



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

**“ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VHC Y LA RESPUESTA INMUNE DEL  
HOSPEDADOR EN LOS PACIENTES TRATADOS CON INTERFERÓN PEGILADO Y  
RIBAVIRINA. BASES RACIONALES PARA LA OBTENCIÓN DE UNA VACUNA  
TERAPÉUTICA”**

**SERGIO MANUEL JIMÍNEZ RUIZ  
GRANADA 2018**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Sergio Manuel Jiménez Ruiz  
ISBN: 978-84-9163-794-3  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/49881>

A mis padres,

Gracias por ayudarme después de cada tropiezo









**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. Sergio Manuel Jiménez Ruiz sobre el tema “Estudio de la variabilidad genética del VHC y la respuesta inmune del hospedador en los pacientes tratados con Interferón Pegilado y Ribavirina. Bases racionales para la obtención de una vacuna terapéutica” 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 8 de enero de 2018

Fdo. Dr. Javier Salmerón Escobar



**Dra. PALOMA MUÑOZ DE RUEDA**, TÉCNICO SUPERIOR DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN DE LA UNIDAD DE GESTIÓN Y APOYO A LA INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO SAN CECILIO DE GRANADA

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal D. Sergio Manuel Jiménez Ruiz sobre el tema “Estudio de la variabilidad genética del VHC y la respuesta inmune del hospedador en los pacientes tratados con Interferón Pegilado y Ribavirina. Bases racionales para la obtención de una vacuna terapéutica” 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 8 de enero de 2018

Fdo. Dra. Paloma Muñoz de Rueda















## **AGRADECIMIENTOS**



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quería agradecerles a Javier y Paloma, mis directores, por su dedicación, porque sin ellos este proyecto no habría salido adelante. A Paloma, por la idea y puesta en marcha de este trabajo, por las horas dedicadas a mí, por su paciencia y por estar ahí siempre que la he necesitado. A Javier, por confiar en mí para formar parte de su equipo.

A toda la Unidad de Apoyo a la Investigación del Hospital Universitario San Cecilio, con los que he coincidido durante todos estos años, periodo en el que he realizado esta tesis doctoral, en especial al grupo de Investigación del Doctor Salmerón, a Rosa, que forma gran parte de este proyecto, a Ana nuestra técnico, a Ángel, con sus ideas, a Jorge siempre dispuesto a ayudar, a Pepi que me acogió y di los primeros pasos en el grupo con ella, a Esther, que ya no está en este grupo pero que me ayudó también en esta andadura, a José Antonio, del cual he aprendido citometría y microscopía y a Ángela, cuyo apoyo moral siempre dan fuerzas para seguir adelante en busca de nuestras metas.

Al Servicio de Digestivo del Hospital Clínico Universitario San Cecilio, en especial a Carmen, la jefa de enfermería por su siempre disposición cada vez que yo le solicitaba su ayuda, a la doctora Ana Gila, de la cual sin su ayuda no habría sido posible la recogida de las muestras y colaboración de nuestros pacientes.

A Marta Bes, por acogerme en su laboratorio en mi pequeña estancia y estar siempre dispuesta a ayudarme.

Y, gracias a todas aquellas personas que han contribuido a que esta tesis doctoral llegue a buen fin, en especial a mi familia, a mis padres que lo han dado y lo dan todo por mí, y a mis hermanas, esos cinco pilares tan importantes y a la vez tan distintas como lo son los cinco dedos de la mano. A

mis amigos, esa segunda familia, que aunque por las distancias no siempre puedo verlos a todos ni al mismo tiempo, siempre que puedo me escapo para tomar un café o echar unas risas con todos ellos. Gracias a todos.

## **ÍNDICE**

---



## Índice

1. INTRODUCCIÓN .....	3
1.1. Virus de la hepatitis C (VHC) .....	3
1.1.1. Epidemiología y vías de transmisión .....	3
1.1.2. Historia natural y manifestaciones clínicas .....	4
1.1.3. Organización genómica .....	6
1.1.4. Heterogeneidad genética: mutaciones y cuasiespecies .....	11
1.1.5. Dinámica de cuasiespecies .....	13
1.1.6. Genotipos virales .....	14
1.2. Inmunopatogénesis del VHC .....	16
1.3. Tratamiento de la Hepatitis Crónica C (HCC) .....	19
1.3.1. Candidatos al tratamiento .....	19
1.3.2. Historia del tratamiento del VHC .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.3.3. Nuevas estrategias terapéuticas .....	25
1.4. Factores predictivos de respuesta al tratamiento antiviral .....	30
1.4.1. Factores relacionados con el virus .....	30
1.4.1.1. Carga viral .....	30
1.4.1.2. Genotipo viral .....	32
1.4.1.3. Cinética de replicación viral .....	32
1.4.1.4. Importancia de las cuasiespecies y las mutaciones en la resistencia del VHC .....	33
1.4.2. Factores relacionados con el paciente .....	35
1.4.2.1. Edad, sexo, etnia .....	35
1.4.3. Otros factores .....	35
1.4.3.1. Factores genéticos del hospedador: relación entre HLA y VHC	36
2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS .....	45
2.1 Justificación .....	45
2.2. Hipótesis .....	47
3. Objetivos .....	49

4. Pacientes y metodología .....	53
4.1. Diseño .....	55
4.2. Pacientes .....	55
4.2.1. Sujetos del estudio.....	55
4.2.2. Tratamiento previo de los pacientes.....	55
4.2.3. Criterios de inclusión y exclusión .....	55
4.3. Variables de estudio .....	55
4.4. Estudio de pirosecuenciación .....	55
4.4. Estudio in vitro: cultivos celulares .....	60
5. Resultados.....	63
5.1. Objetivo 1: Estudio de pirosecuenciación .....	65
5.2. Objetivo 2: Respuesta proliferativa de células T a péptidos sintéticos NSE de VHC .....	72
6. Discusión.....	77
7. Conclusiones.....	83
8. Bibliografía.....	87
9. Anexos .....	99

## **GLOSARIO DE ABREVIATURAS**



## **GLOSARIO DE ABREVIATURAS**

**AADs:** Agentes Antivirales de Acción Directa

**ALT:** enzima alanina aminotransferasa

**ARF/F:** proteína del Virus de la Hepatitis C

**BOC:** Boceprevir

**CDC:** Centros para el control de la Prevención de Enfermedades

**Célula CD4\*:** células linfocitos T, también llamados linfocitos T helper o Th

**Célula CD8\*:** células linfocitos T, también llamadas células T citotóxicas ó células citotóxicas

**CHC:** Hepatocarcinoma

**CICr:** Aclaramiento de Creatinina

**Core:** proteína citosólica de la membrana del Virus de la Hepatitis C

**CV:** Carga Viral

**DM:** Diabetes Mellitus

**E1:** proteína de la envuelta viral del Virus de la Hepatitis C

**E2:** proteína de la envuelta viral del Virus de la Hepatitis C

**EI:** Epítipo Inmunodominante

**EPOC:** Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

**eRVR:** Respuesta Viroológica Rápida Extendida

**GMP:** Monofosfato de Guanosina

**GTP:** Guanosina Trifosfato

**Hb:** Hemoglobina

**HCC:** Hepatitis Crónica C

**HLA:** acrónimo inglés de Human leukocyte antigen, Antígeno Leucocitario Humano

**HTA:** Hipertensión Arterial

**HVR1:** Región Hipervariable del Virus de la Hepatitis C

**HVR2:** Región Hipervariable del Virus de la Hepatitis C

**IFN:** Interferón

**IFN-peg:** Inteferón pegilado

**IFN- $\alpha$ :** Interferón tipo  $\alpha$

**IFN- $\beta$ :** Interferón tipo I

**IFN- $\gamma$ :** Interferón tipo II

**IL-1:** Interleuquina 1

**IL-10:** interleuquina 10

**IL28B:** Interleuquina 28 B

**IL-4:** interleuquina 4

**IL-6:** Interleuquina 6

**IMC:** Índice de Masa Corporal

**IMPDH:** enzima encargada de la Inhibición de la actividad de la inosin-monofosfato deshidrogenasa

**IP:** Inhibidor de la Proteasa

**IPol:** Inhibidores de la polimerasa

**IRES:** acrónimo inglés de Internal Ribosome Entry Site, Sitio Interno de Entrada al Ribosoma

**ISGs:** del inglés Interferon-stimulated genes, genes activados por interferón

**Miravirsen:** Antagonistas del miR-122

**NK:** del inglés *Natural killer*, asesina natural, tipo de lintocito

**NS2:** proteína no estructural del Virus de la Hepatitis C

**NS3:** proteína no estructural del Virus de la Hepatitis C

**NS4A:** proteína no estructural 4A del Virus de la Hepatitis C

**NS4B:** proteína no estructural 4B del Virus de la Hepatitis C

**NS5A:** proteína no estructural 5A del Virus de la Hepatitis C

**NS5B:** proteína no estructural 5B del Virus de la Hepatitis C

**NTPasa:** enzima Nucleótido-trifosfatasa

**NTR:** acrónimo inglés de nontranslated Region, Región No Traducida de los Genes

**ORF:** acrónimo inglés de *Open Reading Frame*, Marco Abierto de Lectura

**P7:** proteína no estructural del Virus de la Hepatitis C

**Peg-IFN- $\alpha$ :** Interferón  $\alpha$  pegilado

**RBV:** Ribavirina

**RC:** Recidiva

**RDP:** Difosfato de Ribavirina

**RdPp:** RNA-polimerasa RNA dependiente

**RF:** del inglés recombinant forms, formas recombinantes

**RMP:** monofosfato de Ribavirina

**RNA:** Ácido Ribonucleico

**RNA-VHC:** Ácido ribonucleico del VHC

**RNA-VHC:** Ácido Ribonucleico del Virus de la Hepatitis C

**RTP:** Trifosfato de Ribavirina

**RVP:** Respuesta Viroológica Precoz

**RVR:** Respuesta Viroológica Rápida

**RVS:** Respuesta Viroológica Sostenida

**SOCS:** Supresores de la Señalización de las Citoquinas

**Tc:** células T citotóxicas, también llamadas células CD8<sup>+</sup>

**TCR:** receptor de linfocitos T

**Th:** células linfocitos T helper, también llamadas células CD4<sup>+</sup>

**Th<sub>1</sub>:** subtipo de células T helper que secreta citoquinas de tipo 1

**Th<sub>2</sub>:** subtipo de células T helper que secreta citoquinas de tipo 2

**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral

**UTR:** acrónimo inglés de Untranslated Region, Región No Traducida de los Genes

**VHB:** Virus de la Hepatitis B

**VHC:** Virus de la Hepatitis C

**VIH:** Virus de la Inmunodeficiencia Humana







## **INDICE DE FIGURAS Y TABLAS**



## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### FIGURAS

- **Figura 1.** Historia natural por la infección del virus de la hepatitis C (VHC)
- **Figura 2.** Organización del RNA genómico del VHC (superior) y procesamiento en poliproteínas (inferior). La región 5'UTR contiene cuatro dominios altamente estructurados y la región de la unión al ribosoma (IRES). La región 3'UTR contiene una región estable. La zona intermedia codifica la poliproteína. Las tijeras presentan el lugar de acción de las peptidasas y el punteado verde sobre E1 E2 indica la glucosilación de las proteínas de la envoltura.
- **Figura 3.** Cuasiespecies. El VHC muta dando lugar a distintas variantes mutantes en cada ciclo replicativo. Cada brazo representa dos variantes unidas por una mutación, y cada círculo un ciclo replicativo. El resultado es una población de secuencias mutantes rodeando a la secuencia mayoritaria. (Figura modificada de Lauin A y cols. PLoS Pathogens 2010).
- **Figura 4.** Distribución geográfica de los diferentes genotipos del VHC.
- **Figura 5.** Activación del sistema inmune tras una infección viral.
- **Figura 6.** Mecanismos de acción propuestos del INF alfa contra el VHC. (Imagen de Hoofnagle y cols., Hepatology 2002).
- **Figura 7.** Mecanismos de acción de la RBV frente al VHC
- **Figura 8.** Ciclo vital del VHC y dinas de los ADD. Adaptado de Manns MP y colaboradores. Nat Rev Drug Discov. 2007;6:991-1000
- **Figura 9.** Estructura de las moléculas HLA clase I y II (Hasan y cols., 2011).
- **Figura 10.** Haplotipos obtenidos por pirosecuenciación y número de muestras/haplotipos.
- **Figura 11.** Alineamiento de la secuencia consenso de la región NS3<sub>1253-1272</sub>, epítipo inmunodominante del alelo HLA DQB1\*030
- **Figura 12.** Alineamiento de la secuencia consenso de la región NS3<sub>1253-1272</sub>, epítipo inmunodominante del alelo HLA DQB1\*030 de pacientes no-RVS.

- **Figura 13.** El nivel de estimulación de CD4 + por péptidos sintéticos de tipo salvaje depende de la proliferación obtenida con el control positivo (PHA)
- **Figura 14.** Proliferación de células T CD4 + debido a la estimulación de péptidos en los pacientes del Grupo 1.
- **Figura 15.** Proliferación de células T CD4 + debido a la estimulación de péptidos en los pacientes del Grupo 2.

## TABLAS

- **Tabla 1.** Factores asociados a la progresión de la fibrosis hepática
- **Tabla 2.** Proteínas estructurales y no estructurales del VHC
- **Tabla 3.** Tipos de contraindicaciones
- **Tabla 4.** Agentes antivirales directos (AADs) frente al VHC
- **Tabla 5.** Tipos de respuesta virológica con el tratamiento IFN/RBV
- **TABLA 6.** Cebadores usados para la transcripción inversa y la amplificación de primera y segunda ronda para la región NS3<sub>1253-1272</sub>.
- **Tabla 7.** Variantes peptídicas de la síntesis de péptidos
- **Tabla 8.** Porcentaje de haplotipos mayoritarios y minoritarios para cada muestra (n = 37).
- **TABLA 9.** Resumen a nivel de la secuencia de aminoácidos para cada muestra basal.
- **TABLA 10.** Análisis estadístico por número de haplotipos, número de mutaciones / haplotipos y número de sitios polimórficos.







## **INTRODUCCIÓN**





## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Virus de la hepatitis C (VHC)**

#### **1.1.1. Epidemiología y vías de transmisión**

El virus de la hepatitis C (VHC) fue identificado y caracterizado en 1989 por Choo y colaboradores [1] después de múltiples investigaciones sobre la detección del genoma del virus de la conocida hasta entonces, hepatitis "no-A, no-B", siendo esta la causa más importante de hepatitis crónicas. Las primeras técnicas de detección de anticuerpos anti-VHC permitieron identificarlo como el principal agente causal de las hepatitis postransfusionales [2, 3].

En la actualidad, según la OMS, datos de julio de 2017, se calcula que en el mundo hay unos 130-150 millones de personas que padecen la infección crónica por el VHC y más de 500.000 enfermos mueren al año por afecciones hepáticas vinculadas al mismo [4], siendo el VHC la causa más frecuente de hepatitis crónica en los países desarrollados. La prevalencia de la infección por el VHC a nivel mundial es aproximadamente del 3 % con una gran variabilidad geográfica, siendo por países Egipto el que tiene mayor incidencia (>10 %). En nuestro país se estima que existen unas 800.000 personas infectadas (aproximadamente el 1,8 % de la población). A escala mundial, se pueden identificar tres patrones epidemiológicos diferentes: en países como Estados Unidos y Australia las infecciones son más frecuentes en personas entre 40-50 años, lo que indica que la infección ocurrió en el pasado, predominantemente entre adultos jóvenes infectados a través de la drogadicción intravenosa. Por otro lado, en países como Japón o el sur de Europa, la prevalencia de infección es mayor en personas de edad avanzada, lo que sugiere que el riesgo de infección era más elevado en un pasado lejano (hace más de 30 años), siendo para estas personas las principales causas de infección las inyecciones inseguras con reutilización de jeringas de vidrio contaminadas y prácticas médicas alternativas. En Egipto, en particular, existe un riesgo continuo de contraer la infección de la

enfermedad. En países como Italia la población refleja un efecto cohorte debido a una epidemiología de infección por el VHC después de la Segunda Guerra Mundial.

Según datos del Sistema de Vigilancia de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), la incidencia de la hepatitis C aguda ha disminuido desde finales de 1980. A partir de la identificación del virus, la infección se produce principalmente entre personas que consumen drogas mediante inyección intravenosa, siendo poco frecuente la exposición ocupacional a sangre, la actividad sexual de alto riesgo, tatuajes, perforaciones corporales y otras formas de penetración en la piel. Por último, la tasa global de transmisión de madre a hijo de infectados por el VHC en madres VIH-negativas se estima el en 5 % de los casos, sin embargo este valor incrementa manera importante en madres coinfectadas con VIH que asciende hasta el 19 %.

### **1.1.2. Historia natural y manifestaciones clínicas**

La historia natural de la infección por el VHC se caracteriza por una gran tendencia a la cronicidad, haciendo que esta enfermedad sea una causa significativa de morbilidad y mortalidad. Su gravedad varía ampliamente pudiendo oscilar desde una infección crónica asintomática hasta cirrosis y carcinoma hepatocelular [5]. La progresión a carcinoma hepatocelular en la infección por el VHC es un serio problema de salud.

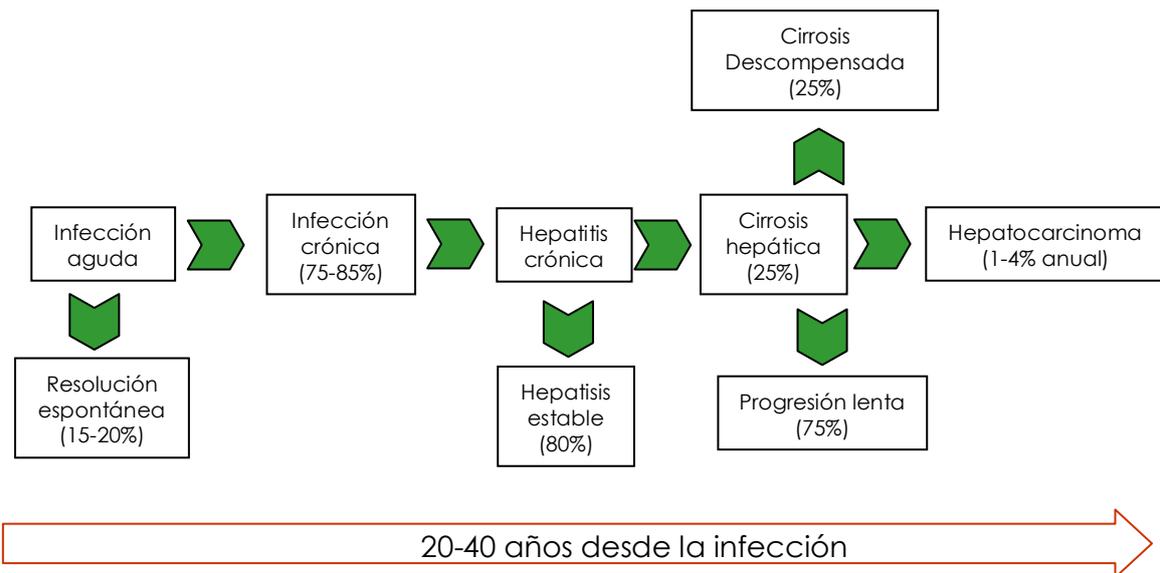
El periodo de incubación es por término medio de 8 semanas, pudiendo variar entre las 2 y las 28, aunque hay casos en los que la seroconversión puede documentarse a las 36 semanas

La evolución de la infección depende de la interacción de determinados factores, tanto virológicos como relativos al huésped. Los factores asociados con el aclaramiento espontáneo del virus incluyen sexo femenino, menor edad en el momento de la infección, raza caucásica,

presencia de síntomas o ictericia durante la infección aguda y el estado inmune [5].

El VHC se caracteriza por su capacidad para persistir aún en presencia de una buena respuesta inmune humoral y celular del huésped, debido tanto a la alta tasa de mutaciones (cuasiespecies) que facilita mecanismos de escape como a la elevada producción y aclaramiento de viriones que se producen a un ritmo de  $10^{12}$  viriones/día, con una vida media de cada virión de 2,7 horas [6].

Entre el 75-85% de los casos, la infección progresa a una forma crónica que se define por la persistencia durante más de 6 meses del ácido ribonucleico del VHC (RNA-VHC) en suero. En el grupo restante se produce un aclaramiento espontáneo del virus que determina la curación de la infección, definida por la ausencia de RNA-VHC en suero y la normalización sérica de los niveles de transaminasas. Un 20-30% de los pacientes desarrollan una cirrosis hepática en un tiempo medio desde el inicio de la infección de 20 años. La **Figura 1** resume la historia natural de la infección por el VHC, y la **Tabla 1** recoge los factores relacionados con una progresión acelerada de la fibrosis hepática [7].



**Figura 1.** Historia natural por la infección del virus de la hepatitis C (HCV)

**Tabla 1.** Factores asociados a la progresión de la fibrosis hepática

### Factores relacionados con el huésped

Edad > 40 años en el momento de la infección  
 Sexo masculino  
 Raza afroamericana (progresión lenta, peor respuesta al tratamiento)  
 Polimorfismos genéticos (HLA tipo I y tipo II, citoquinas profibróticas)  
 Factores metabólicos: EH, DM, obesidad  
 Nivel elevado de ALT  
 Coinfección VIH, VHB, esquistosomiasis  
 Coexistencia de hemocromatosis

### Factores medioambientales

Alcohol  
 Tabaco  
 Tratamiento

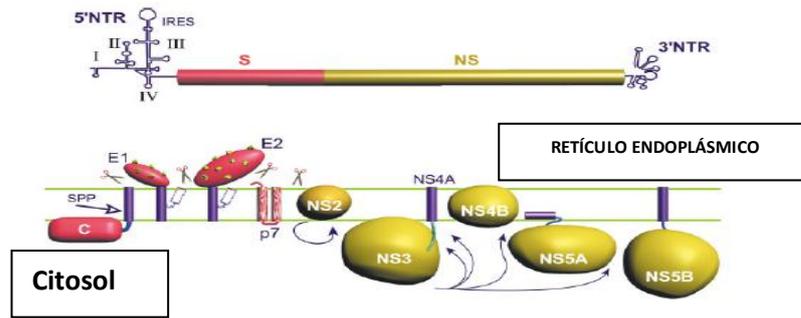
### Factores virológicos --- No evidencia definitiva

Genotipo  
 Carga viral

HLA, Complejo Mayor de Histocompatibilidad; EH, Enfermedad hepática; DM, Diabetes Mellitus; ALT, Alanina Aminotransferasa; VIH, Virus de la Inmunodeficiencia Humana; VHB, Virus de la Hepatitis B.

### 1.1.3. Organización genómica

El VHC pertenece a la familia de los Flaviviridae, siendo el único miembro del género *Hepacivirus*. Se trata de un pequeño virus envuelto de unos 40-60 nm de diámetro compuesto por una cadena simple de RNA de polaridad positiva de aproximadamente 9.600 nucleótidos con uno solo marco de lectura abierto (ORF del inglés "open reading frame"). El ORF se encuentra flanqueado por dos regiones no traducibles en sus extremos 5' y 3' terminales y codifica una larga poliproteína de unos 3.000 aminoácidos (**Figura 2**).



**Figura 2.** Organización del RNA genómico del VHC (superior) y procesamiento en poliproteínas (inferior). La región 5'UTR contiene cuatro dominios altamente estructurados y la región de unión al ribosoma (IRES). La región 3'UTR contiene una región estable. La zona intermedia codifica la poliproteína. 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 envuelta. (Martell y cols. 2001).

Por acción de diversas proteasas, tanto virales como del huésped, la poliproteína es procesada y posteriormente fragmentada dando lugar a tres proteínas virales estructurales (proteína Core, glicoproteínas de la envuelta E1 y E2), y a siete proteínas virales no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). Los genes estructurales están localizados en la zona próxima al extremo 5' del genoma, mientras que los genes no estructurales son adyacentes a 3'. La porción 5'-NTR (del inglés "nontranslated region") se inicia con una región de unos 340 nucleótidos que precede el codón de arranque de la poliproteína. Esta secuencia está muy bien conservada, con analogías superiores al 98 % entre todas las cepas hasta ahora secuenciadas, probablemente contiene importantes lugares para la traducción, replicación y ensamblaje del genoma. Su principal función es permitir la unión del ribosoma de la célula huésped al RNA vírico en la estructura conocida como IRES (del inglés "internal ribosome entry site"). La región codificada del VHC termina en un único codón final seguido por la región no codificadora 3'-NTR, de 230 nucleótidos, en la que se encuentran elementos esenciales para la transcripción y replicación virales [8].

A las distintas proteínas codificadas del VHC se les adjudican distintas funciones (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Proteínas estructurales y no estructurales del VHC

Proteína	Peso molecular (kDa)	Función
<b>Proteínas estructurales</b>		
Core	21	Proteína de la nucleocápside
E1	31-35 (21 sin N-glucosilación)	Proteína de la envoltura del virión
E2	68-72 (36 sin N-glucosilación)	Proteína de la envoltura del virión
P7	7	Viroporina (interviene en la maduración y liberación de la partícula vírica)
<b>Proteínas No Estructurales</b>		
NS2	23	Componente de la proteasa NS2-3
NS3	70	Componente de la proteasa NS2-3, serín-proteasa, NTPasa y helicasa
NS4A	8	Cofactor para la serin-proteasa NS3
NS4B	27	Desconocida
NS5A	58	Parece intervenir en la patogenia de la lesión hepática, de la esteatosis, del CHC y en la resistencia al IFN
NS5B	68	RNA-polimerasa RNA dependiente (RdRp)

NTPasa, enzima Nucleótido-trifosfatasa; CHC, Hepatocarcinoma; IFN, Interferón

La proteína Core es una proteína citosólica de membrana que constituye la nucleocápside viral. Se trata de una secuencia de unos 191 Aa altamente conservada. Además de encapsular el RNA viral, su extremo carboxiterminal está implicado en la señalización para el transporte de la proteína E1 dentro del retículo endoplasmático, e influye en la transcripción

celular, el metabolismo lipídico, la apoptosis celular y la respuesta inmune. También ha sido relacionada directa o indirectamente con el desarrollo de esteatohepatitis y HCC [9].

El complejo proteico de la envuelta está constituido por 2 proteínas transmembrana altamente glicosiladas, la E1 y la E2, que juegan un papel fundamental en la entrada a la célula huésped. Cada una de ellas presenta un determinado número de puntos de glicosilación que constituyen regiones muy estables del virus, y que varían en número según el genotipo viral. En el extremo aminoterminal de la glicoproteína E2 se localizan las regiones más variables de todo el genoma del VHC, las cuales se conocen como regiones hipervariables HVR1 y HVR2. La HVR1 es el principal determinante de la respuesta de anticuerpos neutralizantes. Numerosos estudios se han referido a la heterogenicidad genética de la región HVR1, que puede permitir que el VHC eluda al sistema inmune facilitando la infección crónica, así como influenciar los resultados del tratamiento antiviral [10]. La proteína ARF/F es una proteína de 160 aminoácidos que se codifica en una fase de lectura abierta alternativa de la región codificante del Core. Ha sido recientemente descrita, y su función no ha sido todavía descubierta, si bien se ha sugerido que no es esencial para el proceso de replicación viral. La proteína p7, de unos 63 aa, se localiza entre la región E2 y los genes NS2, formando hexámeros con actividad de canales de iones. Aunque no interviene directamente en la replicación del RNA-VHC, es esencial para la producción de las partículas virales, participando en la unión y liberación de los viriones infectados.

El grupo de las 7 proteínas NS son necesarias para completar el ciclo de replicación viral, aunque sus funciones aún no han sido completamente determinadas (**Tabla 2**).

La proteína NS2 parece que interacciona con otras proteínas, tanto estructurales como no estructurales, del VHC. Junto con la proteína NS3 compone la proteasa NS2-3, cuya función es el procesamiento proteolítico de la región no estructural, participando en el ensamblaje del virión; y se

asocia a las NS5A y NS5B formando parte del complejo de replicación. La proteína NS3 es una proteína de membrana multifuncional, con actividad nucleótido trifosfatasa (NTPasa) y helicasa, fundamental en la replicación del VHC, y presenta también actividad serín-proteasa. Recientes avances en el entendimiento de los mecanismos moleculares de esta enzima se refieren a su inhibición específica como una nueva estrategia antiviral, aunque los estudios con inhibidores de la helicasa están menos desarrollados que los de los inhibidores de la proteasa.

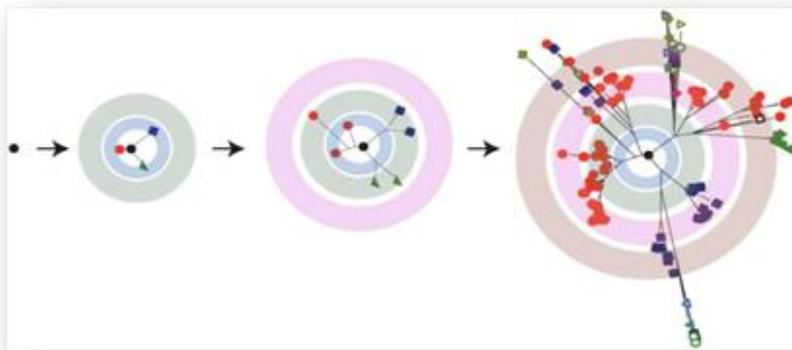
La proteína NS4A actúa como cofactor de la proteína serina NS3, participando en su orientación hacia la membrana del retículo endoplasmático y contribuyendo al ensamblamiento viral. La actividad proteasa NS3-NS4A es también una diana terapéutica atractiva de los nuevos fármacos inhibidores de la proteasa. En cuanto a la NS4B, aunque su función es más desconocida, se ha relacionado con la renovación de las membranas celulares del huésped, probablemente participando en la selección del lugar de unión de la replicasa viral.

Finalmente, la proteína NS5 contiene la actividad RNA polimerasa, y ha demostrado su papel en la replicación viral y modulación de las vías de señalización celular. La NS5A contiene un dominio I conservado, y un dominio II y III más variables entre genotipos. Participa en la modulación de la respuesta antiviral del huésped mediada por el INF, ya que contiene la llamada región determinante de la sensibilidad al INF (del inglés *IFN sensitivity-determining region*, ISDR) y la PKRbd (del inglés *RNA-activated protein kinase binding domain*, dominio de unión a la proteína kinasa dependiente de RNA (PKR)), cuya heterogenicidad genética ha demostrado un papel fundamental en la predicción de la respuesta al tratamiento con IFN [11, 12]. Asimismo, la variabilidad genética del dominio V3 de la región NS5A también parece relacionarse con la respuesta al tratamiento antiviral. La NS5A se considera determinante en la unión con la proteína Core, y así en el ensamblaje del virus, y se ha propuesto que también actúa como cofactor de la NS5B, que codifica la RdRp viral, enzima de la replicación del VHC.

#### 1.1.4. Heterogeneidad genética: mutaciones y cuasiespecies

Una de las características más importantes de la infección por el VHC es la gran variabilidad genética, es decir, el alto grado de heterogeneidad en las secuencias genómicas, y por tanto, de las proteínas codificadas. Esta característica tiene implicaciones en la patogenia y persistencia del virus, diseño de vacunas, selección de mutantes resistentes durante el tratamiento, y diseño e interpretación de los métodos diagnósticos.

La rapidez de la replicación viral y la incapacidad de la RNA polimerasa viral para corregir errores introducidos en el genoma del VHC favorecen la aparición frecuente de mutaciones genómicas. Esta variabilidad es la causante de que el VHC circule en la sangre como una población de variantes genómicas que difieren de la secuencia original de nucleótidos entre un 1 % y un 5 %, denominadas "cuasiespecies", es decir, una secuencia mayoritaria rodeada de secuencias mutantes que difieren entre sí en uno o más nucleótidos (Figura 3). La cuasiespecie predominante sería aquella que contará con una mayor capacidad replicativa en el huésped. Durante la infección, el número y la composición de mutantes en la población viral cambian constantemente en relación con los cambios de su entorno, lo que constituye una gran ventaja adaptativa para el virus [13].



**Figura 3. Cuasiespecies.** El VHC muta dando lugar a distintas variantes mutantes en cada ciclo replicativo. Cada brazo representa dos variantes unidas por una mutación, y cada círculo un ciclo replicativo. El resultado es una población de secuencias mutantes rodeando a la secuencia mayoritaria. (Figura modificada de Lauin A y cols. PLoS Pathogens 2010 [14].

Sin embargo, la variabilidad genética no parece ser igual en todas las áreas del genoma, hay una parte del genoma que está bien conservada, mientras que otras partes muestran distintos grados de variabilidad. La aparición de estas mutaciones en el genoma viral surge como consecuencia de varios procesos mutagénicos:

- **Factores virológicos:** el RNA pequeño y compacto del VHC, junto con la alta tasa de replicación viral y la incapacidad de la RdRp de corregir errores, favorecen la aparición de mutantes genómicas cuya frecuencia varía de  $1,4 \times 10^3$  a  $1,9 \times 10^3$  sustituciones por nucleótidos y por año. La mayoría de las mutaciones son deletéreas. Las subpoblaciones mejor adaptadas serán seleccionadas transmitiendo la nueva información genética a su prole.
- **Factores del huésped:** En los virus RNA, las regiones que varían con mayor frecuencia son aquellas expuestas a la acción del sistema inmune, de tal manera que se ha propuesto que la variación antigénica puede ser también debida, entre otras causas a la selección de variantes como respuesta a la inmunidad humoral y celular. Las mutaciones se producen como un mecanismo de escape a la presión ejercida por el sistema inmune contribuyendo así a la cronificación de la infección impidiendo el control terapéutico. Este proceso suele darse con mayor frecuencia en los primeros estadios de la infección.
- **Factores externos:** La presión del tratamiento antiviral induce la aparición de mutaciones que pueden determinar la aparición de nuevas cepas virales resistentes al tratamiento, o bien interferir en la replicación viral favoreciendo la eliminación del virus.

Estas variantes genómicas en el VHC se manifiestan de la siguiente forma:

En el caso de los genes de la envoltura E1 y E2, sobre todo en la secuencia de este último, conocida como región HVR-1, se produce la mayor

variación genética de todo el virus, siendo por ello utilizada para identificar las distintas cuasiespecies que posee un individuo infectado por VHC, a la vez que el gen de la proteína core es el más altamente conservado. Por el contrario, las regiones 5'-NTR y porciones de 3'-NTR son regiones conservadas [15].

La región HVR-1 es, probablemente, el mayor epítipo de neutralización del VHC por lo que las mutaciones que se acumulan en ésta región permiten al virus evitar la neutralización permitiendo de esta forma que la infección sea persistente.

Por tanto, la diversidad de las cuasiespecies del VHC contribuye al desarrollo de la cronicidad durante la infección debido a los rápidos y continuos cambios que se producen en las proteínas de la envoltura viral actuando de este modo como escape de la presión inmune ejercida por el huésped aunque este no sea el único mecanismo de escape.

#### **1.1.5. Dinámica de cuasiespecies**

La dinámica de las cuasiespecies confiere a los virus RNA una gran adaptabilidad. Las variantes mejor adaptadas se seleccionan y transmiten la nueva información genética a su progenie. Sin embargo, uno de los fundamentos de la teoría de las cuasiespecies, es que la selección de una determinada variante genómica no depende exclusivamente de su adaptabilidad individual, sino también de su relación con las demás mutantes, en lo que se conoce como acoplamiento mutacional. Así, una mutante poco adaptada puede mantenerse con una frecuencia mayor a la esperada por su mayor proximidad genómica con sus variantes vecinas (acoplamiento) seleccionadas positivamente. Por lo que cada variante contribuye a la adaptabilidad del conjunto de la población, y la selección actúa sobre poblaciones más que individualmente [16].

Durante la infección, el número y la composición de mutantes en la población viral cambian constantemente en relación con las modificaciones

del entorno. Cuando las secuencias genómicas presentes en ese momento son las mejor adaptadas existe una baja tasa de mutaciones, y éstas tienden a ser deletéreas y a disminuir la capacidad general de replicación de los genomas que lo portan, sugiriendo una selección negativa que elimina las nuevas variantes manteniendo las establecidas. Este tipo de selección es muy importante para aquellas regiones del genoma viral que contienen motivos genéticos que han de ser preservados. Por el contrario, cuando el conjunto replicativo no está bien adaptado al medio, una tasa de mutaciones elevada se relaciona con la presión selectiva positiva que tiende a seleccionar a las nuevas mutaciones que comporten una ventaja adaptativa al nuevo entorno, de manera que especies minoritarias pueden ser seleccionadas y convertirse en la variante mayoritaria en el nuevo medio.

#### 1.1.6. Genotipos virales

Basándose en la secuencia de nucleótidos y en el análisis filogenético, se han definido seis grupos mayores del VHC, llamados genotipos, designándose estos por números (genotipos 1 al 6) aunque recientemente se ha identificado un 7º genotipo en pacientes de África central. Estos genotipos, se han subdividido en subgenotipos (o subtipos) y se designan con letras minúsculas [17]. Los genotipos tienen aproximadamente un 65 % de homología entre sí, mientras que los subtipos muestran un 77-79 % [18], habiéndose descrito al menos 90 subtipos distintos [19]. Es interesante señalar el descubrimiento de formas recombinantes (RF, del inglés *recombinant forms*) denominados intragenotipos y los intersubtipos, con una baja prevalencia, y cuya relevancia biológica aún está por determinar, ya que existe la posibilidad de que sean infecciones mixtas más que nuevas formas virales.

Aunque los diferentes genotipos se pueden encontrar repartidos por todo el mundo, hay claras diferencias en cuanto a su distribución geográfica, incluso entre los diferentes grupos de población de una misma área geográfica (Figura 4). El genotipo *1a* es el más frecuente en Estados Unidos y el Norte de Europa. El genotipo *1b* tiene una distribución mundial y es

generalmente el más común. Los genotipos 2a y 2b también tienen una distribución mundial, representando un 10-30 % de los genotipos, y son particularmente frecuentes en Japón y el Norte de Italia [5]. El genotipo 3 es el más frecuente en la India y el genotipo 4 en África, con presencia de alta prevalencia en Egipto. Los genotipos 5 y 6 son raros y predominan en Suráfrica y el Sudeste Asiático respectivamente. En algunos pacientes se pueden presentar una mezcla de genotipos, siendo lo más común la coexistencia de los genotipos 1a y 1b. En raras ocasiones no es posible definir el genotipo, bien porque se trata de un nuevo genotipo aún no clasificado o bien porque los niveles de RNA son demasiado bajos para poder ser caracterizados.



**Figura 4.** Distribución geográfica de los diferentes genotipos del VHC.

No se han encontrado diferencias entre la patobiología del VHC en cada uno de sus genotipos, cursando clínicamente de forma similar y sin claras diferencias en el pronóstico de la enfermedad hepática (Chayama, K. and C.N. Hayes, Hepatitis C virus: How genetic variability affects pathobiology of disease. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26 Suppl 1: p. 83-95). La principal propiedad clínica determinada por el genotipo es la diferencia entre la susceptibilidad al tratamiento antiviral basado en IFN. En numerosos estudios de distintas áreas geográficas se ha demostrado que el genotipo 1b es el más resistente al IFN, así como al tratamiento combinado con Ribavirina (RBV) [20]. Así pues, los pacientes infectados con virus del genotipo 1, en particular el subtipo 1b, responden peor al tratamiento que los infectados con

genotipos 2 ó 3. En nuestro entorno, el 80-90 % de las infecciones están producidas por el genotipo 1b. También las personas infectadas con virus de los genotipos 4 y 5 tienen un bajo índice de respuesta. Por el contrario, las mejores respuestas se producen en los infectados por los genotipos 2 y 3 que se han distribuido con mayor frecuencia en el subgrupo de pacientes con antecedentes de adicción a drogas por vía endovenosa [21].

## 1.2. Inmunopatogénesis del VHC

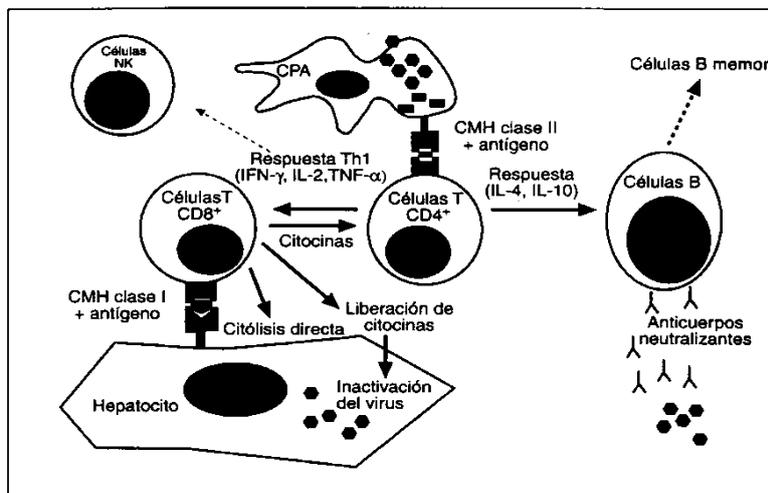
El complejo principal de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex, MHC*), es una familia de genes ubicados en el brazo corto del cromosoma 6 cuyos productos están implicados en la presentación de antígenos a los linfocitos T. En humanos, los genes MHC conforman el denominado sistema HLA (del inglés "*human leukocyte antigen*"), genes cuyas proteínas se descubrieron como antígenos en los leucocitos, las cuales podían detectarse con anticuerpos. Existen tres grandes grupos de moléculas HLA: clase I, II, III. Las moléculas de clase I y II intervienen en el reconocimiento inmunológico. A su vez las de clase I se han dividido de forma tradicional en tres subgrupos: HLA-A, HLA-B, HLA-C y los de clase II en otros tres, HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR. Las moléculas de clase III están formadas por proteínas del complemento: factor B, C2 y C4 y el citocromo P-450 y la 21-hidroxilasa.

El MHC es poligénico y los genes que lo constituyen son codominantes y polimórficos, es decir, cada locus concreto del complejo MHC posee multitud de variantes alélicas dentro de las poblaciones naturales de cada especie. Se han descrito más de mil alelos para HLA de clase I y más de 500 para el de clase II. El polimorfismo de las moléculas HLA es el resultado de un largo proceso evolutivo ejercido por la presión de distintos agentes infecciosos que han contribuido a la creación de nuevos alelos.

La mayoría de las células infectadas por virus presentan péptidos antigénicos en su superficie asociadas a HLA, que son reconocidos por las células T citotóxicas (Tc) mediante su receptor TCR. De esta manera se ha demostrado que las células Tc reconocen un haplotipo HLA determinado y

son incapaces de lisar células con un haplotipo diferente aunque sean infectadas por el mismo virus.

La respuesta inmune a cualquier infección viral está producida por una respuesta inespecífica a cargo de las células natural killer (NK), neutrófilos y macrófagos que se activan, y proporcionan el tiempo suficiente a las células presentadoras de antígeno para procesar las proteínas virales y presentarlas a las células B, linfocitos T helper (Th) ó CD4<sup>+</sup> y células Tc ó CD8<sup>+</sup> (Figura 5). Los linfocitos B producen anticuerpos que pueden aclarar el virus de la circulación y proteger al huésped de una eventual reinfección. Mediante receptores específicos situados sobre la superficie de los linfocitos T, las células Th reconocen péptidos virales que derivan de la fagocitosis y proteólisis y que son presentados a través de moléculas del HLA de tipo II. Tras la activación de receptores específicos de los linfocitos T, las células Th activan la diferenciación e inducción de células B y estimulan a los linfocitos Tc específicos contra el virus.



**Figura 5.** Activación del sistema inmune tras una infección viral.

Se distinguen dos tipos principales de células cooperadoras: Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub>. Tras el contacto con el antígeno mediante las células presentadoras de antígeno, los linfocitos CD4<sup>+</sup> Th<sub>1</sub> secretan citoquinas de tipo 1 como el factor de necrosis tumoral (TNF)-α, mientras que los linfocitos CD4<sup>+</sup> Th<sub>2</sub> secretan citoquinas de tipo 2 como IL-4 e IL-10. Una respuesta dominada por citoquinas de tipo Th<sub>1</sub> favorece la inmunidad dirigida por células T CD8<sup>+</sup> y NK,

mientras que una respuesta CD4+ dominada por citocinas Th<sub>2</sub> inhibe la respuesta Th<sub>1</sub> y favorece la producción de anticuerpos por los linfocitos B [22]. El tipo de citocinas secretadas por estas células T CD4+ específicas desempeñan un papel relevante en la evolución de la infección aguda [23-25]. Así, una respuesta CD4+ caracterizada por la secreción de citocinas de Th<sub>1</sub> se asocia con infección aguda autolimitada, mientras que la secreción de tipo Th<sub>2</sub> se asocia con el curso a la cronicidad. La expresión elevada de citocinas Th<sub>1</sub> en el hígado también podría relacionarse con el daño tisular [22].

Mediante HLA de tipo I, los linfocitos citotóxicos CD8+ reconocen los péptidos virales que han sido procesados y sintetizados por las células infectadas, y la lisis de las células infectadas por el virus por citotoxicidad directa, induciendo la formación de poros en la membrana de las células diana mediante la secreción de perforinas y serinproteasas en los gránulos, o de forma indirecta, liberando mediadores proapoptóticos como el Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

El VHC puede desarrollar una infección crónica a pesar de una respuesta inmune humoral y celular contra las proteínas virales. El virus puede escapar a la respuesta humoral si la cinética de infección y replicación viral no permite que los anticuerpos específicos frente al VHC producidos tras la infección primaria lo neutralicen por completo. Aunque los anticuerpos específicos frente al VHC pueden interferir en la entrada viral hacia las células del huésped y opsonizar el virus para su eliminación por los macrófagos, no son capaces de eliminar la infección de las células ya infectadas. Además, como se puede recordar, el VHC posee una alta tasa de mutación, especialmente en la región hipervariable que codifica las proteínas de la envoltura que podrían ser reconocidas por los anticuerpos neutralizantes (anticuerpos que podrían unirse y eliminar al virus) [26, 27]. Varios estudios han demostrado que la respuesta inmune humoral puede seleccionar variantes del VHC con cambios en su secuencia genómica que le permitan escapar del reconocimiento por los anticuerpos [21]. Sin embargo algunos estudios han sugerido la posibilidad de que el VHC cause infección persistente en

ausencia de mutaciones de la región hipervariable [28, 29]. De este modo, la progresión hacia la cronicidad en la infección por el VHC es muy probablemente un proceso multifactorial que depende de distintos aspectos de la interacción virus-huésped.

La respuesta inmune durante la fase aguda de la infección de los linfocitos Th y Tc difiere entre pacientes que se recuperan de la infección y aquellos que desarrollan una infección crónica [30]. La respuesta celular contra el VHC podría verse interrumpida por distintos mecanismos. En primer lugar, el VHC induce una débil respuesta en pacientes que desarrollan una infección crónica. En la sangre de pacientes con Hepatitis Crónica C (HCC), la cantidad de precursores de células Tc que son específicos para péptidos virales es bastante inferior a la que existe para los virus de la influenza o el citomegalovirus. Las razones que explican esta relativa debilidad de la respuesta inmune son por el momento desconocidas. De hecho, una inmunosupresión o una intolerancia hacia las proteínas virales no son las causas que explican la persistencia de la infección, ya que la mayoría de los pacientes crónicamente infectados activan respuestas inmunes normales contra otros agentes virales [31]. Paradójicamente, una respuesta inmune ineficaz para aclarar la infección viral puede ser más dañina para el hígado, causando inflamación crónica y, tras varios años, fibrosis hepática y cirrosis.

### **1.3. Tratamiento de la Hepatitis Crónica C (HCC)**

#### **1.3.1. Candidatos al tratamiento**

La decisión de tratar a un paciente con HCC se basa en varios factores, incluyendo la historia natural de la enfermedad, el estadio de fibrosis y la eficacia y los factores adversos relacionados con el tratamiento. La terapia generalmente se considera apropiada en pacientes [32] :

- Edad 18 años o más.
- RNA-VHC detectable en suero.
- Biopsia hepática con hepatitis crónica y fibrosis significativa.

- Enfermedad hepática compensada: bilirrubina total suero <1.5 gr/dl, INR <1.5, albúmina >3.4 g/dl, plaquetas >75.000 células/mm<sup>3</sup>, y sin encefalopatía ni ascitis.
- Índices hematológicos y bioquímicos aceptables: hemoglobina >13 g/dl (hombres) y >12 g/dl (mujeres), neutrófilos >1.500 células/mm<sup>3</sup>, creatinina <1.5 mg/dl.
- Aceptan el tratamiento y se ajustan a los requisitos.
- No tienen contraindicaciones para el tratamiento.

Factores adicionales tales como el consumo de alcohol o de drogas, la enfermedad renal crónica o el trasplante hepático previo, se deben tener en cuenta a la hora de decidir si se inicia la terapia antiviral.

En general el 72-98% de los casos de hepatitis aguda C sintomáticos se curan, y, puesto que estos pacientes pueden aclarar el virus espontáneamente en las primeras 12 semanas, sólo se recomienda tratamiento ante la persistencia de la infección tras este tiempo. En los casos asintomáticos está indicado el inicio del tratamiento precozmente, dado que la probabilidad de eliminar el virus es escasa. Por el contrario serán excluidos de tratamiento aquellos pacientes que puedan tener algún tipo de contraindicación (Tabla 3) [33].

**Tabla 3:** Tipos de contraindicaciones

Contraindicaciones absolutas	Contraindicaciones relativas
Cirrosis descompensada	Trasplante de órganos sólidos (salvo hepático)
Trastorno psiquiátrico no controlado	Hemoglobinopatía
Hipertiroidismo no tratado	Anemia (Hb < 10 g/dl)
Comorbilidad severa no controlada (EPOC, HTA severa, fallo cardíaco, coronariopatía, DM mal controlada)	Neutrófilos <750/mm <sup>3</sup>
Embarazo o incapacidad para cumplir tratamiento anticonceptivo	Plaquetas < 40000/mm <sup>3</sup>
Menores de 3 años	Enfermedad cerebro-vascular
Hipersensibilidad fármacos antivirales	Insuficiencia renal avanzada (ClCr <50 ml/min)

*IFN, Interferón; RBV, Ribavirina; HTA, hipertensión arterial; DM, diabetes mellitus; EPOC, enfermedad pulmonar obstructiva crónica; Hb, hemoglobina; ClCr, aclaramiento de creatinina.*

### 1.3.2. Historia del tratamiento del VHC

Hasta agosto de 2014, en España, los tratamientos aprobados para tratar la HCC era el IFN-peg más RBV para los genotipos del 1 al 6 y tripleterapia (IFN-peg, RBV y un inhibidor de la proteasa del VHC antiviral de acción directa de primera generación (boceprevir o telaprevir) solo para el genotipo 1 del VHC. La triple terapia supuso un punto de inflexión muy importante en el tratamiento de la HCC, con un incremento considerable de la efectividad de la terapia que permitió la curación de un mayor número de pacientes que con biterapia.

A partir de esa fecha, para el genotipo 1 y 4 se aprobó la opción de triple terapia con simeprevir, IFN-peg y RBV.

Con estos nuevos tratamientos se pretende cambiar el paradigma de la hepatitis C con dos objetivos fundamentales: ofrecer tasas de curación muy elevadas a los pacientes infectados por cualquiera de los genotipos virales y superar las limitaciones de los regímenes terapéuticos que han existido hasta el momento, como son la eliminación del interferón inyectable debido a la prolongada duración del tratamiento, incomodidad del mismo y los efectos adversos que presenta además de las pautas en la toma de los tratamientos.

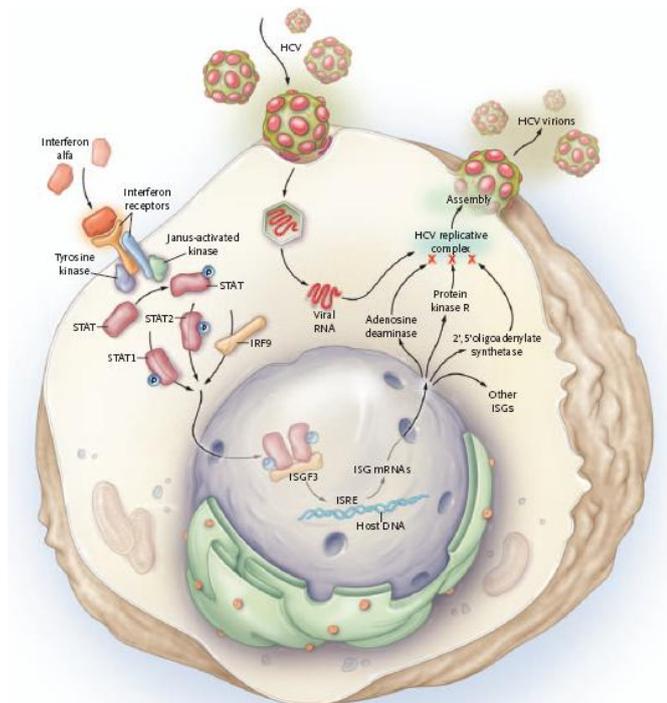
#### - **Interferón pegilado (IFN-peg)**

Desde el primer estudio piloto, realizado por Hoofnagle y cols. en 1986 [34], numerosos ensayos clínicos demostraron la eficacia del IFN en la HCC.

El peg-IFN-a tiene un efecto inmunomodulador, ya que estimula la inmunidad innata (células *Natural Killer*, NK) y adquirida (células T CD4+ CD8+) frente al VHC.

Los IFNs son proteínas o glicoproteínas que producen distintos tipos celulares como respuesta a estímulos diversos entre los que destacan las acciones víricas. Se distinguen tres clases de IFNs según sus características estructurales y biológicas: el IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  (IFN tipo I) e IFN- $\gamma$  (IFN tipo II). En la práctica clínica usamos el IFN- $\alpha$ .

El IFN- $\alpha$  es un polipéptido no glicosilado producido por monocitos, leucocitos y linfocitos B como respuesta a infecciones víricas. Se une de forma covalente con la molécula de polietilenglicol formando el IFN- $\alpha$  pegilado (peg-IFN- $\alpha$ ), de esta manera se reduce la velocidad de absorción subcutánea, el aclaramiento renal y la degradación del IFN, consiguiendo aumentar la concentración en plasma y su vida media, además de disminuir la inmunogenicidad de la proteína [35]. Por otro lado el IFN- $\alpha$  tiene una potente actividad antiviral directa (Figura 6), ya que se une a receptores de superficie celular activando la cascada de respuestas que culmina con la expresión de múltiples genes denominados ISGs (*interferón-stimulated genes*), algunos de los cuales bloquean la síntesis de proteínas virales, inhibiendo la replicación viral.



**Figura 6.** Mecanismos de acción propuestos del IFN alfa contra el VHC. (Imagen de Hoofnagle y cols., *Hepatology* 2002).

Un avance importante en el tratamiento de la hepatitis C fue el desarrollo de un INF de acción prolongada, el INF-Peg que tenía la ventaja de administrarse una vez a la semana. Está producido por la unión covalente de polietilenglicol a la molécula de INF, lo cual reduce su velocidad de absorción tras su administración subcutánea, reduce el aclaramiento renal y celular, y disminuye la inmunogenicidad de la proteína[36].

También se ha sugerido que el IFN- $\alpha$  tiene un papel en la prevención del CHC, en relación con su efecto anti-proliferativo, anti-angiogénico y/o anti-tumoral, sobre todo en los pacientes no cirróticos que consiguen una Respuesta Viroológica Sostenida (RVS). Sin embargo, su utilidad como tratamiento de mantenimiento para la prevención de la progresión de la fibrosis y del CHC en pacientes que no responden al tratamiento es más controvertida, aunque existen trabajos recientes que apoyan el tratamiento de mantenimiento con IFN en pacientes con alto grado de fibrosis o CH, y en la prevención de la recidiva del CHC postransplante.

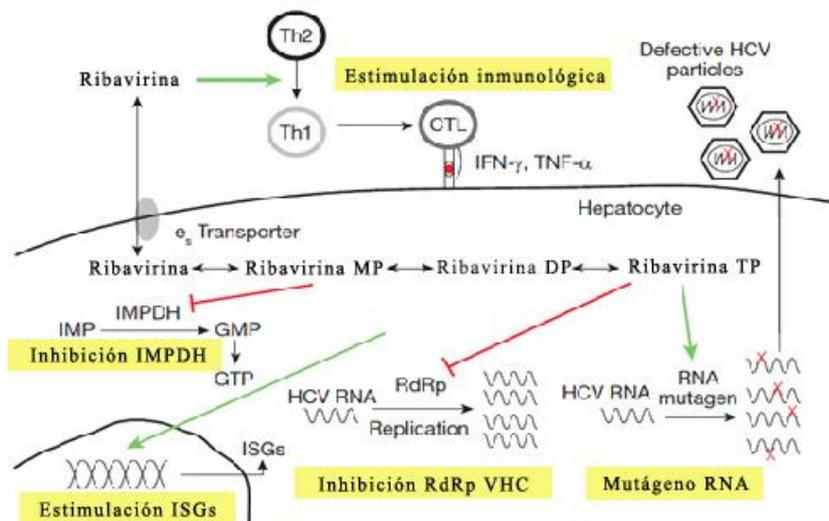
#### - **Ribavirina (1- $\beta$ -D-Ribofuranosil-1,2,4-Triazol-3-Carboxamida)**

La RBV es un nucleósido sintético de la purina cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición de la actividad de la inosin-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), enzima encargada de la síntesis de nucleótidos. Entre los otros mecanismos de actuación se encuentra la unión a receptores Th1 y Th2 de los linfocitos, por lo que inhibe posteriormente la enzima RNA polimerasa.

En un principio se pensó que la RBV tenía un efecto "cosmético", disminuyendo solo las transaminasas. En 1995 se publicó un estudio aleatorizado en 58 pacientes con HCC, comparando la RBV a una dosis de 1200 mg/día durante 48 semanas con placebo. La reducción de ALT fue del 54% en el grupo de RBV, mientras que en los controles era del 5%. En cambio, no modificaba la carga viral del VHC ni durante el tratamiento ni después del mismo [37]. Esto significa que la RBV no tiene un efecto antiviral propio frente al VHC y no es eficaz en monoterapia. Sin embargo, cuando se asocia al IFN-

a mejora claramente la tasa de RVS frente cualquiera de ellos en monoterapia, mediado principalmente por la disminución de las tasas de recaídas [38, 39]. Se podría pensar que la RBV es un adyuvante del IFN, ya que aparentemente no disminuye la CV, presentando un efecto sinérgico, cooperando y potenciando al IFN; sin embargo, el mecanismo por el cual se produce este beneficio aún no se conoce completamente, y son varias las formas de acción propuestas (Figura 6) [40, 41]:

- Potenciación de la inmunidad celular del huésped frente a las infecciones víricas.
- Efecto antiproliferativo de la RBV sobre los linfocitos debido a la inhibición de IMPDH del huésped que limita la síntesis de guanosina trifosfato (GTP), disminuyendo así los ácidos nucleicos.
- Inhibición directa de la replicación del VHC debido a que produce una síntesis anormal del extremo 5' del RNA alterando la transcripción viral y suprime la actividad de la polimerasa antiviral
- Acción mutagénica para el RNA-VHC que empuja al VHC a la "catástrofe de error", por lo que esta alta tasa de mutación reduce su infectividad.



**Figura 7: Mecanismos de acción de la RBV frente al VHC.** GMP, monofosfato de guanosina; GTP, guanosina trifosfato; IMPDH, inosina monofosfato deshidrogenasa; RDP, difosfato de RBV; RdPp, RNA-polimerasa RNA dependiente; RMP, monofosfato de RBV; RTP, trifosfato de RBV; Th1, T helper 1 y Th2, T helper 2.

### 1.3.3. Nuevas estrategias terapéuticas

En la actualidad en España son varios los fármacos que están aprobados, de esta forma los hepatólogos tienen disponibles diferentes opciones de tratamiento para todos los genotipos de la Hepatitis C y para todas las situaciones clínicas de los diferentes pacientes.

Debido al avance en el conocimiento del ciclo vital del VHC y de las características estructurales de las proteínas del VHC, han estimulado y facilitado el desarrollo de los nuevos agentes antivirales de acción directa (AADs). Estos fármacos actúan de forma específica sobre una o varias partes del ciclo de vida del VHC rompiendo así la cadena de reproducción.

El VHC se replica a una velocidad muy elevada en el citoplasma de los hepatocitos. Durante su ciclo viral el VHC pasa por varias etapas como la unión a la membrana plasmática del hepatocito y su endocitosis a través de ésta, pasando por la pérdida de la envoltura y la generación de la red membranosa, la traducción y la replicación, el ensamblaje viral, y finalmente el transporte y la liberación del nuevo virus en el espacio extracelular.

La progresiva comprensión de estos mecanismos ha permitido la identificación de dianas potenciales en puntos concretos del ciclo vital. Se pueden prever e inhibir una serie de posibles objetivos o dianas terapéuticas a nivel de la entrada viral, de la replicación viral y de la formación de partículas infecciosas, actuando sobre las cuales se interrumpe directamente la reproducción del VHC. Los objetivos más obvios son la proteasa NS3/4A y la polimerasa NS5B del VHC. Por eso la primera generación de AADs fueron los inhibidores de la proteasa y los inhibidores de la polimerasa análogos de nucleósidos o no nucleósidos. También muy importante ha sido el descubrimiento de los inhibidores del complejo de replicación NS5A.

Según la fase del ciclo vital sobre la que actúan impidiendo la replicación del VHC reciben diferentes nombres agrupándolos por clases o familias de fármacos.

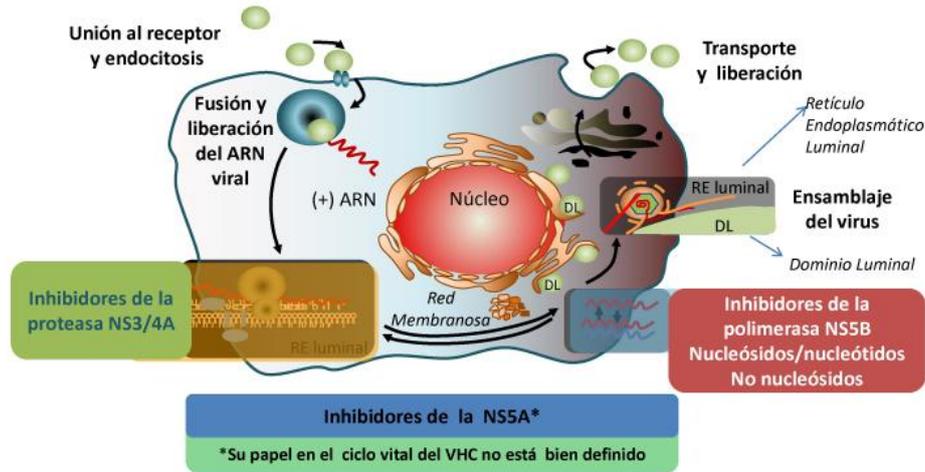
Identificamos tres familias disponibles. Los nombres genéricos de los fármacos nos dan una pista, si nos fijamos en su terminación:

1. Inhibidores de la proteasa: terminación en “previr”: simeprevir, paritaprevir.
2. Inhibidores de la polimerasa: terminación en “buvir”: sofosbuvir, dasabuvir.
3. Inhibidores de la proteína NS5A: terminación en “asvir”: daclatasvir, ombitasvir, velpatasvir.

Con estos fármacos se puede incidir en tres fases del proceso replicativo del VHC: inhibiendo la proteasa viral, inhibiendo la polimerasa, e inhibiendo la proteína NS5A.

Un único AAD no puede evitar por sí solo la reproducción del VHC porque éste realiza cada día millones de copias de sí mismo y fruto de esa reproducción incontrolada algunas de esas copias podrían presentar ciertas mutaciones en su estructura genética que podrían causar que el VHC se volviera resistente a los fármacos antivirales, es por este motivo que como mínimo un tratamiento debe constar de dos medicamentos de diferente familia de inhibidores.

La segunda y tercera generación de nuevos inhibidores tienen propiedades muy favorables como son la cobertura de diferentes genotipos del VHC, menor duración de los tratamientos, mejores perfiles de seguridad e interacciones fármaco-fármaco menos pronunciadas.



**Figura 8:** Ciclo vital del VHC y dianas de los ADD.

Adaptado de Manns MP y colaboradores. Nat Rev Drug Discov. 2007;6:991-1000

El principal inconveniente de los IP de primera generación (Boceprevir y Telaprevir) es su baja barrera genética (número de mutaciones de aminoácidos que precisa el virus para hacerse resistente al fármaco), y el hecho de que su efectividad es limitada a pacientes infectados por el genotipo 1. En la actualidad, los nuevos estudios se han dirigido al desarrollo de los AADs con una mayor potencia antiviral y más alta barrera genética, eficaces frente a múltiples genotipos, y que permitan regímenes de tratamiento más cortos y mejor tolerados [43]. En la actualidad, como tratamiento frente a la HCC se están administrando los nuevos IP de 2ª generación, inhibidores de la polimerasa (IPol), (análogos nucleós(t)idos y no análogos), e inhibidores de la NS5A (Tabla 4).

**Tabla 4.** Agentes antivirales directos (AADs) frente al VHC

Diana	Fármacos	Cobertura genotípica	Potencia	Barrera genética
<b>NS3/ proteasa</b>	<b>1ª Generación</b> Boceprevir, Telaprevir	1	Alta	Baja-intermedia
	<b>2ª Generación</b> Simeprevir, Asunaprevir, Faldaprevir, Danoprevir, ABT-450/r, MK-5172	Pangenotípica	Intermedia-alta	Alta
<b>IPol</b>	<b>Análogos nucleós(t)idos</b> Sofosbuvir, Mericitabina	Pangenotípica	Intermedia-alta	Alta
	<b>No análogos nucleós(t)idos</b> Deleobuvir, ABT-333, BMS-791325, VX-222	Pangenotípica	Intermedia-alta	Baja
<b>NS5A</b>	<b>Inhibidores NS5A</b> Daclatasvir, Ledipasvir, ABT-267, MK-8742	1	Alta	Baja-intermedia
IPol, Inhibidores de la polimerasa				

■ Los **IP de 1ª generación**, Boceprevir y Telaprevir son inhibidores de Proteasas (IP) NS3/4, aprobados en 2011 en Europa y en EEUU, y que en la actualidad combinados con IFN-peg y RBV constituyen la triple terapia en pacientes con HCC por VHC genotipo 1 [42].

Tanto Boceprevir como Telaprevir se combinan junto con el IFN-peg (peg-IFN- $\alpha$ -2a 180  $\mu$ g/semana o peg-IFN- $\alpha$ -2a 1.5  $\mu$ g/kg/semana y la RBV (1000-1200 mg/día según peso en el caso del peg-IFN- $\alpha$ -2a, o 800-1400 mg/día en el caso del peg-IFN- $\alpha$ -2b). El Boceprevir se administra en dosis de 800 mg/7-9 horas, y Telaprevir a dosis de 750 mg tres veces al día vía oral (o 1125 mg/12 horas).

■ Los **IP de 2ª generación** presentan por lo general menores efectos secundarios e interacciones, y han demostrado su eficacia frente al genotipo 1 del VHC (VHC-1), incluso en cepas virales aisladas que desarrollaron resistencias frente a los IP de 1ª generación [44, 45]. Sin embargo, su efecto en genotipos diferentes al 1 es más limitado. En combinación con peg-IFN y RBV consiguen mayores tasas de RVS que la triple terapia con BOC o TVR, con pautas de más fácil administración y posiblemente mejor seguridad.

■ Existen dos clases de **IPol, los análogos de los nucleós(t)idos y los inhibidores no nucleós(t)idos**. Los primeros constituyen los AADs de mayor barrera genética, puesto que imitan el sustrato natural de la polimerasa (una región muy conservada del genoma del virus), y han demostrado ser eficaces frente a los 6 genotipos. El **sofosbuvir** (GS-7977) fue aprobado al final del 2013 por la FDA (*Food and Drug Administration*) en pacientes con VHC-1, 2 o 3; mientras, los estudios en fase II con **mericitabine** asociado a IFN-peg y RBV 24 semanas ha demostrado mejores tasas de RVS en genotipos 1 y 4 que la biterapia estándar durante 48 semanas.

Los inhibidores no análogos de los nucleós(t)idos en monoterapia tienen una potencia y barrera genética más baja, ya que se unen a la RdRp en un lugar distante del centro enzimático. Por este motivo, combinados con IFN-peg y RBV en triple terapia parecen ser menos eficaces frente al VHC-1 que la triple terapia con IP o inhibidores de la NS5A, y tampoco han demostrado utilidad en el resto de genotipos. Su uso se plantea en diferentes combinaciones con otros AADs.

■ Los principales **inhibidores de la NS5A** (daclatasvir, ledipasvir, ABT-267 y BMS-824393) son fármacos bien tolerados y muy eficaces contra todos los genotipos, sin embargo, su perfil de toxicidad es variable y su barrera genética baja, por lo que deben ser combinados con otros AADs para evitar la aparición de mutantes resistentes.

A parte de los AADs existen otras potenciales dianas terapéuticas que afectan a los factores del huésped necesarios para completar la replicación,

y al que pertenecen los **inhibidores de la ciclofilina** (Alisporivir) y los **antagonistas del miR-122** (Miravirsén), que están siendo ensayados en regímenes sin IFN y pautas más cortas de tratamiento, dada su alta barrera genética, la ausencia de resistencias cruzadas con AADs y su actividad pangénica. Alisporivir ha demostrado su eficacia combinado también con IFN-peg y RBV. Existen otras moléculas con capacidad de inhibir el ciclo del VHC en fase clínica o preclínica como la silibilina, inhibidores NS4B, pero habrá aún que esperar a conocer los resultados y su papel en futuras terapias frente al VHC.

#### **1.4. Factores predictivos de respuesta al tratamiento antiviral**

Las causas de resistencia al tratamiento con IFN son multifactoriales. La mayor parte de las veces son combinadas en un mismo paciente y debidas al régimen de tratamiento, factores del huésped, forma de presentación o severidad de la infección por el VHC, o factores virales [46].

##### **1.4.1. Factores relacionados con el virus**

###### **1.4.1.1. Carga viral**

Aunque la cuantificación del RNA viral no ha demostrado ser un factor predictivo para el desarrollo de lesión hepática asociada al VHC o de progresión de la enfermedad, la evolución de la carga viral antes, durante y tras el tratamiento es una importante herramienta para predecir los resultados del tratamiento. Una baja CV basal (<600.000-800.000 UI/ml) ha demostrado ser un factor predictivo de RVS independientemente del genotipo viral. El efecto de la CV es un factor predictivo pero no lineal. Para concentraciones de hasta aproximadamente 400.000 UI/ml se demostró una correlación lineal con la RVS; para niveles mayores, se apreciaron tasas de RVS relativamente estables [47].

Numerosos trabajos han comprobado el papel de la cinética viral en la predicción de la respuesta al tratamiento [48]. En la tabla 5 se realiza una clasificación de los tipos de respuesta virológica basados en la cinética viral.

**Tabla 5.** Tipos de respuesta virológica con el tratamiento IFN/RBV

Tipo de respuesta	Definición
Respuesta virológica sostenida (RVS)	RNA-VHC indetectable 24 semanas tras el final del tratamiento
Respuesta virológica rápida (RVR)	RNA-VHC indetectable desde la semana 4 de tratamiento
Respuesta virológica precoz (RVP)	Descenso del RNA-VHC $\geq 2 \log_{10}$ en la semana 12 de tratamiento (RVP parcial) o RNA-VHC negativo en la semana 12 (RVP completa)
Respuesta virológica al final del tratamiento	RNA-VHC negativo al final de las 24 o 48 semanas de tratamiento
Breakthrough	Reaparición del RNA-VHC en cualquier momento durante el tratamiento después de una respuesta virológica
Recidiva (RC)	Reaparición del RNA-VHC tras finalizar el tratamiento con RNA indetectable
No respondedor	Ausencia de aclaramiento de RNA-VHC tras 24 semanas de tratamiento
Respuesta nula	Ausencia de descenso del RNA-VHC $>1 \log_{10}$ en la semana 4 del tratamiento o $>2 \log_{10}$ en la semana 12.
Respondedor parcial	Descenso de $>2 \log_{10}$ del RNA-VHC en la semana 12 de tratamiento pero detectable en la semana 24

RNA-VHC, Ácido ribonucleico del virus de la hepatitis C

La llegada de los nuevos IP ha introducido nuevos términos en la valoración de la respuesta al tratamiento. En los casos que se usa el IP Telaprevir, el tratamiento está guiado por la respuesta en las semanas 4 y 12, denominándose respuesta virológica rápida extendida (eRVR) a la ausencia de detección del RNA-VHC en esos momentos [49]. En los tratamientos con Boceprevir existe una fase denominada fase de *lead-in* con IFN-peg y RBV previa al inicio de la triple terapia. En estos trabajos, la respuesta temprana se refiere a la negativización del RNA-VHC tras 4 semanas de tratamiento con

los tres fármacos, que corresponde a la semana 8 desde el inicio de la terapia, y la respuesta tardía a la presencia de RNA-VHC detectable en la semana 8 pero indetectable en la 12 (8 semanas con BOC) [50].

#### 1.4.1.2. Genotipo viral

El genotipo del VHC es el factor predictivo basal más importante para la respuesta al tratamiento basado en IFN. En numerosos estudios el genotipo 1b del VHC se ha mostrado como factor de mal pronóstico respecto al resto de genotipos y se ha relacionado con una peor evolución de la infección [32]. De hecho, la tasa de RVS en los pacientes con genotipo 1 se estima en torno al 40-50 %, mientras que para los genotipos 2 y 3 es aproximadamente del 80 % [51].

Los motivos de esta diferente sensibilidad al IFN según los genotipos no se conoce bien. Se piensa que el genotipo 1 es distinto de los genotipos 2 y 3 en los sitios de corte de la ribonucleasa L que se encarga de degradar el RNA viral. También puede deberse a que existe cierta homología en una región de la proteína viral E2 con el factor de iniciación, lo que permite que se produzca la actividad antiviral de la proteína PKR, considerándose por tanto al genotipo 1 más resistente al efecto antiviral del IFN que los genotipos 2 y 3 [52].

#### 1.4.1.3. Cinética de replicación viral

En la etapa crónica de la infección, la cinética de replicación viral es estable. Esto significa que la producción viral por las células infectadas es compensada por la destrucción periférica del virus, mientras que las células infectadas de *novo* se compensa por la muerte de las células infectadas. Esta etapa se caracteriza por una vida media estimada del virión libre de 3 horas, una tasa de producción-aclaramiento diario de  $10^{12}$  partículas virales por día [53].

La administración del IFN induce una típica declinación bifásica de la replicación viral, en la que en una primar fase, en las primeras 24 horas tras la administración, se observa una rápida disminución de la CV debida a la inhibición directa del IFN sobre la producción viral. Esta disminución se da tanto en pacientes que al final del tratamiento presenten una RVS como en los que no. En una segunda fase se produce un descenso más paulatino de la CV correspondiente con la muerte de las células infectadas por el VHC debido a la respuesta inmune específica que junto con la inhibición de la producción viral debido al IFN se produce un aclaramiento del RNA viral en gran cantidad de pacientes [46].

Por otro lado, también se han identificado algunas sustancias que inhiben la unión del IFN a su receptor celular afectando a la cascada de señalización. La activación de estas sustancias puede originar un fallo en el tratamiento. Para ello se han usado supresores de la señalización de las citocinas (SOCS) [54], ya que muchas citoquinas como la interleukina 6 (IL-6), IL-1, IL-10 y TNF- $\alpha$ , inducen la expresión de SOCS, que inhibe las vías de señalización del IFN y su acción antiviral [55]. Se ha demostrado que niveles altos de TNF- $\alpha$  en el hígado y células mononucleares favorecen la resistencia al tratamiento [56].

Durante la triple terapia con los AADs, la mayoría de los pacientes experimentan un retraso abreviado del inicio del descenso de la CV en relación al potente efecto antiviral directo de estos fármacos, seguido del patrón cinético bifásico típico.

#### **1.4.1.4. Importancia de las cuasiespecies y las mutaciones en la resistencia del VHC**

Desde que Okada y cols. en 1992 demostraron una correlación entre la mayor complejidad de cuasiespecies en la región HVR-1 antes de comenzar el tratamiento antiviral y la ausencia de respuesta a éste, se ha sugerido que la persistencia del VHC se debe a su alta capacidad mutagénica y a su

compleja composición en cuanto a cuasispecies, lo que permitirá escapar del sistema de vigilancia inmunológica de mutaciones.

Polyak y cols. en 1998, también demostraron que durante el tratamiento con IFN puede aparecer un incremento en el número de cuasispecies en pacientes NR. Esto sugiere que durante el tratamiento hay una presión selectiva, apareciendo nuevas cepas resistentes al IFN, que se entiende como un proceso adaptativo del virus al entorno en el que se encuentra. Sin embargo, esto es difícil de evaluar, ya que el mecanismo de acción del IFN es muy complejo y aún no es del todo conocido [57-59].

La variabilidad genética del VHC también se ha correlacionado con la persistencia viral y el daño hepático. Farci y cols. en 2011 compararon la heterogenicidad genética en pacientes que aclararon el virus con la de otros que desarrollaron una HCC, y sugirieron que la persistencia del VHC fue debida a una alta capacidad mutagénica y compleja composición genética de la población viral, que le permite al virus escapar del sistema inmune del huésped [60].

Por otro lado también se ha intentado relacionar la respuesta al tratamiento de la HCC con la existencia de determinadas mutaciones en regiones genómicas virales que antagonizan el efecto del IFN. De hecho se ha demostrado que la presencia de más de 4 mutaciones en la región PKRBD es un factor predictivo de la RVS y RVP en pacientes con HCC genotipo 1 y que han recibido tratamiento combinado con IFN-peg y RBV, aunque no lo es de la RVR [11].

Parece que el mecanismo de escape del VHC está relacionado con la variabilidad de dichas regiones. Se ha sugerido que la presión selectiva ejercida por el IFN se distribuye por todo el genoma de forma heterogénea, concentrándose principalmente en las regiones HVR-E1/E2 y la V3 de la NS5A [61]. La mayoría de los estudios se han centrado en el análisis de estas proteínas, mientras que otras regiones más conservadas del genoma del VHC (NS5B, región Core...) han sido menos analizadas. Además, los resultados

obtenidos no siempre han sido homogéneos, probablemente debido al establecimiento de complejas interacciones entre la diversidad genética del virus y la respuesta inmune del huésped.

## 1.4.2. Factores relacionados con el paciente

### 1.4.2.1. Edad, sexo, etnia

La edad en la que se contrae la infección parece ser un factor importante en la respuesta al tratamiento, ya que en todos los grandes estudios con IFN-peg y RBV los pacientes más jóvenes se correlacionan significativamente con la RVS, presentando los pacientes menores de 40-45 años mejores tasas de respuesta [39, 62].

El sexo masculino se ha asociado con peor evolución de la infección en numerosos estudios.

La raza es un importante factor predictor de la respuesta al tratamiento. Los afroamericanos tiene menores tasas de respuesta que los blancos, y los latinos menores tasas de respuesta de los blancos no latinos [63, 64]. Estas diferencias pueden explicarse, al menos en parte, por las variaciones en el gen IL28B, ya que determinados polimorfismos de la IL28B están diferencialmente representados en los diversos grupos raciales. En un estudio de 1.137 pacientes tratados con IFN-Peg+RBV, Ge y cols. en 2009 encontraron que el polimorfismo de un único nucleótido fue el mayor factor predictivo de RVS, por tanto el polimorfismo de la IL28B además de explicar las diferencias en cuanto a la RVS dentro de un grupo de población, también lo hace entre grupos de poblaciones de diferentes etnias [65].

### 1.4.3. Otros factores

Algunos comportamientos tales como el alcoholismo activo o uso de drogas intravenosas, se asocian con menores tasas de respuesta [66, 67].

También la tasa de progresión de la fibrosis actúa como un factor predictor independiente de la respuesta en pacientes con HCC que reciben la terapia antiviral. De hecho se han demostrado mayores tasas de RVS en personas con progresión lenta que en los de progresión rápida [68].

El peso corporal también parece influir en la tasa de respuesta por la modificación del volumen de distribución del fármaco y los niveles de concentración. En un estudio prospectivo, un índice de masa corporal (IMC)  $\geq 25$  Kg/m<sup>2</sup> se asoció significativamente con progresión a fibrosis [69]. Un menor peso corporal ( $\leq 75$ -80 kg) se asoció significativamente con mayores tasas de RVS en tratamiento combinado con ambos IFNs pegilados más RBV [70].

Se ha comprobado que los principales factores metabólicos como son la presencia de fibrosis, un elevado IMC, la presencia de esteatosis, hipertensión arterial y resistencia a la insulina avalan que el síndrome metabólico tiene un papel fundamental en las posibilidades de curación [71].

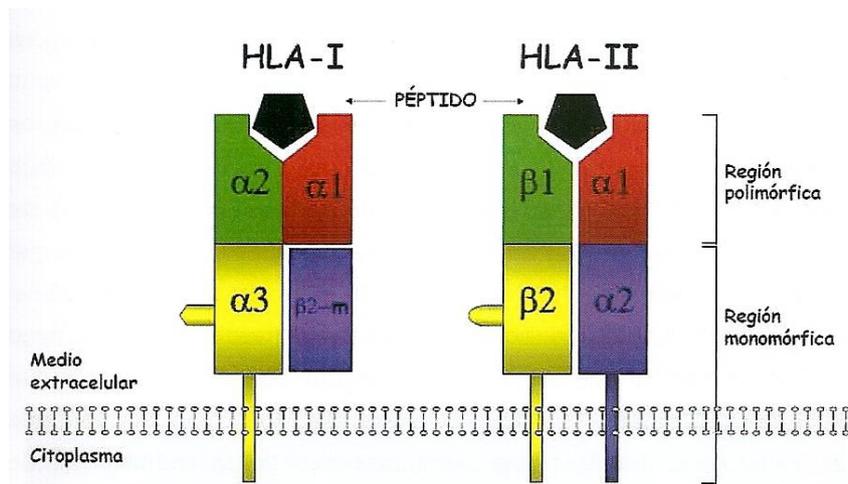
#### **1.4.3.1. Factores genéticos del hospedador: relación entre HLA y VHC**

El MHC es poligénico y los genes que lo constituyen son codominantes y polimórficos, es decir, cada locus concreto del complejo MHC posee multitud de variantes alélicas dentro de las poblaciones naturales de cada especie. Se han descrito más de mil alelos para HLA clase I y más de 500 para el de clase II. Dicho polimorfismo alélico es muy importante ya que origina las diferencias de la respuesta inmune restringida por HLA I.

Las moléculas HLA de clase I se hallan constituidas por dos cadenas polipeptídicas: una cadena pesada  $\alpha$ , de mayor tamaño, glicosilada, que se encuentra asociada mediante interacciones no covalentes a una cadena ligera, la  $\beta$ -2-microglobulina que es idéntica en todos los individuos de la misma especie. La cadena pesada  $\alpha$  es altamente variable entre individuos de la misma especie, siendo la responsable del polimorfismo de estas moléculas. En ella se distinguen tres zonas: una extracelular de mayor tamaño

en la que se encuentran los determinantes antigénicos de la molécula, una pequeña región transmembrana, y una región intracitoplasmática. La zona extracelular se halla organizada en tres dominios denominados,  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2 y  $\alpha$ -3 mantenidos por puentes intracatenarios. Los dominios  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 constituyen regiones de contenido variable en aminoácidos mientras que el dominio  $\alpha$ -3 es bastante constante [72].

Las moléculas de HLA de clase II son glicoproteínas que se encuentran en la superficie celular. Están formadas por dos cadenas denominadas cadena  $\alpha$  ó pesada y cadena  $\beta$  ó ligera, asociadas mediante interacciones de naturaleza no covalente. Están constituidas por dos dominios extracelulares,  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2, y  $\beta$ -1 y  $\beta$ -2, en cada una de ellas, un dominio transmembrana y otro intracitoplasmático (Figura 9)



**Figura 9.** Estructura de las moléculas HLA clase I y II (Hasan y cols., 2011)

Por tanto, el polimorfismo de las moléculas HLA es el resultado de un largo proceso evolutivo ejercido por la presión de distintos agentes infecciosos que han contribuido a la creación de nuevos alelos, algunos como resultado de mutaciones puntuales, mientras que otros proceden de la combinación de secuencias completas entre diferentes alelos bien mediante recombinación génica, o por el proceso denominado conversión, génica según el cual una secuencia es reemplazada por otra semejante de un gen homólogo [73].

Por otro lado, se ha visto que la mayoría de las células infectadas por virus exhiben péptidos antigénicos en la superficie de sus membranas plasmáticas asociadas al HLA, que son reconocidos por las células Tc mediante su receptor TCR. De esta forma se ha podido demostrar en animales que las células Tc que reconocen un haplotipo HLA determinado son incapaces de lisar células que tiene un haplotipo diferente, aunque estén infectadas por el mismo virus. Este fenómeno se denomina citotoxicidad restringida por el haplotipo o restricción MHC. También se ha visto que la patogénesis de la HCC está mediada por los linfocitos Tc CD8+ que reconocen el complejo "antígeno viral-molécula HLA de clase I" expresado en la superficie de la célula diana, activándose y posteriormente destruyendo las células infectadas por citólisis directa o mediante inducción de apoptosis. Por tanto, se ha comprobado que los genes HLA juegan un papel muy importante en la fisiopatología de la hepatitis C, ya que intervienen en la susceptibilidad a la enfermedad, en la progresión de las lesiones y en la respuesta al tratamiento [74].

También se ha estudiado la correlación entre los alelos HLA y el aclaramiento espontáneo de la hepatitis aguda C, siendo muchos los alelos HLA encontrados, en especial el DQB1\*0301 y el DRB1\*11. De hecho hay un metanálisis publicado en el año 2005 que demuestra que ambos alelos están relacionados con el aclaramiento viral espontáneo, siendo los más repetidos en distintas poblaciones [75].

Se ha estudiado a nivel mundial si existe o no una asociación entre las moléculas HLA y la respuesta del tratamiento antiviral con IFN [11, 76, 77]. No se ha encontrado hasta la fecha una asociación repetitiva y clara entre un determinado alelo HLA y la respuesta, como ocurría en el caso del aclaramiento viral espontáneo (DQB1\*0301 y DRB1\*11), y con resultados contradictorios dependiendo de la raza que se estudie. También es cierto que estos resultados varían en función de los genes evaluados y el método de genotipado.

En nuestro grupo de investigación, en el trabajo de Muñoz de Rueda y cols. de 2011 demostramos que la presencia del alelo de clase II DQB1\*0301 es un alelo altamente protector para la infección del VHC en los pacientes con genotipo 1 para el VHC, siendo este un factor predictivo de RVS, ya que el 72 % de los pacientes tratados con IFNpeg+RBV que presentan este alelo, tenían una RVS frente a los pacientes que no presentan este alelo cuya respuesta es menor del 50 % con el mismo tratamiento.







## **JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS**



## 2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

### 2.1 Justificación

Los genes HLA de clase I y II juegan un papel fundamental en la fisiopatología de la hepatitis C, tanto en la evolución de la enfermedad (aclaramiento viral espontáneo o la cronificación de la enfermedad), en la lesión hepática y en la respuesta al tratamiento antiviral. Una efectiva presentación de los antígenos virales a las células T CD4+ y CD8+ por los HLA de clase II y clase I, respectivamente, es la clave de una óptima regulación de la respuesta inmune frente a las infecciones virales.

La asociación entre las moléculas HLA y la respuesta al tratamiento viral ha sido estudiada [11, 76, 77]. Se ha visto que hay una asociación entre ciertos alelos de clase II (DQB1\*0301 y DRB1\*119 y el aclaramiento viral espontáneo. Se sabe que estas moléculas HLA de clase II presentan en la zona de unión con el antígeno viral un surco que interacciona con una corta secuencia de aminoácidos del péptido antigénico, donde se definen residuos específicos para cada alelo que se denominan "binding motif" (motivos de unión o anclaje). Aquellos péptidos antigénicos que son capaces de provocar una respuesta de proliferación celular CD4+ son los llamados "epítomos inmunodominantes". Estos pueden localizarse en zonas estructurales o no estructurales del VHC. Lo ideal es que esta zona de unión (secuencia aminoacídica que incluye el "binding motif") del péptido antigénico-VHC sea lo más conservada posible (sin mutaciones). Si no hay mutaciones la interacción HLA-péptido antiviral será más intensa, y por tanto, condicionará una respuesta inmunológica más vigorosa de las células CD4+. De esta manera la mayoría de epítomos inmunodominantes descritos en el VHC se encuentran sin mutar en zonas conservadas del virus.

Von Hahn y cols., demostraron en el año 2007 que el escape viral al sistema inmune a lo largo de la infección por VHC, se debe en parte a la aparición de mutaciones en epítomos inmunodominantes de regiones conservadas (NS3, NS4 y NS5a) del VHC [78]. Algunos de estos epítomos inmunodominantes pueden ser presentados a las células T por múltiples moléculas de HLA (epítomos promiscuos); sin embargo, también los hay muy conservados que se restringen a determinadas moléculas de HLA.

Nosotros en un anterior estudio hemos estudiado a 428 pacientes tratados con IFN-peg+RBV, de los cuales 277 eran genotipo 1 y en los cuales el 69 % de los pacientes que presenta el alelo de clase II DQB1\*0301 (n=100) presentaban RVS frente a una respuesta menor del 50 % en los que no prestaban dicho alelo. Por tanto, partiendo de la premisa de que los pacientes con genotipo 1 que expresan el alelo DQB1\*0301 tienen una probabilidad del 69 % de responder, nos preguntamos qué ocurre con los pacientes que aún presentando este alelo no responde al tratamiento antiviral.

Concretamente hemos encontrado que el alelo DQB1\*0301 se une a una zona de 20 aminoácidos de la región NS3 del VHC (aa 1253-1272; GYKVLVNLNPSVAATLGFGAY) [79], siendo un epítomo inmunodominante promiscuo, ya que también se une, aunque con menor afinidad, a otras moléculas HLA clase II del tipo DRB1\*.

También en el año 1997, Diepolder HM y colaboradores encontraron gran afinidad entre una zona conservada de la región NS3 (1248-1261) del VHC y moléculas HLA clase II, en pacientes con un aclaramiento viral espontáneo [80]. Teniendo en cuenta todos estos factores nos hemos planteado la siguiente hipótesis.

## 2.2. Hipótesis

Nuestra hipótesis plantea que el 69 % de los pacientes de nuestro estudio previo, que poseen el alelo DQB1\*0301 y presentan RVS al tratamiento antiviral con IFN-peg+RBV, responden debido a que la secuencia aminoacídica del epítipo inmunodominante del VHC (NS3<sub>1253-1272</sub>) se encuentra en su forma salvaje (no mutada). En cambio, este epítipo viral se encuentra mutado en el 31 % de los pacientes que presentan el alelo y no responden al tratamiento combinado, lo cual impiden una correcta unión a la molécula de HLA.

Así, cuando el epítipo viral está mutado y no se produce la correcta unión con la molécula HLA-DQB1\*0301, no se produce una respuesta inmune por parte de las células CD4+, lo cual da lugar a una no-RVS.



## **OBJETIVOS**



### 3. Objetivos

- Estudiar el papel que juega la variabilidad genética, mediante pirosecuenciación, del epítipo inmunodominante (NS3<sub>1253-1272</sub>) del VHC, en la resistencia al tratamiento antiviral en los pacientes con HCC genotipo 1 que expresan el alelo HLA de clase II DQB1\*0301.
- Comprobar mediante citometría de flujo, en estudios in vitro, si el epítipo inmunodominante salvaje (péptido sintético) es capaz de generar una proliferación de las células CD4+ en los pacientes con RVS y NR DQB1\*0301 positivos, mientras que un péptido sintético mutado no es capaz de generar esta respuesta en ninguno de los grupos anteriores. Con este objetivo se pretende en un futuro obtener una "vacuna terapéutica" para los pacientes que presentan el alelo DQB1\*0301.



## **PACIENTES Y METODOLOGÍA**



## **4. Pacientes y metodología**

### **4.1. Diseño**

El presente estudio es un estudio observacional retrospectivo casos; controles.

### **4.2. Pacientes**

#### **4.2.1. Sujetos del estudio y ámbito de estudio:**

Los pacientes fueron seleccionados de un estudio previo con 428 pacientes enfermos de HCC genotipo I, en el que demostramos que la presencia del HLA-DQB1\*0301 se asociaba a una mayor probabilidad a la respuesta al tratamiento antiviral combinado. Del total de los 428 pacientes, 100 presentaban el alelo HLA-DQB1\*030. De estos 100 pacientes, únicamente disponíamos de sueros basales de 40, los cuales fueron incluidos en el estudio. Todos los pacientes fueron tratados en el Hospital Universitario San Cecilio de Granada y el trabajo realizado en los laboratorios de la Unidad de Apoyo a la Investigación.

Para la participación en este estudio se requirió consentimiento informado de cada uno de los pacientes. El protocolo de estudio se realizó conforme a las guías éticas de la declaración de Helsinki de 1975, previa aprobación del estudio por el comité ético.

#### **4.2.2. Tratamiento previo de los pacientes**

Consistió en la administración de 180 µg de IFN-Peg alfa-2a (*Pegasys*<sup>®</sup>, de Roche) inyectado por vía subcutánea una vez por semana. Se administró RBV entre 1000-1200 mg/día según peso (<75 kg: 1000 mg y >75 kg: 1200 mg). La duración del tratamiento fue de 48 semanas.

#### 4.2.2.1. Criterios de respuesta

Los criterios de respuesta fueron los establecidos en la práctica clínica habitual siendo estos los siguientes:

- RVS: pacientes que mantienen el RNA-VHC negativo más de 6 meses después de finalizar el tratamiento combinado.
- RVR: pacientes con un RNA-VHC negativo en la semana 4 de tratamiento combinado.
- RVP: pacientes con un RNA-VHC negativo o con un descenso  $\geq 2 \log_{10}$  de la CV en la semana 12 de tratamiento.
- NR: pacientes sin RVP (no-RVP). Estos pacientes también fueron considerados no-RVS.
- RC: pacientes que negativizan el RNA-VHC durante el tratamiento pero presentan de nuevo un RNA-VHC positivo al final del mismo o a los 6 meses tras finalizar la terapia. Estos pacientes también fueron considerados como no-RVS.
- Breakthrough: pacientes que negativizan el RNA-VHC en la semana 4 a 12 de tratamiento, pero presentan de nuevo un RNA-VHC positivo antes de finalizar el mismo. Estos pacientes también fueron considerados como no-RVS.

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

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

#### 4.2.3. Criterios de inclusión y exclusión

- **Criterios de inclusión**

Se consideran los mismos criterios de inclusión del estudio original:

- Pacientes de raza blanca españoles, con HCC genotipo 1, que expresan el alelo HLA de clase II DQB1\*0301 que han recibido el tratamiento combinado y lo hayan finalizado (n=100).
- Disponer de sueros basales congelados a - 80 °C (n=40).
- **Criterios de exclusión**
  - Se consideran los mismos criterios del estudio original: se excluyen a todos aquellos pacientes que abandonaron o suspendieron el tratamiento antiviral por decisión propia. Los excluimos del estudio por desconocer en ellos la respuesta al tratamiento. También a aquellos pacientes que presentaban coinfección con VHB, VIH, alcoholismo, enfermedad hepática autoinmune o inducida por fármacos.

#### 4.3. Variables del estudio

##### ■ Estudio de pirosecuenciación

- Variable dependiente: cantidad de sitios polimórficos en el conjunto de haplotipos: RVS y no RVS.
- Variables independientes: número de haplotipos diferentes, número promedio de mutaciones por haplotipo.

##### ■ Estudio in vitro: proliferación celular

- Variable dependiente: nivel de estimulación de las células CD4+.
- Variable independiente: péptidos mutados o no mutados (salvaje).

#### 4.4. Estudios de pirosecuenciación

##### Pacientes

Del total de los 100 pacientes disponibles DQB1\*0301+, sólo se disponía de suero basal congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  de 40 de ellos (21 pacientes con RVS y 19 con no-RVS). Del suero de los 40 pacientes se pirosecuenció la región viral NS3<sub>1253-1272</sub> cuya secuencia patrón se seleccionó de una base de datos de secuencia pública (<http://hcv.lanl.gov/>; número de acceso de GenBank AF009606).

De los 19 pacientes con no-RVS, se seleccionaron un grupo de 5 pacientes para hacerles el estudio de pirosecuenciación durante y después del tratamiento teniendo en cuenta la existencia de muestras de suero congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . En total se pirosecuenciaron 50 muestras de suero.

##### **Amplificación de la región NS3<sub>1253-1272</sub> del virus de la hepatitis C y pirosecuenciación**

Se pirosecuenciaron un total de 50 muestras, procedentes de los 40 pacientes seleccionados. Del total de 50 muestras, solo se consiguió amplificar 44 muestras correspondientes a 37 pacientes (21 pacientes RVS y 16 pacientes con no-RVS), 21 muestras basales procedentes de pacientes con RVS y 23 muestras procedentes de pacientes con ausencia de RVS (16 muestras basales y 7 durante el tratamiento y postratamiento).

El procedimiento empleado fue el siguiente:

**Extracción de RNA.** El RNA viral fue extraído a partir de 300  $\mu\text{l}$  de suero usando el kit PrepitoViral DNA / RNA 300 (Chemagen Technologie, PerkinElmer, Madrid, España).

## Retrotranscripción y Amplificación del DNA de la secuencia

### NS3<sub>1253-1272</sub> del virus.

Se obtuvieron dos microlitros de la solución que contenía RNA y se sometieron a transcripción inversa (RT) usando un kit de síntesis de cDNA de qScript Flex (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD).

Se utilizó el DNAc para la amplificación de las regiones de interés. Las secuencias se amplificaron mediante RT-PCR usando SYBR Green Supermix Low ROX (Quanta Biosciences, Gaithersburg). El SYBR R Green es una molécula que da fluorescencia cuando se une al surco menor del DNA de doble cadena. Los primers utilizados para RT y la amplificación de primera y segunda ronda para la región NS3<sub>1253-1272</sub> se muestran en la Tabla 6. La RT se realizó a 42°C durante 90 min y finalizó a 85°C durante 5 min, seguido de la primera ronda PCR a lo largo de 35 ciclos, produciéndose en cada ciclo una desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, una hibridación a 60°C durante 30 segundos y una extensión a 72°C durante 70 segundos. La segunda ronda de PCR se realizó en las mismas condiciones. El producto de la segunda ronda de PCR se purificó utilizando Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega, Promega Biotech Ibérica, Madrid, España) y se resuspendió en 20 µL de agua. La pirosecuenciación de la región NS3<sub>1253-1272</sub> se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante para amplicones usando el sistema FLX 454 (Roche SL). El análisis bioinformático de los resultados obtenidos en el sistema FLX 454 (Roche SL) se presenta en la sección Resultados (Tabla 10).

TABLA 6. Cebadores usados para la transcripción inversa y la amplificación de primera y segunda ronda para la región NS3<sub>1253-1272</sub>.

Aplicación	Dirección	Secuencia
Primera PCR	Sentido	5'-CAAGTGCAGCATCTACACGCGCCACAGG-3'
RT y primera PCR	Antisentido	5'-TGGCACTCATCACATATTATGATGTCATAGGC-3'
	Sentido	5'-GGGAAGAGTACTAAGGTGCCGGCTGCGTATGC-3'
Segunda PCR	Antisentido	5'-CAACCACCGTCAGCTAGGAACITGCCGTATGT-3'

#### 4.5. Estudios in vitro: cultivos celulares

##### Pacientes

De los 37 pacientes estudiados por pirosecuenciación, para el estudio in vitro de cultivos celulares, fueron seleccionados 7 pacientes (3 RVS, 4 no-RVS) tomando como criterios de inclusión que los pacientes no deberían haber comenzado un nuevo tratamiento (en el caso de no RVS) y deberían ser contactables (ya que era necesario disponer de sangre fresca para realizar el estudio). De estos 37 pacientes, solo 7 cumplían estas condiciones, 3 RVS y 4 no-RVS.

##### Aislamiento de PBMCs

Para el aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica se recolectó sangre periférica completa de cada paciente mediante punción venosa en tubos BD Vacutainer K2-EDTA para evitar la coagulación. Posteriormente, se mezcló asépticamente con solución salina 1:1 y las células mononucleares de sangre periférica se aislaron mediante la técnica Ficoll Histopaque-1077 (Sigma Aldrich), de la siguiente manera: primero, se introdujeron 3 ml de Ficoll-1077 en 15 ml tubo cónico. Luego, sin perturbar la interfaz, la mezcla de sangre completa y solución salina se escurrió por el costado del tubo. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 800 G durante 20 minutos. Los tubos se retiraron cuidadosamente y, usando una pipeta Pasteur estéril, la interfaz donde se encuentran la mayoría de las células mononucleares se transfirió a una placa de cultivo celular de fondo redondo. La muestra se diluyó luego a 10 ml con PBS pH 7,4 y se homogeneizó por inversión. Después de esto, se centrifugó a 100 G durante 10 minutos, se separó el sobrenadante, las células se enjuagaron con PBS (pH 7,4) y se resuspendieron, y la etapa anterior se repitió a continuación. El sobrenadante se eliminó de nuevo después de la centrifugación y el sedimento celular se resuspendió con 1 ml de medio de cultivo RPMI-1640 básico (Sigma Aldrich) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) (JRH Biosciences). El

recuento celular se realizó en una solución de 0,4% de azul de tripano (Sigma Aldrich) mezclado 9: 1 con la suspensión celular, homogeneizando la mezcla para alcanzar un volumen de 10  $\mu$ L, después de lo cual se realizó el recuento celular en el hemocitómetro. Las células se almacenaron entonces en nitrógeno líquido disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich) y FBS (5: 1) para mantener la viabilidad, a una concentración celular de  $5 \times 10^6$  células mononucleares/ml mediante un procedimiento por etapas. Para la descongelación posterior, los viales se colocaron en un baño de agua a 37 ° C durante 2 minutos. Cuando se descongelaron parcialmente, se colocaron en hielo y se añadió RPMI-1640 a 37 ° C. Se llevaron a cabo dos lavados con PBS (pH 7,4) y las células se resuspendieron en 1 ml de RPMI-1640. Se realizó un recuento y verificación de viabilidad celular nuevamente, como se describió anteriormente.

### Síntesis de péptidos

Se sintetizaron nueve péptidos sintéticos (Bionova) correspondientes a los haplotipos (n=9) de la región NS3<sub>1253-1272</sub> encontrados en los 7 pacientes que se han incluido en el estudio in vitro (Tabla 7).

**Tabla 7.** Variantes peptídicas de la síntesis de péptidos

Peptidos	Secuencia
Peptido Salvaje	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY
Peptido H7	GYKVPVLNPSVAATLGFGAY
Peptido H11	GYKVLVPNPSVAATLGFGAY
Peptido H15	GYKVLVLNPSVAATS <sup>S</sup> GFGAY
Peptido H2	GYKVL <sup>A</sup> LNPSVAATLGFGAY
Peptido H5	GYKVLVLS <sup>S</sup> PSVAATLGFGAY
Peptido H30	GYKVLVLNPSVAATLS <sup>S</sup> FGAY
Peptido H18	GYKVLVLNPSVAAT <sup>*****</sup>
Peptido H14	<sup>R</sup> YKVLVLNPSVAATLGFGAY

Los péptidos se purificaron por HPLC hasta > 98% de pureza. Para su uso posterior, se disolvieron en DMSO (Sigma Aldrich), ajustando la concentración a 1 mg / ml y luego diluyendo en RPMI-1640 (Sigma Aldrich) para obtener una dosis de cultivo de 8 µg / ml para estimular las PBMC.

### **Estimulación de PBMCs con péptidos sintéticos**

Las células T se expandieron en tubos de fondo redondo de 15 ml a una concentración celular de  $1 \times 10^6$  células / ml. Se realizaron tres repeticiones para cada uno de ellos, y el procedimiento se llevó a cabo en las mismas condiciones para cada paciente, utilizando PBMC, previamente almacenadas en nitrógeno líquido, marcadas con CFSE 50 µM (Life Technologies) de acuerdo con las especificaciones del fabricante, marcadas durante 7 minutos a 37 ° C. Una vez marcadas, las células se lavaron dos veces con PBS para eliminar el exceso de reactivo, y luego se cultivaron con 400 ml de medio RPMI 1640 (Sigma Aldrich) con HEPES 25 mM, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U / ml, estreptomina 100 mg / ml y 10% de suero humano inactivado por calor. La estimulación con péptidos sintéticos se realizó posteriormente, a una dosis de péptido de 8 mg / ml. Se usó fitohemaglutinina (PHA, Sigma Aldrich) como control positivo, a una dosis de 8 mg / ml. Los cultivos se incubaron a 37 ° C en 5% de CO<sub>2</sub> humidificado durante 5 días.

### **Análisis de citometría de flujo**

Después de cinco días de cultivo, las PBMC (a una concentración de  $1 \times 10^6$  células / ml) se lavaron una vez con PBS al 1% de BSA y se incubaron con anti-CD4 PE (Beckton Dickinson) durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego se lavaron dos veces con PBS 1x + FBS al 0,5% y se analizaron usando un citómetro de flujo FACSAria Becton Dickinson II. Los datos se adquirieron y analizaron a partir de  $1 \times 10^5$  células por cada análisis FACS usando el software Becton Dickinson 6.1 FACSDivas (BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica).

## **RESULTADOS**

---



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Objetivo 1: Estudio de pirosecuenciación

La secuenciación de El NS3<sub>1253-1272</sub> del VHC se realizó con éxito en 37 pacientes. De estos, 10 fueron genotipo 1a / ab, 7 fueron genotipo 1a y 20 fueron genotipo 1b. Después del control de calidad y el filtrado de lecturas de baja calidad (se omitieron los haplotipos con menos de 50 lecturas (secuencias de nucleótidos), ya que pueden considerarse ruido de fondo en una muestra que contiene miles de lecturas), se leyeron un total de 18197.7 lecturas de pirosecuenciación (mín. max: 4815-42788) y se obtuvieron 34 haplotipos o variantes genómicas diferentes (Figura 10).

Position	Response	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Number of samples
haplo1_wt sequence	Both	G	Y	K	V	L	V	L	N	P	S	V	A	A	T	L	G	F	G	A	Y	36
haplo2	Both	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	13
haplo3	Both	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4
haplo4	Both	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	4
haplo5	Both	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	11
haplo6	no-SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2
haplo7	no-SVR	.	.	.	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4
haplo8	Both	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2
haplo9	Both	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4
haplo10	no-SVR	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2
haplo11	no-SVR	.	.	.	.	.	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4
haplo12	no-SVR	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
haplo13	Both	.	.	.	.	.	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3
haplo14	no-SVR	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
haplo15	no-SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	4
haplo16	no-SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	37
haplo17	no-SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
haplo18	Both	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	*	*	*	*	*	6
haplo19	no-SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	1
haplo20	no-SVR	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	*	*	*	*	*	1
haplo21	no-SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	37
haplo22	no-SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	.	.	1
haplo23	no-SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	1
haplo24	no-SVR	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
haplo25	no-SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
haplo26	no-SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	1
haplo27	Both	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	3
haplo28	no-SVR	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	*	*	*	*	*	*	1
haplo29	no-SVR	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	*	*	*	*	*	1
haplo30	Both	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	3
haplo31	SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	1
haplo32	SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	1
haplo33	SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	1
haplo34	SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	1

Figura 10. Haplotipos obtenidos por pirosecuenciación y número de muestras/haplotipos.

En la tabla 8 se representa el porcentaje de haplotipos mayoritarios y minoritarios para cada muestra. Los recuadros sombreados en gris indican la ausencia del haplotipo.

Muestras	Respuesta	Haplotype (%)																																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34		
Muestra1	noRVS	94.85	.46	.31	.26	.25	.25																														
Muestra11	noRVS	94.47	.41		.20	.27		.29				.28				.21		.32	.20																		
Muestra12	noRVS	4.94																	85.50	4.34	1.15																
Muestra14	noRVS	93.95	.56	.25	.21	.16		.24		.27	.20	.30	.27			.35							.49	.22	.21	.19	.17										
Muestra15	noRVS	95.32																	.99																		
Muestra16	noRVS	27.53																	67.47										.61	.35							
Muestra18	noRVS	97.84																																			
Muestra2	noRVS	94.10	.42	.22		.42	.21	.34	.31	.25	.25	.24	.19	.19	.18	.17																					
Muestra20	noRVS	93.22																																			
Muestra21	noRVS	99.72																																			
Muestra22	noRVS	94.83	.46			.36																														.54	
Muestra23	noRVS																																			93.72	
Muestra24	noRVS	91.78																					4.34														
Muestra25	noRVS	94.80																																			
Muestra32	noRVS	94.48	.34			.41																															
Muestra6	noRVS	93.96	.39			.34		.45				.47				.42																					
Muestra26	RVS	98.32											1.37																								
Muestra27	RVS	99.60																																			
Muestra29	RVS	94.93	.41																																		
Muestra30	RVS	94.60	.44																																		
Muestra31	RVS	94.55				.35														.67																	
Muestra33	RVS	97.14	.36	.27		.22																														.39	
Muestra34	RVS	95.82	.34																																		
Muestra35	RVS	99.68																																			
Muestra37	RVS	97.85																																			
Muestra38	RVS	94.28	.47			.29																														.24	
Muestra39	RVS	99.42																																			
Muestra40	RVS	92.16										.33																									
Muestra41	RVS	94.56	.34			1.12																														.75	
Muestra43	RVS	18.61																																			.49
Muestra44	RVS	86.41			9.02															78.06																.39	
Muestra45	RVS	99.16										.26																									
Muestra46	RVS	99.81																																			
Muestra47	RVS	99.08																																			
Muestra48	RVS	90.54																																			3.31
Muestra49	RVS	97.32																																			
Muestra50	RVS	96.67																																			1.95

Tabla 8. Porcentaje de haplotipos mayoritarios y minoritarios para cada muestra (n = 37).

En la figura 10 podemos ver que de los 33 haplotipos mutados, 19 fueron específicos para el grupo de pacientes sin RVS, solo 4 fueron específicos para pacientes con RVS y 10 para ambas respuestas (Figura 10). Por lo tanto, en los pacientes que no tenían RVS, hubo 4.75 veces más haplotipos mutados diferentes que en el grupo RVS. Por otro lado, 29 haplotipos mutados tenían una única mutación, mientras que cuatro presentaban un codón de parada en la posición 15, y tres de estos cuatro también presentaban una mutación; la posición 14 no estaba mutada en ningún haplotipo.

La tabla 9 resume nuestros resultados a nivel de secuencia de aminoácidos, con la siguiente información para cada muestra basal (n = 37): número de haplotipos diferentes, número promedio de mutaciones por haplotipo, cantidad de sitios polimórficos en el conjunto de haplotipos, genotipo y respuesta al tratamiento antiviral (RVS; no-RVS).

**TABLA 9.** Resumen a nivel de la secuencia de aminoácidos para cada muestra basal.

Pacientes	Haplotipos totales	Número medio de mutaciones por haplotipo	Sitios polimórficos	Genotipo	Grupo
P1 (Muestra 33)	4	0.75	3	1a	RVS
P12 (Muestra 39)	1	0	0	1a	RVS
P13 (Muestra 34)	2	0.50	1	1b	RVS
P14 (Muestra 29)	2	0.50	1	1b	RVS
P15 (Muestra 38)	5	0.80	4	1b	RVS
P16 (Muestra 37)	1	0	0	1a	RVS
P17 (Muestra 47)	1	0	0	1b	RVS
P18 (Muestra 40)	5	0.80	4	1a /1b	RVS
P19 (Muestra 27)	1	0	0	1a /1b	RVS
P20 (Muestra 31)	3	0.67	2	1b	RVS
P21 (Muestra 43)	2	0.50	1	1a /1b	RVS
P22 (Muestra 35)	1	0	0	1b	RVS
P23 (Muestra 26)	2	0.50	1	1a	RVS
P25 (Muestra 45)	2	0.50	1	1a	RVS
P28 (Muestra 46)	1	0	0	1a /1b	RVS
P30 (Muestra 30)	4	2.33	7	1b	RVS
P31 (Muestra 48)	2	0.50	1	1a /1b	RVS
P32 (Muestra 44)	2	0.50	1	1b	RVS
P33 (Muestra 49)	1	0	0	1a /1b	RVS
P34 (Muestra 41)	3	0.67	2	1b	RVS
P37 (Muestra 50)	2	0.50	1	1b	RVS
P2 (Muestra 1)	6	0.83	5	1b	No-RVS
P5 (Muestra 21)	1	0	0	1b	No-RVS
P7 (Muestra 32)	3	0.67	2	1b	No-RVS
P26 (Muestra 14)	16	0.94	12	1a	No-RVS
P29 (Muestra 16)	4	5.00	8	1b	No-RVS
P36 (Muestra 18)	1	0	0	1a	No-RVS
P3 (Muestra 6)	6	0.83	5	1b	No-RVS
P4 (Muestra 12)	4	3.50	7	1b	No-RVS
P6 (Muestra 23)	1	1.00	1	1a /1b	No-RVS
P8 (Muestra 11)	9	1.44	11	1b	No-RVS
P9 (Muestra 2)	14	0.93	11	1b	No-RVS
P10 (Muestra 15)	2	3.00	6	1b	No-RVS
P11 (Muestra 25)	1	0	0	1b	No-RVS
P24 (Muestra 20)	2	0.50	1	1a /1b	No-RVS
P27 (Muestra 24)	2	0.50	1	1a /1b	No-RVS
P35 (Muestra 22)	4	0.75	3	1a /1b	No-RVS

P: paciente; RVS: Respuesta Viroológica Sostenida; no-RVS: no Respuesta Viroológica Sostenida

Al estudiar las variables del estudio, según respuesta al tratamiento (RVS, RC, NR, no-RVS), los pacientes con RVS tenían menos haplotipos diferentes ( $P = 0,07$ ), un número promedio menor de mutaciones por haplotipos ( $P = 0,01$ ) y menos sitios polimórficos en el conjunto de haplotipos ( $P = 0,02$ ) que los no pacientes con RVS (tabla 10).

**TABLA 10.** Análisis estadístico por número de haplotipos, número de mutaciones / haplotipos y número de sitios polimórficos.

			no-RVS					
			RVS (n=21)	RC (n=6)	NR (n=10)	no- RVS (n=16)	P*	P**
<b>Número</b>	<b>medio</b>	<b>de</b>	2.19 ±	5.17 ±	4.5 ±	4.75 ±	0.07	n.s
<b>haplotipos</b>			0.2	2.3	1.3	1.1		
<b>Número</b>	<b>medio</b>	<b>de</b>	0.48 ±	1.24 ±	1.24 ±	1.24 ±	0.01	0.03
<b>mutaciones/haplotipo</b>			0.1	0.7	0.8	0.3		
<b>Número</b>	<b>medio</b>	<b>de</b>	1.43 ±	4.5 ±	4.6 ±	4.56 ±	0.02	0.06
<b>polimórficos</b>	<b>sitios</b>		0.3	1.9	1.3	1		

Respuesta virológica sostenida (RVS), recidiva (RC), no-respondedores (NR).

\*RVS vs. no-RVS; Mann-Whitney U test.

\*\*RVS vs. RP vs. NR; Kruskal-Wallis test.

La Figura 11 muestra el alineamiento de la secuencia consenso de la región NS3<sub>1253-1272</sub>, El del alelo HLA DQB1\*030. De las muestras basales procedentes de 21 pacientes con RVS y 16 pacientes con no RVS, 10/37 pacientes solamente presentaron el haplotipo de tipo salvaje (haplotipo 1) (7 RVS y 3 no RVS). El haplotipo mayoritario fue la secuencia de tipo salvaje, que apareció en mayor proporción entre los pacientes con RVS (RVS: 92,4% ± 3,7%; no-RVS: 84,3% ± 7,2;  $P = 0,04$ ). Sin embargo, la proporción de haplotipos mutados fue mayor entre los pacientes no-RVS (RVS: 4,5% ± 3,6, no RVS: 17,3% ± 8,4,  $P = 0,04$ ). Por otro lado observamos en la tabla 8 que sólo 1 paciente (muestra 23) no presentó el haplotipo salvaje (H1) y que dos muestras (las muestras 12 y 16) presentaron un 4,94% y un 27,53% del H1, siendo los 3

pacientes no-RVS, mientras que entre los pacientes con RVS, solo uno (muestra 43) tenían un 18,61% del haplotipo salvaje.

	POSITION	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Samples (n)	Haplotypes (n)	%
	Wild-Type	G	Y	K	V	L	V	L	N	P	S	V	A	A	T	L	G	F	G	A	Y			
Sample27,35,37,39,46,47,49	SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	7/21	1	92.4†
Sample26	SVR	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1/21	2	
Sample29,34	SVR	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2/21	2	
Sample45	SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1/21	2	
Sample44	SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	1/21	2	
Sample48	SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	1/21	2	
Sample50	SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	1/21	2	4.5†
Sample31	SVR	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	1/21	3	
Sample41	SVR	.	.	.	A	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1/21	3	
Sample33	SVR	.	.	E	A	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1/21	4	
Sample38	SVR	.	.	.	A	.	.	.	S	L	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	1/21	5	
Sample40	SVR	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	T	S	.	.	.	S	.	.	.	1/21	5	
Sample43	SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	*	*	*	*	1/21	2	
Sample30	SVR	.	.	.	A	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	*	*	*	*	*	1/21	4	
Sample18,21,25	non-SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3/16	1	84.3†
Sample24	non-SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	.	.	1/16	2	
Sample20	non-SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1/16	2	
Sample23	non-SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	1/16	1	
Sample15	non-SVR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	*	*	*	*	1/16	2	
Sample12	non-SVR	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	*	*	V/*	*	1/16	4	
Sample32	non-SVR	.	.	.	A	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1/16	3	
Sample22	non-SVR	.	.	.	A	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	1/16	4	17.3†
Sample16	non-SVR	.	.	.	.	A	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	*	*	*	*	*	1/16	4	
Sample1	non-SVR	.	.	E	A	.	.	S	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	1/16	6	
Sample11	non-SVR	.	.	.	A	P	.	P	S	.	P	.	.	.	.	S/*	*	*	*	*	H/*	1/16	9	
Sample6	non-SVR	.	.	.	A	P	.	P	S	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	1/16	6	
Sample2	non-SVR	R	C	E/R	A	P	.	P	D/S	L	A	A	.	.	.	S	.	.	.	.	1/16	14		
Sample14	non-SVR	.	C	E/R	A	P	.	P	D/S	.	T	.	V	T	.	S	.	.	.	.	C/H	1/16	16	

**Figura 11.** Alineamiento de la secuencia consenso de la región NS3<sub>1253-1272</sub>, epítipo inmunodominante del alelo HLA DQB1\*030

Seis pacientes tenían un codón de parada en la posición 15 (2 RVS y 4 no RVS).

Tres sitios polimórficos se asociaron con los pacientes no-RVS: haplotipo 7, aa5 (L5P); haplotipo 11, aa7 (L7P); y haplotipo 15, aa15 (L15S) (RVS: 0/21, no RVS: 4/16, P = 0,02, paciente 3 / muestra 6, paciente 8 / muestra 11, paciente 9 / muestra 2 y paciente 26 / muestra 14).

Por otro lado a 5 pacientes con no-RVS se les hizo un seguimiento (Figura 12), cuyas muestras obtenidas durante el tratamiento y después del mismo se sometieron a secuenciación. En cuatro de ellos, el número de mutaciones había disminuido al concluir el tratamiento, mientras que en el paciente restante, el número de mutaciones había aumentado, aunque no encontramos diferencias significativas (P> 0.05).

Patient/ Response	POSITION	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Number Mutated Haplotypes
	Wild-Type	G	Y	K	V	L	V	L	N	P	S	V	A	A	T	L	G	F	G	A	Y	
Patient 3 -NR	Basal	.	.	.	A	P	.	P	S	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	5
	Treatment	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
	Post-Treatment	.	.	.	A	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	S	.	L	.	.	.	4
Patient 9 -NR	Basal	R	C	E/R	A	P	.	P	D/S	L	A	A	.	.	.	S	.	.	.	.	.	13
	Treatment	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	1
	Post-Treatment	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
Patient 2 -RP	Basal	.	.	E	A	.	.	.	S	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	H	5
	Post-Treatment	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	1
Patient 26-RP	Basal	.	.	.	.	P	A	.	.	.	.	.	.	.	.	*	*	*	*	*	*	3
	Post-Treatment	.	C	E/R	A	P	.	P	D/S	.	T	.	V	T	.	S	.	.	.	.	C/H	14
Patient 29-RP	Basal	.	.	.	.	.	A	.	S	.	.	.	.	.	.	*	*	*	*	*	*	3
	Post-Treatment	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	*	*	*	*	*	1

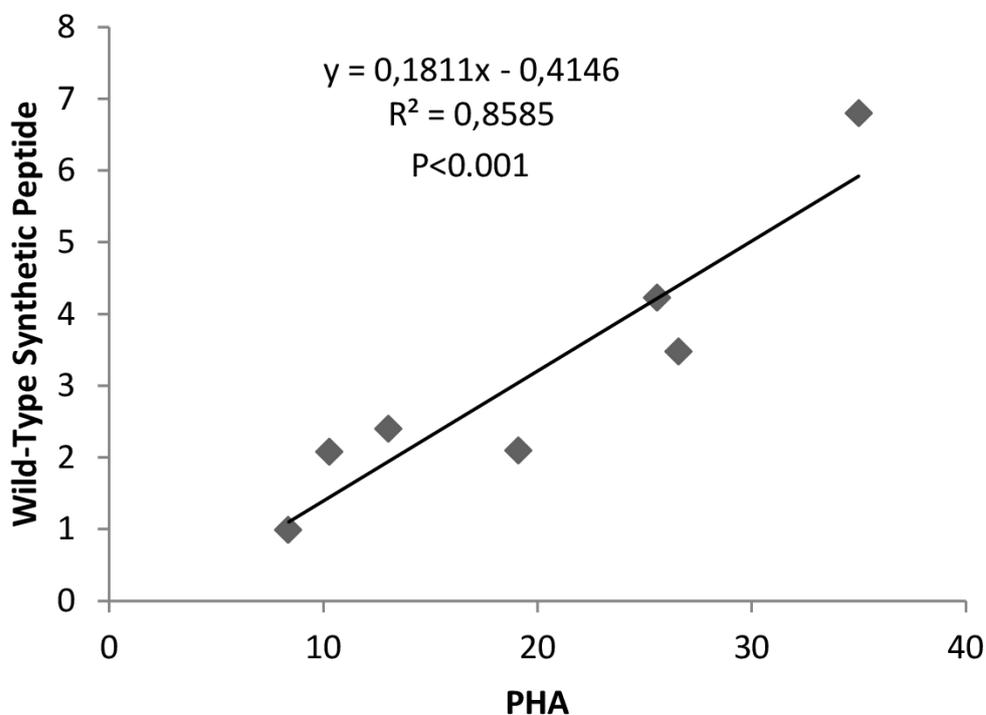
Figura 12. Alineamiento de la secuencia consenso de la región NS3<sub>1253-1272</sub>, epítipo inmunodominante del alelo HLA DQB1\*030 de pacientes no-RVS.

## 5.2. Objetivo 2: Respuesta proliferativa de células T a péptidos sintéticos NS3<sub>1253-1272</sub> del Virus de la Hepatitis C (VHC)

Debido a que no estaba claro si las sustituciones de aminoácidos observadas en el epítipo NS3<sub>1253-1272</sub> inmunodominante del alelo HLA-DQB1\*0301 habían producido un escape viral a la respuesta de las células T CD4+, decidimos comprobar si ésta era la causa evaluando el impacto de las mutaciones, individualmente o en conjunto, con respecto a su capacidad para estimular células T CD4+, aislando las propias células de los pacientes. Por consiguiente, se seleccionaron 7 de los pacientes que habían sido sometidos a pirosecuenciación (los criterios de inclusión se describen en la sección de metodología). De los haplotipos presentes en estos 7 pacientes, se sintetizaron 9 péptidos sintéticos diseñados a partir de los haplotipos encontrados (Tabla 7): el péptido salvaje, péptidos H7, H11 y H15 (correspondientes a los haplotipos 7, 11 y 15) que se asociaron directamente con la falta de respuesta, y H2, H5, H30, H18 y H14 (correspondientes a los haplotipos 2, 5, 30, 18 y 14), que fueron los haplotipos encontrados en los

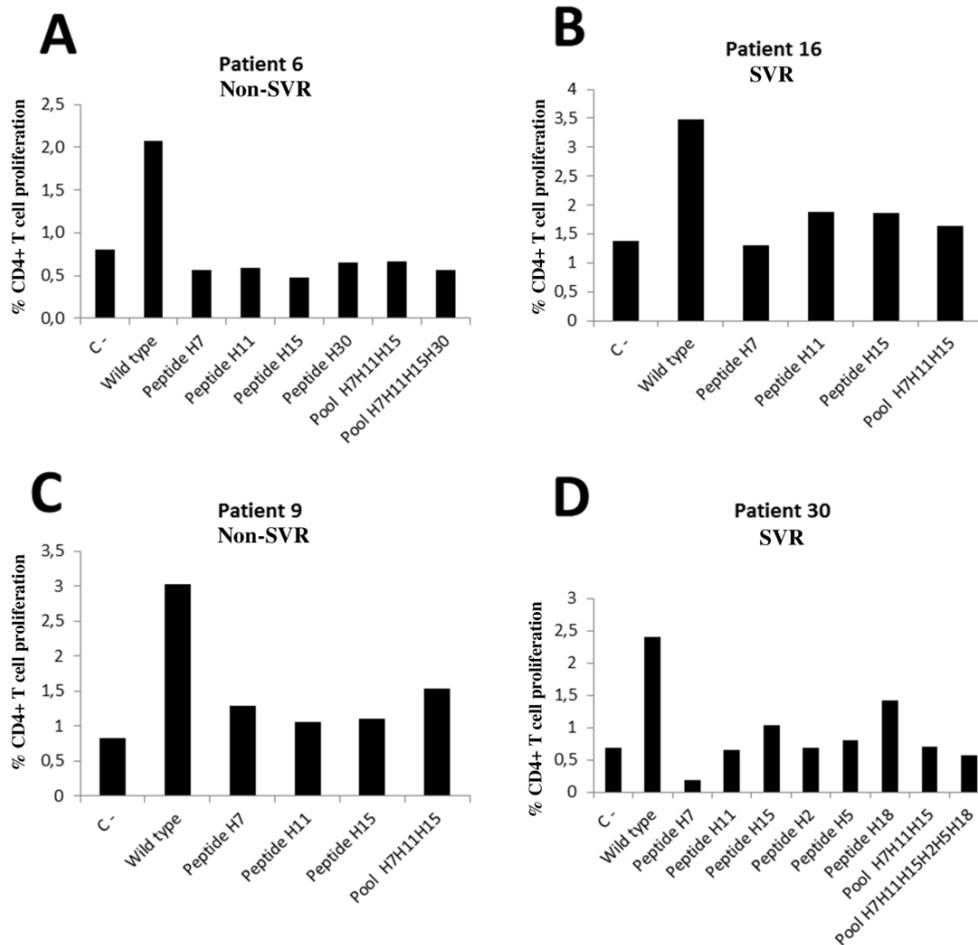
pacientes del estudio. Cada experimento por triplicado in vitro se llevó a cabo con PBMCs de cada paciente, y se trató con: PHA (control positivo), un control negativo (sin estimulación), el péptido de tipo salvaje, los péptidos mutados H7, H11 y H15, un conjunto de los tres, y con cada uno de los péptidos correspondientes a los haplotipos encontrados en el estudio viral (pirosecuenciación), junto con un conjunto de todos estos últimos péptidos. Los péptidos H7, H11, H15 se usaron en todos los pacientes, porque estaban directamente asociados con la falta de respuesta. Los péptidos mutados (individualmente o agrupados) se compararon con el péptido de tipo salvaje en ensayos de proliferación de células T CD4 + con PBMC recogidas de cada paciente.

Se realizó un estudio de correlación para demostrar que los niveles de estimulación de CD4 + por péptidos sintéticos de tipo salvaje se correlacionan con la proliferación obtenida con el control positivo. Por lo tanto, si la PHA producía poca estimulación, hubo poca estimulación con los péptidos sintéticos ( $R^2 = 0,8585$ ;  $P < 0,001$ ) (Figura 13), como era de esperar.

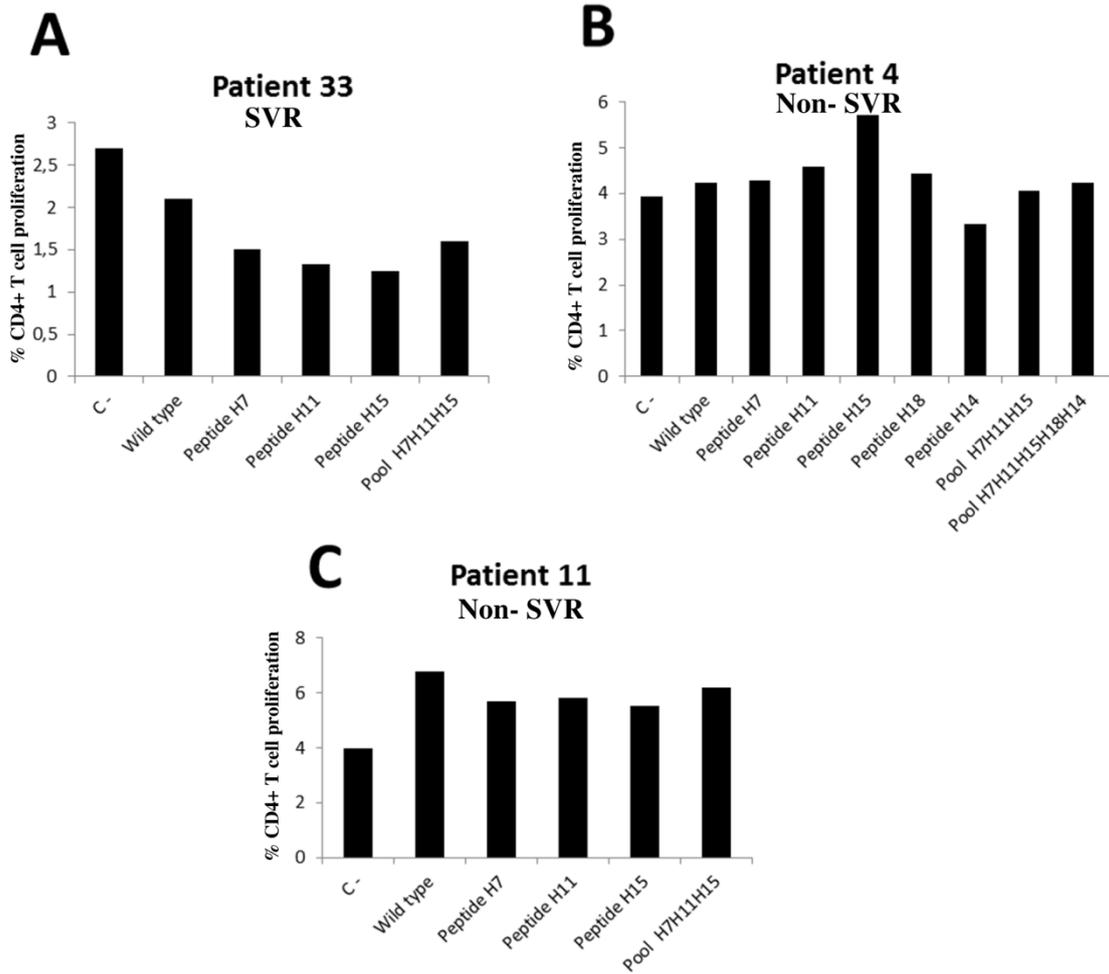


**Figura 13.** El nivel de estimulación de CD4 + por péptidos sintéticos de tipo salvaje depende de la proliferación obtenida con el control positivo (PHA)

De acuerdo con nuestra hipótesis de estudio, en 4 pacientes, los péptidos mutados no produjeron un aumento en la proliferación de las células T CD4+ pero el péptido de tipo salvaje sí tuvo este efecto; mientras que en 3 pacientes, no se observó esta tendencia. Debido a esta causa, los pacientes los dividimos en dos grupos, el Grupo 1, compuesto por los cuatro pacientes entre quienes se cumplió la hipótesis, y el Grupo 2, que contenía los pacientes que no confirmaron la hipótesis. Grupo 1: (n = 4; péptido de tipo salvaje,  $2,7\% \pm 0,6\%$  proliferación frente a péptidos mutados,  $1,1\% \pm 0,5\%$ ;  $P = 0,039$ ) (Figura 14: A, B, C,D); Grupo 2: (n = 3, péptido de tipo salvaje,  $4,3\% \pm 2,3\%$  proliferación frente a péptido mutado,  $4\% \pm 2,3\%$ ,  $P = 0,7$ ) (Figura 15: A, B, C).



**Figura 14.** Proliferación de células T CD4 + debido a la estimulación de péptidos en los pacientes del Grupo 1.



**Figura 15.** Proliferación de células T CD4 + debido a la estimulación de péptidos en los pacientes del Grupo 2.

La principal diferencia observada entre el Grupo 1 y el Grupo 2 de pacientes fue que aquellos que coincidían con el patrón esperado (Grupo 1) presentaban valores más bajos de proliferación CD4+ con el control negativo que el grupo que no coincidía con el patrón (control negativo: 0,9% ± 0,3% de proliferación frente a 3,5% ± 0,7 respectivamente, P = 0,05; prueba de Mann-Whitney), lo que sugiere que hay un menor nivel de tolerancia inmune en los pacientes del Grupo 2.



## **DISCUSIÓN**

---



## 6. DISCUSIÓN

Una presentación efectiva de los antígenos virales por las moléculas HLA clase I y II a las células T CD8 + y CD4 + es esencial para una respuesta inmune adecuada a la infección viral. Se sabe que los pacientes en los que la enfermedad es crónica tienen una respuesta más baja de las células T CD4+ que aquellos pacientes que eliminan el virus [23, 81]. Los factores genéticos del huésped, como HLA-DQB1\*0301 e IL-28B se han asociado fuertemente con el aclaramiento viral espontáneo y la respuesta a la terapia antiviral. Estas consideraciones resaltan la importancia del mecanismo de unión viral del HLA-Ag contra la proliferación efectiva de CD4 + y CD8 +, en la cual el antígeno viral, E1, juega un papel importante. Hemos estudiado la variabilidad antigénica de este E1, en particular NS3<sub>1253-1272</sub> (por pirosecuenciación) y su importancia para desencadenar la activación efectiva de CD4 + a través de su molécula HLA-DQB1\*0301 (por estudios in vitro), encontrando que la presencia de mutaciones en el E1 provoca una respuesta pobre al tratamiento antiviral, que se debe en parte al aumento de la tolerancia inmune inducida por una presentación inadecuada del antígeno por parte de las moléculas del MHC de clase II (DQB1\*0301) a las células T CD4 +.

En los últimos años, con la llegada de las técnicas de secuenciación masiva, ha sido posible determinar el número y tipo de variantes virales encontradas en pacientes infectados. Mediante la pirosecuenciación, podemos identificar haplotipos que se encuentran en proporciones muy bajas, de solo el 0,1% de la población total. Esta técnica es altamente sensible [82], a diferencia de otros métodos comúnmente utilizados como la secuenciación directa de Sanger, que tiene una sensibilidad de solo 15-20% para detectar variantes menores; además, requiere una clonación extensiva, es más lenta y más costosa [83, 84]. La pirosecuenciación llevada a cabo en

nuestro estudio muestra que tanto el número de mutaciones como el número de sitios polimórficos de NS3<sub>1253-1272</sub>, E1, son significativamente mayores en pacientes no RVS que en pacientes con RVS, y el grupo no-RVS presenta más del doble haplotipos que el grupo RVS.

Larrat y colaboradores [85] en un estudio en el que se realizaron pirosecuenciación para la región NS3<sub>1253-1272</sub> de pacientes que recibían terapia triple, obtuvieron resultados similares, indicando que la heterogeneidad de las cuasiespecies era menor en pacientes con RVS que en aquellos con no-RVS. La mayor heterogeneidad de cuasiespecies en estos últimos pacientes también fue observada por Sato y colaboradores [86], quienes secuenciaron la región NS3<sub>1253-1272</sub> de 34 pacientes en dos puntos de tiempo iniciales y a las 12 horas después de administrar terapia triple con Telaprevir, peg-IFN y RBV. Estos autores encontraron que la frecuencia de mutaciones fue significativamente menor a las 12 horas entre los pacientes con RVS, en comparación con aquellos con no-RVS. Además de ello comprobaron que la composición de cuasiespecies virales presentaba cuasiespecies resistentes. Por tanto no es solo la heterogeneidad de la cuasiespecie/haplotipo lo que se ha asociado con una menor tasa de RVS; sino también la aparición de mutaciones puntuales en la región NS3<sub>1253-1272</sub>.

Por otro lado, Dietz y colaboradores [87] encontraron que la mutación Q80K en la región NS3 tiene una prevalencia mucho más alta en pacientes con genotipo 1a que en pacientes con genotipo 1b, generando cuasiespecies resistentes a AADs. En nuestro trabajo hemos encontrado tres sitios polimórficos asociados con pacientes no-RVS, L5P (haplotipo 7), L7P (haplotipo 11) y L15S (haplotipo 15), apareciendo los tres haplotipos de manera simultánea. Estas mutaciones no se han descrito en ninguna investigación previa. En dos de estas mutaciones, hay un cambio de aminoácido, de lisina a prolina. Creemos que esta mutación en particular es importante, ya que la aparición de prolina descompone la  $\alpha$ -hélice en la estructura de la proteína, produciendo un cambio drástico. En nuestra opinión, también el cambio en el grupo de un aminoácido (hidrofóbico, polar, ácido y básico) presupone una alteración en la función y en la

estructura. Numerosos estudios han concluido que cuando estos Els están mutados, hay menos respuesta CD4 + y CD8 + que evita la eliminación viral [88-90]. En 2006, Puig y colaboradores [91] realizaron un estudio en el que los chimpancés se inmunizaron con péptidos sintetizados a partir de secuencias de Els de la región NS3, y observaron que cuando estos péptidos estaban mutados no eran reconocidos por las células T, probablemente debido a no existir reconocimiento del VHC a través de las moléculas HLA de clase II.

Con el fin de determinar si las mutaciones encontradas en nuestros pacientes impiden la respuesta inmune CD4+, las propias células de los pacientes se cultivaron junto a péptidos sintéticos mutados en los mismos sitios correspondientes a su población viral. En el grupo 1 (n=4) los péptidos mutados no produjeron un aumento en la proliferación de las células T CD4 + debido a la inadecuada presentación del antígeno por las moléculas MHC de clase II DQB1\*0301 a las células T CD4+, mientras que el péptido de tipo salvaje causó un aumento en la proliferación de dichas células. Esto no ocurrió en el Grupo 2 (n=3) probablemente debido a que presentaban un nivel más bajo de tolerancia inmunológica, ya que comprobamos que los pacientes del grupo 2 presentaban altos niveles basales de estimulación y, por lo tanto, no era probable que alcanzara la proliferación de CD4 + con la estimulación con péptido.

Se han descrito estudios similares a los nuestros. Por ejemplo, Cubero y colaboradores [92] sugirieron que la variabilidad de aminoácidos en el carboxi-terminal grupo del dominio NS3 podría afectar la respuesta inmune de las células CD4 +, contribuyendo así a la cronicidad de la enfermedad. En este estudio se desarrollaron cultivos celulares de células CD4 + junto a un grupo de 13 péptidos mutados sintetizados a partir de los haplotipos encontrados en el suero del paciente. Los resultados obtenidos muestran que la población viral es más homogénea cuando la infección es aguda y forma un cuello de botella cuando la enfermedad es crónica. Resultados similares fueron obtenidos por Wang y colaboradores [93], que informaron que las mutaciones en los epítomos de la región NS3, además de producir la pérdida de reconocimiento del antígeno viral, pueden inhibir la producción de citoquinas necesarias para que se produzca la respuesta inmune, y se debilitan por la estimulación de ciertas citoquinas, como IL-2.

También es cierto que aunque la presencia de mutaciones no parece tener un impacto clínico significativo en la nueva era de AADs sin interferón [94, 95], la presencia de poblaciones minoritarias resistentes probablemente sea relevante para el éxito o no de la terapia y el uso prolongado de AAD, ya que la presencia de estos polimorfismos puede impedir la respuesta completa del paciente, aunque la tasa de respuesta de los nuevos AADs sea muy alta. Es por eso que es de gran importancia continuar estudiando las mutaciones de regiones conservadas como NS3, que además de ser una región altamente conservada, en ésta región se encuentran ciertos EIs necesarios para producir una respuesta inmune adecuada, siendo el estudio de esta región importante para el diseño de vacunas terapéuticas. Igualmente hemos visto que autores como Bes y colaboradores [96] han producido la expansión in vitro de antígenos virales específicos de NS3 de tipo salvaje, restaurando la producción de IFN e IL-2 a niveles similares a los de los pacientes respondedores.

Por tanto creemos que en un futuro no muy lejano, será posible realizar un seguimiento personalizado de cada paciente, ya que estas técnicas de pirosecuenciación son cada vez más baratas y más rápidas, y de esta manera predecir la respuesta a los tratamientos dependiendo de si presentan o no ciertos haplotipos. Este conocimiento puede ser crucial para decidir si administrar o no el tratamiento, lo que ayuda a evitar efectos secundarios indeseables y permite un ahorro económico significativo.

## **CONCLUSIONES**

---



## 7. CONCLUSIONES

1. Los pacientes sin RVS tienen 4,75 veces más haplotipos mutados que los pacientes con RVS.
2. En las muestras basales, los pacientes con RVS tienen menor número de haplotipos, un número promedio menor de mutaciones por haplotipos y menos sitios polimórficos en el conjunto de haplotipos que los no pacientes con RVS.
3. El haplotipo salvaje aparece en mayor proporción en los pacientes con RVS que en los pacientes no-RVS, mientras que el % de haplotipos mutados es mayor en los pacientes con no-RVS.
4. Tres sitios polimórficos se asociaron con los pacientes sin RVS: posición aa5 (L5P); posición aa7 (L7P); y posición aa15 (L15S).
5. En el estudio de seguimiento de mutaciones durante y postratamiento en pacientes con no-RVS, no encontramos diferencias significativas en el número de mutaciones entre la basal y el postratamiento, aunque la tendencia es a disminuir. Quizás necesitamos aumentar el tamaño de muestra.
6. En los estudios in vitro, vemos que el porcentaje de estimulación de células CD4+ es mayor con la presencia de péptido sintético sin mutaciones que con la presencia de péptidos sintéticos mutados con diferencias significativas. Sin embargo encontramos un grupo de

pacientes que no sigue este patrón probablemente debido a que presentan un menor nivel de tolerancia inmune.

Como conclusión final decimos que, aunque la presencia de mutaciones no parece tener un impacto clínico significativo en la nueva era de AADs sin interferón, la presencia de poblaciones minoritarias resistentes probablemente sea relevante para el éxito o no de la terapia y el uso prolongado de AAD, ya que la presencia de estos polimorfismos puede impedir la respuesta completa del paciente, aunque la tasa de respuesta de los nuevos AADs es muy alta.

## **BIBLIOGRAFÍA**



## 1. BIBLIOGRAFÍA

1. Choo, Q.L., et al., *Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome*. Science, 1989. 244(4902): p. 359-62.
2. Esteban, J.I., et al., *Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain*. Lancet, 1989. 2(8658): p. 294-7.
3. Kuo, G., et al., *An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis*. Science, 1989. 244(4902): p. 362-4.
4. Lozano, R., et al., *Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet, 2012. 380(9859): p. 2095-128.
5. Hoofnagle, J.H., *Course and outcome of hepatitis C*. Hepatology, 2002. 36(5 Suppl 1): p. S21-9.
6. Eisen-Vandervelde, A.L., Z.Q. Yao, and Y.S. Hahn, *The molecular basis of HCV-mediated immune dysregulation*. Clin Immunol, 2004. 111(1): p. 16-21.
7. Alazawi, W., et al., *Systematic review: outcome of compensated cirrhosis due to chronic hepatitis C infection*. Aliment Pharmacol Ther, 2010. 32(3): p. 344-55.
8. Martell, M., J. Gomez, and J.I. Esteban, *[Molecular biology in the study of hepatitis C virus]*. Gastroenterol Hepatol, 2001. 24 Suppl 1: p. 1-6.
9. Hourieux, C., et al., *The genotype 3-specific hepatitis C virus core protein residue phenylalanine 164 increases steatosis in an in vitro cellular model*. Gut, 2007. 56(9): p. 1302-8.
10. Sheridan, I., et al., *High-resolution phylogenetic analysis of hepatitis C virus adaptation and its relationship to disease progression*. J Virol, 2004. 78(7): p. 3447-54.
11. Munoz de Rueda, P., et al., *Mutations in E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR, and NS5A-V3 of hepatitis C virus genotype 1 and their relationships to pegylated interferon-ribavirin treatment responses*. J Virol, 2008. 82(13): p. 6644-53.

12. Murphy, M.D., et al., *Analysis of sequence configurations of the ISDR, PKR-binding domain, and V3 region as predictors of response to induction interferon-alpha and ribavirin therapy in chronic hepatitis C infection.* Dig Dis Sci, 2002. 47(6): p. 1195-205.
13. Pawlotsky, J.M., *Hepatitis C virus population dynamics during infection.* Curr Top Microbiol Immunol, 2006. 299: p. 261-84.
14. Luring, A.S. and R. Andino, *Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses.* PLoS Pathog, 2010. 6(7): p. e1001005.
15. Hijikata, M., et al., *Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(13): p. 5547-51.
16. Fishman, S.L. and A.D. Branch, *The quasispecies nature and biological implications of the hepatitis C virus.* Infect Genet Evol, 2009. 9(6): p. 1158-67.
17. Enomoto, N., et al., *Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region.* J Clin Invest, 1995. 96(1): p. 224-30.
18. Simmonds, P., et al., *Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region.* J Gen Virol, 1993. 74 ( Pt 11): p. 2391-9.
19. Nakano, T., et al., *An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region.* Liver Int, 2012. 32(2): p. 339-45.
20. Ghany, M.G., et al., *Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update.* Hepatology, 2009. 49(4): p. 1335-74.
21. Liang, T.J., et al., *Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C.* Ann Intern Med, 2000. 132(4): p. 296-305.
22. Lopez Labrador, F.J., *[Immune cellular response in hepatitis C].* Gastroenterol Hepatol, 2001. 24 Suppl 1: p. 29-34.
23. Diepolder, H.M., et al., *Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection.* Lancet, 1995. 346(8981): p. 1006-7.

24. 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.
25. 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.
26. Kurosaki, M., et al., *Rapid sequence variation of the hypervariable region of hepatitis C virus during the course of chronic infection*. Hepatology, 1993. 18(6): p. 1293-9.
27. Weiner, A.J., et al., *Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins*. Virology, 1991. 180(2): p. 842-8.
28. Major, M.E., et al., *Long-term follow-up of chimpanzees inoculated with the first infectious clone for hepatitis C virus*. J Virol, 1999. 73(4): p. 3317-25.
29. Bassett, S.E., et al., *Viral persistence, antibody to E1 and E2, and hypervariable region 1 sequence stability in hepatitis C virus-inoculated chimpanzees*. J Virol, 1999. 73(2): p. 1118-26.
30. Missale, G., et al., *Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response*. J Clin Invest, 1996. 98(3): p. 706-14.
31. *National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C 2002 (June 10-12, 2002)*. Gastroenterology, 2002. 123(6): p. 2082-99.
32. Ghany, M.G., et al., *Progression of fibrosis in chronic hepatitis C*. Gastroenterology, 2003. 124(1): p. 97-104.
33. Seeff, L.B. and J.H. Hoofnagle, *National Institutes of Health Consensus Development Conference: management of hepatitis C: 2002*. Hepatology, 2002. 36(5 Suppl 1): p. S1-2.
34. Hoofnagle, J.H., et al., *Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report*. N Engl J Med, 1986. 315(25): p. 1575-8.
35. Chen, C.H. and M.L. Yu, *Evolution of interferon-based therapy for chronic hepatitis C*. Hepat Res Treat, 2010. 2010: p. 140953.

36. Shiffman, M.L., *Pegylated interferons: what role will they play in the treatment of chronic hepatitis C?* Curr Gastroenterol Rep, 2001. 3(1): p. 30-7.
37. Di Bisceglie, A.M., et al., *Ribavirin as therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial.* Ann Intern Med, 1995. 123(12): p. 897-903.
38. McHutchison, J.G., et al., *Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group.* N Engl J Med, 1998. 339(21): p. 1485-92.
39. Fried, M.W., et al., *Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection.* N Engl J Med, 2002. 347(13): p. 975-82.
40. 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.
41. Chung, R.T., et al., *Mechanisms of action of interferon and ribavirin in chronic hepatitis C: Summary of a workshop.* Hepatology, 2008. 47(1): p. 306-20.
42. Jensen, D.M., *A new era of hepatitis C therapy begins.* N Engl J Med, 2011. 364(13): p. 1272-4.
43. Au, J.S. and P.J. Pockros, *Novel therapeutic approaches for hepatitis C.* Clin Pharmacol Ther, 2014. 95(1): p. 78-88.
44. Wendt, A., et al., *Chronic hepatitis C: future treatment.* Clin Pharmacol, 2014. 6: p. 1-17.
45. Manns, M.P., et al., *Vaniprevir with pegylated interferon alpha-2a and ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C: a randomized phase II study.* Hepatology, 2012. 56(3): p. 884-93.
46. Pawlotsky, J.M., *Hepatitis C virus resistance to antiviral therapy.* Hepatology, 2000. 32(5): p. 889-96.
47. Kau, A., J. Vermehren, and C. Sarrazin, *Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C.* J Hepatol, 2008. 49(4): p. 634-51.
48. Jacobson, I.M., et al., *Standardization of terminology of virological response in the treatment of chronic hepatitis C: panel recommendations.* J Viral Hepat, 2012. 19(4): p. 236-43.

49. Hezode, C., et al., *Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection*. N Engl J Med, 2009. 360(18): p. 1839-50.
50. Poordad, F., et al., *Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection*. N Engl J Med, 2011. 364(13): p. 1195-206.
51. Zeuzem, S., et al., *Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3*. J Hepatol, 2004. 40(6): p. 993-9.
52. Gale, M., Jr. and E.M. Foy, *Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus*. Nature, 2005. 436(7053): p. 939-45.
53. Neumann, A.U., et al., *Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy*. Science, 1998. 282(5386): p. 103-7.
54. Krebs, D.L. and D.J. Hilton, *SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling*. J Cell Sci, 2000. 113 ( Pt 16): p. 2813-9.
55. Song, M.M. and K. Shuai, *The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities*. J Biol Chem, 1998. 273(52): p. 35056-62.
56. Larrea, E., et al., *Tumor necrosis factor alpha gene expression and the response to interferon in chronic hepatitis C*. Hepatology, 1996. 23(2): p. 210-7.
57. Polyak, S.J., et al., *Evolution of hepatitis C virus quasispecies in hypervariable region 1 and the putative interferon sensitivity-determining region during interferon therapy and natural infection*. J Virol, 1998. 72(5): p. 4288-96.
58. Salmeron, J., et al., *Quasispecies as predictive response factors for antiviral treatment in patients with chronic hepatitis C*. Dig Dis Sci, 2006. 51(5): p. 960-7.
59. Salmeron, J., et al., *Quasispecies as predictive factor of rapid, early and sustained virological responses in chronic hepatitis C, genotype 1, treated with peginterferon-ribavirin*. J Clin Virol, 2008. 41(4): p. 264-9.
60. Farci, P., *New insights into the HCV quasispecies and compartmentalization*. Semin Liver Dis, 2011. 31(4): p. 356-74.
61. Hofmann, W.P., S. Zeuzem, and C. Sarrazin, *Hepatitis C virus-related resistance mechanisms to interferon alpha-based antiviral therapy*. J Clin Virol, 2005. 32(2): p. 86-91.

62. Manns, M.P., et al., *Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial*. *Lancet*, 2001. 358(9286): p. 958-65.
63. Muir, A.J., et al., *Peginterferon alfa-2b and ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C in blacks and non-Hispanic whites*. *N Engl J Med*, 2004. 350(22): p. 2265-71.
64. 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.
65. Ge, D., et al., *Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance*. *Nature*, 2009. 461(7262): p. 399-401.
66. Schiff, E.R., *The alcoholic patient with hepatitis C virus infection*. *Am J Med*, 1999. 107(6B): p. 95S-99S.
67. Ohnishi, K., et al., *Interferon therapy for chronic hepatitis C in habitual drinkers: comparison with chronic hepatitis C in infrequent drinkers*. *Am J Gastroenterol*, 1996. 91(7): p. 1374-9.
68. 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.
69. Ortiz, V., et al., *Contribution of obesity to hepatitis C-related fibrosis progression*. *Am J Gastroenterol*, 2002. 97(9): p. 2408-14.
70. Berg, T., et al., *Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1: comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon-alfa-2a plus ribavirin*. *Gastroenterology*, 2006. 130(4): p. 1086-97.
71. 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.
72. Hassan, I. and F. Ahmad, *Structural diversity of class I MHC-like molecules and its implications in binding specificities*. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2011. 83: p. 223-70.
73. Shao, W., et al., *Molecular typing of human leukocyte antigen and related polymorphisms following whole genome amplification*. *Tissue Antigens*, 2004. 64(3): p. 286-92.

74. Harris, R.A., et al., *Human leukocyte antigen class II associations with hepatitis C virus clearance and virus-specific CD4 T cell response among Caucasians and African Americans*. *Hepatology*, 2008. 48(1): p. 70-9.
75. Hong, X., et al., *Human leukocyte antigen class II DQB1\*0301, DRB1\*1101 alleles and spontaneous clearance of hepatitis C virus infection: a meta-analysis*. *World J Gastroenterol*, 2005. 11(46): p. 7302-7.
76. Yee, L.J., *Host genetic determinants in hepatitis C virus infection*. *Genes Immun*, 2004. 5(4): p. 237-45.
77. Singh, R., et al., *A comparative review of HLA associations with hepatitis B and C viral infections across global populations*. *World J Gastroenterol*, 2007. 13(12): p. 1770-87.
78. von Hahn, T., et al., *Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo*. *Gastroenterology*, 2007. 132(2): p. 667-78.
79. Lamnaca, V., et al., *Conserved hepatitis C virus sequences are highly immunogenic for CD4(+) T cells: implications for vaccine development*. *Hepatology*, 1999. 30(4): p. 1088-98.
80. Diepolder, H.M., et al., *Immunodominant CD4+ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection*. *J Virol*, 1997. 71(8): p. 6011-9.
81. Wertheimer, A.M., et al., *Novel CD4+ and CD8+ T-cell determinants within the NS3 protein in subjects with spontaneously resolved HCV infection*. *Hepatology*, 2003. 37(3): p. 577-89.
82. Caraballo Cortes, K., et al., *Ultradeep pyrosequencing of hepatitis C virus hypervariable region 1 in quasispecies analysis*. *Biomed Res Int*, 2013. 2013: p. 626083.
83. Farci, P., et al., *Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(5): p. 3081-6.
84. Cuevas, J.M., et al., *Refined analysis of genetic variability parameters in hepatitis C virus and the ability to predict antiviral treatment response*. *J Viral Hepat*, 2008. 15(8): p. 578-90.
85. Larrat, S., et al., *Ultradeep pyrosequencing of NS3 to predict response to triple therapy with protease inhibitors in previously treated chronic hepatitis C patients*. *J Clin Microbiol*, 2015. 53(2): p. 389-97.

86. Sato, M., et al., *Deep sequencing and phylogenetic analysis of variants resistant to interferon-based protease inhibitor therapy in chronic hepatitis induced by genotype 1b hepatitis C virus*. J Virol, 2015. 89(11): p. 6105-16.
87. Dietz, J., et al., *Consideration of Viral Resistance for Optimization of Direct Antiviral Therapy of Hepatitis C Virus Genotype 1-Infected Patients*. PLoS One, 2015. 10(8): p. e0134395.
88. Timm, J., et al., *CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection*. J Exp Med, 2004. 200(12): p. 1593-604.
89. Tester, I., et al., *Immune evasion versus recovery after acute hepatitis C virus infection from a shared source*. J Exp Med, 2005. 201(11): p. 1725-31.
90. Cusick, M.F., et al., *Naturally occurring CD4+ T-cell epitope variants act as altered peptide ligands leading to impaired helper T-cell responses in hepatitis C virus infection*. Hum Immunol, 2011. 72(5): p. 379-85.
91. Puig, M., et al., *CD4+ immune escape and subsequent T-cell failure following chimpanzee immunization against hepatitis C virus*. Hepatology, 2006. 44(3): p. 736-45.
92. Cubero, M., et al., *Identification of host and viral factors involved in a dissimilar resolution of a hepatitis C virus infection*. Liver Int, 2014. 34(6): p. 896-906.
93. Wang, H. and D.D. Eckels, *Mutations in immunodominant T cell epitopes derived from the nonstructural 3 protein of hepatitis C virus have the potential for generating escape variants that may have important consequences for T cell recognition*. J Immunol, 1999. 162(7): p. 4177-83.
94. Lawitz, E., et al., *Sofosbuvir and ledipasvir fixed-dose combination with and without ribavirin in treatment-naïve and previously treated patients with genotype 1 hepatitis C virus infection (LONESTAR): an open-label, randomised, phase 2 trial*. Lancet, 2014. 383(9916): p. 515-23.
95. Sulkowski, M.S., et al., *Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection*. N Engl J Med, 2014. 370(3): p. 211-21.
96. Bes, M., et al., *Reversal of nonstructural protein 3-specific CD4(+) T cell dysfunction in patients with persistent hepatitis C virus infection*. J Viral Hepat, 2012. 19(4): p. 283-94.





## **ANEXOS**

---



## CONTRIBUCIONES CIENTIFICAS

The antigenic variability of HCV in viral HLA-Ag binding is related to the activation of the host immune response. P. Muñoz de Rueda, S. M. Jiménez-Ruiz, R. Quiles, E. J. Pavón-Castillero, J. A. Muñoz-Gámez, J. Casado, A. Gila, A. Ruiz-Extremera, J. Salmerón. Scientific Reports. Manuscript ID: SREP-17-26044A. Accepted for Publication 23 October 2017.

Mutaciones en el epítipo inmunodominante de la región NS3 del VHC frente al HLA-DQB1\*0301 se asocian a la no respuesta al tratamiento antiviral combinado: análisis por pirosecuenciación. P. Muñoz de Rueda, R. Quiles Pérez, M.A. Lopez Nevot, J. Casado, A. Carazo, A.B. Martín Álvarez, A. Gila Medina, S. Jiménez Ruiz, J.A. Muñoz Gámez, E.J. Pavón Castillero, L. Sanjuán Núñez, A. Ruiz Extremera, y J. Salmerón. XXXIX Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Madrid, 19-21 de febrero de 2014. Póster.

