G., et al., *Adherence to combination therapy enhances sustained response in genotype-1-infected patients with chronic hepatitis C*. Gastroenterology, 2002. 123(4): p. 1061-9.
61. Tabone, S., *In our hands*. Tex Nurs, 2002. 76(5): p. 12-4.
62. Anand, B.S., et al., *Alcohol use and treatment of hepatitis C virus: results of a national multicenter study*. Gastroenterology, 2006. 130(6): p. 1607-16.
63. Myers, R.P., et al., *The rate of fibrosis progression is an independent predictor of the response to antiviral therapy in chronic hepatitis C*. J Viral Hepat, 2003. 10(1): p. 16-22.
64. Feld, J.J. and T.J. Liang, *Hepatitis C -- identifying patients with progressive liver injury*. Hepatology, 2006. 43(2 Suppl 1): p. S194-206.
65. Massard, J., et al., *Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C*. J Hepatol, 2006. 44(1 Suppl): p. S19-24.
66. Rodriguez-Torres, M., et al., *Peginterferon alfa-2a and ribavirin in Latino and non-Latino whites with hepatitis C*. N Engl J Med, 2009. 360(3): p. 257-67.
67. Howell, C.D., et al., *Peginterferon alfa-2a and ribavirin for chronic hepatitis C genotype 1 infections in black patients: safety, tolerability and impact on sustained virologic response*. J Viral Hepat, 2006. 13(6): p. 371-6.
68. Osna, N.A., *Hepatitis C virus and ethanol alter antigen presentation in liver cells*. World J Gastroenterol, 2009. 15(10): p. 1201-8.
69. Tarantino, G., et al., *Metabolic factors involved in the therapeutic response of patients with hepatitis C virus-related chronic hepatitis*. J Gastroenterol Hepatol, 2006. 21(8): p. 1266-8.
70. Palmer, C., et al., *The effect of obesity on intrahepatic cytokine and chemokine expression in chronic hepatitis C infection*. Gut, 2009. 59(3): p. 397-404.
71. Dai, C.Y., et al., *Rapid virological response in hepatitis C virus genotype 1 and early ribavirin exposure*. Hepatology, 2008. 48(2): p. 692-3; author reply 693-4.
72. Davis, A.M., et al., *Blockade of virus infection by human CD4+ T cells via a cytokine relay network*. J Immunol, 2008. 180(10): p. 6923-32.

73. Martin, M.P. and M. Carrington, *Immunogenetics of viral infections*. Curr Opin Immunol, 2005. 17(5): p. 510-6.
74. Amaraa, R., et al., *Production of interleukins 10 and 12 by activated peripheral blood monocytes/macrophages in patients suffering from chronic hepatitis C virus infection with respect to the response to interferon and ribavirin treatment*. Immunol Lett, 2002. 83(3): p. 209-14.
75. Kanto, T. and N. Hayashi, *Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity*. Intern Med, 2006. 45(4): p. 183-91.
76. Avramescu, C.S., et al., *Correlations among the serum levels of some interleukins and the histopathological aspects in chronic viral hepatitis C*. Rom J Morphol Embryol, 2008. 49(1): p. 57-62.
77. Gigi, E., et al., *Cytokine mRNA expression in hepatitis C virus infection: TH1 predominance in patients with chronic hepatitis C and TH1-TH2 cytokine profile in subjects with self-limited disease*. J Viral Hepat, 2008. 15(2): p. 145-54.
78. Chen, T.Y., et al., *Impact of serum levels and gene polymorphism of cytokines on chronic hepatitis C infection*. Transl Res, 2007. 150(2): p. 116-21.
79. Saito, K., et al., *Hepatitis C virus inhibits cell surface expression of HLA-DR, prevents dendritic cell maturation, and induces interleukin-10 production*. J Virol, 2008. 82(7): p. 3320-8.
80. Wan, L., et al., *Th1 and Th2 cytokines are elevated in HCV-infected SVR(-) patients treated with interferon-alpha*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. 379(4): p. 855-60.
81. Larrubia, J.R., et al., *Cytokines - their pathogenic and therapeutic role in chronic viral hepatitis*. Rev Esp Enferm Dig, 2009. 101(5): p. 343-51.
82. Tracey, K.J. and A. Cerami, *Tumor necrosis factor, other cytokines and disease*. Annu Rev Cell Biol, 1993. 9: p. 317-43.
83. Dinarello, C.A., *Biologic basis for interleukin-1 in disease*. Blood, 1996. 87(6): p. 2095-147.

84. Wong, H.L., et al., *Reproducibility and correlations of multiplex cytokine levels in asymptomatic persons*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008. 17(12): p. 3450-6.
85. Fausto, N., *Liver regeneration*. *J Hepatol*, 2000. 32(1 Suppl): p. 19-31.
86. Commins, S., J.W. Steinke, and L. Borish, *The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29*. *J Allergy Clin Immunol*, 2008. 121(5): p. 1108-11.
87. Orange, J.S., et al., *Mechanisms for virus-induced liver disease: tumor necrosis factor-mediated pathology independent of natural killer and T cells during murine cytomegalovirus infection*. *J Virol*, 1997. 71(12): p. 9248-58.
88. Trauner, M., P.J. Meier, and J.L. Boyer, *Molecular pathogenesis of cholestasis*. *N Engl J Med*, 1998. 339(17): p. 1217-27.
89. Friedman, S.L., *Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury*. *J Biol Chem*, 2000. 275(4): p. 2247-50.
90. Tilg, H. and A.M. Diehl, *Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis*. *N Engl J Med*, 2000. 343(20): p. 1467-76.
91. Akerman, P., et al., *Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy*. *Am J Physiol*, 1992. 263(4 Pt 1): p. G579-85.
92. Cressman, D.E., et al., *Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice*. *Science*, 1996. 274(5291): p. 1379-83.
93. Yamada, Y. and N. Fausto, *Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor*. *Am J Pathol*, 1998. 152(6): p. 1577-89.
94. Tilg, H., A. Kaser, and A.R. Moschen, *How to modulate inflammatory cytokines in liver diseases*. *Liver Int*, 2006. 26(9): p. 1029-39.
95. Mosmann, T.R., *Properties and functions of interleukin-10*. *Adv Immunol*, 1994. 56: p. 1-26.

96. Blackburn, S.D. and E.J. Wherry, *IL-10, T cell exhaustion and viral persistence*. Trends Microbiol, 2007. 15(4): p. 143-6.
97. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10*. Annu Rev Immunol, 1993. 11: p. 165-90.
98. Koziel, M.J., *Cellular immune responses against hepatitis C virus*. Clin Infect Dis, 2005. 41 Suppl 1: p. S25-31.
99. Torre, F., et al., *Kinetics of soluble tumour necrosis factor (TNF)-alpha receptors and cytokines in the early phase of treatment for chronic hepatitis C: comparison between interferon (IFN)-alpha alone, IFN-alpha plus amantadine or plus ribavirin*. Clin Exp Immunol, 2004. 136(3): p. 507-12.
100. Gramenzi, A., et al., *Cytokine profile of peripheral blood mononuclear cells from patients with different outcomes of hepatitis C virus infection*. J Viral Hepat, 2005. 12(5): p. 525-30.
101. Cacciarelli, T.V., et al., *Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: pre- and posttreatment with interferon alfa*. Hepatology, 1996. 24(1): p. 6-9.
102. Abayli, B., A. Canataroglu, and H. Akkiz, *Serum profile of T helper 1 and T helper 2 cytokines in patients with chronic hepatitis C virus infection*. Turk J Gastroenterol, 2003. 14(1): p. 7-11.
103. Westendorp, R.G., et al., *Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease*. Lancet, 1997. 349(9046): p. 170-3.
104. Reuss, E., et al., *Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors--a twin study*. Genes Immun, 2002. 3(7): p. 407-13.
105. Turner, D.M., et al., *An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter*. Eur J Immunogenet, 1997. 24(1): p. 1-8.
106. Vidigal, P.G., J.J. Germer, and N.N. Zein, *Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta1 genes in chronic hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin*. J Hepatol, 2002. 36(2): p. 271-7.

107. Abbas, O.M., et al., *Interleukin-10 promoter polymorphisms in hepatitis C patients with and without Schistosoma mansoni co-infection*. Liver Int, 2009. 29(9): p. 1422-30.
108. Bouzgarrou, N., et al., *Combined analysis of interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms and chronic hepatitis C severity*. Hum Immunol, 2009. 70(4): p. 230-6.
109. Chuang, J.Y., et al., *IL-10 promoter gene polymorphisms and sustained response to combination therapy in Taiwanese chronic hepatitis C patients*. Dig Liver Dis, 2009. 41(6): p. 424-30.
110. Paladino, N., et al., *Gender susceptibility to chronic hepatitis C virus infection associated with interleukin 10 promoter polymorphism*. J Virol, 2006. 80(18): p. 9144-50.
111. Persico, M., et al., *Interleukin-10 - 1082 GG polymorphism influences the occurrence and the clinical characteristics of hepatitis C virus infection*. J Hepatol, 2006. 45(6): p. 779-85.
112. Koss, K., et al., *Cytokine (TNF alpha, LT alpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies*. Genes Immun, 2000. 1(3): p. 185-90.
113. Knapp, S., et al., *Interleukin-10 promoter polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection*. Immunogenetics, 2003. 55(6): p. 362-9.
114. Zein, N.N., et al., *Ethnic differences in polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, and transforming growth factor-beta1 genes in patients with chronic hepatitis C virus infection*. Am J Trop Med Hyg, 2004. 70(4): p. 434-7.
115. Nattermann, J., et al., *Effect of the interleukin-6 C174G gene polymorphism on treatment of acute and chronic hepatitis C in human immunodeficiency virus coinfecting patients*. Hepatology, 2007. 46(4): p. 1016-25.
116. Lawson, A., *Hepatitis C virus-infected patients with a persistently normal alanine aminotransferase: do they exist and is this really a group with mild disease?* J Viral Hepat, 2010. 17(1): p. 51-8.
117. Zekri, A.R., et al., *Expression of pro- and anti-inflammatory cytokines in relation to apoptotic genes in Egyptian liver disease patients associated with HCV-genotype-4*. J Gastroenterol Hepatol, 2009. 24(3): p. 416-28.

118. Antonelli, A., et al., *Serum levels of proinflammatory cytokines interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor alpha in mixed cryoglobulinemia*. *Arthritis Rheum*, 2009. 60(12): p. 3841-7.
119. Barrett, S., et al., *Polymorphisms in tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma, and outcome of hepatitis C virus infection*. *J Med Virol*, 2003. 71(2): p. 212-8.
120. Yee, L.J., et al., *Interleukin-6 haplotypes and the response to therapy of chronic hepatitis C virus infection*. *Genes Immun*, 2009. 10(4): p. 365-72.
121. Streetz, K.L., et al., *Interleukin 6/gp130-dependent pathways are protective during chronic liver diseases*. *Hepatology*, 2003. 38(1): p. 218-29.
122. Spanakis, N.E., et al., *Cytokine serum levels in patients with chronic HCV infection*. *J Clin Lab Anal*, 2002. 16(1): p. 40-6.
123. Amaraa, R., et al., *Immunological predictors of different responses to combination therapy with interferon alpha and ribavirin in patients with chronic hepatitis C*. *J Gastroenterol*, 2003. 38(3): p. 254-9.
124. Mookerjee, R.P., et al., *Tumour necrosis factor alpha is an important mediator of portal and systemic haemodynamic derangements in alcoholic hepatitis*. *Gut*, 2003. 52(8): p. 1182-7.
125. Kimball, P., M. Baker, and R.A. Fisher, *Allograft TNFbeta and IL16 polymorphisms influence HCV recurrence and severity after liver transplantation*. *Liver Transpl*, 2006. 12(2): p. 247-52.
126. Antonelli, A., et al., *High interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha serum levels in hepatitis C infection associated or not with mixed cryoglobulinemia*. *Clin Rheumatol*, 2009. 28(10): p. 1179-85.
127. Dai, C.Y., et al., *Tumor necrosis factor- alpha promoter polymorphism at position -308 predicts response to combination therapy in hepatitis C virus infection*. *J Infect Dis*, 2006. 193(1): p. 98-101.
128. Yu, M.L., et al., *Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms at position -308 in Taiwanese chronic hepatitis C patients treated with interferon-alpha*. *Antiviral Res*, 2003. 59(1): p. 35-40.

129. Sarih, M., N. Bouchrit, and A. Benslimane, *Different cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from patients with persistent and self-limited hepatitis C virus infection*. Immunol Lett, 2000. 74(2): p. 117-20.
130. Dai, C.Y., et al., *Polymorphism of interferon-gamma gene at position +874 and clinical characteristics of chronic hepatitis C*. Transl Res, 2006. 148(3): p. 128-33.
131. Huang, Y., et al., *A functional SNP of interferon-gamma gene is important for interferon-alpha-induced and spontaneous recovery from hepatitis C virus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(3): p. 985-90.
132. Weng, H.L., et al., *The etiology of liver damage imparts cytokines transforming growth factor beta1 or interleukin-13 as driving forces in fibrogenesis*. Hepatology, 2009. 50(1): p. 230-43.
133. Couluarn, C., V.M. Factor, and S.S. Thorgeirsson, *Transforming growth factor-beta gene expression signature in mouse hepatocytes predicts clinical outcome in human cancer*. Hepatology, 2008. 47(6): p. 2059-67.
134. Pereira, F.A., et al., *Association of TGF-beta1 codon 25 (G915C) polymorphism with hepatitis C virus infection*. J Med Virol, 2008. 80(1): p. 58-64.
135. Clark, P.J., A.J. Thompson, and J.G. McHutchison, *IL28B genomic-based treatment paradigms for patients with chronic hepatitis C infection: the future of personalized HCV therapies*. Am J Gastroenterol, 2011. 106(1): p. 38-45.
136. Ge, D., et al., *Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance*. Nature, 2009. 461(7262): p. 399-401.
137. Thomas, D.L., et al., *Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus*. Nature, 2009. 461(7265): p. 798-801.
138. Sheppard, P., et al., *IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R*. Nat Immunol, 2003. 4(1): p. 63-8.
139. Uze, G. and D. Monneron, *IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family*. Biochimie, 2007. 89(6-7): p. 729-34.
140. Ank, N., et al., *An important role for type III interferon (IFN-lambda/IL-28) in TLR-induced antiviral activity*. J Immunol, 2008. 180(4): p. 2474-85.

141. de Rueda, P.M., 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): p. 1246-54.
142. Caballero, T., 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(5): p. 740-7.
143. Alter, M.J., et al., *The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team*. *N Engl J Med*, 1992. 327(27): p. 1899-905.
144. Seeff, L.B., *The natural history of chronic hepatitis C virus infection*. *Clin Liver Dis*, 1997. 1(3): p. 587-602.
145. Mauss, S., et al., *Estimating the likelihood of sustained virological response in chronic hepatitis C therapy*. *J Viral Hepat*, 2011. 18(4): p. e81-90.
146. Petta, S., et al., *Visceral adiposity index is associated with histological findings and high viral load in patients with chronic hepatitis C due to genotype 1*. *Hepatology*, 2010. 52(5): p. 1543-52.
147. Costa, J.M., et al., *HCV-GenoFibrotest: a combination of viral, liver and genomic (IL28b, ITPA, UGT1A1) biomarkers for predicting treatment response in patients with chronic hepatitis C*. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2011. 35(3): p. 204-13.
148. Colakogullari, M., et al., *The involvement of IL-10, IL-6, IFN-gamma, TNF-alpha and TGF-beta gene polymorphisms among Turkish lung cancer patients*. *Cell Biochem Funct*, 2008. 26(3): p. 283-90.
149. Aman, M.J., et al., *Interferon-alpha stimulates production of interleukin-10 in activated CD4+ T cells and monocytes*. *Blood*, 1996. 87(11): p. 4731-6.
150. Brooks, D.G., et al., *Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo*. *Nat Med*, 2006. 12(11): p. 1301-9.
151. Diaz-Valdes, N., et al., *Improved dendritic cell-based immunization against hepatitis C virus using peptide inhibitors of interleukin 10*. *Hepatology*, 2011. 53(1): p. 23-31.

152. Trapero-Marugan, M., et al., *Sustained virological response to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C genotype 1 patients is associated with a persistent Th1 immune response*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006. 24(1): p. 117-28.
153. Martin-Blondel, G., et al., *Low interleukin-10 production by monocytes of patients with a self-limiting hepatitis C virus infection*. *J Viral Hepat*, 2009. 16(7): p. 485-91.
154. Spahr, L., et al., *Combination of steroids with infliximab or placebo in severe alcoholic hepatitis: a randomized controlled pilot study*. *J Hepatol*, 2002. 37(4): p. 448-55.
155. Tilg, H., et al., *Anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis*. *J Hepatol*, 2003. 38(4): p. 419-25.
156. Marek, B., et al., *TGF-beta1 mRNA expression in liver biopsy specimens and TGF-beta1 serum levels in patients with chronic hepatitis C before and after antiviral therapy*. *J Clin Pharm Ther*, 2005. 30(3): p. 271-7.
157. Bertolotti, A., et al., *Different cytokine profiles of intraphepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections*. *Gastroenterology*, 1997. 112(1): p. 193-9.
158. Tsai, S.L., et al., *Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity*. *Hepatology*, 1997. 25(2): p. 449-58.