



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

***POLIMORFISMOS HLA COMO FACTOR
PREDICTIVO DE RESPUESTA VIROLÓGICA
SOSTENIDA (RVS) EN PACIENTES CON
HEPATITIS CRÓNICA C (HCC), GENOTIPO 1,
TRATADOS CON INTERFERÓN PEGILADO Y
RIBAVIRINA (IFN-peg y RBV).***

PABLO JOSÉ PALOMARES RIVAS

GRANADA 2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Pablo José Palomares Rivas
D.L.: Gr 1293-2011
ISBN: 978-84-694-1060-8

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. Pablo José Palomares Rivas sobre el tema “Polimorfismos HLA como factor predictivo de respuesta virológica sostenida (RVS) en pacientes con hepatitis crónica C (HCC), genotipo 1, tratados con interferón pegilado y ribavirina“ 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 22 de Noviembre de 2010

Fdo. Dr. Javier Salmerón Escobar.

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

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal D. Pablo José Palomares Rivas sobre el tema “Polimorfismos HLA como factor predictivo de respuesta virológica sostenida (RVS) en pacientes con hepatitis crónica C (HCC), genotipo 1, tratados con interferón pegilado y ribavirina“ 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 22 de Noviembre de 2010

Fdo. Dra. Paloma Muñoz de Rueda

Dr. MIGUEL ÁNGEL LÓPEZ NEVOT, ADJUNTO DEL SERVICIO DE INMUNOLOGÍA DEL HOSPITAL VIRGEN DE LAS NIEVES Y PROFESOR TITULAR DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal D. Pablo José Palomares Rivas sobre el tema “Polimorfismos HLA como factor predictivo de respuesta virológica sostenida (RVS) en pacientes con hepatitis crónica C (HCC), genotipo 1, tratados con interferón pegilado y ribavirina“ 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 22 de Noviembre de 2010

Fdo. Dr. Miguel Ángel López Nevot

AGRADECIMIENTOS

A continuación, quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a todas aquéllas personas que de alguna manera han contribuido a la realización de esta tesis, ya que si bien ha requerido de mucho esfuerzo y dedicación, no hubiese sido posible completarlo sin ellas.

A mis directores de tesis: Dr. Javier Salmerón, por haber confiado en mí y dado la oportunidad de llevar a cabo este proyecto de investigación; Dr. Miguel Ángel López Nevot, por su gran aporte científico al desarrollo de esta tesis; y, cómo no, a la Dra. Paloma Muñoz de Rueda, por su apoyo y su inestimable dedicación, por su paciencia y por sus consejos. Por estar siempre disponible para resolver mis dudas. Por su confianza y amistad.

Para mí ha sido todo un honor trabajar con vosotros.

A los miembros del Equipo de Investigación CTS-277 del Hospital Universitario San Cecilio de Granada, en especial a Ana Gila, por su disposición y amabilidad, y por su colaboración en la recogida de datos; a Jorge Casado, sin cuya idea todo esto no sería una realidad; a Rosa Quiles, por su ayuda en la realización de la base de datos; sin poderme olvidar de Antonia Martín, del Hospital Virgen de las Nieves de Granada, por su maravilloso trabajo en el tipaje HLA.

A mis compañeros de la Unidad Clínica de Digestivo: su enorme capacidad de trabajo me sirve como estímulo y motivación. Gracias por inyectarme vuestra alegría en los momentos de mayor estrés.

Al departamento de Medicina de la Universidad de Granada por haberme facilitado la realización de esta tesis.

A la Fundación del Hospital Clínico San Cecilio, por el soporte institucional prestado y por su ayuda en la impresión de este trabajo.

No podría estar escribiendo esto si mis padres no hubiesen puesto su granito de arena, su educación, su apoyo y su amor incondicional. Gracias, hermano, por tu complicidad y alegría. Gracias, Irene, por animarme a iniciar este proyecto, por no dejar que me olvide de la importancia real de las cosas y por soportarlo todo.

Si me olvido de alguien, mis más sinceras disculpas.

De este trabajo se han presentado las siguientes comunicaciones y publicaciones:

1. COMUNICACIONES:

- *Muñoz de Rueda P, López-Nevot MA, Casado J, Martín-Casares A, Palomares P, Quiles R, Romero-Gómez M, Diago M, Martín A, Muñoz JA, Ruiz-Extremera A, Salmerón J.* Importancia del alelo HLA-DQB1*0301 como factor predictivo de respuesta virológica mantenida (RVM) en pacientes con Hepatitis Crónica (HCC), genotipo 1, tratados con interferón pegilado y ribavirina. XXXIV Congreso de la Asociación Española para el estudio del Hígado. Asociación Española para el estudio del Hígado. Madrid (España), 2009. Comunicación oral.

- *Muñoz de Rueda P, López- Nevot MA, Casado J, Martín-Casares A, Palomares P, Quiles R, Romero- Gómez M, Diago M, Martín A, Muñoz JA, Ruiz- Extremera A, Salmerón Escobar J.* Importance of HLA-DQB1*0301 as predictive factor of sustained virologic response (SVR) in patients with chronic hepatitis (CHC), Genotype-1, treated with peginterferon (PEGIFN) and Ribavirin (RBV). 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the liver. European Association for the Study of the Liver. Copenhagen (Dinamarca), 2009. Poster.

- *Palomares P., Muñoz de Rueda P., López-Nevot MA., Casado J., Martín Casares A., Romero Gómez M., Diago M., Sanjuán L., Salmerón J.* Importancia del alelo HLA-DQB1*0301 en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 tratados con IFN pegilado y RBV. XL

Reunión de la Sociedad Andaluza de patología Digestiva. Sociedad Andaluza de patología Digestiva. Granada (España), 2009. Comunicación oral y poster.

- ***Muñoz de Rueda P, López-Nevot MA, Sáenz-López P, Casado J, Martín-Casares A, Palomares P, Quiles R, Gila A, Romero-Gómez M, Pavón EJ, Muñoz JA, Carazo A, Sanz-Cameno P, Moreno-Otero R, Diago M, Palacios A, Ruiz-Extremera A, Salmerón J.*** Importance of host genetic factor, HLA and IL28B, as predictors of response to pegylated interferon and ribavirin in patients with chronic hepatitis C. The Liver Meeting® 2010 (AASLD). Boston Octubre 2010. Poster 965.

2. PUBLICACIONES (ANEXO)

- **Importance of Host Genetic Factor, HLA and IL28B, as Predictors of Response to Pegylated Interferon and Ribavirin**

Paloma Muñoz de Rueda^{1,2}, Miguel-Ángel López-Nevot^{3*}, Pablo Sáenz-López³, Jorge Casado¹, Antonia Martín-Casares³, Pablo Palomares¹, Rosa Quiles^{1,2}, Ana Gila^{1,2}, Manuel Romero-Gómez^{2,4}, Esther-José Pavón¹, José-Antonio Muñoz¹, Ángel Carazo¹, Paloma Sanz-Cameno^{2,5}, Ricardo Moreno-Otero^{2,5}, Moisés Diago⁶, Josefa León^{1,2}, Ángeles Ruiz-Extremera^{2,7}, Javier Salmerón^{1,2}*

¹Unidad de Aparato Digestivo, Hospital Universitario San Cecilio, Granada. Spain

²CIBEREHD (Instituto de Salud Carlos III). Spain

³Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada. Spain

⁴Unidad de Hepatología, Hospital Ntra. Sra. de Valme, Sevilla. Spain

⁵Unidad de Hepatology, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid. Spain.

⁶Unidad de Hepatología, Hospital General de Valencia. Spain

⁷Unidad de Pediatría, Hospital Universitario San Cecilio Granada. Spain

Que actualmente se encuentra enviada para su revisión y publicación en la revista “American Journal of Gastroenterology”.

ÍNDICE _____

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. VIRUS DE LA HEPATITIS C.....	3
1.1.1. Genotipos y cuasiespecies.....	6
1.2 EPIDEMIOLOGÍA Y VÍAS DE TRANSMISIÓN	8
1.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS E HISTORIA NATURAL.....	9
1.3.1. Factores asociados con la progresión de la hepatitis.....	10
1.4. DIAGNÓSTICO.....	12
1.5 TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS CRÓNICA C	14
1.5.1. Candidatos al tratamiento.....	14
1.5.2. Fármacos.....	15
1.5.3. Tipos de respuesta al tratamiento antiviral.....	19
1.6 FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTIVIRAL.....	25
1.6.1. FACTORES RELACIONADOS CON EL VIRUS.....	25
1.6.1.1. Genotipo.....	25
1.6.1.2. Carga viral.....	27
1.6.1.3. Cuasiespecies.....	27
1.6.2. FACTORES RELACIONADOS CON EL TIPO DE TRATAMIENTO Y LA ADHERENCIA.....	30

1.6.3. FACTORES RELACIONADOS CON EL PACIENTE Y LA ENFERMEDAD.....	31
1.6.3.1. Edad, sexo, etnia.....	31
1.6.3.2. Fibrosis.....	32
1.6.3.3. Sistema Inmune.....	33
1.6.3.4. Factores Genéticos.....	41
1.6.3.4.1. Estructura y distribución tisular de las moléculas de histocompatibilidad.....	42
1.6.3.4.2. Genética del complejo mayor de histocompatibilidad.....	45
1.6.3.4.3. Polimorfismos HLA	46
1.6.3.4.4. Relación entre el HLA y el VHC	50
1.6.3.4.5. Otros polimorfismos genéticos: ILB28 ...	52
2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	53
2.1. JUSTIFICACIÓN	55
2.3. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	57
3. OBJETIVOS	59
4. PACIENTES Y MÉTODOS	64
4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	64
4.2. ÁMBITO DEL ESTUDIO.....	64
4.3. PACIENTES Y RECOGIDA DE DATOS.....	64
4.4. VARIABLES DEL STUDIO.....	65
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	66
4.6. METODOLOGÍA.....	67
4.6.1. Determinación del genotipo.....	67

4.6.2. Determinación de la carga viral	67
4.6.3. Tipaje HLA	68
4.6.4. Estudio histológico	68
4.7. CONSIDERACIONES ÉTICAS	70
5. RESULTADOS.....	72
5.1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES.....	72
5.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DE LA RVP Y RVS.....	74
5.3. ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA ALÉLICA HLA Y SU ASOCIACIÓN CON LA RVP Y RVS.....	78
5.4. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE VARIABLES ASOCIADAS DE FORMA INDEPENDIENTE CON LA RVP Y RVS	82
5.5. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DEL ALELO DQB1*0301 ...	84
5.6. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES GENOTIPO 1 PORTADORES DEL ALELO EN FUNCIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO VIRAL.....	86
6. DISCUSIÓN	89
7. CONCLUSIONES	97
8. BIBLIOGRAFIA	101
9. ANEXO	125

ABREVIATURAS

AcVHC: anticuerpos frente al virus de la hepatitis C
ADN: ácido desoxirribonucleico
ARN: ácido ribonucleico
CH: cirrosis hepática
CHC: carcinoma hepatocelular
CPA: células presentadoras de antígeno
DM2: diabetes mellitus tipo II
HCC: hepatitis crónica C
HLA: antígeno leucocitario humano
IC: intervalo de confianza
IFN: interferón
IFN-peg: interferón pegilado
IL-2: interleucina 2
ISDR: IFN sensitivity-determining region
Linfocitos Tc: linfocitos T citotóxicos
Linfocitos Th: linfocitos T colaboradores
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad
NK: células asesinas
NR: no respondedor
ORa: odds ratio ajustada
ORc: odds ratio cruda
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PMN: neutrófilos
RBV: ribavirina
RI: resistencia a la insulina
RVP: respuesta viral precoz
RVR-4s: respuesta virológica rápida a la semana 4
RVS: respuesta virológica sostenida
TNF-alfa: factor de necrosis tumoral alfa
VHB: virus de la hepatitis B
VHC: virus de la hepatitis C
VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

INTRODUCCION-

1. INTRODUCCIÓN

1.1. VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)

El virus de la hepatitis C (VHC) pertenece a la familia *Flaviviridae* y es el único miembro del género *Hepacivirus*. Es la principal causa de hepatitis crónica, cirrosis hepática (CH) y carcinoma hepatocelular (CHC), siendo la indicación más común para el trasplante hepático¹.

Se trata de un virus recubierto, de alrededor de 50 nm de diámetro, que está compuesto por una cadena de polaridad positiva de ácido ribonucleico (ARN) con una longitud aproximada de 9600 nucleótidos, rodeada por el core (nucleocápside icosaédrica) que, a su vez, está cubierta por dos proteínas de la envoltura (E1 y E2), con función de anclaje de membrana. Presentan un alto grado de heterogenicidad genética². Estudios *in vitro* han demostrado que la proteína del core podría interactuar con protooncogenes de las células del huésped y algunos trabajos la han implicado en el desarrollo de CHC en pacientes con infección crónica por el VHC, al igual que ha ocurrido con otras regiones genómicas³.

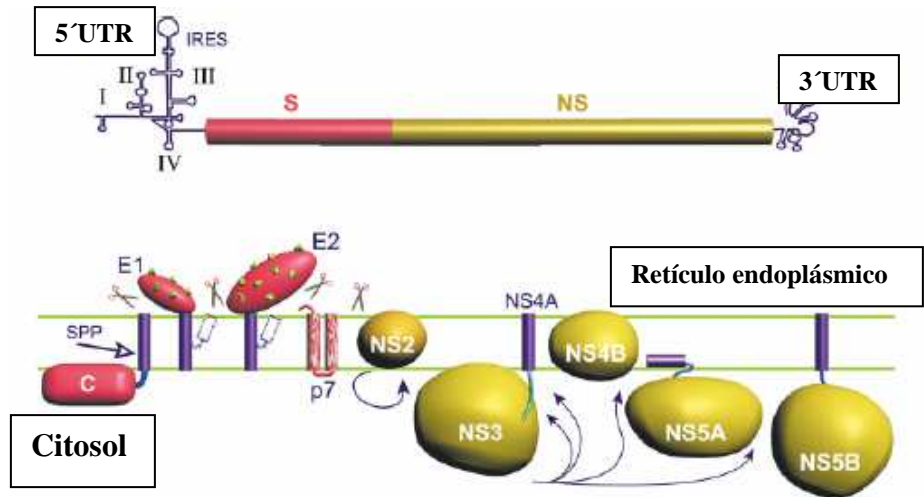


Figura 1. Organización genómica del VHC (superior) y procesamiento en poliproteínas (inferior). La región 5'UTR contiene cuatro dominios altamente estructurados y la región de unión al ribosoma (IRES). La región 3'UTR contiene una región estable. La zona intermedia codifica una poliproteína de aproximadamente 3.000 aminoácidos según el genotipo. S y NS son las regiones que codifican las proteínas estructurales y no estructurales, respectivamente. Las tijeras representan el lugar de acción de las peptidasas y el punteado verde sobre E1 y E2 indica la glucosilación de las proteínas de la envoltura.

El grupo de las proteínas no estructurales está formado por siete integrantes cuyas funciones no han sido aún completamente dilucidadas. Por ejemplo, la NS5A se ha implicado en la modulación de la respuesta antiviral del huésped mediada por el interferón (IFN). En concreto, se ha observado que la acumulación de mutaciones en una

Introducción

determinada región de NS5A, la conocida como ISDR (interferon sensitivity determining region) se relaciona con una mejor respuesta al IFN en pacientes infectados por el genotipo 1b del VHC^{4,6}. Además, la presencia de mutaciones en la región PKRBD se ha relacionado con una buena respuesta al tratamiento⁷.

Tabla1. Función de las proteínas estructurales y no estructurales del VHC

Proteína	Peso molecular (kDa)	Función
C	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°	Desconocida
NS2	23	Componente de la proteasa NS2-3
NS3	70	Componente de la proteasa NS2-3, serínproteasa, NTPasa y helicasa
NS4A	8	Cofactor para la serínproteasa NS3
NS4B	27	Desconocida
NS5A	58	Desconocida, involucrada en la resistencia al interferón
NS5B	68	ARN-polimerasa dependiente de ARN

1.1.1. Genotipos y cuasiespecies

Se han descrito seis genotipos mayores (del 1 al 6) y más de 50 subtipos o subgenotipos (Ej.:1a, 1b, 2a...) del VHC. Diferentes cepas virales del mismo subtipo pueden diferir en un 5-15% de su secuencia de nucleótidos, un 10-30% entre distintos subtipos, y un 30-50% entre distintos genotipos.

El genotipo 1 es el más común en el mundo occidental, representando un 70-80% de los casos. Los más frecuentes en Estados Unidos y Europa occidental son el 1a y 1b, seguidos del genotipo 2 y 3.

Los genotipos virales difieren poco en el pronóstico o severidad en la enfermedad hepática causada. Los distintos genotipos pueden conducir a CH o CHC, siendo la frecuencia de estas complicaciones similar con cualquiera de ellos.

Sin embargo, no ocurre lo mismo en cuanto a la respuesta al tratamiento. En la práctica clínica, el conocimiento de estos genotipos ha ayudado a planificar un tratamiento y a seleccionar a los pacientes. Diferenciamos dos grupos de pacientes; los infectados por genotipos 1, 4 y 5, por una parte, y 2 y 3 por otra, con distinta respuesta al tratamiento con IFN, siendo la tasa de respuesta más probable entre dos y tres veces en los segundos que en los primeros⁸.

Una de las características más importantes y con mayores implicaciones en la patogenia de la infección por el VHC es la gran **heterogeneidad genética** del VHC. Como ocurre con otros virus ARN, se producen defectos en la actividad reparadora de la ARN polimerasa

Introducción

dependiente de ARN y ausencia de actividad exonucleasa 5'-3'. El resultado es la aparición de una población de variantes genómicas que difieren de la original, y se denominan en su conjunto cuasiespecies. La cuasiespecie predominante sería aquella que contara con una mayor capacidad replicativa en el huésped.

En virus ARN, las regiones que varían con mayor frecuencia son aquéllas expuestas a la acción del sistema inmune, de tal manera que se ha propuesto que la variación antigénica es el resultado directo de la selección de variantes como respuesta a la inmunidad humoral y celular. En la región codificadora, los genes de envoltura E1 y E2, conocida como región hipervariable 1 (HVR-1), muestran la mayor variación genética; sin embargo, el gen de la proteína core es el más altamente conservado. La región 5'-NRT y porciones de 3'-NTR también están altamente conservadas.

La diversidad de las cuasiespecies del VHC puede, por tanto, contribuir al desarrollo de cronicidad durante la infección debido a los rápidos cambios que suceden en las proteínas de la envoltura viral como mecanismo de escape a la presión inmune ejercida por el huésped. También tendrá importancia en el diseño y desarrollo de vacunas, selección de mutantes resistentes durante el tratamiento, y diseño e interpretación de los métodos diagnósticos.

1.2 EPIDEMIOLOGÍA Y VÍAS DE TRANSMISIÓN

Se estima que existen unos 170-240 millones de personas portadoras del VHC, lo que equivale aproximadamente a un 3% de la población mundial⁹. En España la prevalencia se sitúa en el 1,6-2,6%, lo que permite una estimación de 480.000-760.000 infectados crónicos por el VHC¹⁰. La principal vía de transmisión es la parenteral siendo los riesgos más importantes para la transmisión la transfusión de sangre antes de 1992, el uso de drogas por vía intravenosa y las actividades sexuales de alto riesgo^{11,12}, mientras que la exposición ocupacional, la hemodiálisis, la exposición intrafamiliar, la transmisión vertical y el uso de cocaína intranasal entrañan un riesgo más bajo. Los trabajadores sanitarios constituyen un grupo de riesgo, aunque la incidencia de infección tras un pinchazo accidental es tan solo del 5-10%.

Un gran porcentaje de las personas con infección crónica por el VHC permanecen asintomáticas y aún no han sido diagnosticadas, pero, probablemente, recibirán atención médica en la próxima década por lo que se espera un incremento del cuádruple de personas diagnosticadas de infección crónica por VHC hasta el año 2015¹³.

1.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS E HISTORIA

NATURAL.

Inicialmente el VHC produce una hepatitis aguda, aunque se caracteriza por su carácter clínicamente silente. El período de incubación es por término medio de unas 8 semanas, pudiendo variar entre las 2 y las 28. Tan sólo un 25% de las hepatitis agudas son clínicamente sintomáticas y suelen manifestarse en forma de síntomas inespecíficos, como astenia, anorexia, náuseas e ictericia. La forma fulminante es muy rara.

Un 15% de las hepatitis agudas curan, definiéndose la resolución completa como la ausencia de ARN-VHC en suero acompañado de la normalización de los niveles de transaminasas. Varios trabajos recientes están estudiando los factores que determinan esta eliminación del virus; el 85% restante desarrolla una hepatitis crónica, definida por la persistencia del ARN-VHC durante un periodo superior a 6 meses tras el comienzo de la infección. Los factores predictivos de curación tras una hepatitis aguda son la aparición de ictericia en la fase aguda y el sexo femenino^{14,15}.

El 80% de los pacientes con hepatitis C crónica (HCC) experimentará una evolución estable, sin una progresión significativa en los 20 años posteriores a la infección, mientras que un 30% (fibrosadores rápidos) desarrollará una CH en los 20-25 años siguientes a la infección; muchos de estos pacientes cirróticos continuarán progresando lentamente y alrededor de un 20% desarrollarán

rápidamente descompensación de la enfermedad hepática y CHC (riesgo del 1-4% anual)^{16,17}.

1.3.1. Factores asociados con la progresión de la hepatitis crónica C (HCC)

Los factores asociados a la progresión de la HCC son la edad en el momento de la infección, la duración de la infección, el sexo, el consumo de alcohol, el hierro, el trasplante hepático, factores metabólicos, coinfección con otros virus (VHB, VIH) así como el nivel de transaminasas¹⁷⁻²¹

La progresión de la fibrosis hepática se incrementa de forma notable por encima de los 40 años, mientras que la posibilidad de cronicidad es más baja en mujeres jóvenes, oscilando entre el 46 y el 55%¹⁷.

Aunque no se conoce bien el nivel por encima del cual el alcohol acelera la progresión de la enfermedad se sabe que su consumo favorece la progresión de la HCC. Los mecanismos por los cuales el alcohol agrava la HCC probablemente son multifactoriales, y entrañan una combinación de alteración en la función inmunológica, estrés oxidativo, esteatosis hepática e incremento en los depósitos de hierro y de la intensidad de la apoptosis, así como el desarrollo de cuasiespecies e incluso un incremento en la replicación viral¹⁸.

Introducción

Existe una clara asociación entre infección por el VHC y diabetes mellitus tipo 2 (DM2) debido a la aparición de resistencia a la insulina (RI)¹⁹

En cuanto al nivel de transaminasas, la patología hepática es menos agresiva en los pacientes con niveles normales que en aquellos que las tienen elevadas, y la velocidad de progresión de la fibrosis es menor²¹.

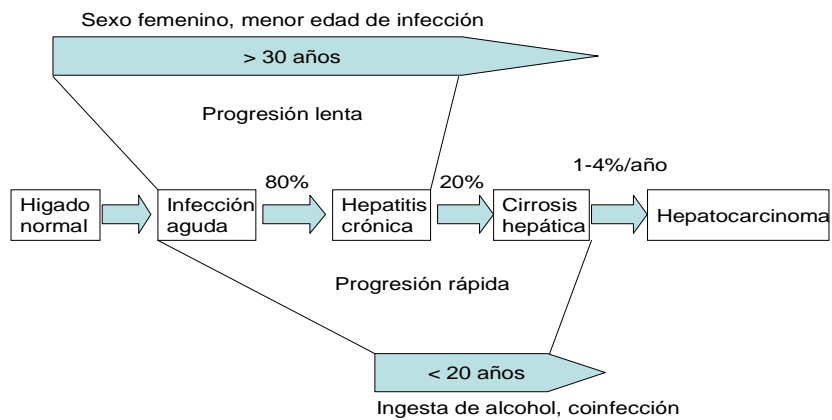


Figura 2. Historia natural de la infección por el VHC

1.4. DIAGNÓSTICO

Los métodos de diagnóstico de que disponemos en la actualidad nos permiten un diagnóstico sencillo, con análisis serológicos y virológicos cuya interpretación no resulta complicada. Se pueden resumir en tres parámetros que nos son útiles en la práctica clínica diaria: anticuerpos frente al VHC (AcVHC), el ARN-VHC y el genotipo del VHC^{22,23}.

El estudio de la infección se realiza inicialmente a través de la detección de los AcVHC (tipo IgG), mediante técnicas inmunoenzimáticas. La sensibilidad de éstas es mayor del 98%, y permite detectar una seroconversión entre las 4 y 10 semanas post infección (tests de ELISA de 2ª y 3ª generación). Pese a la alta sensibilidad, estos ensayos presentan limitaciones relacionadas con el agente y la condición del huésped:

a) No permite discriminar entre los sujetos con infección aguda, crónica o pasada con recuperación. Los anticuerpos perduran de por vida en los pacientes crónicos y por más de 18-20 años en aquellos que se recuperan, ya sea de forma espontánea (20-30% de casos) o post tratamiento antiviral.

b) Seroconversión tardía: no permite la detección precoz de una infección aguda.

c) Falsos positivos: en población sana y de bajo riesgo como donantes de sangre y pacientes con autoinmunidad.

d) Falsos negativos: en pacientes inmuno-comprometidos (VIH, hemodializados, tratamiento inmunosupresor)^{24,25}.

e) Traspaso transplacentario: no discrimina entre una infección del recién nacido y los anticuerpos maternos.

En cada uno de estos casos particulares, es necesario determinar la presencia de viremia circulante. Esta se realiza mediante la detección de ARN-VHC cualitativa mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y nos permite evaluar la existencia de replicación viral activa y confirmar una infección activa o pasada por el virus. Por lo tanto, el estudio del ARN por PCR estará indicado en todo sujeto AcVHC positivo y en los casos de dudas diagnósticas antes descritos. Además, por su alta sensibilidad (< 100 copias de ARN/ml, < 50 UI/ml) es de gran utilidad para la detección precoz de una primo-infección (detección a partir de 2 semanas post infección), y para la evaluación post tratamiento antiviral. La detección cuantitativa de ARN (cuantificación de la carga viral) y el estudio del genotipo viral están indicados en los casos agudos o crónicos que serán sometidos a terapia antiviral. Sin embargo, esta determinación cuantitativa no tiene valor en cuanto al pronóstico o evolución de la infección.

1.5 TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS CRÓNICA C

1.5.1. Candidatos al tratamiento

El tratamiento actual de la infección crónica por el VHC se basa en la administración conjunta de IFN-pegilado y ribavirina (IFNpeg + RBV), y pretende, además de la eliminación serológica del virus, detener la progresión de la enfermedad crónica hepática, y disminuir el número de personas infectadas.

En general, debe ser tratado todo paciente con HCC no tratado previamente, que presenten transaminasas normales y/o elevadas, positividad del ARN-VHC en el suero y lesiones de hepatitis crónica en la biopsia hepática, ya que son los pacientes con más riesgo de desarrollo de CH²⁶. Cuando presentan fibrosis portal y en puentes, y al menos moderada inflamación y necrosis, la mayoría tienen niveles de ALT persistentemente elevados²⁷, pero alrededor de un 25% cursan con transaminasas persistentemente normales. La mayoría de este grupo de pacientes presenta lesiones histológicas mínimas, pero no siempre es así. Por ello se aconseja tratar a todos aquellos pacientes que lo desean, y sobre todo a los infectados por los genotipos 2 y 3, que tienen mayores posibilidades de curación²⁶. Los resultados del tratamiento en estos pacientes son superponibles a los que se obtienen en pacientes con transaminasas elevadas²⁸. Además, es importante valorar cuál va a ser la eficacia y los efectos adversos de la terapia.

En general, se suelen incluir los pacientes menores de 65 años, o mayores que presenten buena calidad de vida; con una cirrosis

compensada; coinfectados por VHB o VIH si están estabilizadas; o con trastornos extrahepáticos asociados. Como criterios de exclusión, los que no cumplan estos parámetros y las embarazadas o que presenten una negativa a usar métodos anticonceptivos.

1.5.2. Fármacos

-Interferón pegilado (IFN-peg): de forma general, los IFNs son proteínas ó glicoproteínas producidas por distintos tipos celulares como respuesta a un estímulo, sobre todo a infección vírica. El IFN alfa es un polipéptido no glicosilado producido por monocitos, leucocitos y linfocitos B como respuesta a infecciones víricas con la función de mediar la respuesta inmune inespecífica.

Posee dos acciones, una antiviral directa y otra inmunomoduladora. La primera se manifiesta inhibiendo la replicación viral, transmitiendo señales al interior de la célula a través de receptores situados en la superficie celular. En esta ruta intervienen de manera acoplada las proteínas JAK-1 (Janus-activated Kinase-1) y Tyk2 (tyrosine kinase-2). La acción de las kinasas fosforiladas resulta en una activación de proteínas STAT-1 y STAT-2 que son traslocadas al núcleo y ejercen su acción incrementando la transcripción de genes estimulados por IFN (ISG) que codifican proteínas con actividad antiviral (adenosin deaminasa, proteína kinasa R y 2'5'oligoadenilato sintasa)²⁹⁻³¹.

La segunda, incrementando la expresión de moléculas del antígeno leucocitario humano (HLA) en la membrana de los

Introducción

hepatocitos y facilitando que los linfocitos T citotóxicos (Linfocitos Tc) reconozcan y eliminen las células infectadas, además de estimular la inmunidad innata (células NK)³².

Clásicamente se han usado 4 tipos de IFN alfa obtenidos mediante tecnología ADN recombinante, administrados tres veces por semana. La pegilación de una proteína consiste en su unión a una molécula de polietilenglicol para disminuir su aclaramiento y así prolongar su permanencia tras su administración, obteniendo una mejoría considerable tanto en la farmacocinética como en la farmacodinámica. Hoy día, el que se utiliza específicamente en el tratamiento actual es el IFN-pegilado-alfa, que tiene la ventaja de que se administra sólo una vez por semana, disminuyendo en frecuencia los efectos secundarios, además de conseguir una mayor y más eficaz supresión de la actividad antiviral en comparación con la administración del IFN estándar tres veces por semana. Hay dos tipos, el alfa-2a y alfa-2b. Aunque han sido varios los estudios que comparan la eficacia de ambos combinados con RBV, un estudio sistemático realizado por Cochrane³³ sobre ensayos clínicos aleatorizados en los que se comparaban los dos tipos de IFN-peg con respecto a las tasas de RVS, confirmó las ventajas del alfa-2a, mientras que el tipo de acontecimientos adversos y la incidencia de los mismos fueron muy parecidos en ambas pautas de tratamiento^{33,34}.

-Rivabirina (RBV): es un análogo de nucleósido (guanosina), utilizado también en el tratamiento del VIH. Su incorporación a la terapia frente a VHC mejoró sustancialmente los porcentajes de respuesta viral sostenida (RVS) en pacientes infectados por VHC,

Introducción

incrementando por un lado la proporción de casos que aclaraban el virus y disminuyendo, por otro, el número de recaídas.

Se podría pensar que la RBV es un adyuvante del IFN-alfa, ya que aparentemente no disminuye la carga viral. La realidad es que la RBV tiene un efecto sinérgico, y actúa cooperando y potenciando al IFN alfa. Aunque su mecanismo de acción no se conoce con exactitud, recientemente se ha demostrado que tiene una leve acción sobre la replicación viral y que es un mutágeno del VHC. El mecanismo de acción antiviral propuesto para la RBV se desarrolla a varios niveles. Se sabe que “in vitro” es capaz de inhibir distintos virus ARN y ADN bloqueando la síntesis de guanosina trifosfato y por lo tanto disminuyendo la síntesis de ácidos nucleicos. También actúa produciendo una síntesis anormal del extremo 5´del ARN, y por lo tanto, alterando la transcripción viral y suprimiendo la actividad de la polimerasa viral, además de llevar a los nuevos viriones a un “error catastrófico” al incorporarse a modo de mutágeno dentro de los nuevos genomas. Sin embargo, en los estudios clínicos, aunque modifica los niveles de ALT, no modifica los niveles de viremia, por lo que se postula que pudiera actuar por mecanismo inmunomodulador. Este efecto también se ha comprobado “in vitro”, favoreciendo la inmunidad del huésped frente al VHC potenciando una respuesta Th1 frente a Th2 con aumento de citocinas como el IFN-gamma, TNF-alfa e IL-2, que aumenta la lisis de los hepatocitos infectados y reduce la producción de viriones. Se administra por vía oral variando en función del peso³⁵. No se utiliza en monoterapia.

Introducción

Los hepatocitos infectados producen una liberación de viriones infecciosos y no infecciosos. El IFN inhibe la producción del VHC, y la RBV introduce mutaciones dentro del genoma VHC e incrementa la producción de viriones no infecciosos. Se piensa que el IFN y la RBV favorecen la respuesta inmunológica a través de los NK y linfocitos T, consiguiendo la muerte de las células infectadas por el VHC. También la RBV puede actuar a través de un mecanismo no citolítico, curando las células infectadas sin destruirlas. Esto explicaría por qué la RBV tiene ese efecto llamado “cosmético” y normaliza las transaminasas. Las células dianas del virus, que son los hepatocitos sanos, pueden ser atacadas por los viriones infecciosos pero no por los no infecciosos³⁶(figura 3).

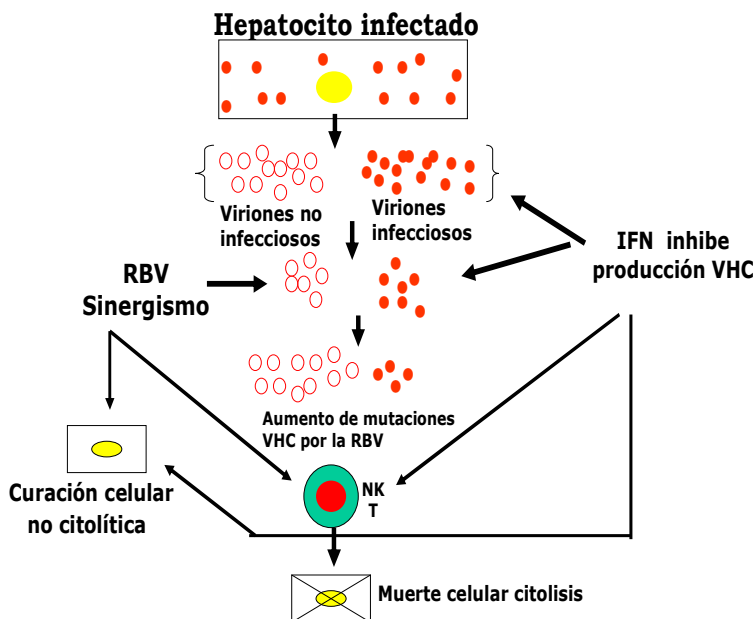


Figura 3. Mecanismo de acción de IFN y RBV

1.5.3. Tipos de respuesta al tratamiento antiviral

Para conocer el tipo de respuesta, es necesario conocer antes cómo es la 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 la células infectadas *de novo* se compensa por la muerte de las células infectadas.

La administración de IFN induce una típica declinación bifásica de la replicación viral (Figura 4): en una primera fase, en las primeras 24 horas tras la administración, se observa una rápida disminución de la carga viral debida a la inhibición directa del IFN sobre la producción viral. Esta disminución se observa tanto en los pacientes que al final del tratamiento conseguirán una RVS como en los que no^{37,38}.

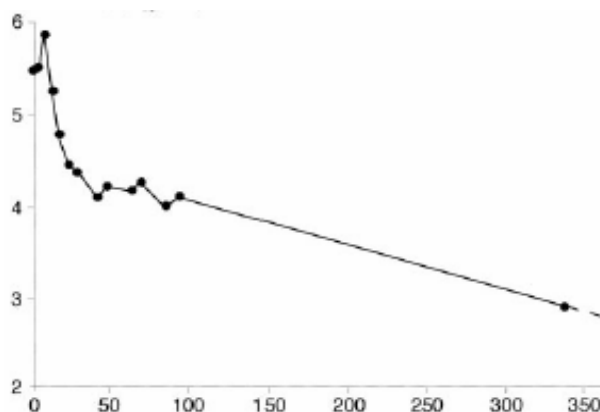
La segunda fase de descenso de la carga viral, más paulatina, que se corresponde con la muerte de las células infectadas por el VHC con participación de la respuesta inmune específica, en la que el IFN tiene por supuesto un papel, en el contexto de la eficaz inhibición de la producción viral, y conduce al aclaramiento del ARN viral en una gran proporción de pacientes³⁷⁻⁴¹.

Posteriormente, se ha propuesto una tercera fase de cinética viral que representa la eliminación de viriones de células infectadas mediada por mecanismos inmunitarios celulares. Esta fase ha sido definida a partir de un estudio que ha investigado los efectos sobre la

Introducción

cinética viral de la combinación de IFN-peg más RBV. La disminución de la viremia en esta tercera fase fue más importante en los pacientes que habían recibido tratamiento combinado con IFN y RBV. Probablemente esta fase represente un aumento de la degradación de células infectadas causada por la potenciación de la respuesta inmune que produce la RBV asociada al IFN-peg^{42,43}.

Carga viral (\log_{10} UI/ml)



Horas tras el inicio de la terapia

Figura 4. Ejemplo de cinética viral en un paciente que recibió 3 MU/día de IFN alfa. La disminución de la carga viral siguió un patrón bifásico, con una primera fase de descenso rápido en las 48 horas iniciales, seguido de una segunda fase más lenta y mantenida a partir del segundo día.

Introducción

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

Además, es importante conocer las distintas modalidades de respuesta al tratamiento para decidir qué dosis y qué duración se ha de mantener. La respuesta al tratamiento se define según criterios bioquímicos entendidos por la normalización de las transaminasas, según criterios virológicos considerando la ausencia de ARN-VHC, y según criterios histológicos valorados por la mejoría en el índice de actividad inflamatoria hepática.

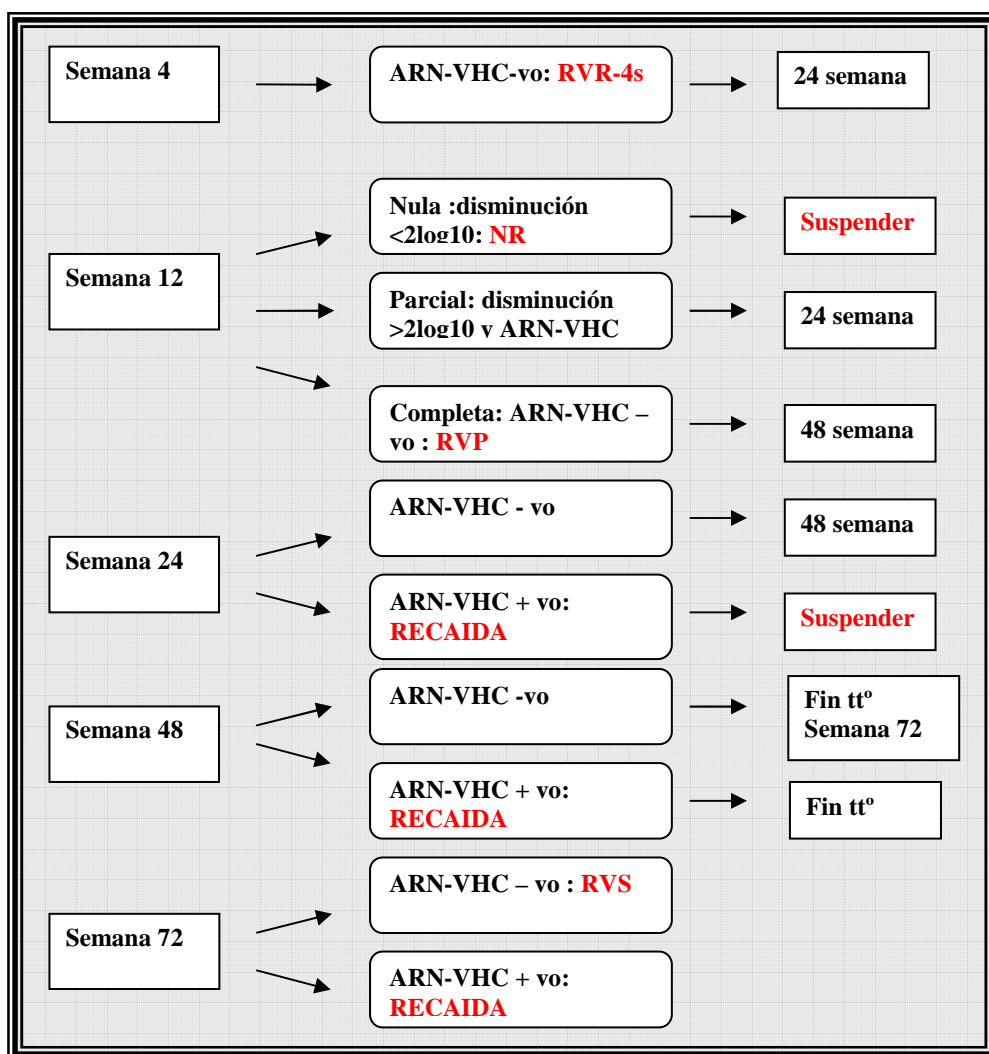
- **Evaluación de la respuesta tras 4 semanas de tratamiento:** la respuesta virológica rápida a la semana 4 de tratamiento (RVR-4s) se define como ARN-VHC indetectable en este tiempo, y se ha reconocido como uno de los factores predictivos de RVS independientes más importantes⁴⁴(tabla 2).

- **Evaluación de la respuesta tras 12 semanas de tratamiento:** durante muchos años, la respuesta virológica precoz (RVP), definida como la disminución de la carga viral $>2\log_{10}$ o ARN indetectable en la semana 12, se ha utilizado como el principal factor para tomar decisiones acerca del tratamiento. Se ha demostrado que en pacientes infectados con el genotipo 1 del VHC que han presentado una RVP parcial (descenso $>2\log_{10}$ pero con ARN detectable en la semana 12) lograban una RVS en un 17-29% con IFN-peg/RBV durante 48 semanas, beneficiándose este subgrupo de pacientes “respondedores lentos” de una ampliación de la duración del tratamiento combinado a 72 semanas^{45,46}(tabla 2).
- **Evaluación de la respuesta tras 24 semanas de tratamiento:** los pacientes que cumplen criterios de RVP pero que mantienen niveles de ARN viral detectables en la semana 24 no alcanzarán RVS en el 98-100% de los casos, por lo que se recomienda la interrupción del tratamiento en esta situación⁴⁶(tabla 2).

De forma global, se define como RVS la ausencia de ARN del VHC a los 6 meses y normalización de las transaminasas tanto al final del tratamiento como a los 6 meses de seguimiento. Lograr una RVS es sinónimo de curación, ya que se produce una mejoría paulatina de la lesión hepática y desaparece el riesgo de desarrollar complicaciones relacionadas con la hepatitis C. La respuesta con recaída se define como la normalización de los valores antes citados al término del

tratamiento, pero con reaparición del ARN en el control semestral. Los no respondedores (NR) se definen como aquéllos que presentan una caída de menos de 2 logaritmos en los valores de ARN-VHC durante las 12 primeras semanas de tratamiento y/o la persistencia del mismo a partir de la semana 24 de tratamiento²⁶(tabla 2).

Tabla 2. Resumen de las fechas clave en el seguimiento del tratamiento.



En pacientes que portan el genotipo 1, previamente no tratados (naive) el tratamiento combinado con IFN-peg y RBV consigue una RVS del 50-55%. Esta tasa de respuesta depende de varios factores que luego veremos. Los genotipo 2 y 3 consiguen una tasa de RVS alrededor del 80%, y con menor tiempo de tratamiento⁴⁷⁻⁴⁹. Los pacientes no respondedores a tratamientos previos con interferón convencional en monoterapia o combinado con RBV presentan unas tasas de RVS al tratamiento estándar actual de un 28 y 12% respectivamente⁴⁹⁻⁵⁰.

El cumplimiento terapéutico es fundamental en estos pacientes, ya que si no reciben al menos el 80% de la dosis inicial la tasa de RVS desciende de forma significativa. La tendencia actual es a individualizar cada vez más el tratamiento ya que el beneficio no solo afecta a la vertiente económica, sino también a la correcta adhesión al tratamiento y a la minimización de los efectos adversos del mismo.

1.6 FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTIVIRAL

Los factores de respuesta a la terapia antiviral de la infección por el VHC han sido ampliamente estudiados. Se sabe que intervienen los factores relacionados con el propio virus (carga viral, genotipo, cuasiespecies y mutaciones); factores relacionados con el tipo de tratamiento y la adherencia al mismo; factores relacionados con el huésped (edad, sexo, etnia, hábitos tóxicos e inmunología) y con la enfermedad (grado de fibrosis, cirrosis y coinfección VIH).

1.6.1 Factores relacionados con el virus

1.6.1.1 Genotipo

Según los ensayos clínicos, el genotipo y después la carga viral basal son los factores pronóstico más importantes de la RVS. El genotipo es el que más importancia tiene, tanta que, aunque la dosis de IFN permanece fija, la duración del tratamiento y la dosis de RBV variarán en función del genotipo. Ya en los primeros estudios con IFN-estándar y RBV se demostró que los pacientes con genotipo 1 eran más resistentes al tratamiento³¹. Hasta el momento actual no existen suficientes datos para conocer la duración óptima del tratamiento en cada una de las diferentes situaciones que pueden presentar los pacientes, aunque sí se han consensuado algunas estrategias.

En líneas generales, las indicaciones establecidas en cuanto a la duración del tratamiento son que los genotipos 2 y 3 se tratarán durante 24 semanas y con 800 mg de RBV; mientras que en el caso del genotipo 1 la duración del tratamiento será de 48 semanas administrando dosis máximas de RBV según peso (1.000 mg/día \leq 75 Kg peso y 1.200 mg/día $>$ 75 Kg peso), aunque cada vez se plantea un tratamiento más individualizado. En algunos pacientes con genotipo 1 que negativizan el VHC a las 4 semanas (respuesta viral rápida o RVR-4s) y que partían de una carga viral baja, se podría plantear reducir la duración de la terapia a 24 semanas, aunque este es un tema aún en controversia ya que los estudios realizados son incompletos y no están aleatorizados dependiendo de la presencia o ausencia de RVR; se planteó que en pacientes con respuesta incompleta en la semana 12, pero que negativizaron la viremia en la 24, prolongar el mismo hasta la semana 72 para disminuir las recaídas: estudios recientes han demostrado la ineficacia de dicha prolongación^{51,52}. Igualmente, en pacientes con genotipos 2 y 3, que presentan una RVR, se ha intentado acortar la duración del tratamiento a 16 semanas, consiguiendo resultados similares que en 24 semanas⁵³⁻⁵⁵, aunque esto último también está en controversia.

Los motivos de esta diferente sensibilidad al IFN según los genotipos no se conoce bien. Recientemente se ha postulado que el genotipo 1 es distinto de los genotipos 2 y 3 en los sitios de corte de la ribonucleasa L, encargada de degradar el ARN viral. Además, existe una región de 12 aminoácidos de la proteína E2 del genotipo 1 que presenta una intensa homología con el factor de iniciación que permite

la actividad antiviral de la proteína PKR, lo que haría que el genotipo 1 fuese más resistente al efecto antiviral del IFN que los genotipos 2 y 3⁵⁶.

1.6.1.2 Carga viral

La gran mayoría de los estudios con IFN-peg han demostrado que los pacientes con alta carga viral (> 600.000 - 800.000 UI/mL) responden peor al tratamiento, de tal manera que, como ya se ha mencionado previamente, en pacientes genotipo 1 que alcanzan una RVR podría acortarse el tratamiento si presentan una baja carga viral basal, ya que en este grupo se mantendrían intactas las posibilidades de curación. Por otro lado, se ha observado recientemente que los paciente con genotipo 3, que tradicionalmente se han considerado más fáciles de curar, si presentan una carga viral basal elevada (> 800.000 UI/mL) obtienen una respuesta mediocre, inferior al 50% en muchos casos⁵⁴. Por tanto, estos pacientes han de ser considerados “difíciles de tratar”.

1.6.1.3 Cuasiespecies

Aunque los factores comentados son cruciales para la erradicación del virus, hay que tener en cuenta que existe una compleja interacción entre la variabilidad genética viral y la respuesta inmune del

Introducción

paciente que puede condicionar la resolución de la infección. Se sabe que la infección por el VHC induce una respuesta inmune celular y humoral, pero generalmente es insuficiente para erradicar al virus o prevenir su reinfección. Esto indica que la variabilidad genética viral es muy importante en la resolución de la infección durante la terapia antiviral⁵⁷. La aparición de mutaciones en el genoma viral surge como consecuencia de varios procesos:

- La rapidez de la replicación viral y la incapacidad de la ARN polimerasa viral para corregir errores introducidos en el genoma del VHC favorecen la aparición frecuente de mutantes 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. Una gran cantidad de estas variantes virales pierden su capacidad de replicación (“catástrofe de error”), de forma que la gran mayoría de mutaciones que aparecen son letales, pero el resto transmite la nueva información genética a su progenie, y las partículas infecciosas mejor adaptadas son seleccionadas en base a su capacidad de replicación.

- La presión inmunológica del paciente también puede provocar la aparición de distintas poblaciones virales dentro de un mismo individuo, mecanismo que utiliza el virus para escapar de esta presión inmune, lo que condiciona que la enfermedad evolucione hacia la cronicidad⁵⁸. Este proceso suele ocurrir en los primeros estadios de la infección, es decir, antes de comenzar con el tratamiento antiviral.

Introducción

- La presión del tratamiento antiviral también induce la aparición de mutaciones. Por un lado, favoreciendo la aparición de nuevas cepas virales (cuasiespecies) resistentes al tratamiento y, por otro, como mecanismo para interferir en la replicación viral. De hecho, una de las hipótesis del mecanismo de acción de la RBV es que actúa como un factor mutagénico de ARN, provocando la llamada “catástrofe de error” en las partículas virales⁵⁹.

Hay que matizar que la aparición de estas nuevas mutaciones se producen mayoritariamente en la región hipervariable E1 y E2 del genoma viral, lo que da lugar a una gran variabilidad genética dentro de un mismo individuo. Sin embargo, esto no impide que aparezcan mutaciones en otras regiones del virus, como son las regiones NS5A y NS5B, mutaciones que han sido íntimamente relacionadas con la respuesta al tratamiento antiviral⁷. En la clínica tiene una gran importancia el número de mutaciones de la secuencia mayoritaria del genoma viral de dichas regiones. Si bien, el número de cuasiespecies se correlaciona inversamente con la RVS (a más cantidad de cuasiespecies menor RVS)^{60,61}, el número de mutaciones en NS5A (sobre todo en las regiones ISDR (o región determinante de la sensibilidad al IFN) y en la PKRBD) se correlaciona positivamente con la RVS (a mayor número de mutaciones en NS5A mayor tasa de RVS)⁷. Si la secuencia mayoritaria del virus está conservada en estas regiones de la proteína NS5A (virus salvaje con pocas o ninguna mutación), los pacientes serían resistentes al tratamiento con IFN, lo que en la clínica se correspondería con los no respondedores (NR). En cambio, en los casos de mayor número de mutaciones en esta región, el virus perdería su mecanismo de resistencia al IFN y se produciría la RVS. Así, la

proteína NS5A se ha convertido en una proteína de gran importancia por su valor pronóstico en la respuesta al tratamiento antiviral.

1.6.2 Factores relacionados con el tipo de tratamiento y la adherencia

Está demostrado que los pacientes que cumplen el tratamiento tienen más posibilidades de presentar una RVS⁵³. Además, las tasas de RVS son mucho mayores cuando se combina el IFN-peg frente al IFN-estándar.

Aunque el consumo de alcohol no es una contraindicación absoluta para el tratamiento, está demostrado que los bebedores activos de más de 80 g/día tienen una peor respuesta a los antivirales, ya que disminuye la adherencia a los fármacos y el alcohol interfiere con la acción antiviral del IFN^{62,63}. La mayoría de los ensayos clínicos excluyen a los consumidores de alcohol y se exige al menos de 1 a 2 años de periodo de abstinencia, aunque nunca se ha investigado a fondo cuál es el periodo mínimo necesario.

Durante el tratamiento los pacientes están sometidos a múltiples efectos adversos que obligan a modificar la dosis inicial de los fármacos. Algunos de ellos son muy frecuentes y aparecen al inicio del tratamiento, como la fiebre, la fatiga, el cansancio, la astenia, irritabilidad, insomnio, caída del cabello... aunque esta sintomatología pseudogripal producida por el IFN mejora con paracetamol y

desaparece a las pocas semanas del tratamiento. Con respecto a la RBV, es relativamente frecuente la anemia, y más raramente otros más graves como la supresión de la médula ósea (leucopenia y plaquetopenia), que obligan a reducir su dosis (10%) o incluso interrumpirlo (5%).

1.6.3 Factores relacionados con el paciente y con la enfermedad

En cuanto a los factores del huésped que influyen en las posibilidades de curación pueden agruparse en genéticos (polimorfismos, raza), ambientales (consumo de alcohol), metabólicos (resistencia a la insulina, obesidad, esteatosis) y demográficos (edad, sexo); también hay factores inherentes a la propia enfermedad como la fibrosis.

1.6.3.1. Edad, sexo, etnia

Por lo general, tener una edad inferior a 40 años, presentar una duración corta de la enfermedad, ser mujer y no consumir alcohol son factores que se han asociado con mayores tasas de curación.

El papel del consumo de alcohol per se no influye directamente en la posibilidad de curación, pero disminuye el cumplimiento del tratamiento y en estos casos se detecta una menor tasa de RVP^{62,63}. La juventud y el sexo femenino se asocian con una menor tasa de resistencia a la insulina y obesidad. El papel de la sobrecarga férrica no

Introducción

está completamente aclarado. La sobrecarga férrica es común en pacientes con HCC y se ha asociado al sexo masculino, consumo de alcohol y una mayor fibrosis e inflamación. Ni la realización de flebotomías previas al tratamiento antiviral ni la concentración de hierro en el hígado se relacionan con la posibilidad de curación⁶⁴. La raza ejerce un efecto importante sobre las posibilidades de curación, de forma que en pacientes con genotipo 1 la RVS es el doble en pacientes caucásicos que en afroamericanos, aunque esta diferencia de respuesta no se observa en pacientes con genotipo 2 o 3⁶⁵.

Al analizar la repercusión de los principales factores metabólicos implicados en la posibilidad de curación de la hepatitis C, se ha encontrado que el perímetro de cintura, la intolerancia a la glucosa, el índice de masa corporal, la esteatosis y la fibrosis hepática, así como la hipertensión arterial, eran más frecuentes en el grupo de no respondedores a la terapia combinada con IFN-peg y RBV⁶⁶. Todo ello avala que el síndrome metabólico tiene un papel fundamental en las posibilidades de curación, por lo que la RI como fenómeno metabólico clave en este síndrome está involucrada en esa falta de respuesta terapéutica.

1.6.3.2 Fibrosis

La fibrosis desempeña un papel importante en la posibilidad de alcanzar RVS. Aparece como una variable independiente en la predicción de respuesta en pacientes tratados con terapia combinada,

tanto cuando se compara cirróticos frente a no cirróticos, como al analizar el impacto de la velocidad de progresión de la fibrosis, de forma que los fibrosadores rápidos presentan una menor tasa de RVS⁶⁷.

1.6.3.3. Sistema inmune

El conocimiento de la patogénesis de la infección crónica por el VHC es fundamental tanto para la determinación de una terapia antiviral exitosa como para encontrar una vacuna. La infección por VHC y su curso dependen del equilibrio entre la tasa de replicación del virus y la rapidez, especificidad y eficacia de la respuesta inmunológica del huésped⁶⁸⁻⁷². A diferencia del VHB, el VHC es un virus que evade el reconocimiento inmunológico eficaz o inhibe la respuesta inmunológica del huésped a través de mutaciones en sitios antigénicos que pueden ocurrir bajo presión selectiva durante la respuesta de los linfocitos B o T, y así servir como un mecanismo para establecer la persistencia del VHC⁷³⁻⁷⁵.

Se sabe que inmediatamente después de la infección por el VHC, éste se replica eficientemente induciendo la producción de IFNs tipo I. Sin embargo, el rápido incremento en la replicación viral no es reconocido de forma eficiente por la respuesta inmune adaptativa y después de un intervalo corto, la carga viral se incrementa y persiste en la mayoría de los individuos infectados llevando a una infección crónica y al daño hepático subyacente^{76,77}. Se considera que este fenómeno tiene una naturaleza inmunológica, que involucra tanto a

Introducción

linfocitos Tc, como a un mecanismo indirecto que implica la síntesis de citocinas que son inducidas por el VHC^{69,70,73}.

De forma general, varios estudios han agregado un concepto importante con respecto a que la inmunidad innata y adaptativa no son dos mecanismos de defensa separados, sino que están estrechamente interconectados uno con el otro, y determinan el resultado a la infección por organismos patógenos^{69,73,78,79}. Así, la inmunidad innata, gracias a sus mecanismos efectores rápidos, no sólo precede a la inmunidad adaptativa, sino que ejerce un importante control en el tipo y la calidad de la respuesta dada por los linfocitos T y B. Es notable que a pocos días de la infección primaria la defensa se debe a la inmunidad innata que se basa en la respuesta eficaz de células T que requiere de tres a cinco días, mientras que la respuesta adaptativa (producción de anticuerpos) necesita más de una semana. Los mecanismos inmunológicos innatos pueden controlar las infecciones antes de la intervención de la inmunidad específica; por consiguiente, los primeros pueden terminar con la mayor parte de las infecciones que se contraen antes de manifestar la enfermedad y la iniciación de la respuesta específica.

Se sabe que la respuesta inmune a cualquier infección viral se compone de una respuesta inespecífica a cargo de células asesinas (*NK*), polimorfonucleares (*PMN*) y macrófagos que se activan de forma no específica, y proporcionan el tiempo suficiente a las células presentadoras de antígeno (*CPA*) para procesar las proteínas virales y presentarlas a las células B, linfocitos Th y células Tc (Figura 5). En muchas infecciones virales, 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 complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de tipo II⁸⁰⁻⁸³.

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.

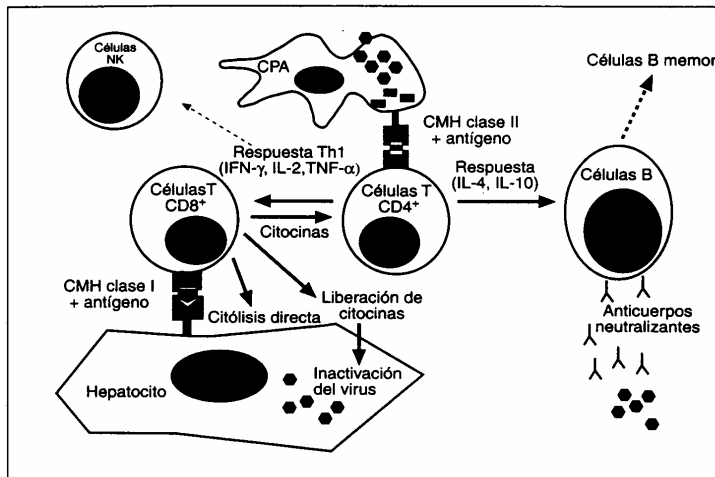


Figura 5⁸⁰⁻⁸³. Activación del sistema inmune tras una infección viral. Tras una defensa inicial inespecífica mediada por NK, PMN y macrófagos. Las CPA internalizan viriones por endocitosis, procesan las proteínas del virus y presentan péptidos antigénicos junto al

complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC clase II). Las células T CD4+ cooperadoras reconocen los antígenos asociados al MHC clase II y secretan citocinas que regulan la actividad de las células T CD8+ y la producción de anticuerpos por los linfocitos B. Las células T CD8+ pueden reconocer antígenos del virus que se presentan en la superficie celular de los hepatocitos infectados junto con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I (MHC de tipo I). Las células T CD8+ pueden controlar la replicación viral mediante histolisis de células infectadas, o mediante mecanismos no citotóxicos secretando citocinas que inactivan al virus intracelularmente.

Se distinguen dos tipos principales de células cooperadoras: Th₁ y Th₂ (T-helper 1 y T-helper 2 respectivamente). Tras tomar contacto con el antígeno mediante las CPA, los linfocitos CD4+ Th₁ secretan citoquinas de tipo 1 como el IFN-gamma, la interleucina 2 (IL-2) y el factor de necrosis tumoral (TNF-alfa), mientras que los linfocitos CD4+ Th₂ secretan citoquinas de tipo 2 como IL-4 e IL-10. Una respuesta dominada por citoquinas de tipo Th₁ favorece la inmunidad celular antiviral dirigida por células T CD8+ y células NK, mientras que una respuesta CD4+ dominada por citocinas Th₂ inhibe la respuesta Th₁ y favorece la producción de anticuerpos por los linfocitos B. Los anticuerpos específicos para VHC son, por lo común, detectables entre las siete u ocho semanas después de la infección. La función de estos anticuerpos en la protección ha sido cuestionada porque no previenen la reinfección y no correlacionan con resultados favorables. Varios

Introducción

estudios han puesto de manifiesto que el tipo de citocinas secretadas por estas células T CD4+ específicas desempeñan un papel relevante en la evolución de la infección aguda. Así, una respuesta CD4+ caracterizada por la secreción de citocinas de Th₁ se asocia con la infección aguda autolimitada, mientras que la secreción de tipo Th₂ se asocia con el curso a la cronicidad⁸⁴⁻⁸⁷.

Mediante MHC de tipo I, los linfocitos citotóxicos CD8+ reconocen los péptidos virales que han sido procesados y sintetizados por las células infectadas. Este encuentro produce una respuesta específica consistente en la lisis de las células infectadas por el virus mediante varios mecanismos: 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 TNF-alfa. Estas células CD8+ específicas del antígeno también pueden inhibir la replicación viral mediante mecanismos no citopáticos incrementando las concentraciones de citocinas antivirales, como en el modelo de infección por el VHB.

Debido a que el VHC causa con frecuencia una infección crónica clínicamente silente en pacientes considerados inmunocompetentes, lleva a pensar que es capaz de eludir una respuesta inmune eficaz por parte del huésped. Los mecanismos mediante los cuales el VHC desarrolla una infección de forma mantenida no están actualmente definidos. Se considera que si ocurre una respuesta insuficiente o inadecuada de células T (CD4+ y CD8+) específicas del

Introducción

virus, el ARN-VHC persiste en células T hepáticas, situación que se observa aún en aquellos individuos que alcanzan una respuesta terapéutica con una inhibición viral considerada como sostenida. El VHC ha desarrollado varias estrategias para escapar a la erradicación mediada por las células T, que incluye interferir con la vía de presentación de las moléculas del MHC de clase I del huésped o teniendo un “escondite” en células a las que les falta la expresión de las MHC clase I⁸⁸.

Respuesta inmune humoral

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, 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). 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

anticuerpos⁸⁹. 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-huésped⁹⁰.

Respuesta inmune celular

La respuesta inmune celular probablemente juegue un papel importante en el pronóstico de la infección por VHC debido a su capacidad para reconocer y eliminar los virus de las células infectadas. La mayoría de los estudios se han centrado en la respuesta inmune frente antígenos específicos mediada por los linfocitos T helper CD4+ y los linfocitos T citotóxicos CD8+⁹¹.

Debido a que la mayoría de las infecciones agudas pasan desapercibidas, los estudios inmunológicos se han basado en pacientes con infección persistente por VHC que no han sido capaces de aclarar el virus. Únicamente algunos estudios han analizado la respuesta inmune durante la fase aguda de la infección. Estos estudios sugieren, como se ha comentado, que la respuesta de los linfocitos Th y Tc difiere entre pacientes que se recuperan de la infección y aquellos que desarrollan una infección crónica⁹². Más importante aún, las secuencias virales que son reconocidas con mayor frecuencia y generan una respuesta inmune más intensa por parte de los linfocitos T, apenas varían entre los distintos genotipos. Además, muchos de estos péptidos virales frecuentemente reconocidos se unen con alta afinidad a distintas

Introducción

moléculas del MHC tipo II, sugiriendo que estas pueden ser eficazmente presentadas por pacientes con diferentes haplotipos. Así, estas secuencias virales podrían ser estudiadas más a fondo para el desarrollo de tratamientos curativos o vacunas contra el VHC.

La respuesta celular contra el VHC podría verse interrumpida por distintos mecanismos. En primer lugar, el VHC induce una débil respuesta defensiva en pacientes que han desarrollado una infección crónica. En la sangre de pacientes con HCC, la cantidad de precursores de células Tc que son específicas 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 inmunotolerancia 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. El incremento de mutantes virales o cuasiespecies con variaciones de la secuencia en los epítopes de las células T puede contribuir a la aparente ineficacia de la respuesta inmune mediada por células. Igualmente, cada vez se sostiene con mayor fuerza la idea de que múltiples proteínas virales como la del core, E2, y NS5A, interfieren con la respuesta inmune. Finalmente, la respuesta inmune celular puede considerarse un arma de doble filo. 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. Los trabajos realizados hasta la fecha implican la respuesta inmune celular como la responsable de la lesión hepática inflamatoria cuando no es capaz de controlar el virus.

La progresión hacia la persistencia viral y los mecanismos de lesión hepática son, por tanto, consecuencia de múltiples interacciones entre el virus y el huésped. La identificación de las vías de aclaramiento inmunológico viral podrían contribuir al desarrollo de una vacuna efectiva y a la mejora de las terapias contra la infección por el VHC.

1.6.3.4. Factores genéticos

Las moléculas del MHC fueron inicialmente descubiertas por ser las principales responsables del rechazo de tejidos trasplantados entre individuos de la misma especie. Sin embargo hoy sabemos que las moléculas de histocompatibilidad juegan un papel esencial en la respuesta inmunológica capturando y presentando antígenos a las células T sin cuya función sería imposible la defensa del organismo frente a todos aquellos microorganismos, principalmente virus, que consiguen entrar en las células de cada individuo. Se localizan en la superficie de las células de las distintas especies animales y en el humano se denominan antígenos HLA (Antígeno Leucocitario Humano).

1.6.3.4.1. Estructura y distribución tisular de las moléculas de histocompatibilidad

Según su estructura, las MH se dividen en dos grandes grupos: moléculas de clase I y moléculas de clase II. Entre las primeras se encuentran las moléculas clásicas de clase I que se corresponden con los antígenos HLA-A, B y Cw y las moléculas no clásicas entre las que se encuentran HLA-E, F, G y CD1. Las moléculas HLA clase II pueden ser HLA-DR, DQ y DP. Se encuentran codificadas por regiones genéticas distintas dentro del MHC y desempeñan distintas funciones inmunológicas:

- **Las moléculas HLA de clase I** se hallan constituidas por dos cadenas polipeptídicas: una cadena pesada α , de mayor tamaño, glicosilada, que se encuentra asociada mediante interacciones no covalentes a una cadena ligera, la β -2-microglobulina, que es idéntica en todos los individuos de la misma especie y se expresa en el cromosoma 16. Por tanto, no es polimórfica en el hombre. La β -2-microglobulina muestra una fuerte homología a la región constante de las inmunoglobulinas. Es una proteína que, además de encontrarse en la superficie celular, se aísla en el suero a una concentración de 2 mg/l. La cadena pesada α es altamente variable entre individuos de la misma especie, siendo la responsable del polimorfismo antigénico de estas moléculas. En ella se distinguen tres zonas bien definidas, una zona extracelular de mayor tamaño en la que se encuentran los determinan-

Introducción

tes antigénicos de la molécula, una pequeña región transmembrana, hidrófoba, y finalmente una región intracitoplasmática de unos 35 aminoácidos. La zona extracelular se halla organizada en tres dominios de aproximadamente unos 90 residuos cada uno, denominados α -1, α -2 y α -3 mantenidos por la existencia de puentes intracatenarios. Los dominios α -1 y α -2 constituyen regiones de contenido variable en aminoácidos mientras que el dominio α -3 es bastante constante⁹³(figura 6).

Las moléculas de clase I se encuentran presentes en la mayoría de las células nucleares del organismo, aunque no son detectables en el endotelio corneal, glándulas de Brunner duodenales, trofoblasto veloso o neuronas del sistema nervioso central⁹⁴. Se detectan en niveles más bajos en tejido endocrino, miocardio y músculo esquelético.

- **Las moléculas HLA de clase II** son glicoproteínas que se encuentran en la superficie celular. Están formadas por dos cadenas, ambas con un dominio transmembrana, denominadas cadena α ó pesada y cadena β ó ligera, asociadas entre sí mediante interacciones de naturaleza no covalente. Ambas se encuentran codificadas por genes situados en el MHC y tienen una organización semejante. Están constituidas por dos dominios extracelulares, α -1 y α -2 y β -1 y β -2 en cada una de ellas, un dominio transmembrana y otro intracitoplasmático. (figura 6).

Introducción

La expresión de las moléculas de clase II se encuentra fundamentalmente en las células presentadoras de antígenos: macrófagos, monocitos, linfocitos B y cuando están activados también en linfocitos T y NK, células dendríticas, y células de Langerhans. También se encuentran en progenitores hematopoyéticos, células leucémicas y células de diferentes tipos de tumores^{94,95}.

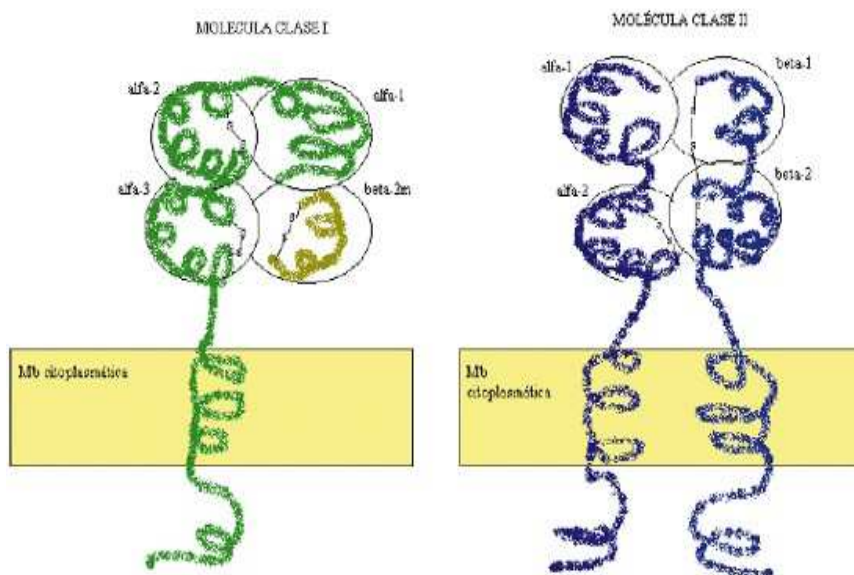


Figura 6. Estructura de las moléculas de clase I y II

1.6.3.4.2 Genética del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

Los loci genéticos que codifican estas moléculas se encuentran agrupados en el genoma en una región denominada MHC, que en el humano contiene al menos 50 genes distintos y se sitúa en el cromosoma 6. Este grupo de genes se encuentra organizado de forma diferente en las distintas especies, conociéndose con precisión la organización genética del MHC en el hombre. Esta región contiene múltiples genes que se expresan y genes que no.

Entre los de clase I se encuentran los genes que codifican las cadenas α de los antígenos HLA-A, HLA-B y HLA-C y entre los de clase II se encuentran los pares de genes que codifican las cadenas α y β de los antígenos HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. La región III contiene genes que codifican proteínas del complemento: Factor B, C2 y c4 y el citocromo P-450 y la 21-hidroxilasa (figura 7).

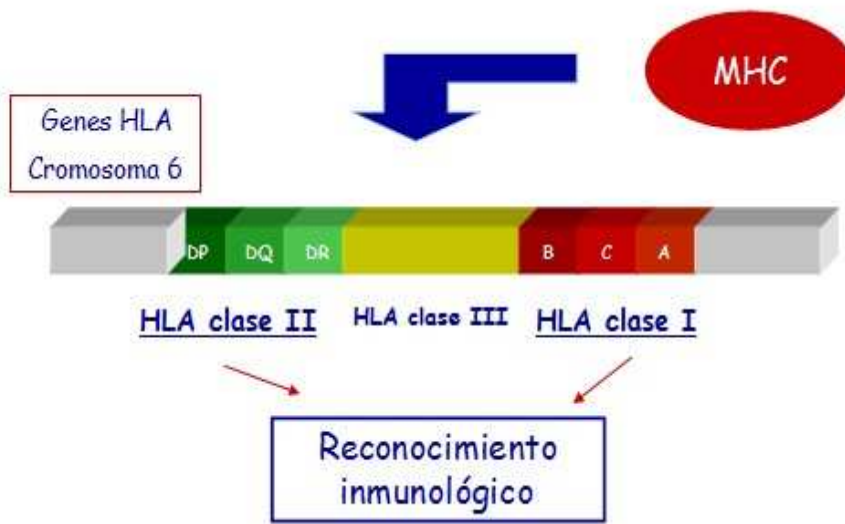


Figura 7. Genética del MHC.

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

1.6.3.4.3. Polimorfismos genéticos del HLA

El MHC es poligénico y los genes que lo constituyen son codominantes y polimórficos. Los distintos loci del complejo MHC están estrechamente ligados. En cada especie de mamífero los distintos loci del MHC son muy polimórficos, es decir, cada locus concreto del

Introducción

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 clase II. Cada individuo hereda un juego de MHC del padre y otro juego de la madre, cada uno con sus distintos alelos. Cada juego completo de alelos heredado de un progenitor se denomina haplotipo⁹⁶⁻⁹⁸. Por tanto, los individuos de cada generación descendientes de los parentales suelen ser heterocigotos en múltiples loci del MHC. Los dos alelos de cada locus son de expresión codominante, por tanto, un individuo heterocigoto para los distintos loci del MHC expresará en sus células al mismo tiempo los dos tipos de variantes alélicas de cada locus. No obstante, existen zonas muy conservadas, prácticamente idénticas en todos los individuos y zonas altamente variables. Cada especificidad definida en la superficie celular representaría un alelo diferente a nivel genómico⁹⁶.

Las moléculas de HLA clase I muestran un gran polimorfismo. La frecuencia de los alelos en una población varía según el grupo étnico. Por ejemplo, el HLA-A2 es encontrado en el 45% de los europeos caucasianos pero en negros africanos la frecuencia es sólo del 20%. Al contrario, el HLA-Bw52 está presente en el 20.5% de la población japonesa y es del 3% en los caucasianos. Es más, en una misma etnia la frecuencia alélica varía dependiendo de la localización geográfica⁹⁸.

Las bases estructurales del polimorfismo alélico han sido dirigidas por comparación de secuencias proteicas y nucleótidos de más de 100 alelos reconocidos de los loci HLA-A ,HLA-B y HLA-C. El

Introducción

polimorfismo se debe predominantemente a cambios aminoacídicos en los dominios α -1 y α -2 de la cadena pesada. El α -3 y la región transmembrana son también polimórficas pero menos. Este polimorfismo alélico es funcionalmente importante y origina las diferencias de la respuesta inmune restringida por HLA I. La sustitución de algunos aminoácidos es suficiente para alterar la serología y el reconocimiento de las células T. Por comparación de secuencias es posible determinar la distribución y frecuencia de la sustitución de nucleótidos que resultan en un cambio de aminoácidos y sustitución de nucleótidos que no causen un cambio de aminoácidos (silenciosas). La mayoría de sustituciones en α -3 son silenciosas⁹⁶.

Esto implica que las variaciones en las secuencias de aminoácidos de la porción de unión al antígeno es seleccionado por evolución, probablemente porque confiere una ventaja funcional en cuanto que genera diferencias en la respuesta inmune. El número de alelos de clase I en el hombre hace posible generar una respuesta inmune efectiva contra una gran variedad de antígenos extraños. Varios mecanismos genéticos están envueltos en la generación de la diversidad. Sustituciones nucleotídicas o mutaciones puntuales forman las bases de la diversidad. La comparación de las secuencias de humanos y chimpancés en genes de clase I muestra que la mayoría de estas mutaciones son muy ancestrales y se originaron antes de la divergencia de las líneas humana y chimpancé hace 3.3 millones de años. Todo esto crea un gran obstáculo para los trasplantes e injertos entre individuos de la misma especie.

Introducción

Por tanto, el alto grado de polimorfismo del MHC es una respuesta evolutiva para optimizar la protección de las especies de vertebrados frente a los distintos y variados microorganismos patógenos. Como cada molécula de MHC reconoce preferentemente un determinado repertorio de epítomos, esto influye en la calidad de la respuesta a la infección, o a las células tumorales. Este polimorfismo es el resultado de un largo proceso evolutivo ejercido por la presión de distintos agentes infecciosos, y 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 un proceso de recombinación génica o bien mediante el proceso denominado conversión génica, según el cual una secuencia es reemplazada por otra semejante de un gen homólogo⁹⁹. La recombinación entre alelos del mismo locus parece ser el mecanismo más frecuentemente utilizado para la creación del polimorfismo y así muchos alelos diferentes pueden proceder de procesos de recombinación repetidos a partir de un pequeño número de genes ancestrales. La existencia de este proceso evolutivo apoya que el polimorfismo es esencial para la función de los antígenos de histocompatibilidad.

1.6.3.4.4 Relación HLA y VHC

La mayoría de las células infectadas por virus exhiben péptidos antigénicos en la superficie de sus membranas plasmáticas asociadas al HLA, que son reconocidos por las células T citotóxicas (Tc) mediante su receptor TCR. De esta forma se ha podido demostrar en animales, que las células Tc que reconocen un haplotipo HLA determinado pertenecientes a un animal infectado por un virus se sensibilizan para destruir las células infectadas. Sin embargo, son incapaces de lisar células que tienen un haplotipo diferente infectadas por el mismo virus. Este fenómeno se conoce como citotoxicidad restringida por el haplotipo o de modo más genérico, restricción MHC.

No existen evidencias de que el VHC sea directamente citopático. Por el contrario, la patogénesis de la HCC está mediada por la respuesta inmunitaria frente a antígenos virales, es decir, por la activación de los linfocitos Tc. Los linfocitos Tc CD8+ 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 histólisis directa o mediante inducción de apoptosis, provocando un daño histológico.

Introducción

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^{100,101}.

Hasta la fecha, lo más estudiado ha sido la correlación entre los alelos HLA y el aclaramiento espontáneo de la hepatitis aguda C, siendo muchos los alelos HLA encontrados, en especial el HLA-DQB1*0301 y el HLA-DRB1*11 y el haplotipo DRB1*11-DQB1*0301. De hecho hay un metanálisis publicado en el año 2005 con todos los trabajos publicados al respecto hasta ese momento, que demuestra que ambos alelos están relacionados con el aclaramiento espontáneo viral, siendo los más repetidos en distintas poblaciones¹⁰².

Desde que se conoce que el IFN-peg tiene un efecto antiviral directo y que la RBV promueve una respuesta inmune mediada por citoquinas tipo I favoreciendo una respuesta inmune antiviral, podríamos pensar que existe una asociación entre las características inmunogenéticas del hospedador y la respuesta a la terapia antiviral del VHC. Se sabe que la eliminación del VHC y la patogénesis de esta enfermedad se debe en gran medida a una fuerte respuesta que es multiespecífica por parte de las células T¹⁰⁰. Si existe o no una asociación entre las moléculas HLA y la respuesta del tratamiento antiviral con IFN se ha estudiado a nivel mundial. Hasta la fecha, no se ha encontrado una asociación repetitiva y clara entre un determinado alelo HLA y la respuesta, como ocurría en el caso de aclaramiento viral espontáneo (HLA-DQB1*0301 y HLA-DRB1*11), con resultados contradictorio dependiendo de la raza que se estudie^{103,104}. Además, estos resultados pueden variar en función de los genes que sean

evaluados y el método de genotipado. Únicamente el locus HLA-DR parece ser un factor inmunogenético relacionado con la respuesta al tratamiento¹⁰³. Muchos de los estudios que estudian esta asociación entre moléculas HLA y respuesta al tratamiento antiviral, usan IFN en monoterapia o combinado con RBV, pero son muy pocos los que abordan al IFNpeg/RBV^{105,106}.

1.6.3.4.5. Otros polimorfismos genéticos: IL28B

Muy recientemente, un cambio de nucleótido simple (SNP, single nucleotide polymorphism), en rs12979860, en el cromosoma 19q13, se ha asociado fuertemente con la RVS del tratamiento con IFN-peg y RBV en una cohorte de aproximadamente 1600 individuos mediante estudios de análisis de genomas masivos (GWAS)¹⁰⁷. Esta variante genómica se localiza cerca del locus de la IL28B, el cual codifica para los IFN- λ o IFNs tipo III. La variante es un cambio de citosina por timina (C>T) en rs12979860. Estos datos han sido corroborados por otros autores^{108,109}. De acuerdo con todos los resultados obtenidos en estos últimos meses, se ha llegado a la conclusión de que este polimorfismo es el mejor marcador genético que predice la respuesta al tratamiento combinado IFN-peg/RBV, incluso mejorando a los factores virales ya conocidos.

2. JUSTIFICACIÓN

HIPÓTESIS

2.1. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO

La infección por el VHC constituye un problema sociosanitario de ámbito universal. Como hemos visto, tanto los factores virales (genotipo, carga viral, etc) como los factores del hospedador (edad, sexo, consumo de alcohol, respuesta inmune, etc) pueden alterar la historia natural de la enfermedad y la respuesta terapéutica. El único tratamiento que se ha mostrado eficaz frente a la infección es IFN-alfa sólo o en combinación con RBV. La tasa de RVS en los pacientes tratados con IFN-peg combinado con dosis máximas de RBV alcanza hasta el 54% en el genotipo 1. La respuesta al tratamiento depende fundamentalmente del genotipo y la carga viral, sin embargo, hay pacientes con el mismo genotipo y una carga viral parecida que presentan un tipo de respuesta diferente. La posibilidad de que parámetros genéticos e inmunológicos puedan predecir la respuesta al tratamiento ha despertado un gran interés

El IFN-alfa además de tener un efecto antiviral directo, presenta una actividad inmunomoduladora que puede aumentar la respuesta inmune antiviral del paciente al aumentar la expresión del antígeno del MHC de clase I. Muchos estudios han indicado que determinados genotipos HLA pueden estar relacionados con el aclaramiento espontáneo del VHC y que pueden modular de alguna manera la gravedad de la infección provocada por dicho virus. La expresión del MHC de clase I y II en la superficie celular, que está inducido por el IFN- α , induce a que las células diana sean reconocidas por los linfocitos Tc y las células NK. Por tanto, variaciones en el genotipo

HLA pueden jugar un papel muy importante en la respuesta al tratamiento con IFN-peg y RBV. Entre otros aspectos, este alto grado de variabilidad es debido a diferencias étnicas y la heterogeneidad demográfica.

Por tanto, ya que el genotipo HLA representa un marcador antropológico y muestra diferencias en los distintos grupos étnicos, se deben intentar hacer estudios en los que la cohorte de pacientes sea lo más homogénea posible.

Llegados a este punto, son muchos los estudios que relacionan el papel de los polimorfismos genéticos de HLA con el control y aclaramiento del VHC durante la infección aguda. Pero son escasos los trabajos y muy controvertidos, que relacionan estos polimorfismos con la respuesta al tratamiento con IFN y RBV en la HCC¹⁰²⁻¹⁰⁴. De hecho, en la revisión bibliográfica efectuada son pocos los trabajos que relacionen estos polimorfismos con el tratamiento actual con IFN-peg y RBV conjuntamente^{105,106}. Además, se está estudiando el tipaje HLA en relación con la HCC en muchos países de una forma global y en distintas razas étnicas¹¹⁰, pero son muy pocos los datos en España, y con una población de estudio homogénea.

Por otro lado, como ya han descrito diversos autores, el tipaje de HLA debe de ser lo más amplio posible (de alta resolución), para así poder determinar con mayor exactitud la relación entre frecuencia alélica y respuesta al tratamiento. Por tanto, en el presente proyecto de investigación tratamos de confeccionar un “mapa” genético que nos

permita conocer qué tipo de pacientes responderán mejor al tratamiento con IFN-peg y RBV.

La **hipótesis** de este proyecto es que existe una asociación positiva o negativa entre determinados genotipos HLA y la RVS al tratamiento con IFN-peg y RBV en pacientes con HCC genotipo 1 previamente no tratados.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS

- **Principal**

Valorar la influencia de los factores genéticos del paciente (genotipo HLA de clase I y clase II) en la respuesta al tratamiento con IFN-Peg y RBV mediante un estudio de cohorte retrospectivo.

- **Secundarios**

1.- Estudiar si los factores predictivos de respuesta (del huésped, virológicos y tratamiento) ya conocidos, se relacionan con la RVP y RVS en nuestro medio.

2.- Estudiar si existe alguna relación entre el genotipo HLA y la carga viral con los distintos factores predictivos de respuesta.

PACIENTES ***Y***

MÉTODOS-

4. PACIENTES Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO

Estudio de cohorte retrospectivo.

4.2. ÁMBITO DEL ESTUDIO

Hospital Universitario “San Cecilio” de Granada.

4.3. PACIENTES Y RECOGIDA DE DATOS

Un total de 277 pacientes con HCC genotipo 1, de raza blanca, españoles, tratados con IFN-peg + RBV, y que previamente no habían sido tratados, fueron incluidos en este estudio retrospectivo. El diagnóstico de HCC estaba basado en niveles de ALT aumentados al menos durante 6 meses y la detección permanente en el suero de ARN-VHC. Los pacientes no presentaban coinfección con VHB, VIH, alcoholismo ni enfermedad autoinmune hepática o inducida por fármacos.

Se realizaron extracciones de sangre: basal y en todos los meses durante el tratamiento, así como en los 6 meses postratamiento. En todas las muestras se procedió a la obtención de tres alícuotas de suero, almacenándose a -80°C; dos alícuotas fueron utilizadas posteriormente para el estudio virológico y la otra para el de bioquímica. En la muestra basal también se guardaron dos alícuotas de sangre total para el genotipado de HLA clase I y II.

Los datos clínicos, bioquímicos, virológicos, así como los parámetros histológicos basales, fueron recogidos en una base de datos, para su posterior análisis estadístico.

El tratamiento consistió en la administración de 180 µg de IFN-peg alfa-2a (Pegasys, Roche Diagnostic) vía subcutánea una vez por semana o IFN standard (3MU/3 veces por semana), en combinación con RBV, dosis-ajustada al peso (800-1200 mg/día; Copegus, Roche Diagnostic) durante 48 semanas.

Los criterios de respuesta fueron los ya admitidos:

Tabla 3. Definiciones del tipo de respuesta virológica utilizados en este estudio.

Respuesta	Definición
RVR	ARN del VHC indetectable (<50 UI/ml) a la semana 4
RVP	Descenso del ARN del VHC $\geq 2 \log_{10}$ UI/ml (100 veces) del inicial o indetectable a la semana 12
RVS	ARN del VHC indetectable a los 6 meses de suspender el tratamiento
NR	Descenso del ARN del VHC $< 2 \log_{10}$ UI/ml (100 veces) del inicial a la semana 12
Recidiva	ARN del VHC detectable tras suspender el tratamiento con un ARN del VHC indetectable durante el mismo (recurrencia)

4.4. VARIABLES DEL ESTUDIO

1. En el estudio de los factores predictivos de respuesta las variables dependientes han sido el tipo de respuesta: RVP frente no-RVP; RVS frente a no-RVS; RVS frente a recidiva.

Las variables independientes han sido las características basales clínicas y biológicas de los pacientes: edad, sexo, datos epidemiológicos, datos bioquímicos (ALT, AST, GGT) y grado de lesión histológica; las características inmunogenéticas del paciente (todos los alelos HLA de tipo I (A, B y C) y de tipo II (DRB1 y DQB1)) y los datos virológicos: genotipo y carga viral.

2. En el estudio de las características de los pacientes portadores del alelo DQB1*0301, la variable dependiente ha sido la presencia frente a la ausencia de dicho alelo; y en aquellos pacientes con este alelo, la RVS frente a la no-RVS. Las variables independientes han sido las ya descritas en el punto anterior, exceptuando el resto de alelos HLA.

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Al ser las variables dependientes cualitativas, se ha utilizado una regresión logística simple para el análisis bivalente, con la obtención de Odds ratio cruda (ORc) con un intervalo de confianza (IC) del 95% y un α de 0.05. Para determinar si una variable está asociada independientemente a la variable dependiente, se utilizó una regresión logística multivariante. Las covariables del análisis bivalente incluidas en el multivariante fueron la edad, el sexo, la fibrosis, el tipo de tratamiento, los niveles de ALT y de GGT, así como la carga viral basal y la presencia del alelo DQB1*0301, con la obtención de las Odds ratio ajustadas (ORA) (IC del 95%, y un α de 0.05). Debido al carácter

poligenómico de los alelos HLA, los valores de P se han corregido por el número de alelos encontrados en cada locus (P_c ; Bonferroni).

El criterio de significación estadística fue $P \leq 0.05$. El estudio estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 15.0 para Windows.

4.6. METODOLOGÍA

Tanto la carga viral, como la determinación del ARN-VHC y el genotipo se han realizado en el laboratorio de microbiología del Hospital Universitario “San Cecilio” de Granada. Así mismo, la bioquímica se realiza en el laboratorio de bioquímica y el hemograma en el laboratorio de hematología del mismo hospital.

4.6.1. DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO

El genotipo viral fue determinado mediante técnicas de hibridación inversa (Inno-LIPA II HCV; Innogenetics, S.A., Ghent, Belgium).

4.6.2. DETERMINACIÓN DE LA CARGA VIRAL

La concentración del VHC se realizó mediante COBAS AMPLICOR MONITOR-HCV V2.0 (Roche Diagnostics).

4.6.3. TIPAJE HLA

Tipaje HLA genómico de alta resolución mediante los métodos PCR-SSO (Sequence-specific oligoprobes) (One Lambda, Inc.) y secuenciación de los distintos loci por SBT (Sequence-based typing). Para ello se realiza una amplificación por PCR utilizando primers específicos para cada locus HLA-A, -B, -C y -DRB1 y -DQB1, cada uno de estos amplificados se secuencian posteriormente utilizando primer específicos de locus para los exones 2, 3 y 4 (este exon en el locus A) en las dos direcciones. Los productos de la reacción de PCR se purifican usando columnas Microcon (Amicon), mientras que las reacciones de secuenciación se purifican usando columnas de centrifugación CentriSep Spin Columns (Applied Biosystems). Las reacciones de secuenciación se hacen con “big-dye terminators” y se someten a electroforesis en un gel de poliacrilamida en el secuenciador automático ABI PRISM 377 (PE Applied Biosystem) utilizando el software Matchtools de PE Applied Biosystem.

4.6.4. ESTUDIO HISTOLÓGICO

Para la toma de muestras de tejido hepático, se realiza punción del hígado a través de una aguja que obtiene por aspiración bajo control previo ecográfico a través del octavo o noveno espacio intercostal derecho a nivel de la línea axilar media. El estudio histológico fue

realizado conforme a la clasificación de Scheuer con mínimas modificaciones:

Tabla 4. Sistema de Scheuer

Grado	(A) Actividad portal / periportal	(B) Actividad lobulillar
0	Ninguna	Ninguna
1	Inflamación portal	Focos inflamatorios sin necrosis
2	Inflamación periportal leve	Focos necroinflamatorios
3	Inflamación periportal moderada	Focos de necrosis
4	Inflamación periportal Grave	Necrosis en puentes

Actividad (0-8). El scheuer modificado consiste en sumar (A)+(B)

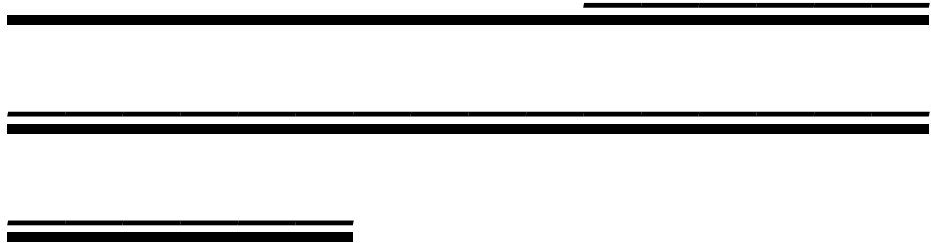
Grado	Fibrosis
0	Ninguna
1	Fibrosis portal
2	Fibrosis periportal +- algunos puentes
3	Fibrosis periportal + puentes
4	Cirrosis

Fibrosis (0-4)

4.7. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Para la participación se requirió consentimiento informado a cada paciente, cuyo protocolo de estudio se conformó según las directrices éticas de la declaración de Helsinki de 1975. La aprobación previa para el estudio fue obtenida de los Comités de Ética correspondientes del Hospital Universitario San Cecilio de Granada.

RESULTADOS



5. RESULTADOS

5.1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES:

Las principales características clínicas, virológicas e histológicas de todos los pacientes vienen resumidas en la **tabla 5**. El 42% de los pacientes tenían \leq de 40 años y el 48% fueron mujeres. En cuanto a la fibrosis, el 77% presentaban una fibrosis estadio 0-2, frente a los 50 pacientes (23%) en los que se objetivó estadio 3-4. En relación con el grado de actividad inflamatoria y necrosis, el 63% se encontraban en grado 0-4. El 91% de los pacientes fueron tratados con IFN-peg + RBV; el 9% restante, con IFN-estándar + RBV. En cuanto a los niveles de transaminasas, sólo el 10% presentaban niveles de ALT \leq 40 U/L, y un 33% niveles de AST \leq 40 U/L. La mitad de los pacientes en los que se midieron los niveles de GGT los encontramos en cifras \leq 37 U/L. En cuanto a la carga viral, el 29% partía de cifras \leq 600.000 UI/mL.

Tabla 5. Características basales de la población a estudio

	Total Pacientes n=277 (%)
Edad (años)	
• ≤40	117 (42)
• >40	160 (58)
Sexo	
• Mujeres	133 (48)
• Hombres	144 (52)
Estadio de fibrosis (n=219)	
• 0-2	169 (77)
• 3-4	50 (23)
Grado de actividad (n=212)	
• 0-4	133 (63)
• 5-8	79 (37)
Tratamiento	
• IFN-peg+RBV	251 (91)
• IFN+RBV	26 (9)
ALT (U/L)	
• ≤40	27 (10)
• >40	250 (90)
AST (U/L)	
• ≤40	91 (33)
• >40	186 (67)
GGT (U/L)(n=260)	
• ≤37	129 (50)
• >37	131 (50)
Carga viral basal (UI/ml)	
• ≤600000	78 (29)
• >600000	199 (71)

5.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DE LA RVP Y RVVS:

El 18% (n=50) de los pacientes no obtuvieron una RVP a las 12 semanas de tratamiento, y el 82% (n=227) fueron respondedores precoces (**Tabla 6**). Los únicos factores relacionados con la RVP fueron el tratamiento con IFN-peg + RVB (P=0.004) y los pacientes con niveles de GGT ≤ 37 U/L (P=0.011). Aunque no está representado, al hacer el estudio con las medias de ALT, AST y GGT en ambos grupos, nos encontramos que la ALT era mayor en los pacientes con no-RVP (no-RVP: $121 \pm 20,1$ U/L vs RVP: $99 \pm 4,7$ U/L; ns); también la AST (no-RVP: 86 ± 14 U/L vs RVP: 60 ± 3 U/L; p=0.048), y de la misma forma la GGT (no-RVP: 100 ± 13 U/L vs RVP: 52 ± 50 U/L; P=0.001), siendo significativas, por tanto, las diferencias en el caso de la AST y GGT.

Tabla 6. Características de los pacientes en función de la RVP

	no-RVP n=50(18%)	RVP n=227(82%)	ORc (95% IC.)	valor-P
Edad (años)				
•≤40	22 (19)	95 (81)	0.87 (0.48-1,58)	0.66
•>40	28 (19)	132 (88)	1	
Sexo				
•Mujeres	25 (19)	108 (81)	0.83 (0.46-1.51)	0.55
•Hombres	25 (17)	119 (83)	1	
Estadio de fibrosis				
•0-2	33 (19)	136 (81)	0.99 (0.45-2.17)	0.99
•3-4	10 (20)	40 (80)	1	
Grado de actividad				
•0-4	28 (21)	105 (79)	0.64 (0.3-1.33)	0.23
•5-8	12 (15)	67 (85)	1	
Tratamiento				
•IFNpeg+RBV	40 (16)	211 (84)	<u>3.4 (1.46-7.86)**</u>	<u>0.004</u>
•IFN+RBV	10 (38)	16 (62)	<u>1</u>	
ALT (U/L)				
•≤40	4 (15)	23 (85)	0.92 (0.33-2.53)	0.87
•>40	46 (18)	204 (82)	1	
AST (U/L)				
•≤40	14(15)	77 (85)	1.04 (0.54-1.99)	0.89
•>40	36 (19)	150 (81)	1	
GGT (U/L)				
•≤37	14 (11)	115(89)	<u>2.34 (1.21-4.52)**</u>	<u>0.011</u>
•>37	32 (24)	99 (76)	<u>1</u>	
Carga viral (UI/ml)				
•≤600000	11 (14)	67(86)	1.4 (0.73-2.97)	0.26
•>600000	39 (20)	160 (80)	1	

Se representan los datos en valor absoluto con los porcentajes en paréntesis. RVP, respuesta virológica precoz; ORc, Odds Ratio cruda; IC, intervalo de confianza; ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; GGT, gamma glutamiltranspeptidasa. Analisis bivariante mediante regresión logística simple.

En cuanto a la RVS (**Tabla 7**), nos encontramos que el 56% de los pacientes (n=156) tienen RVS. Los únicos factores asociados con la RVS fueron la edad ≤ 40 años (ORc=2,96; P<0.001) y la carga viral basal ≤ 600.000 UI/mL (OR=2.68; P<0.001). Al hacer el estudio con las medias de ALT, AST y GGT, nos encontramos que la ALT es igual en ambos grupos (no-RVS: $105 \pm 9,7$ U/L vs RVS: 101 ± 6 U/L; ns), mientras que la AST era mayor en el grupo de los no-RVS (no-RVS: 74 ± 7 U/L vs RVS: 58 ± 3 U/L; P=0.025), y de la misma forma la GGT (no-RVS: 75 ± 7 U/L vs RVS: 48 ± 3 U/L; P=0.001), como ocurría en el caso de la RVP. Es importante destacar la ausencia de correlación entre la respuesta al tratamiento antiviral, el estadio de fibrosis y el grado de inflamación y necrosis.

Tabla 7. Características de los pacientes en función de la respuesta al tratamiento

	no-RVS n=121(44%)	RVS n=156(56%)	ORc (95% IC)	valor-P
Edad (años)				
• ≤40	36 (31)	81 (69)	<u>2.96 (1.5-4.3)</u>	<u><0.001</u>
• >40	85 (53)	75 (47)	<u>1</u>	
Sexo				
• Mujeres	63 (47)	70 (53)	0.75 (0.4-1.2)	0.23
• Hombres	58 (40)	86 (60)	1	
Estadio de fibrosis				
• 0-2	70 (41)	99 (59)	1.53 (0.8-2.8)	0.18
• 3-4	26 (52)	24 (48)	1	
Grado de actividad				
• 0-4	57 (43)	76 (57)	1.11 (0.63-1.95)	0.7
• 5-8	36 (46)	43 (54)	1	
Tratamiento				
• IFN-peg+RBV	107 (43)	144 (57)	1.5 (0.68-3.53)	0.27
• IFN+RBV	14 (54)	12 (46)	1	
ALT (U/L)				
• ≤40	13 (48)	14 (52)	0.8 (0.3-1.77)	0.58
• >40	108 (43)	142 (57)	1	
AST (U/L)				
• ≤40	35 (38)	56 (62)	1.35 (0.8-2.26)	0.24
• >40	86 (46)	100 (54)	1	
GGT (U/L)				
• ≤37	54 (42)	75 (58)	1.2 (0.7-2.03)	0.37
• >37	62 (47)	69 (53)	1	
Carga viral (UI/ml)				
• ≤600000	21 (27)	57 (73)	<u>2.68 (1.5-4.7)</u>	<u><0.001</u>
• >600000	100 (50)	99 (50)	<u>1</u>	

Se representan los datos en valor absoluto con los porcentajes en paréntesis; ORc, Odds Ratio cruda; IC, intervalo de confianza; RVS, respuesta virológica sostenida; ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; GGT, gamma glutamiltranspeptidasa.

Analisis bivalente mediante regresión logística simple.

5.3. ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA ALÉLICA HLA Y SU ASOCIACIÓN CON LA RVP Y RVS.

En nuestra muestra de estudio, en la región HLA clase I se observaron 35, 58 y 33 alelos para los loci tipo A*, B* y C* respectivamente. En cuanto a la clase II, nos encontramos 35 alelos en el locus HLA DRB1* y 16 alelos en el locus DQB1*. Sólo 6 alelos HLA-A*, 7 alelos HLA-B*, 8 alelos HLA-C*, 7 alelos HLA-DRB1* y 7 alelos DQB1* fueron observados con una frecuencia alélica $\geq 5\%$. Ningún alelo de clase I ni de clase II se asoció estadísticamente con la RVP, así como ninguno de clase I se asoció estadísticamente con la RVS después de aplicar la corrección de Bonferroni. Sin embargo, la presencia del alelo de clase II DQB1*0301 (n=62) fue asociado con la RVS ($P_c=0.016$) (**Tabla 8**).

Tabla 8. †Alelos HLA clase I y II seleccionados y asociación con la RVP y RVS

	No-RVP n=50 (18%)	RVP n=227 (82%)	ORc (95% IC, valor de p (Pc))	No-RVS n=121 (44%)	RVS n=156 (56%)	ORc (95% CI, valor de p (Pc))
Alelos clase I						
A*0201+	23 (19)	98 (81)	0.94 (0.52-1.72, 0.86)	43 (36)	78 (64)	1.86 (1.14-3.02, 0.012 (0.42))
A*0301+	17 (29)	42 (71)	0.5 (0.26-0.96, 0.039)	33 (56)	26 (44)	0.49 (0.27-0.89, 0.019 (0.6))
B*4403+	13 (22)	47 (78)	0.78 (0.39-1.56, 0.49)	32 (53)	28 (47)	0.62 (0.34-1.1, 0.1)
Cw*0401+	13 (18)	58 (82)	1.005 (0.5-1.99, 0.98)	29 (41)	42 (59)	1.19 (0.69-2.06, 0.52)
Cw*0701+	9 (16)	47 (84)	1.33 (0.61-2.88, 0.46)	22 (39)	34 (61)	1.27 (0.7-2.32, 0.42)
Alelos clase II						
DRB1*0301+	16 (22)	58 (78)	0.73 (0.38-1.41, 0.36)	35 (47)	39 (53)	0.83 (0.49-1.42, 0.51)
DRB1*0701+	25 (25)	76 (75)	0.53 (0.29-0.97, 0.04 (1.4))	55 (54)	46 (46)	0.48 (0.33-0.79, 0.004 (0.14))
DQB1*0201+	17 (21)	63 (79)	0.74 (0.39-1.4, 0.34)	37 (46)	43 (54)	0.88 (0.52-1.48, 0.63)
DQB1*0202+	21 (22)	73 (78)	0.69 (0.37-1.22, 0.24)	51 (54)	43 (46)	0.53 (0.32-0.88, 0.015 (0.24))
DQB1*0301+	8 (13)	54 (87)	1.5 (0.7-3.3, 0.27)	16 (26)	46 (74)	2.74 (1.46-5.14, 0.001 (0.016))
DQB1*0501+	9 (12)	65 (88)	1.9 (0.87-4.1, 0.93)	28 (38)	46 (62)	1.4 (0.82-2.44, 0.21)

Se representan los datos en valor absoluto con los porcentajes en paréntesis. RVP, respuesta virológica precoz; ORc, Odds Ratio cruda; IC, intervalo de confianza; RVS, respuesta virológica sostenida.

Analisis bivariante mediante regresión logística: ORc, IC 95% y valor de P. † Sólo representados los alelos con una frecuencia portadora $\geq 10\%$.

En la **tabla 9** se representan sólo aquéllos alelos que se asociaron de forma estadísticamente significativa con la respuesta al tratamiento antes de aplicar la corrección mediante el método de Bonferroni. Podemos apreciar que una vez una vez que se aplica esta corrección, el único alelo que se sigue asociando de forma significativa es el DQB1*0301 (n=62) (P=0.001, Pc=0.016).

Tabla 9. Alelos HLA de clase I y II que se asociaron de forma estadísticamente significativa con la respuesta al tratamiento antes de la corrección mediante el método de Bonferroni.

	ORc* (IC 95%)	Valor de P	Pc
Alelos de clase I y II			
A*0201 (+)	1.86 (1.14-3.02)	0.012	0.42
A*0301 (+)	0.49 (0.27-0.89)	0.019	0.6
B*4001 (+)	5.34 (1.20-23.78)	0.02	1
B*4402 (+)	2.47 (1.03-5.918)	0.03	1
Cw*0304 (+)	4.31 (1.25-14.96)	0.02	0.6
DRB1*0701(+)	0.48 (0.33-0.84)	0.004	0.14
DRB1*1101(+)	2.2 (1.02-4.9)	0.04	1
DQB1*0202(+)	0.53 (0.32-0.88)	0.015	0.24
DQB1*0301(+)	2.74 (1.46-5.14)	0.001	0.016

RVS, respuesta virológica sostenida; ORc, Odds Ratio cruda; IC, intervalo de confianza; Pc, corrección de Bonferroni.

**Regresión logística simple: la ORc representa la probabilidad de RVS de los pacientes que portan el alelo, con respecto a los que no lo portan (grupo de referencia).*

Debido al desequilibrio de unión que existe entre los alelos DRB1*11 y DQB1*0301, hemos examinado si la presencia del haplotipo DRB1*11-DQB1*0301, se relaciona con la respuesta al tratamiento. 31 pacientes portaban este haplotipo, de los cuáles 24 (78%) obtuvieron una RVS, mientras que de los 246 pacientes sin el mismo, 143 (58%) presentaron una RVS ($p=0.03$). Tras corregirlo mediante el método de Bonferroni, perdimos esta significación.

5.4. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LAS VARIABLES ASOCIADAS DE FORMA INDEPENDIENTE CON LA RVP Y RVS.

En las **figuras 8 y 9** se representan la ORa estimada mediante un modelo de regresión logística multivariante de aquellas variables que se asocian independientemente con la RVP y la RVS. El alelo DQB1*0301 permaneció asociado independientemente a la RVS después del ajuste por cada uno de los demás factores predictivos.

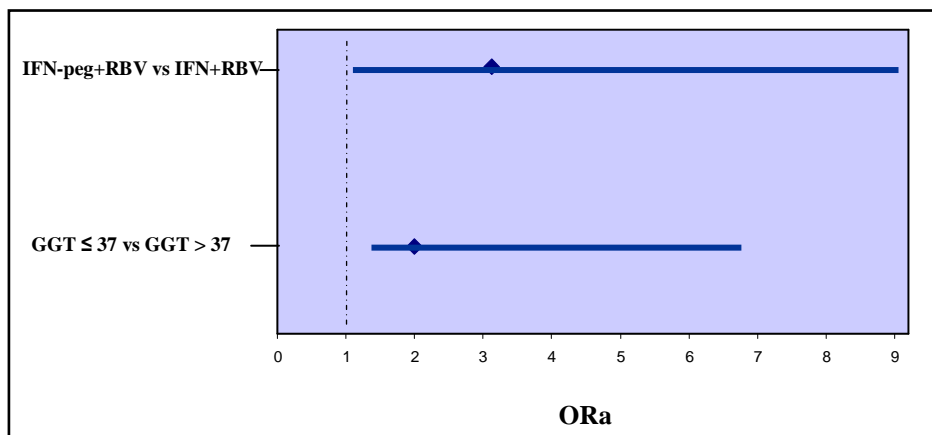


Figura 8. Representación gráfica de los factores asociados independientemente a la RVP. Las variables del modelo multivariante final son: IFN-peg+RBV (ORa=3.12, IC95%:1.08-9.05, P=0.0036) y GGT≤37U/L (ORa=3.07, IC95%:1.38-6.8, P=0.006).

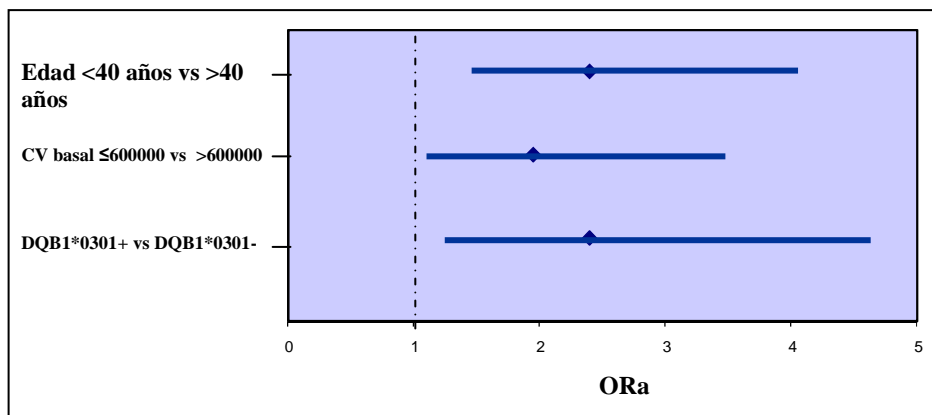


Figura 9. Representación gráfica de los factores asociados independientemente a la RVS. Las variables del modelo multivariante final son: edad ≤40 años (ORa=2.4, IC95%:1.4-4.04, P=0.001), Carga viral ≤600000UI/ml (ORa=1.95, IC95%:1.06-3.5, P=0.031) y presencia del alelo DQB1*0301(ORa=2.4, IC95%:1.2-4.6, P=0.01). El test de bondad de ajuste de Horner-Lemeshow: p=0.97 para el modelo de RVS.

5.5. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DEL ALELO DQB1*0301

En la **tabla 10** se representan las características de los pacientes portadores (n=62) y no portadores (n=215) del alelo DQB1*0301. Estos pacientes sólo se diferencian significativamente en la carga viral basal ($p<0.0001$), de manera que el 48% de los pacientes portadores de este alelo tiene una carga viral >600000 UI/ml, mientras que el 78% de los no portadores tienen una carga viral >600000 UI/ml. En el análisis estratificado por tratamientos se apreció que de 251 pacientes que recibieron IFN-peg, el 23.5% (n=59) poseían el alelo DQB1*0301 frente al 76.5% (n=192) que no lo portaban. El 76.3% de los portadores de este alelo (45/59) obtuvieron una RVS, frente al 51% (98/192) de los que no lo portaban (ORc=3.083, 95% CI=1.5-5.9, P=0.001; Pc=0.016). En los pacientes tratados con IFN estándar (n=26) no se pudo realizar este estudio debido al pequeño tamaño de muestra, con sólo 3 pacientes (3/26) que portaban este alelo.

Tabla 10. Características basales de los pacientes genotipo 1 con y sin el alelo DQB1*0301

	Portadores DQB1*0301 n=62 (22%)	No portadores DQB1*0301 n=215 (78%)	Valor de p
Sexo • Mujeres • Hombres	31 (50) 31 (50)	102 (47) 113 (53)	0.722
Estadio de Fibrosis • 0-2 • 3-4	36 (74) 13 (26)	133 (78) 37 (22)	0.484
Grado de actividad • 0-4 • 4-8	34 (68) 16 (32)	99 (61) 63 (39)	0.378
ALT (U/L) • ≤40 • >40	6 (10) 56 (90)	21 (10) 190 (90)	0.949
AST (U/L) • ≤40 • >40	26 (42) 36 (58)	65 (31) 147 (69)	0.097
GGT (U/L) • ≤37 • >37	35 (58) 25 (42)	94 (47) 106 (53)	0.124
Carga virológica basal (UI/mL) • ≤600000 • >600000	32 (52) 30 (48)	46 (22) 165 (78)	<u><0.0001</u>

Se representan los datos en valor absoluto con los porcentajes en paréntesis. ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; GGT, gamma glutamiltranspeptidasa.

Se diseñó también un análisis de regresión logística multinomial simple donde la variable dependiente tenía tres categorías: RVS, recidivantes y NR, y se encontró que los pacientes que presentaban el alelo DQB1*0301 tenían 3.09 veces más probabilidad de RVS (IC 95%=1.42-6.72, P=0.004) que aquéllos que no lo portaban en comparación con los recidivantes, y 1.89 veces en comparación con los NR a la 12 semana de tratamiento (IC 95%=1.38-4.3, P=0.003). Así, el test de la “razón de verosimilitudes” nos indica que la presencia o no del alelo DQB1*0301 influye de forma significativa en la respuesta al tratamiento (p=0.006).

5.6. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES GENOTIPO 1 PORTADORES DEL ALELO HLA DQB1*0301 EN FUNCIÓN A LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTIVIRAL.

Si nos centramos en los 62 pacientes que presentan el alelo DQB1*0301, el 74% alcanzan una RVS (46/62), y el único factor asociado con esta RVS fue el nivel de GGT ≤ 37 U/L, de manera que los pacientes con una GGT ≤ 37 U/L tienen 3.2 veces más posibilidad de responder que los que presentan una GGT > 37 U/L (p=0.047).

En el análisis multivariante se incluyeron las siguientes variables: edad, sexo, niveles ALT, niveles de GGT y carga viral. Los niveles de GGT fueron el único factor independientemente asociado a la RVS (ORa: 4.8, 95% IC: 1.09-21.2, p=0.038), de forma que los pacientes con una GGT ≤ 37 U/L tienen 4.8 veces más probabilidad de obtener RVS que los que presentan una GGT > 37 U/L) (**tabla 11**).

Tabla 11. Características basales de los pacientes genotipo 1 que portan el alelo DQB1*0301 con respecto a la respuesta al tratamiento.

	DQ0301 (n=62)		ORc (95% CI)	Valor de p
	No-RVS n=16 (26%)	RVS n=46 (74%)		
Edad (años)				
• ≤40	5 (18)	22 (82)	2.017 (0.6-6.7)	0.254
• >40	11 (31)	24 (69)	1	
Sexo				
• Mujeres	10 (32)	21 (68)	0.504 (0.15-1.61)	0.246
• Hombres	6 (19)	25 (81)	1	
Estadio de fibrosis				
• 0-2	8 (22)	28 (78)	1.05 (0.23-4.7)	0.95
• 3-4	3 (23)	10 (77)	1	
Grado de actividad				
• 0-4	10 (29)	24 (71)	0.8 (0.2-3.08)	0.746
• 4-6	4 (25)	12 (75)	1	
ALT (U/L)				
• ≤40	3 (50)	3 (50)	0.302 (0.05-1.68)	0.150
• >40	13 (23)	43 (77)	1	
AST (U/L)				
• ≤40	6 (23)	20 (77)	1.28 (0.4-4.12)	0.676
• >40	10 (28)	26 (72)	1	
GGT (U/L)				
• ≤37	6 (17)	29 (83)	<u>3.22 (1.05-10.5*)</u>	<u>0.047</u>
• >37	10 (40)	15 (60)	<u>1</u>	
Carga virológica basal (UI/mL)				
• ≤60000	7 (22)	25 (78)	1.78 (0.6-5.5)	0.31
• >60000	10 (33)	20 (67)	1	

Se representan los datos en valor absoluto con los porcentajes en paréntesis. *Análisis multivariante: GGT ≤ 37 U/L fue el único factor independiente asociado a la RVS (ORa:4.8, 95% CI:1.09-21.2, P=0.038). Test de bondad de ajuste de Horner-Lemeshow: p=0.97.

DISCUSIÓN



Desde que se conoce que el IFN tiene un efecto antiviral directo y que la RBV promueve una respuesta inmune tipo 1 mediada por citocinas, que puede mejorar la respuesta inmune antiviral, se piensa que puede existir una asociación entre las características inmunogenéticas del paciente con HCC y la respuesta al tratamiento antiviral. Así, nuestra hipótesis fue que las variaciones genéticas en los loci HLA, con respecto a la presentación del antígeno a las células T, podrían ser marcadores inmunogenéticos relacionados con la respuesta al tratamiento antiviral con IFN y RBV.

Se sabe que la diversidad en cuanto a la presentación antigénica por parte de los diferentes alelos HLA, influye en la eficacia de la respuesta del paciente a la infección por el VHC. La mayor o menor expresión de un alelo en particular, podría estar asociada con la susceptibilidad y resistencia a este tipo de infección. La asociación existente entre las moléculas HLA y el aclaramiento y cronificación del VHC, así como con la severidad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento antiviral, ha sido estudiada en diversos tipos de poblaciones. En este estudio hemos examinado los efectos de la diversidad genética del CMH humano sobre la respuesta de los pacientes con HCC al tratamiento antiviral combinado. Hemos utilizados una cohorte amplia y bien definida de pacientes españoles infectados por el genotipo 1 del VHC, que han recibido un tratamiento con IFN (estándar o pegilado) y RBV. Se han genotipado los locis HLA-A*, B* y C* de clase I, así como los HLA-DRB1* y DQB1* de clase II, encontrando asociación entre el alelo de clase II DQB1*0301 y la RVS. Sin embargo, dicha asociación no la hemos encontrado con

ningún alelo HLA de clase I después de corregir el valor de P mediante el método de Bonferroni.

Debido al hecho de que después de hacer una minuciosa búsqueda bibliográfica sobre “hepatitis C” y “HLA” (o “human leukocyte antigen”), hemos encontrado muy pocos datos en los que se asocie el VHC y los alelos HLA de clase I en comparación con los alelos HLA clase II, en esta discusión me he centrado en los diversos estudios que han relatado diferentes asociaciones entre los genes HLA de clase II y los distintos estadios de la infección por el VHC en los últimos 5 años, sobre todo en cuanto a la susceptibilidad a la infección, aclaramiento viral espontáneo y cronificación o progresión de la enfermedad, así como con la respuesta al tratamiento antiviral.

Los alelos HLA-DRB1*1101 y DQB1*0301 se han relacionado con el **aclaramiento viral espontáneo** de la infección por VHC en la población americana y europea^{101,111,112}. Harris y cols.¹⁰¹ concluyen que la base inmunogenética para el aclaramiento del virus difiere según los distintos grupos étnicos; de hecho, han encontrado una asociación entre el aclaramiento y estos dos alelos, pero solamente en los pacientes americanos caucásicos y no en los afroamericanos. Hong y col.¹¹¹, encuentran una asociación entre el aclaramiento viral y el alelo HLA-DQB1*0301 pero asociado a otros alelos distintos al DRB1*. Muy recientemente, Kuniholm y cols¹¹², han hecho un estudio en una cohorte muy grande y multirracial de mujeres americanas con alta prevalencia de VHC y VIH, donde encuentran una asociación positiva entre la presencia del alelo HLA-DQB1*0301 y el aclaramiento viral

espontáneo, en mujeres VIH-seronegativas. Todos estos resultados nos sugieren que este alelo puede ser uno de los marcadores inmunogenéticos más importantes en el aclaramiento viral espontáneo.

Otros estudios, han examinado la relación entre los genes HLA clase II y la **cronificación del VHC** junto con los niveles de ALT. Recientemente, Yu et al¹¹³ describen que, entre pacientes crónicamente infectados por el VHC, la frecuencia alélica de DQB1*0301 y DRB1*0401 era significativamente más elevada en el grupo de pacientes con niveles normales de ALT que en el grupo de pacientes que presentaban niveles anormalmente elevados. También observaron que la frecuencia haplotípica DQA1*0301-DQB1*0301, DQA1*0501-DQB1*0301 y DRB1*1101-DQB1*0301 era considerablemente más alta en el grupo de pacientes con niveles normales de ALT, lo que nos sugiere que los alelos HLA clase II pueden estar relacionados con los niveles de ALT en suero de los pacientes con HCC, y servir como factor inmunogenético en la población china.

En cuanto a la **respuesta al tratamiento antiviral**, en nuestra muestra, el alelo DQB1*0301 se asoció de forma positiva con la RVS pero no con la RVP. De igual forma, tener ≤ 40 años y una carga viral basal ≤ 600.000 UI/mL también se han asociado a la RVS; estos últimos factores han sido previamente asociados con dicha respuesta por otros autores, tanto en genotipo 1 como no-1^{114,115}. En el modelo multivariante de regresión logística utilizado para conocer la asociación que existe entre diversos factores predictivos de respuesta, se han incluido todos los alelos HLA con una frecuencia superior al 10%,

encontrando que tanto la edad (≤ 40 años) como la presencia del alelo DQB1*0301, se asocian positivamente con la RVS, con una OR superior a la encontrada para la carga viral aunque, en los tres casos, la asociación es estadísticamente significativa.

En la revisión realizada de la literatura, hemos encontrado muy pocos artículos en los que se estudie la asociación existente entre alelos HLA y la RVS al tratamiento combinado con IFN-peg y RBV durante una infección crónica por VHC^{105,106,116}. Rhodes y cols¹⁰⁵ observaron que los alelos HLA A*02, B*58 y DPB1*1701 estaban asociados de una forma independiente a la RVS. El número de pacientes era alto (n=343) en este estudio, pero se habían separado en 2 razas, americanos blancos (n=194) y afroamericanos (n=179), disminuyendo, por tanto, el número de pacientes en cada brazo, siendo algunas de las frecuencias alélicas muy bajas en ciertos subgrupos, como por ejemplo el alelo B*58 que fue sólo encontrado en un 1% de la muestra total de americanos blancos. Sin embargo, el valor de P no fue ajustado por el número de alelos encontrados en cada loci (corrección de Bonferroni). Pensamos que si estos valores de P hubiesen sido ajustados, algunos de estos alelos HLA perderían posiblemente su asociación con la RVS. De hecho, en nuestro estudio, varios alelos, como el HLA-A*0201, se asociaron estadísticamente con la RVS, pero al corregir el valor de P por el método de Bonferroni, perdieron dicha significación. Yee y cols¹⁰⁶, hacen un estudio en población americana, en el que correlacionan los alelos HLA clase I y II con la tasa de disminución viral durante las primeras dos semanas de tratamiento, encontrando, curiosamente, que una rápida caída viral se asocia a la presencia de un alelo HLA clase I (Cw*03), mientras que una lenta caída viral con la

presencia de dos alelos HLA clase II (DQA1*04 y DQB1*0402), argumentando que esto se debe al hecho de que la frecuencia alélica de estos últimos es mayor en la población afroamericana, y ya se sabe que estos últimos responden peor al tratamiento antiviral. Muy recientemente, Dai y cols¹¹⁶, encuentran que los alelos HLA-A*24 y B*40 se asocian de forma estadísticamente significativa con la RVS, ajustando por los factores genotipo viral, fibrosis hepática y carga viral basal, en pacientes taiwaneses. A pesar de las diferencias encontradas con nuestros datos, pensamos que el estudio de los alelos HLA nos puede permitir identificar marcadores específicos de respuesta y no-respuesta, contribuyendo así, a seleccionar más activamente a los pacientes que van a recibir una terapia específica con IFN.

Basándonos en el desequilibrio de unión entre los alelos HLA-DRB1*1101 y DQB1*0301, hemos examinado si la presencia del haplotipo DRB1*1101-DQB1*0301 podría influir en la RVS, no encontrando diferencias estadísticamente significativas. Este hallazgo, por tanto, corrobora el papel del alelo DQB1*0301, el cual actúa de manera independiente del DRB1*11, pudiéndose asociar con otros alelos DRB1* como el 0401, 0407, 1303 y 1402.

El alelo DQB1*0301 también ha sido asociado a otros tipos de patologías, como con la respuesta a la infección por el VHB¹¹⁷. Además, también se ha descrito como un factor protector frente al desarrollo de hepatitis de tipo autoinmune y de colangitis esclerosante primaria, mientras que el grupo DQ3 tiene una asociación negativa frente a la enfermedad inflamatoria intestinal¹¹⁸.

Por todo lo visto anteriormente, parece que el alelo DQB1*0301 se comporta como un factor protector en patologías que usualmente se han asociado con una respuesta inmune. Se asume que el DQB1*0301 puede presentar epítomos inmunodominantes del VHC que conducen a una mayor respuesta de las células Th CD4+ que otros alelos, dando lugar a una actividad más vigorosa por parte del sistema inmune y teniendo una gran implicación, en la recuperación de la infección por VHC¹¹⁹. Además, en sujetos en los que no se produce un aclaramiento del virus, este alelo DQB1*0301 puede tener también un papel crítico a la hora de limitar el daño hepático. Por el contrario, en pacientes no portadores de este alelo, el daño crónico del hígado puede acelerar el desarrollo de fibrosis¹²⁰. Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro estudio, teniendo en cuenta tanto la presencia como la ausencia de este alelo, y el estadio de fibrosis o grado de inflamación a nivel hepático, no han revelado esta asociación. Lo que sí hemos encontrado es que los pacientes que no portan este alelo tienen una carga viral mayor que los pacientes que sí lo poseen.

Estudios previos también han demostrado que los pacientes que presentan niveles más altos de células Th CD4+ antes de comenzar el tratamiento antiviral tienen más probabilidad de conseguir una RVS que aquéllos con niveles más bajos^{121,122}. Como ya se ha comentado anteriormente, el alelo DQB1*0301 proporciona una mayor eficacia a la hora de presentar epítomos VHC a las células Th CD4 que otros alelos; de hecho, en nuestra búsqueda bibliográfica, hemos identificado un epítomo inmunomodulador del VHC para el alelo DQB1*0301 (<http://www.hcv.lanl.gov>) lo que podría corroborar los resultados obtenidos por Rosen y cols¹²¹ y Golden-Mason y cols¹²². Así, podríamos pensar que un paciente portador de este alelo tendría una

mayor probabilidad de presentar células T que reconozcan péptidos del VHC expresados en las membranas de los hepatocitos infectados, en comparación con los pacientes que no lo portan. Este hecho inmunológico, podría dar lugar a que el VHC sea más susceptible a la presión inducida por la terapia antiviral. El no haber encontrado ninguna asociación entre la respuesta a la terapia antiviral y algún alelo HLA de clase I, podría deberse al hecho de que la influencia de los factores inmunogenéticos sobre la función de los linfocitos CD8+ (HLA clase I) es menor que con los linfocitos CD4+ (HLA clase II).

Resumiendo podemos decir que el alelo DQB1*0301 es un marcador inmunogenético, independientemente asociado con la RVS al tratamiento con IFN-peg y RBV en pacientes con HCC. Nuestros resultados confirman que el estudio de los factores inmunogenéticos del paciente con HCC pueden ayudarnos a planear nuevas y más efectivas estrategias terapéuticas.

Futuros estudios con HLA y otros factores genéticos, nos ayudarán a identificar otros marcadores genéticos de respuesta/no respuesta, que nos conducirán a tratamientos más individualizados en los pacientes con HCC.

CONCLUSIONES

- Los factores predictivos de RVS encontrados en nuestra cohorte de pacientes son los ya conocidos en la práctica clínica habitual para el tratamiento de la HCC con genotipo 1 tratados de forma combinada con IFN-peg y RBV: jóvenes \leq de 40 años y carga viral baja (cifras \leq 600.000 UI/mL).
- Ningún alelo de clase I ni de clase II de los estudiados en nuestra muestra de estudio se asoció con la RVP; tan sólo el alelo de clase II DQB1*0301 se asoció con la RVS, incluso después de la corrección de Bonferroni.
- Los factores predictivos asociados independientemente con la RVS fueron la edad \leq de 40 años , la presencia del alelo DQB1*0301 y la carga viral baja.
- Los pacientes que no portan el alelo DQB1*0301 presentan una carga viral basal mayor que los pacientes portadores del mismo.
- La única diferencia entre los pacientes portadores del alelo DQB1*0301 que presentan una RVS y los que no la presenan, fue el nivel de GGT, el cual era menor en los pacientes con RVS.

- Por tanto, el alelo DQB1*0301 puede considerarse como un marcador inmunogenético asociado con la RVS al tratamiento combinado en pacientes con HCC genotipo 1 no tratados previamente. Este resultado nos abre una puerta para el estudio de vacunas terapéuticas personalizadas para pacientes “difíciles de tratar” basados en la estimulación de los linfocitos T.

BIBLIOGRAFIA-



7.1. BIBLIOGRAFIA

1. Lauer GM, Walter BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2001;345(1):41-52
2. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995; 15: 41-54.
3. García-Retortillo M, Forns X. Variabilidad genómica e historia natural de la infección por el virus de la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol* 2002; 25 (8): 514-520.
4. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. *J Clin Invest* 1995; 96:224
5. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996; 334:77.
6. Sáiz JC, López-Labrador FX, Ampurdanès S, Dopazo J, Forns X, Sánchez-Tapias JM, et al. The prognostic relevance of the

- nonstructural 5A gene interferon sensitivity determining region is different in infections with genotype 1b and 3a isolates of hepatitis C virus. J Infect Dis 1998; 177: 839-47.*
7. P. Muñoz de Rueda, J. Casado, R. Patón, D. Quintero, A. Palacios, A. Gila, R. Quiles, J. León, A. Ruiz-Extremera, and J. Salmerón. *Mutations in E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR, and NS5A-V3 of Hepatitis C Virus Genotype 1 and Their Relationships to Pegylated Interferon-Ribavirin Treatment Responses. J Virol. 2008; 82(13): 6644–6653.*
 8. Liang TJ, Rehermann B, Seeff LB, Hoofnagle JH. *Pathogenesis, natural history, treatment and prevention of hepatitis C. Ann Intern Med 2000; 132: 296-305.*
 9. World Health Organization, *Weekly Epidemiological Record 1997; 72: 65-72*
 10. Bruguera M, Forns X. *Hepatitis C en España. Med Clin (Barc). 2006; 127: 113-117.*
 11. Eyster ME, Alter MJ, Aledort LM, Quan S, Hatzakis A, Goeder J. *Heterosexual co-transmission of hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (VIH). Ann Intern Med 1991; 115: 764-768.*
 12. Terraul NA. *Sexual activity as risk factor for hepatitis C. Hepatology 2002; 36: S99-S105.*
 13. National Institutes of Health Consensus Development Conference *Statement: Management of Hepatitis C 2002 – June 10-12. Hepatology 2002; 36(5) Supl 1: S3-20.*

14. Orland JR, Wright TL, Cooper S. Acute hepatitis C. *Hepatology*. 2001; 33:321-7.
15. Micallef JM, Kaldor JM, Dore GJ. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *J Viral Hepat*. 2006;13:34-41
16. Enríquez J, Gallego A. Historia natural y situaciones clínicas de la hepatitis C. En: *Hepatitis C. Presente y futuro*, págs. 1-7, 2007. Ed. Mayo. Andrade RJ, Moreno R, Planas R. Spain.
17. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 1997; 349: 832-852.
18. Feld JJ, Jake Liang T. Hepatitis C –Identifying patients with progressive liver injury. *Hepatology*. 2006; 43: S194-S206.
19. Noto H, Raskin P. Hepatitis C infection and diabetes. *J Diabetes Complications*. 2006; 20(2):113-20
20. Ghany MG, Kleiner DE, Alter H, Doo E, Khokar F, Promrat K, et al. Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2003; 124:97-104.
21. Alberti A. Towards more individualised management of hepatitis C virus patients with initially or persistently normal alanineaminotransferase levels. *J Hepatol*. 2005;42:266-74.

22. Thio cL, Nolt KR, Astemborski J, Vlahov D, Nelson KE, Thomas DL. Screening for hepatitis C virus in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Clin Microbiol.* 2000 Feb; 38(2): 575-7.
23. Pawlotsky JM. Diagnostic test for hepatitis C. *J Hepatol.* 1999;31 Suppl 1:71-9.
24. Kalantar-Zadeh K, Miller LG, Daar ES. Diagnostic discordance for hepatitis C virus infection in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2005 Aug; 46(2): 290-300.
25. Scott JD, Gretch DR. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: a systematic review.
26. Bruguera M, Bañares R, Córdoba J, Jardí R, González Lahoz J, Ladero JM, et al. Documento de consenso de la AEEH sobre el tratamiento de las infecciones por los virus de las hepatitis B y C. *Gastroenterol Hepatol.* 2006;29 Supl:216-30.
27. Seef, LB, Hoofnagle, JH. National institutes of health consensus development conference: Management of hepatitis C: 2002. *Hepatology* 2002; (Suppl 1):S1.
28. Zeuzem S, Diago M, Gane E, Reddy KR, Pockros P, Prati D, et al PEGASYS study NR 16071 Investigator Group. Peginterferon alpha2a and Ribavirin in patients with chronic hepatitis C and normal aminotransferase levels. *Gastroenterology.* 2004;127:1724-32.
29. Gale M Jr. Effector genes of interferon action against hepatitis C virus. *Hepatology* 2003; 37: 975-978.

30. Sen GC. *Viruses and interferons* . *Annu Rev Microbiol* 2001; 55: 255-281.
31. Ji X, Cheung R, Cooper S, Li Q, Greenberg HB, He XS. *Interferon alfa regulated gene expression in patients initiating interferon treatment for chronic hepatitis C*. *Hepatology* 2003; 37: 610-621.
32. Gao B, Hong F, Radaeva S. *Host factors and failure of interferon- α treatment in hepatitis C*. *Hepatology* 2004; 39: 880-890
33. Awad T, Thorlund K, hauser G, et al. *Cochrane Hepato-Biliary Group. Peginterferon alpha-2a may achieve higher sustained virological response than peginterferon alpha-2b in chronic hepatitis C: a Cochrane systematic review of randomized clinical trials*. *Hepatology* 2009; 50(suppl): 707-708A.
34. Ascione A, De Luca m, Tartaglione MT, et al. *peginterferon alpha-2a plus ribavirin is more effective than peginterferon alpha-2b plus ribavirin for treating chronic hepatitis C virus infection*. *Gastroenterology* 2010, 138: 116-122.
35. Feld JJ and hoofnaglr JH. *Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis c*. *Nature* 2005; 436:967-972
36. Hoofnagle JH, Seef LB. *Peginterferon and ribavirin for chronic hepatitis C*. *N Engl J Med*. 2006; 355: 2444-2451.
37. Swain MG, Lai MY, Shiffman ML, Cooksley WGE, Abergel A, Lin A, et al. *Durable sustained virological response after treatment with peginterferon alpha- 2a (PEGASYS (R)) alone or in combination with*

- ribavirin (COPEGUS (R)): 5-year-follow-up and the criteria of a cure. J Hepatol 2007; 46 (Suppl. 1): 3A.*
38. Pawlotsky JM. *Hepatitis C Virus Resistance to Antiviral Therapy. Hepatology 2000; 32 (5): 889-896*
39. Neumann AU, Lamp NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, Perelson AS. *Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon- α therapy. Science 1998; 282: 103-107.*
40. Lindsay K, Manns MP, Gordon SC, Pockros P, Haussinger D, Hadziyannis SJ, et al. *Clearance of HCV at 5 year follow-up for peginterferon alfa-2b with or without ribavirin is predicted by sustained virological response at 24 weeks post-treatment. Gastroenterology 2008; 134 (Suppl. 1): 772A.*
41. Zeuzem S, Schmidt JM, Lee JH, Ruster B, Roth WK. *Effect of interferon alfa on the dynamics of hepatitis C virus turnover in vivo. Hepatology 1996; 23: 366-371.*
42. Zeuzem S, Herrmann E, Lee JH, Fricke J, Colucci G, Roth WK. *Hepatitis C virus kinetics in chronically infected patients treated with pegylated interferon- α . Hepatology 1999; 30: 309A.*
43. Pawlotsky JM, Neumann AU, Dahari H, Conrad A, Hezode C, Lonjon I, et al. *Hepatitis C virus (HCV) dynamics during induction therapy with interferon (IFN) alpha and/or ribavirin. Antiviral Ther 2000; 5 (Suppl. 1): 71.*

44. Herrmann E, Lee JH, Marinos G, Mondi M, Zeuzem S. *Effect of ribavirin on hepatitis C viral kinetics in patients treated with pegylated interferon. Hepatology* 2003; 37: 1351-8.
45. Fried MW, Hadziyannis SJ, Shiffman M, Messinger D, Zeuzem S. *Rapid viral response is more important predictor of sustained virologic response (SVR) than genotype in patients with chronic hepatitis C virus infection. J Hepatol* 2008; 48 (Suppl. 2): 5A.
46. Davis GL, Wong JB, McHutchinson JG, Manns MP, Harvey J, Albrecht J. *Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. Hepatology* 2003; 38: 645-652.
47. Manns MP, McHutchinson JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. *Peginterferon alfa 2b plus ribavirin compared with interferon alfa2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised controlled trial. Lancet.* 2001;358:958-65.
48. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçalves FL Jr, et al. *Peginterferon alfa 2a plus ribavirin for Chronic hepatitis C virus infection. N Engl J Med.* 2002;347:975-82.
49. Hadziyannis SJ, Sette HJr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, et al. *Peginterferon α -2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. A randomised study of treatment duration and ribavirin dose. Ann Intern Med.* 2004; 140: 346-355.
50. Shiffman ML, Di Bisceglie AM, Lindsay KL, Morishima C, Wright EC, Everson GT, et al. *Peginterferon alfa-2a and ribavirin in patients*

- with chronic hepatitis C who have failed prior treatment. Gastroenterology. 2004;126(4):1015-23.*
51. Ferenci P, Bergholz U, Laferl H, et al. 24-week treatment regimen with peginterferon alfa-2a (40 kd) plus ribavirin in HCV genotype 1 or 4 superresponders. *EASL. 2006; abstract 8.*
52. Zeuzem S, Buti M, Ferenci P, et al. Efficacy of 24 weeks treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C with genotype 1 and low pre-treatment viremia. *J Hepatol. 2006; 44:97-103.*
53. McHutchison JF, Manss M, Patel K, Poynard T, Lindsay KL, Trepo C, et al. Adherence to combination therapy enhances sustained response in genotype 1 infected patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology. 2002;123:1061-9.*
54. Mangia A, Santoro R, Minerva N, et al. Peginterferon alfa-2b and ribavirin for 12 vs. 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med 2005; 352:2609-17.*
55. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, et al. Randomised trial of interferon a2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon a2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Lancet 1998;352:1426-1432.*
56. Gale M Jr, Foy EM. Evasión of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature. 2005; 436: 939-945*
57. Le Guillou-Guillemette H, Vallet S, Gaudy-Graffin C, Payan C, Pivert A, Goudeau A, Lunel-Fabiani F. Genetic diversity of the

- hepatitis C virus: Impact and issues in the antiviral therapy. World J Gastroenterol* 2007;13(17):2416-2426.
58. Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, Strazzera A, Chien DY, Munoz SJ, Balestrieri A, Purcell RH, Alter HJ. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science*. 2000 Apr 14;288(5464):339-44
59. Lau JYN, Tam RC, Liang TJ, Hong Z. Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection. *Hepatology* 2002; 35: 1002-1009.
60. Salmeron J, De Rueda PM, Ruiz-Extremera A, Casado J, Huertas C, Bernal Mdel C, Rodriguez L, Palacios A. Quasispecies as predictive response factors for antiviral treatment in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci*. 2006;51:960–967.
61. Salmerón J, Casado J, Muñoz De Rueda P, Lafuente V, Diago M, Romero- Gómez M, Palacios A, León J, Gila A, Quiles R, Rodriguez L, Ruiz-Extremera A. 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 Apr;41(4):264-9.
62. Tabone M, Sidoli L, Laudi C, et al, Alcohol abstinence does not offset the strong negative effect of lifetime alcohol consumption on the outcome of interferon therapy. *J Viral Hepat* 2002;9:288-294.

63. Anand BS, Currie S, Dieperink E, Bini EJ, Shen H, Ho SB, Wright T. Alcohol use and treatment of hepatitis C virus: results of a national multicenter study. *Gastroenterology*. 2006; 130: 1.607-1.616.
64. Hofer H, Osterreicher C, Jessner W, Penz M, Steindl-Munda P, Wrba F, Ferenci P. Hepatic iron does not predict response to standard and pegylated-IFN/ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis. *J Hepatol*. 2004; 40: 1.018-1.022.
65. Howell CD, Jeffers LS, Cassidy W, Reddy KR, Hu S, Lee JS. Peginterferon alfa-2a and ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in black patients: safety, tolerability and impact on sustained virologic response. *J Viral Hepat*. 2006; 13: 371-376
66. Tarantino G, Conca P, Sorrentino P, Ariello M. Metabolic factors involved in the therapeutic response of patients with hepatitis C virus-related chronic hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 21: 1.266-1.268.
67. Myers RP, Patel K, Pianko S, Poynard T, McHutchison JG. The rate of fibrosis progression is an independent predictor of response to antiviral therapy in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*. 2003; 10: 16-22.
68. Dai CY, Chuang WL, Huang JF, Hsieh MY, Yu ML. Rapid virological response in hepatitis C virus genotype 1 and early ribavirin exposure. *Hepatology* 2008;48:692-3.
69. Chang KM. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2003;7:89-105.

70. Semmo N, Klenerman P. *CD4+ T cell responses in hepatitis C virus infection. World J Gastroenterol 2007;13:4831-8.*
71. Billerbeck E, Bottler T, Thimme R. *Regulatory T cells in viral hepatitis. World J Gastroenterol 2007;13:4858-64.*
72. Poccia F, Agrati C. *Intrahepatic natural immunity and HCV immuno-pathogenesis. Cell Death Differ 2003;(10 Suppl 1):S9-S12.*
73. Moretta L. *Lymphocyte effector functions. Lymphocyte effector mechanisms in innate and adaptive immunity. Curr Opin Immunol 2005;17:303-5.*
74. Rehermann B, Nascimbeni M. *Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. Nat Rev Immunol 2005;5:215-29.*
75. Ward S, Lauer G, Isba R, Walker B, Klenerman P. *Cellular immune responses against hepatitis C virus: the evidence base 2002. Clin Exp Immunol 2002;128:195-203.*
76. Missale G, Cariani E, Ferrari C. *Role of viral and host factors in HCV persistence: which lesson for therapeutic and preventive strategies? Dig Liver Dis 2004;36:703-11.*
77. Davis AM, Hagan KA, Matthews LA, Bajwa G, et al. *Blockade of virus infection by human CD4+T cells via a cytokine relay network. J Immunol 2008;180:6923-32.*
78. Martin MP, Carrington M. *Immunogenetics of viral infections. Curr Opin Immunol 2005;17:1-7.*

79. *Mogensen TH, Paludan SR. Molecular pathways in virus-induced cytokine production. Microbiol Mol Biol Rev 2001;65:131-50.*
80. *Cerny A, Chisari FV. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. Hepatology 1999;30:595-601.*
81. *Gershewin ME, Vierling JM, Manns MP. Liver Immunology. Philadelphia: Hanley & Belfus, 2003;pp:1-29.ç*
82. *Kanto T, Hayashi N. Immunopathogenesis of Hepatitis C Infection: Multifaceted strategies subverting innate and adaptative immunity. Internal Med 2006;45:183-91.*
83. *Thimme R, Lohmann V, Weber F. A target on the move: Innate and adaptative immune escape strategies of hepatitis C virus. Antiviral Research 2006;69:129-41.*
84. *Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, Wierenga EA, Santantonio T, Jung MC 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: 1006-1007.*
85. *Tsai SL, Liaw YF, Chen MH, Huang CY, Kuo GC. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. Hepatology 1997; 25: 449-458.*
86. *Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R et al. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4+ T-cell response in acute hepatitis C. Gastroenterology 1999; 117: 933-941.*

87. Zavaglia C, Martinetti M, Silini E, Bottelli R, Daielli C, Asti M, et al. Association between HLA class II alleles and protection from or susceptibility to chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1998;28:1-7.
88. Hong X, Yu RB. The mechanisms of hepatitis C virus evasion to host immune response. *World Chin. J. Digestol.* 2005; 13: 772–5.
89. Komatsu H, Lauer G, Pybus OG et al. Do antiviral CD8+ T cells select hepatitis C virus escape mutants? Analysis in diverse epitopes targeted by human intrahepatic CD8+ T lymphocytes. *J. Viral Hepat.*2006; 13: 121–30.
90. Bowen, D. G., and C. M. Walker. 2005. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 436:946–952.
91. López Labrador FJ. Respuesta immune celular en la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol* 2001; 24 (Supl 1): 29-34.
92. Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C, 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: 706-14.
93. Bjorkman PJ, Parham P. Structure, function and diversity of Class I major histocompatibility complex molecules. *Ann. Rev. Biochem* 1990; 59: 253-288.
94. Krensky AM. The HLA syste, antigen processing and presentation. *Kidney Int Suppl* 1997; 58: S2-S7

95. *Castellino F. Antigen presentation by MHC class II molecules: invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture. Hum Immunol 1997; 54 (2), 159-169.*
96. *Jack L. Strominger. Human histocompatibility proteins, Immunological Reviews 185/2002, Vol 185: 69–77.*
97. *Yunis EJ, Larsen CE, Fernandez-Viña M, Romero T, Hansen JA and Alper CA. Inheritable variable sizes of DNA stretches in the human MHC: conserved extended haplotypes and their fragments or blocks. In press: Tissue Antigens*
98. *Clayton J, Lonjou C. Allele and haplotype frequencies for HLA loci in various ethnic groups. In: Whittle D. (ed): Genetic Diversity of HLA. Functional and medical implications. Paris: EDK;(1): p665, 1996.*
99. *Shao W, Tang J, Dorak MT et al. Molecular typing of human leukocyte antigen and related polymorphisms following whole genome amplification. Tissue Antigens 2004; 64: 286–92.*
100. *Folgori A, Spada E, Pezzanera M, et al. Early impairment of hepatitis C virus specific T cell proliferation during acute infection leads to failure of viral clearance. Gut 2006; 55:1012-1019*
101. *Harris RA, Sugimoto K, Kaplan DE, et al. Human leukocyte Antigen Class II associations with hepatitis C virus clearance and virus-specific CD4 T cell response among caucasians and african americans. Hepatology 2008; 48: 70-79.*

102. *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 December 14;11(46):7302-7307*
103. *Singh R, Kaul R, Kaul A, et al. A comparative review of HLA associations with hepatitis B and C viral infections across global populations. World J Gastroenterol 2007; 13: 1770–87.*
104. *Yee LJ. Host genetic determinants in hepatitis C virus infection. Genes Immun 2004; 5: 237-245*
105. *Rhodes SL, Erlich H, Im KA, et al. Associations between the human MHC and sustained virologic response in the treatment of chronic hepatitis C virus infection . Genes Immun 2008; 9:328–333*
106. *Yee LJ, Im K, Wahed AS, Bugawan T, Li J, Shannon L, Rhodes SL, et al. Polymorphism in the Human Major Histocompatibility Complex and Early Viral Decline during Treatment of Chronic Hepatitis C. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(2): 615–621.*
107. *Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. Nature 2009;46:399-401*
108. *Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. Nat Genet 2009;41:1105–1109.*

109. McCarthy, J.J., Li, J.H., Thompson, A., Suchindran, S., Lao, X.Q., Patel, K., Tillmann, H.L., Muir, A.J., McHutchison, J.G., *Replicated Association between an IL28B Gene Variant and a Sustained Response to Pegylated Interferon and Ribavirin, Gastroenterology* (2009), doi: 10.1053/j.gastro.2010.02.009.
110. E Wang JH, Zheng X, Ke X, Dorak MT, Shen J, Boodram B, O’Gorman M, Beaman K, Cotler SJ, Hershov R, Rong L. *Ethnic and geographical differences in HLA associations with the outcome of hepatitis C virus infection. Virol J* 2009; 6: 46
111. Hong X, Yu RB, Sun NX, et al. *Human leukocyte antigen class II DQB1*0301, DRB1*1101 alleles and spontaneous clearance of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. World J Gastroenterol* 2005; 11: 7302-7307.
112. Mark H. Kuniholm, Andrea Kovacs, Xiaojiang Gao, Xiaonan Xue, Darlene Marti, Chloe L. Thio, Marion G. Peters, Norah A. Terrault, Ruth M. Greenblatt, James J. Goedert, Mardge H. Cohen, Howard Minkoff, Stephen J. Gange, Kathryn Anastos, Melissa Fazzari, Tiffany G. Harris, Mary A. Young, Howard D. Strickler, Mary Carrington. *Specific Human Leukocyte antigen Class I and II Alleles Associated with Hepatitis C Virus Viremia. Hepatology* 2010; 51(5): 1514-22.

113. Yu RB, Hong X, Ding WL, et al. The association between the genetic polymorphism of HLA-DQA1, DQB1, and DRB1 and serum alanine aminotransferase levels in chronic hepatitis C in the Chinese population. *J Gastroen hepatol* 2008; 23:1394-1402.
114. Shirakawa H, Matsumoto A, Joshita S, et al. Pretreatment prediction of virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients using viral and host factors. *Hepatology* 2008;48(6): 1753-1760.
115. Shiffman ML, Suter F, Bacon BR, et al. Associations between the human MHC and sustained virologic response in the treatment of chronic hepatitis C virus infection. *Genes Immun* 2008; 9:328-333.
116. Dai CY, Chuang WL, Hsieh MY, et al. Human leukocyte antigen alleles and the response to pegylated interferon/ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. *Antiviral Res* 2010; 85(2):396-402.
117. Zang GQ, Xi M, Feng ML, et al. Curative effects of interferon-alpha and HLA-DRB1-DQA1 and -DQB1 alleles in chronic viral hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2004; 10:2116-2118.

118. Cassinotti A, Birindelli S, Clerici M, et al. *HLA and Autoimmune Digestive Disease: A Clinically Oriented Review for Gastroenterologists. Am J Gastroenterol* 2009;104: 195-217.
119. Lamonaca V, Missale G, Urbani S, et al. *Conserved hepatitis C virus sequences are highly immunogenic for CD4(+) T cells: implications for vaccine development. Hepatology* 1999;30(4):1088-98.
120. Renou C, Halfon P, Pol S, et al. *Histological features and HLA class II alleles in hepatitis C virus chronically infected patients with persistently normal alanine aminotransferase levels. Gut* 2002; 51: 585-90.
121. Rosen HR, Weston SJ, Im K, et al. *Selective decrease in hepatitis C virus-specific immunity among African Americans and outcome of antiviral therapy. Hepatology* 2007;46(2): 350-8.
122. Golden-Mason L, Klarquist J, Wahed AS, et al. *PD-1 expression is increased on immunocytes in chronic HCV and predicts failure of response to antiviral therapy: race-dependent differences. J Immunol* 2008; 180: 3637-3641.

