

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO DEL GEN *IL28B* SOBRE LA
BIOQUÍMICA Y LAS CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LA
INFECCIÓN CRÓNICA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

TESIS DOCTORAL DE:
MARTA ÁGREDA CHINEA

BAJO LA DIRECCIÓN DE:
MANUEL DÍAZ-RUBIO GARCÍA
JOSÉ MARÍA LADERO QUESADA

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



Influencia del polimorfismo del gen IL28B sobre la bioquímica y las características histológicas de la infección crónica por el virus de la hepatitis C

Memoria para optar al grado de doctor presentada por

Marta Ágreda Chinaa

Bajo la dirección de los doctores

Prof. Manuel Díaz-Rubio García

Prof. José María Ladero Quesada

Madrid, 2013

Agradecimientos

A mis padres y a mis hermanas

A mis hijos: Javier, Ana y Laura

A Manu

Quisiera mostrar en estas líneas mi agradecimiento a todas las personas e instituciones que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral, comenzando por el Hospital Clínico San Carlos donde me formé como residente con magníficos profesionales. Me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento a mis directores de tesis, el Profesor Manuel Díaz-Rubio y el Profesor José María Ladero Quesada, por su inestimable apoyo y su dedicación, por contagiarme ese afán de investigación, por haberme enseñado tantas cosas, no estrictamente médicas, y por hacerme sentir como en casa. Agradezco enormemente la gran cantidad de tiempo dedicado a este proyecto, así como la amistad que creo que hemos forjado después de tantas horas de trabajo.

Quisiera agradecer al Profesor José A. Agúndez y su equipo su colaboración que ha sido determinante para llevar a cabo este proyecto.

También tengo que dar las gracias a todas las personas que integran la Unidad de Hígado del Hospital Clínico San Carlos que me acogieron y me dieron la oportunidad de pertenecer a un grupo e iniciar mi andadura en la investigación médica, así como a mis compañeros de residencia, en especial a mis residentes mayores, Mónica, Natalia, Fran y Lucía, a mis corresidentes Jaime y Moisés con los que he compartido tantas cosas. A Anna Lee, no sólo por ser mi amiga y por su apoyo, sino por su altruismo al proporcionarme una guía para empezar a escribir la tesis doctoral.

A mis compañeros de la Fundación Jimenez Díaz, donde trabajo actualmente, que se han convertido en amigos muy especiales, incluida la Doctora Sonia Albertos.

Me gustaría agradecer también a mis grandes amigas (las de Tenerife) por saber escucharme y apoyarme y por estar ahí siempre que las he necesitado.

Pero, sobre todo, me gustaría agradecer a mi familia, que tanto apoyo y cariño me ha proporcionado siempre:

A mis padres, a los que admiro y quiero. A mi madre, Pino, por esa energía que emana y transmite y a mi padre, Enrique, por ser, probablemente, una de las mejores personas que conozco, por apoyarme y quererme tal y como soy.

A mis hermanas, Mercedes e Isabel, por su apoyo incondicional y por poder compartir con ellas una complicidad especial que sólo los hermanos pueden experimentar.

A mis suegros, Nino y Lourdes, que tanto me han ayudado, por acogerme como una hija más, haciéndome cada día el camino más fácil. A avó.

A mis cuñados y a todos mis sobrinos.

Pero, sobre todo a Manu, que tanto me apoya y me ayuda, que me comprende, que me anima y me quiere y me lo demuestras día a día; y a mis tres hijos, Javier, Ana y Laura por ser lo más grande que he hecho y haré nunca.

Muchas gracias a todos.

Índice

| | |
|---|-----------|
| Abreviaturas..... | 10 |
| Índice de tablas | 17 |
| Índice de ilustraciones..... | 19 |
| Índice de gráficos..... | 20 |
| <i>Introducción</i> | 21 |
| 1. Capítulo 1. La hepatitis C..... | 23 |
| 1.1. Etiología. El virus de la hepatitis C. | 23 |
| 1.1.1. Organización y expresión del genoma..... | 24 |
| 1.1.2. Replicación y morfogénesis del VHC. | 27 |
| 1.1.3. Genotipos, cuasiespecies y origen del VHC. | 29 |
| 1.2. Epidemiología..... | 30 |
| 1.2.1. Prevalencia. | 31 |
| 1.2.1.1. Prevalencia y distribución de los distintos genotipos del VHC..... | 32 |
| 1.2.2. Incidencia..... | 33 |
| 1.2.3. Vías de transmisión..... | 33 |
| 1.2.3.1. Vías de transmisión parenterales | 33 |
| 1.2.3.2. Vías de transmisión no parenterales..... | 36 |
| 1.3. Patogenia..... | 38 |
| 1.3.1. Mecanismos virales..... | 39 |
| 1.3.2. Mecanismos mediados por el sistema inmune..... | 39 |
| 1.3.3. Citocinas..... | 41 |
| 1.3.4. El óxido nítrico..... | 43 |
| 1.4. Anatomía patológica..... | 43 |

| | |
|---|----|
| 1.5. Historia natural de la infección por el VHC | 44 |
| 1.5.1. Hepatitis aguda por VHC..... | 45 |
| 1.5.2. Hepatitis crónica y cirrosis hepática por VHC..... | 46 |
| 1.5.3. Carcinoma hepatocelular..... | 49 |
| 1.6. Diagnóstico de la infección por el VHC..... | 50 |
| 1.6.1. Pruebas serológicas..... | 50 |
| 1.6.2. Pruebas virológicas o moleculares..... | 51 |
| 1.6.3. Determinación del genotipo del virus de la hepatitis C..... | 54 |
| 1.6.4. Diagnóstico de la infección en fase aguda..... | 55 |
| 1.6.5. Diagnóstico de la infección en fase crónica..... | 56 |
| 1.7. Evolución y factores determinantes de la progresión..... | 57 |
| 1.7.1. Factores dependientes del huésped..... | 57 |
| 1.7.2. Factores dependientes del hígado..... | 60 |
| 1.7.3. Factores dependientes del virus..... | 60 |
| 1.8. Manifestaciones extrahepáticas de la infección por el VHC..... | 62 |
| 1.9. Fibrosis hepática..... | 64 |
| 1.9.1. Fisiopatología de la fibrosis hepática. La matriz extracelular | 65 |
| 1.9.1.1. Activación de las células estrelladas..... | 65 |
| 1.9.1.2. Remodelación tisular y metaloproteinasas..... | 66 |
| 1.9.2. Hepatocarcinogénesis..... | 67 |
| 1.9.3. La biopsia hepática..... | 68 |
| 1.9.3.1. Indicaciones de la biopsia hepática en la infección crónica por VHC..... | 68 |
| 1.9.3.2. Sistemas de estadiaje..... | 69 |
| 1.9.3.3. Limitaciones de la biopsia hepática..... | 74 |
| 1.9.3.4. Complicaciones de la biopsia hepática..... | 74 |

| | |
|---|------------|
| 1.9.4. Métodos incruentos de valoración de la fibrosis hepática..... | 75 |
| 1.9.4.1. Pruebas basadas en la determinación sérica de marcadores biológicos..... | 75 |
| 1.9.4.1.1. Marcadores séricos indirectos de la fibrosis hepática..... | 77 |
| 1.9.4.1.2. Marcadores séricos directos de la fibrosis hepática..... | 79 |
| 1.9.4.2. Métodos de imagen (Basados en métodos instrumentales)..... | 80 |
| 1.9.4.2.1. Elastografía transitoria (Fibroscán)..... | 80 |
| 1.9.4.2.2. Software específico de RM | 82 |
| 1.9.4.2.3. Software específico de TC (Fibro TC)..... | 82 |
| 2. Capítulo 2. Hepatitis C y genética: polimorfismos del <i>gen IL28B</i> | 83 |
| 2.1. Genética. Polimorfismos del <i>gen IL28B</i> | 83 |
| 2.1.1. Conceptos básicos en genética..... | 83 |
| 2.1.2. Estudios de amplitud genómica y características de los SNPs..... | 84 |
| 2.1.3. Polimorfismos del <i>gen IL28B</i> | 85 |
| 2.1.3.1. Resumen funcional de la IL28B..... | 86 |
| 2.2. Estudios genéticos en relación con la hepatitis crónica C..... | 88 |
| 2.2.1. Polimorfismos del <i>gen IL28B</i> y resolución espontánea del VHC..... | 89 |
| 2.2.2. Polimorfismos del <i>gen IL28B</i> y respuesta al tratamiento combinado..... | 92 |
| 2.2.3. Polimorfismos del <i>gen IL28B</i> y progresión de la enfermedad..... | 96 |
| 2.2.4. Estudios genéticos en relación con el carcinoma hepatocelular..... | 97 |
| <i>Hipótesis</i> | 99 |
| <i>Objetivos</i> | 100 |

| | |
|--|----------------|
| <i>Pacientes y métodos</i> | 101 |
| 1. Diseño del estudio..... | 101 |
| 1.1. Tipo y ámbito de estudio..... | 101 |
| 1.2. Descripción de la muestra a estudio..... | 101 |
| 2. Estudio basal..... | 102 |
| 2.1. Datos demográficos y epidemiológicos..... | 102 |
| 2.2. Determinaciones de laboratorio..... | 103 |
| 2.2.1. Detección de anticuerpos anti VHC..... | 103 |
| 2.2.2. Determinación del ARN-VHC..... | 103 |
| 2.2.3. Determinación del genotipo viral..... | 104 |
| 2.2.4. Análisis del polimorfismo rs12979860..... | 104 |
| 2.3. Biopsia hepática bajo control ecográfico..... | 105 |
| 3. Análisis estadístico..... | 106 |
| 3.1. Descripción de las variables cuantitativas..... | 106 |
| 3.2. Descripción de las variables cualitativas..... | 106 |
| <i>Resultados</i> | 108 |
| 1. Grupo 1. Hepatitis crónica C..... | 108 |
| 1.1. Distribución del Polimorfismo rs12979860 CT..... | 108 |
| 1.2. Influencia del polimorfismo del <i>gen IL28B</i> sobre los parámetros clínicos, bioquímicos y virológicos en la hepatitis crónica por VHC..... | 109 |
| 1.3. Influencia del polimorfismo del <i>gen IL28B</i> sobre las características anatomopatológicas en los enfermos de hepatitis C sometidos a biopsia hepática antes de recibir tratamiento antiviral..... | 110 |
| 2. Grupo 2. Carcinoma hepatocelular..... | 110 |
| 2.1. Distribución del polimorfismo rs12979860 CT..... | 111 |

2.2. Análisis comparativo de los pacientes infectados por VHC con y sin
CHC.....112

Discusión.....117

1.1. Influencia del polimorfismo IL28B sobre los parámetros bioquímicos en la
hepatitis crónica por VHC.....119

1.2. Relación del polimorfismo IL28B y la carga viral en la hepatitis crónica C.....122

1.3. Necroinflamación.....123

1.4. Fibrosis.....123

1.5. Esteatosis hepática.....124

1.6. Carcinoma hepatocelular.....126

Conclusiones.....128

***Summary: Relation of IL28B gene polymorphism with biochemical and histological
features in hepatitis C virus- induced liver disease.....129***

Bibliografía.....140

Abreviaturas

| | |
|----------|---|
| % | Por ciento |
| µg | Microgramos |
| 3'NC | Región 3' no codificante |
| 5'NC | Región 5' no codificante |
| A2MG | Alfa 2 macroglobulina |
| ABC | Área bajo la curva |
| Ac HBc | Anticuerpos frente al core del virus B |
| ACP | Análisis de Componentes Principales |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADNc | Ácido desoxirribonucleico complementario |
| AFP | Alfafetoproteína |
| AFP- L3 | Alfafetoproteína lectina 3 |
| Ag HBs | Antígeno de superficie del virus B |
| AGP | Alfa 1 glicoproteína ácida |
| Ag-VHC | Antígeno del virus de la hepatitis C |
| AH | Ácido hialurónico |
| ALT | Alanino amino transferasa |
| Anti-VHC | Anticuerpos frente al virus de la hepatitis C |
| ApoA-I | Apolipoproteína A-I |
| ApoA-IV | Apolipoproteína A-IV |
| ApoE | Apolipoproteína E |
| ApoJ | Apolipoproteína J |
| APRI | AST to Platelet Radio Index |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |

| | |
|-----------------------|--|
| AST | Aspartato amino transferasa |
| bDNA | ADN Branched |
| Br | Bilirrubina |
| CD5L | Proteína CD 5 antígeno-like |
| CDVP | Consumidores de drogas por vía parenteral |
| CEH | Células estrelladas hepáticas |
| Células Th | Células T helper o cooperadoras |
| CHC | Carcinoma hepatocelular |
| Ci | Cirrosis hepática |
| CM | Crioglobulinemia |
| cm | Centímetros |
| CME | Crioglobulinemia mixta esencial |
| Complejo Ag-A | Complejo antígeno-anticuerpo |
| Complejo MBL / MASP-1 | Complejo Manano-lectina |
| Copias/ml | Copias/mililitro |
| CPA | Células presentadoras de antígenos |
| CPC | Cadena pesada de la clatrina |
| Da | Daltons |
| DCP | Des-gamma-carboxiprotrombina |
| E | Especificidad |
| E1 | Envoltura 1 |
| E2 | Envoltura 2 |
| EEUU | Estados Unidos de América |
| EHC | Enfermedad hepática crónica |
| EHNA | Esteatohepatitis no alcohólica |
| EHNAG | Enfermedad no alcohólica por depósito de grasa |
| EIA | Ensayo de enzimoimmunoanálisis |
| ELF | Grupo europeo de fibrosis hepática |

| | |
|--------|---|
| ELISA | Ensayo de enzimoimmunoanálisis |
| ET | Elastografía transitoria |
| FA | Fosfatasa alcalina |
| FABP-1 | Proteína de los ácidos grasos de la unión-1 |
| FGF | Factor de crecimiento de los fibroblastos |
| FH | Fibrosis hepática |
| FHAsC | Insuficiencia hepática aguda sobre hepatopatía crónica. |
| Fig. | Figura |
| FNT | Factor de necrosis tumoral |
| FPI | Fibrosis probability index |
| FT | Fracaso terapéutico |
| FTCD | Forminotransferasa ciclodeaminasa |
| FVP | Fracaso viral primario |
| FVS | Fracaso viral secundario o Recidiva |
| g | Gramos |
| GGT | Gamma glutamil transferasa |
| GM-CSF | Factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos |
| GNMP | Glomerulonefritis membranoproliferativa |
| gp | Glicoproteína |
| GP73 | Proteína de Golgi 73 hiperfucosilada |
| GRP78 | Proteína regulada por glucosa 78 |
| GWA | Técnica de asociación genómica amplia |
| HAI | Índice de actividad histológica |
| Hb | Hemoglobina |
| HC | Hepatitis crónica |
| HCC | Hepatitis crónica por virus C |
| hCE1 | Carboxilesterasa 1 humana |
| HCSC | Hospital Clínico San Carlos |

| | |
|---------------|--|
| HeG2 | Células de hematoma |
| HGF | Factor de crecimiento hepatocitario |
| HLA | Antígeno leucocitario humano |
| Hp | Haptoglobina |
| HSP27 | Proteína de choque térmico 27 |
| HVR | Región hipervariable |
| IAH | Índice de actividad histológica |
| IECA | Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina |
| Ig | Inmunoglobulina |
| IgA | Inmunoglobulina A |
| IGF-1 | Factor de crecimiento derivado de la insulina |
| IgG | Inmunoglobulina G |
| IL | Interleucina |
| ILB28 | Interleucina B 28 |
| IMC | Índice de masa corporal |
| INF | Interferón |
| INF- γ | Interferón gamma |
| INR | Ratio Internacional Normalizada |
| IRES | Internal ribosome entry site |
| IRF-7 | Interferon factor-7 |
| IRS1 | Receptor fosforilado de la insulina sustrato 1 |
| ISDR | Región determinante de la sensibilidad al interferón |
| ISG | Genes estimulados por interferón |
| ISGF3 | Factor génico 3 estimulado por interferón |
| ITPA | Inosinatrifosfatopirofosfatasa |
| Kb | Kilobases |
| Kd | Kilodalton |
| Kg | Kilogramos |

| | |
|-----------------|--|
| KIR | Receptor de las células asesinas o <i>natural killer</i> |
| KPa | Kilopascales |
| LB | Linfocitos B |
| LC | Linfocitos C |
| LDL | Lipoproteínas de baja densidad |
| LDLR | Receptor de lipoproteínas de baja densidad |
| LMNB1 | Laminina B |
| Log | Logaritmo |
| LT | Linfocitos T |
| LTC | Linfocitos T citotóxicos |
| LTx | Linfotoxina |
| M-CSF | Factor estimulador de colonias de macrófagos |
| MEC | Matriz extracelular |
| MFAP-4 | Proteína humana asociada a microfibrillas 4 |
| mg | Miligramo |
| mg/día | Miligramos día |
| mg/dl | Miligramos / decilitros |
| MHC | Complejo mayor de histocompatibilidad |
| min. | Minutos |
| ml | Mililitro |
| ml/min | Mililitros minuto |
| MM | Masa molecular |
| mm ³ | Milímetros cúbicos |
| MMPs | Metaloproteinasas |
| NAFLD | Enfermedades del hígado graso no alcohólico |
| NC | No codificante |
| NF- κ B: | Factor nuclear kappa B |
| ng/ ml | Nanogramos por mililitro |

| | |
|------------|---|
| NIK | Cinasa inductora del factor nuclear kappa B |
| NK | Natural killer o células asesinas naturales |
| nm | Nanómetro |
| NS | Proteína no estructural |
| N-terminal | Aminoterminal |
| nTIR | Nitrotirosina |
| OAS | 2' 5'-oligoadenilato sintetasa |
| OMS | Organización mundial de la salud |
| ON | Óxido nítrico |
| ONSi | Óxido nítrico sintasa |
| OR | Odds ratio |
| ORF | Open reading frame o región de lectura abierta |
| p | Proteína |
| p/v | Peso / Volumen |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PDGF | Factor de crecimiento derivado de las plaquetas |
| Peg-IFN | Interferón pegilado |
| PIIINP | Propéptido N-terminal del colágeno tipo III |
| PKA | Protein-cinasa A |
| PKR | Protein-cinasa R |
| PNT | Peroxinitrito |
| PoliUC | Poliuracilo |
| PTB | Polipirimidina |
| RBV | Ribavirina |
| RCT | Receptor de linfocitos T |
| RH | Rigidez hepática |
| RIBA | Inmunotransferencia con antígenos recombinantes |
| RL | Regresión logística |

| | |
|--------------|--|
| RM | Resonancia magnética |
| RT-PCR | Reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa |
| RVP | Respuesta viral precoz |
| RVR | Respuesta viral rápida |
| RVS | Respuesta viral sostenida |
| S | Sensibilidad |
| SAA | Amiloide sérico A |
| Ser | Serina |
| SNP | Polimorfismo de un solo nucleótido |
| TC | Tomografía computerizada |
| TGF | Factor de transformación de crecimiento |
| TGF- β | Factor de transformación del crecimiento beta |
| Th | Linfocito T helper |
| TIMPs | Inhibidores de proteasas |
| TMA | Transcripción mediada por amplificación |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |
| TNFR | Receptor del factor de necrosis tumoral |
| UI/ml | Unidades internacionales/mililitros |
| UTR | Untranslated region o región no codificada |
| VCAM | Molécula de adhesión vascular |
| VDBP | Proteína de unión a Vitamina D |
| VHA | Virus de la hepatitis A |
| VHB | Virus de la hepatitis B |
| VHC | Virus de la hepatitis C |
| VIH | Virus de inmunodeficiencia humana |
| VPN | Valor predictivo negativo |
| VPP | Valor predictivo positivo |
| VSG | Velocidad de sedimentación globular |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Introducción..... | |
| Tabla 1. Vías de transmisión del VHC..... | 38 |
| Tabla 2. Citocinas y respuesta adaptativa. Efectos biológicos principales..... | 41 |
| Tabla 3. Diagnóstico de la infección por VHC..... | 55 |
| Tabla 4. Factores determinantes de la progresión de la enfermedad..... | 61 |
| Tabla 5a. Manifestaciones extrahepáticas del VHC con clara evidencia científica..... | 62 |
| Tabla 5b. Manifestaciones extrahepáticas del VHC probables..... | 63 |
| Tabla 6. Puntuación HAI o índice de Knodell..... | 71 |
| Tabla 7. Puntuación HAI modificada o índice de Ishak..... | 72 |
| Tabla 8. Sistema METAVIR..... | 73 |
| Tabla 9. Marcadores serológicos indirectos de fibrosis hepática..... | 76 |
| Tabla 10. Marcadores serológicos directos de fibrosis hepática..... | 77 |
| Tabla 11. Principales marcadores biológicos de la fibrosis hepática y grado de correlación con diagnóstico histológico de Metavir F3-F4..... | 78 |
| Tabla 12. Marcadores de fibrogénesis utilizados para estimar el grado de fibrosis hepática..... | 79 |
| Tabla 13. Ventajas e inconvenientes de los marcadores biológicos de la fibrosis hepática..... | 80 |
| Tabla 14. Utilidad clínica de la elastografía de transición para la estimación de la fibrosis hepática (Ventajas e inconvenientes)..... | 82 |

Resultados.....

Tabla 1. Análisis de los parámetros bioquímicos, virológicos e histológicos en relación con el genotipo rs12979860 TC en 512 pacientes con hepatitis C crónica. Alelo Mayor: C. Alelo Menor: T.....113

Tabla 2. Análisis de los rasgos histológicos en relación con el genotipo rs12979860 en 294 enfermos con hepatitis crónica C.....115

Tabla 3. Distribución del polimorfismo rs12979860CT del gen *IL28B* en 249 pacientes con hepatitis C crónica (HCC) y en 134 pacientes con carcinoma hepatocelular inducido por VHC (CHC).....116

Índice de ilustraciones.

| | |
|--|----|
| Ilustración 1. Estructura del VHC..... | 23 |
| Ilustración 2. Organización y expresión del genoma del VHC..... | 27 |
| Ilustración 3. Replicación del VHC..... | 28 |
| Ilustración 4. Prevalencia de la infección por VHC..... | 31 |
| Ilustración 5. Historia natural del VHC..... | 44 |
| Ilustración 6. Elastografía transitoria (Fibroscan)..... | 81 |
| Ilustración 7. Representación del cromosoma 19 y localización de las distintas mutaciones del <i>gen IL28</i> | 85 |
| Ilustración 8: Desequilibrio de ligamiento..... | 86 |
| Ilustración 9. Mecanismo de acción del INF λ | 87 |
| Ilustración 10. Frecuencias alélicas de los SNP rs12979860 entre los diferentes grupos étnicos..... | 90 |
| Ilustración 11. Efecto del polimorfismo <i>IL28B</i> rs 12979860 (C/T) en la tasa de RVS en los pacientes del estudio IDEAL..... | 93 |

Índice de gráficos.

| | |
|---|-----|
| Gráfico 1. Distribución del polimorfismo rs12979860 CT..... | 108 |
| Gráfico 2. Distribución del plimorfismo rs12979860 CT en el carcinoma hepatocelular.. | 111 |

Introducción.

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es una causa muy frecuente de enfermedad crónica hepática. Es un problema muy importante de salud mundial ya que aproximadamente 170 millones de personas están infectadas crónicamente por él (1), afectando aproximadamente a unas 800000 en nuestro país. Aún cuando la mayoría de los pacientes están clínicamente asintomáticos es una de las causas más importantes de hepatitis crónica, cirrosis y hepatocarcinoma (1).

Si bien la infección crónica por el VHC no conlleva una mayor mortalidad global con respecto a grupos similares no infectados, determina un mayor riesgo de morir por enfermedad hepática, con una tasa de mortalidad asociada de aproximadamente un 5% a los 20 años de evolución de la enfermedad (2).

La resolución de la hepatitis aguda por VHC ocurre solo en un 14-46% de los pacientes que se infectan, siendo la mayoría restante la que sufre una infección crónica, con predisposición a desarrollar cirrosis y carcinoma hepatocelular (3,4). Por otro lado, los porcentajes de respuesta al tratamiento combinado en los pacientes con hepatitis crónica por VHC que son tratados, son muy variables.

Numerosos investigadores han intentado esclarecer qué factores son los responsables de la distinta resolución de la infección del VHC y de la variable respuesta al tratamiento en estos pacientes, con resultados prometedores. En los últimos años, estudios de amplitud genómica (GWAS) han determinado que varios polimorfismos de nucleótido único (SNPs) cerca del gen *interleucina 28 (IL 28)* están asociados de forma directa con estos dos aspectos de la infección (5-7). Sin embargo, los datos sobre la influencia del polimorfismo del gen *IL28B* y la historia natural de la infección crónica por el VHC son muy escasos (8, 9).

Por la gran importancia de esta infección y las nefastas consecuencias de su evolución, es de suma importancia conocer y controlar, en lo posible, los factores que se relacionan con la progresión desfavorable de la enfermedad. Si la hipótesis de la existencia de alguna relación entre los polimorfismos genéticos del gen *IL28B* y la gravedad de la enfermedad hepática inducida por el VHC es válida, la conclusión más lógica debería ser la existencia de diferencias en las frecuencias genotípicas en las diferentes etapas de la enfermedad.

1. Capítulo 1. La hepatitis C.

En 1989 se descubrió el virus de la hepatitis C (2;10) y desde entonces se ha convertido en un problema importante de salud mundial. Se trata de un virus que infecta preferentemente a los hepatocitos (virus hepatotropo) aunque puede infectar otras células como son los monocitos y los linfocitos (11;12).

1.1. Etiología. El virus de la hepatitis C.

El conocimiento de la estructura y el mecanismo de replicación del VHC es todavía incompleto debido, en gran medida, a la falta tanto de sistemas de cultivos celulares eficientes como de modelos animales para su estudio.

Taxonómicamente, el virus de la hepatitis C pertenece al género *Hepacivirus* y a la familia *Flaviviridae* (13). Se trata de un virus de ácido ribonucleico (ARN) monocatenario y de sentido positivo, de un tamaño aproximado de 50-60 nanómetros (nm) de diámetro, que se replica preferentemente en el citoplasma de los hepatocitos. Adopta una forma icosaédrica y está provisto de una nucleocápside, formada por unidades repetitivas de la proteína denominada antígeno core del VHC (14;15) y de una envoltura lipídica compuesta por dos glicoproteínas, una transmembrana (E1) y otra de superficie (E2).

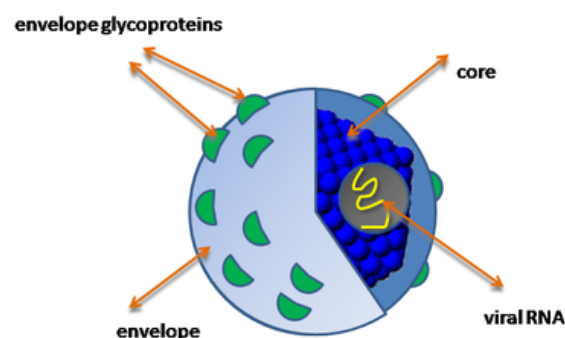


Ilustración 1. Estructura del VHC.

1.1.1. Organización y expresión del genoma.

El genoma del VHC consiste en una molécula única y lineal de ARN de cadena simple de aproximadamente 9600 nucleótidos y sentido positivo. Consta de dos regiones no codificantes y altamente conservadas denominadas 5' y 3' UTR (untranslated region) que flanquean una región de lectura abierta (región ORF u Open Reading frame) que abarca casi todo el genoma. La región ORF codifica un gran polipéptido viral precursor de 3010 a 3033 aminoácidos (16) que es sometido a un posterior procesamiento por proteasas para generar un total de once productos independientes, dando lugar a proteínas estructurales [nucleocápside (c) o p21, envoltura 1 (E1) o gp 31 y envoltura 2 (E2) o gp70] y proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b) (16;17).

En el genoma del VHC se diferencia claramente nueve regiones: (12)

a. Regiones no codificantes.

El genoma está flanqueado por dos regiones que no se traducen, la 5'UTR y la 3'UTR. Son secuencias que desempeñan funciones reguladoras de la expresión del genoma y participan en la replicación de ARN viral. Son las partes más conservadas del genoma, con analogías superiores al 98% entre las distintas variantes, lo que indica que una mutación en esta región resulta letal para el virus.

Región 5' no codificante (5'NC): Está formada por 341 nucleótidos y juega un papel importante en la traducción, la replicación (sus 40 primeros nucleótidos) y el ensamblaje del genoma del VHC. Incluye el sitio de iniciación de traducción característico de los virus de ARN de sentido positivo, así como una región interna para la entrada del ARN mensajero en el ribosoma (IRES o internal ribosomal entry site) (18;16).

Región 3' no codificante (3'NC): Consta de dos regiones bien definidas, la primera de 40 nucleótidos y la segunda de 98, separadas por una secuencia rica de poliuracilo (poli-UC).

Esta región parece participar tanto en la replicación del ARN viral como en la unión de ciertas proteínas celulares como la proteína fijadora de trectos de polipirimidina (PTB), que podrían requerirse para dicha replicación (19;20).

b. Regiones estructurales.

Las proteínas estructurales se localizan en la zona amino terminal (N-terminal) del precursor proteico y serán los componentes de los nuevos viriones.

Región "core" (Región c): Está formada por 570 nucleótidos y es donde se codifica la secuencia del antígeno core del VHC (HCcAg). Los primeros residuos parecen participar también en la iniciación de la traducción del genoma. El HCcAg es una proteína de 20-22 kilodaltons (kD) y 173 aminoácidos de longitud que forma la nucleocápside del virión del VHC y que podría participar en la supresión de la síntesis de proteínas que precede al inicio de la replicación del genoma viral (20;21) así como en la carcinogénesis, en el metabolismo lipídico (18;22), en la modulación de la respuesta inmune del huésped (23), en la apoptosis y en lo referente al estrés oxidativo y generación de radicales libres.

Regiones de las glicoproteínas de la envoltura (E1 y E2): Estas regiones comprenden aproximadamente 1850 nucleótidos y codifican tres proteínas: las glicoproteínas E1 (gp 31) y E2 (gp70) y la proteína p7. Las dos primeras participan en la adhesión de los viriones a la membrana de las células huésped para infectarlas. La proteína E2 interactúa con el receptor CD 81 (24) y el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) (25), utilizando este último para penetrar en la célula. Entre las regiones E1 y E2 se encuentra una zona denominada hipervariable (HVR), de aproximadamente 27 aminoácidos de longitud, que es la responsable de que el VHC pueda escapar del sistema inmune (26). Por el momento, no está clara la función de la proteína p7 (18).

c. Regiones no estructurales (NS).

Codifican a las proteínas no estructurales, las cuales no forman parte de las partículas virales. Se definen por las siglas NS seguido de un número arábigo que va del 2 al 5 (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, y NS5B).

Región NS2. Su producto de expresión (la proteína NS2) junto con la región amino terminal de la proteína NS3 participa de una proteasa que se activa en presencia de iones de zinc divalentes (enzima zinc-dependiente) y se inhibe por agentes quelantes. Esta proteasa lleva a cabo la lisis que induce la liberación de la proteína p23.

Región NS3: Esta secuencia codifica una proteína de 72 kD llamada p72 que por un lado presenta actividad serín-proteasa, cuya actuación determina la liberación de todas las proteínas NS del extremo carboxi-terminal de la poliproteína precursora, por lo que su presencia activa es esencial para la replicación del virus (27). Por otro lado, la p72 presenta en la región C-terminal un dominio NTPasa/ARN helicasa que facilita la separación de las cadenas del intermediario de replicación y elimina las regiones del genoma cuya estructura secundaria dificulta el acceso de la ARN polimerasa, dicho de otra manera, se comporta como una helicasa (desenrolla el ARN viral durante la replicación) (28).

Región NS4: Está formada por 950 nucleótidos y se subdivide en 2 regiones conocidas como NS4a y NS4b. La secuencia codificada por el primero, la proteína p6, colabora en la actividad proteolítica que libera la p72, conocida por ello como NS3-4a proteasa, además de potenciar la actividad de la helicasa de la p72, por lo que también se le conoce como “potenciador de la helicasa”. La NS4b codifica una proteína de 27 kD, la p27, cuya función es desconocida por el momento.

Región NS5. Es la región más extensa del genoma, comprendiendo unos 3500 nucleótidos. También se subdivide en dos regiones (NS5a y NS5b). La NS5a codifica una proteína (p58) cuya función es desconocida aunque se piensa que participa en la regulación de la

replicación viral y que puede estar involucrada en fenómenos de resistencia a la acción del interferón a través de una zona que se denomina ISDR (región determinante de la sensibilidad al interferón) (29). Además posee la capacidad de inhibir la actividad de la proteínacinasas R (PKR) (30). Por otro lado, interfiere con el metabolismo intracelular de los lípidos y de las lipoproteínas (31) y es importante en la regulación del ciclo celular en la célula huésped (30). La subregión NS5b codifica a la p70 con actividad ARN-polimerasa dependiente de ARN, que ejecuta la replicación del genoma del virus (32).

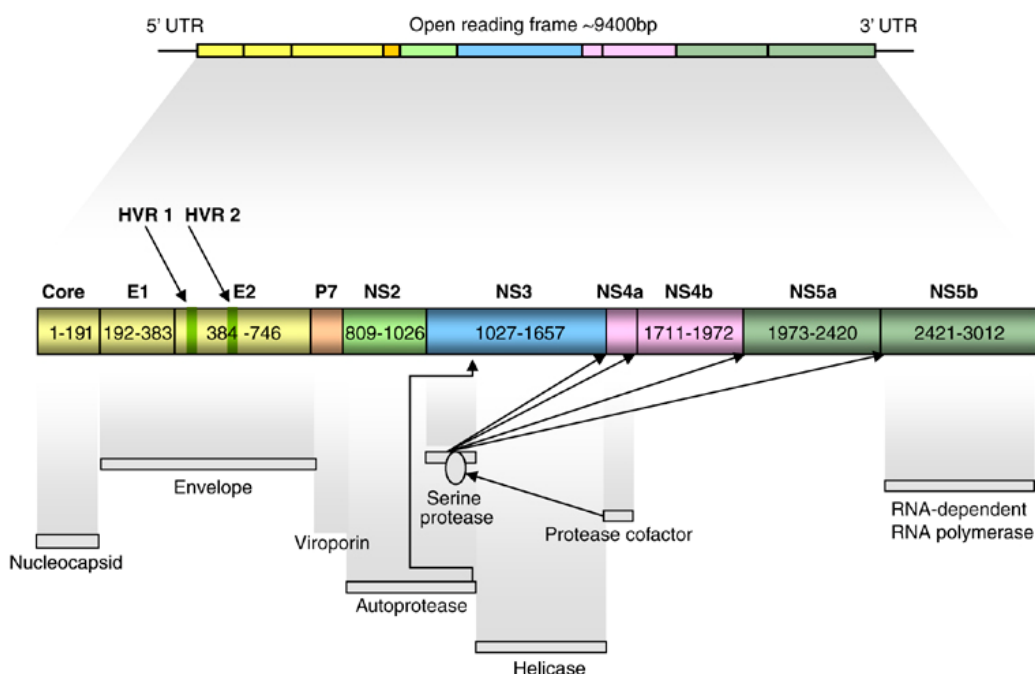


Ilustración 2. Organización y expresión del genoma del VHC.

1.1.2. Replicación y morfogénesis del VHC.

La cadena positiva de ARN del VHC sirve tanto de molde para la síntesis de la cadena negativa de ARN durante la replicación, como para la traducción de proteínas virales. Por otro lado, es un ARN genómico que va a ser ensamblado en los nuevos viriones. La penetración de las partículas virales podría suceder a través de la interacción entre la E2 y el

receptor celular de membrana conocido como CD 81, seguido de un proceso de endocitosis probablemente mediada por la E1. Una vez en el citoplasma, el ARN viral es traducido por los ribosomas gracias a la actuación del IRES y de las secuencias situadas en el extremo 5' de la región C, produciendo la poliproteína precursora que va a ser procesada por la NS2-3 proteinasa, la NS3-4a proteasa y la serín-proteasa viral (p72), liberando las proteínas estructurales (HCcAg, E1 y E2) y las proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, y NS5B).

Los productos derivados de este proceso se asocian a las membranas del retículo endoplásmico formando el complejo replicativo típico de los virus de ARN de sentido positivo. La ARN polimerasa (p70) es el componente clave para la replicación del genoma. Posteriormente se produce el ensamblaje, probablemente con la interacción del extremo 5' del ARN viral y el HCcAg. Este último formará la cápside. Las proteínas E1 y E2 se retendrán en la luz de las cisternas del retículo endoplásmico y la maduración de las partículas se producirá al brotar las nucleocápsides hacia el interior, adquiriendo así la envuelta. Las partículas completas se exportan fuera de la célula por tránsito a través del aparato del Golgi, aunque el VHC muestra una tendencia a permanecer asociado a componentes celulares.

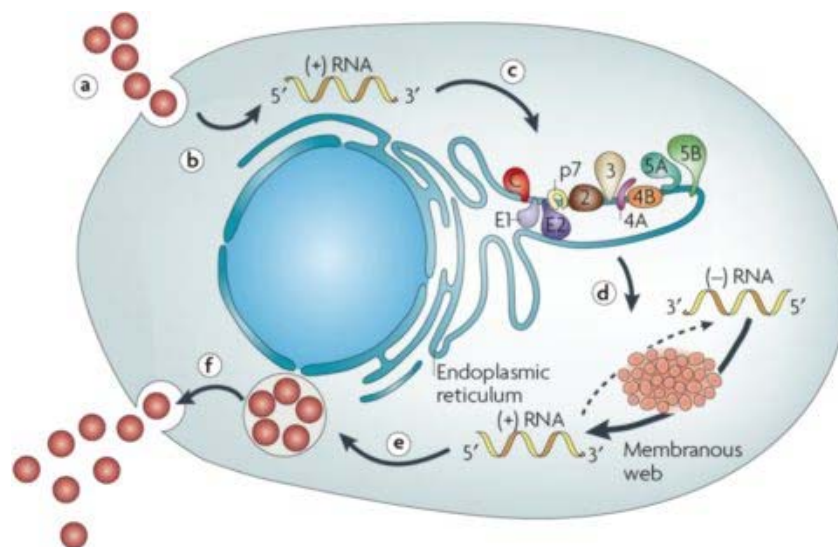


Ilustración 3. Replicación del VHC (35).

1.1.3. Genotipos, cuasiespecies y origen del VHC.

El VHC genera nuevas variantes genéticas viables a un ritmo superior al de otros virus similares a él, lo que le habilita para evolucionar con especial rapidez. Esta alta tasa intrínseca de mutaciones (aproximadamente $1,44 \times 10^{-3}$ sustituciones por base y año), es debida a una elevada cinética de replicación viral y a la elevada tasa de error de la enzima responsable de la replicación (ARN polimerasa dependiente de ARN), que es alrededor del 10^4 , lo que condiciona una marcada heterogeneidad del genoma del VHC (33;34).

Este hecho no es uniforme a lo largo del genoma del VHC, así las regiones no codificantes 3' y 5' exhiben un alto grado de conservación al comparar las distintas poblaciones, sin embargo, las regiones E1, E2 (máxima en su región hipervariable), NS 2-5 y la mayoría de las regiones C sufren mutaciones que generan progenies viables capaces de ser transmitidas. Estas mutaciones son la base del fenómeno conocido como “deriva genética” y su análisis conduce a la definición de los subgrupos poblacionales que conocemos como genotipos (34).

Por último, puede suceder que las condiciones del ambiente en el que se desarrolla la especie determinen que algunas de las mutaciones espontáneas que se producen en el genoma confieran a sus portadores una mayor capacidad para sobrevivir y, por lo tanto, una mayor oportunidad de transmitirse a las siguientes generaciones. Las regiones del genoma afectadas pueden experimentar cambios muy frecuentes y continuos, evolucionando con gran rapidez, fenómeno que involucra regiones genómicas que se conocen como “hipervariables” las cuales se localizan en el extremo 5' de la región E2 del genoma del VHC. La respuesta inmune del huésped constituye un elemento ambiental que puede influir poderosamente en la selección natural de las variantes genéticas (34;35).

La comparación de secuencias obtenidas de fragmentos discretos de las regiones 5'NC, C y NS5b de cepas del VHC procedentes de diferentes regiones del mundo han llevado a definir hasta 6 genotipos distintos (designados en números arábigos; genotipos 1, 2, 3, 4, 5 y 6) y cuyo grado de homología se encuentra en proporción igual o superior al 70%. Pueden diferenciarse tres o más genosubtipos (con un grado de homología entre el 77-80%) en cada uno de ellos (designados con letra minúscula: 1a, 1b, 1c...) y, a su vez, diferentes poblaciones llamadas cuasiespecies (con un grado de homología mayor del 98%). De esta forma se define a los genotipos como grupos de VHC aislados, distintos desde el punto de vista genético, que han surgido durante la replicación del virus. Diversos genotipos se asocian con diferencias en la geografía, el modo de adquisición y la capacidad de respuesta a la terapia antiviral (34).

La existencia de cuasiespecies representa la heterogeneidad genética de la población del VHC dentro de un paciente individual, mientras que el genotipo representa la heterogeneidad genética del virus entre los pacientes. La naturaleza de las cuasiespecies del VHC puede ser uno de los mecanismos con el que el virus escapa de la respuesta inmune (36).

1.2. Epidemiología.

La infección por el VHC es una de las causas más importantes de hepatitis crónica (HC), cirrosis (Ci) y hepatocarcinoma (CHC). En los países industrializados, es el agente causal de aproximadamente el 20% de las hepatitis agudas, 70% de las hepatitis crónicas y 40% de las cirrosis (37). Por otro lado, está presente en el 60% de los pacientes con hepatocarcinoma y es el causante del 30% de los trasplantes hepáticos (37;38).

1.2.1. Prevalencia.

No es fácil determinar la prevalencia de la infección, ya que depende de los métodos utilizados para estimarla y de la población estudiada (de sus hábitos, costumbres y nivel social y económico). Se calcula que es de aproximadamente un 3% de la población general, y que en el mundo existen entre 170 y 240 millones de portadores. En España la prevalencia oscila entre el 1% y el 2,7%, dependiendo del estudio analizado, por lo que se estima que existen unos 800000 individuos infectados (1).

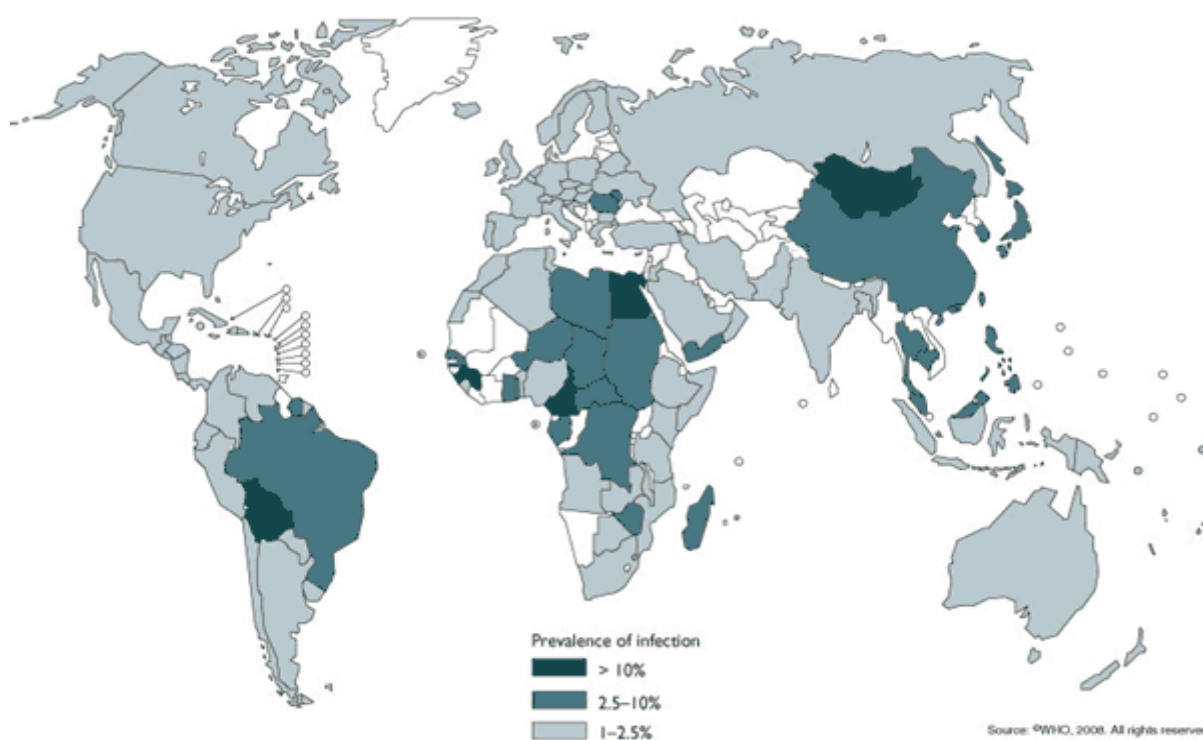


Ilustración 4. Prevalencia de la infección por VHC.

La prevalencia varía de forma importante dependiendo del área geográfica estudiada. Así en Norteamérica y Europa Occidental las tasas son bajas, en Japón son intermedias y en algunas zonas de Europa Oriental, Asia, Sudamérica y Egipto son elevadas. Es más, dentro de un mismo continente se ha observado que existe un gradiente norte-sur. En Europa se

registran prevalencias del 0,5% en los países nórdicos frente al 2% en los países mediterráneos (2).

Pero la prevalencia de la enfermedad no solo varía con el área geográfica, sino que también lo hace con el sexo (es más frecuente en el sexo masculino), con la raza (es más prevalente en individuos de raza negra) (39) y con la edad (mayor en individuos de edad avanzada) (1).

En un estudio con población catalana realizado en el año 2002, se observó una prevalencia del 1,74% en pacientes de entre 25 y 44 años, frente a un 4.15 % en pacientes mayores de 65 años (40).

En parte, la variabilidad demográfica se podría explicar por las condiciones socioeconómicas de una población, ya que se ha observado en diferentes estudios que la infección es más frecuente en aquellas poblaciones con peores medidas higiénicas (41;42).

1.2.1.1. Prevalencia y distribución de los distintos genotipos del VHC.

Los genotipos no están uniformemente distribuidos por el mundo. En Estados Unidos y en el norte de Europa, el genotipo que predomina es el 1a (1;43). El genotipo 1b es el más frecuente y tiene una distribución mundial. Los genotipos 2a y 2b representan el 10 % de las infecciones y son más frecuentes en Japón y en el norte de Italia. El genotipo 3, que predomina en la India y otras zonas de Asia, se ha introducido de forma reciente en países como EEUU, Europa y Australia, al igual que el genotipo 4, debido a los movimientos migratorios y al aumento del uso de drogas por vía parenteral en los años 60 y 70. El genotipo 4 predomina en África central y Egipto, el 5 es endémico de África del Sur y el 6 del sudeste asiático (38;41).

Tanto en EEUU como en Europa, los genotipos predominantes son el 1a y el 1b, siendo responsables de aproximadamente el 75% de los casos de hepatitis crónica C en estas áreas

geográficas (1;43). Una pequeña proporción de pacientes está infectada por varios genotipos, siendo más frecuente que sea por los genotipos 1a y 1b.

En nuestro medio, el genotipo 1 es responsable del 60%-70% de las infecciones crónicas por VHC, seguido por el genotipo 3 (20%-30%) y, a más distancia, por los genotipos 2 y 4 (5%-10%).

1.2.2. Incidencia.

La incidencia de la enfermedad es muy difícil de estimar debido a que la mayoría de las hepatitis agudas por virus C cursan de forma asintomática o con mínimos síntomas inespecíficos. Sin embargo, mediante estimaciones indirectas, se cree que el número de casos nuevos ha disminuido de forma importante desde la década de los ochenta del pasado siglo (38). Este descenso se atribuye, entre otras causas, a la mejora de las medidas sanitarias, como son la determinación de marcadores virales en las donaciones sanguíneas y el uso de material desechable en la práctica clínica.

Aunque la incidencia esté disminuyendo, la prevalencia de la infección es muy alta debido a que se cronifica aproximadamente en el 60-80% de los pacientes y se prevé que seguirá aumentando debido a que el periodo que transcurre entre la adquisición de la infección y la aparición de los primeros síntomas es, por lo general largo siendo, de media, unos 20 años (38).

1.2.3. Vías de transmisión.

1.2.3.1. Vías de transmisión parenterales.

Dentro de las vías de transmisión posibles del VHC, la vía parenteral es la más importante (44). En diversos estudios epidemiológicos se ha demostrado dicha vía a través de

transfusiones de sangre o de sus derivados, por medio de hemodiálisis, por el uso de drogas por vía parenteral y en trasplantes de órganos sólidos de donantes infectados (45).

Antes de comenzar a realizarse de forma sistemática la detección de anticuerpos contra el VHC en donantes de sangre, la prevalencia del virus de la hepatitis no A no B en pacientes que recibían *transfusiones* era muy alta, alcanzando en algunas series hasta el 90% en pacientes con hemofilia y el 60% en pacientes con talasemia (46).

Se estima que un paciente que haya recibido una transfusión de sangre o derivados antes de 1990 tiene un riesgo del 10% de haber adquirido el VHC por cada unidad de sangre recibida (46).

La introducción del inmunoanálisis enzimático (test de ELISA) fue determinante en el cribado de los donantes de sangre (46), ya que la utilización de “marcadores sustitutivos” [determinación de alaninoaminotransferasa (ALT) y de anticuerpos anticore del VHB (AcHBc)] era poco sensible para detectar la infección (47). Los test de ELISA fueron mejorando con el paso de los años, aumentando considerablemente su sensibilidad, de tal manera que con la introducción de los de primera generación se consiguió una reducción del número de casos de hepatitis C en los receptores de sangre y hemoderivados desde un 10% antes de 1990, a un 0,9% (48); y con los de tercera generación esta cifra descendió hasta un 0,3%.

En la actualidad, el riesgo de adquirir una infección por el VHC en pacientes que reciben transfusiones de sangre y hemoderivados ha disminuido de forma importante y, si se realiza la determinación del ARN-VHC de forma sistemática y se rechazan los donantes virémicos que son seronegativos, el riesgo es prácticamente nulo.

Sin embargo, a pesar de todas estas mejoras, actualmente se siguen documentado brotes en la población general y en algunas instituciones, debido, probablemente, a la mala aplicación de las medidas de higiene y de prevención de enfermedades potencialmente transmisibles por la sangre.

Por otro lado, se comprobó que la infección por el VHC era mucho más frecuente en pacientes sometidos a *hemodiálisis* que en la población general de la misma área geográfica (49). Un estudio español determinó que la prevalencia de la infección por el VHC en pacientes con insuficiencia renal en hemodiálisis era del 7% (50).

Los *consumidores de drogas por vía parenteral (CDVP)* son el grupo de riesgo más importante. La prevalencia de anticuerpos anti-VHC en estos individuos es aproximadamente del 90%. Se ha detectado que la principal vía de transmisión en este colectivo es el uso compartido de jeringuillas contaminadas y, en menor medida, la promiscuidad sexual y el bajo nivel socioeconómico (51). Sin embargo, en los últimos años ha disminuido la incidencia del VHC en estos sujetos debido al miedo de adquirir la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y, en parte, por las campañas de salud pública realizadas. La prevalencia de anticuerpos frente al VHC en pacientes *receptores de órganos* de donantes con anticuerpos positivos es del 95%, por lo que, en la actualidad, se rechazan estos individuos como posibles donantes (45).

El *personal sanitario* puede sufrir el contagio del virus por parte de un paciente (44), pero lo que es más importante, también puede ser el vector de transmisión de la infección (52). Los factores que se ha demostrado que influyen en la probabilidad de transmisión del virus tras sufrir un pinchazo accidental con una aguja contaminada son la cantidad de sangre que se transmite al receptor, la presencia de ARN-VHC en suero, la carga viral y la profundidad de la inoculación (53;54).

La *estancia hospitalaria* se ha analizado en múltiples estudios como posible factor de riesgo de adquirir la infección por el VHC. A pesar de un control estricto de vías de contagio conocidas en los medios hospitalarios (transfusiones de sangre o punciones con material médico no desechable) se han documentado varios casos de infección por VHC tras estancias hospitalarias, sobre todo si es en un recinto común. Este hecho se ha relacionado

con deficientes medidas de asepsia que permitirían la transmisión de la infección de paciente a paciente o la utilización de viales multidosis (55).

Un estudio realizado en España demostró que en salas convencionales de hospitalización se produce transmisión nosocomial del VHC y ésta tiene lugar de paciente a paciente, a pesar de un correcto cumplimiento de las medidas universales de prevención de transmisión de enfermedades infecto-contagiosas. Dicho estudio se realizó durante 2 años con pacientes ingresados en 3 salas de una unidad de hepatología que no tenían otro factor de riesgo de adquirir la infección por VHC. Se registraban todos los procedimientos invasivos a los que eran sometidos los pacientes y se comprobó el adecuado cumplimiento de las medidas de prevención de transmisión de enfermedades infecto-contagiosas. En el periodo que duró el estudio se observó una seroconversión anti-VHC en 3 pacientes con viremia positiva, lo que arrojaba una incidencia anual calculada de seroconversión de VHC de 0,19 por cada 100 ingresos. Se encontró una relación estrecha entre las cepas de los tres pacientes infectados por VHC y pacientes con infección crónica por VHC que se encontraban en la misma habitación (dos casos) o en la misma sala (un caso), no observándose en ningún caso relación entre la seroconversión anti-VHC y la realización de procedimientos invasivos o transfusión de hemoderivados (56).

El aumento de la práctica de procedimientos como son la colocación de *piercings*, la *acupuntura* y los *tatuajes*, ha propiciado que aparezcan otras vías de transmisión del VHC (44), así como el consumo de cocaína, merced al que se ha descrito una vía de transmisión *intranasal* (57).

1.2.3.2. *Vías de transmisión no parenterales.*

Se infiere de varios estudios que la transmisión de la infección del VHC por *vía sexual* existe, pero con una frecuencia muy inferior a otros virus que se transmiten por esta vía,

como son el virus de la hepatitis B (VHB) y el VIH (58;59). Actualmente, las relaciones sexuales no se consideran una vía efectiva de transmisión del VHC en parejas heterosexuales estables (el riesgo de transmisión sexual anual es inferior al 1%) aunque se ha demostrado que puede existir en casos aislados (60;61).

Sin embargo, las tasas de prevalencia de la infección por el VHC en hombres homosexuales son algo superiores a las de la población general (oscilan entre un 5 y un 7%) aunque son mucho menores que las referidas para los virus de la hepatitis B y para el VIH en el mismo grupo de riesgo. Esta vía de transmisión se relaciona con el intercambio de secreciones corporales infectadas (que normalmente presentan bajos títulos de ARN-VHC) o sangre contaminada a través de la superficie de las mucosas no intacta (58). El riesgo de transmisión por vía sexual es más elevado en personas promiscuas, que tienen parejas infectadas por el VIH o con enfermedades de transmisión sexual (58).

La mayoría de los estudios sobre la transmisión del VHC en individuos de la misma familia que conviven, arrojan una prevalencia de anti-VHC similar a la de la población general (1,3-2%) (62). Ninguno de ellos ha podido demostrar una vía de transmisión distinta a las mencionadas anteriormente, por lo que la vía de transmisión intrafamiliar no se acepta en la actualidad.

Sin embargo, está bien documentada la transmisión que ocurre de madre a hijo durante el parto (63), también llamada *vía vertical*. Esta vía no es muy frecuente, aunque sí lo es en poblaciones donde la infección por el VHC es endémica (64;65). Los factores que se relacionan con mayor riesgo de transmisión vertical son la carga viral elevada en el tercer trimestre de gestación (64;66) y la coinfección por el VIH, debido probablemente a que estos individuos tienen niveles más elevados de ARN del VHC en suero por su condición de inmunosupresión (65;67). No se ha objetivado relación con el genotipo viral.

La transmisión vertical también es posible que ocurra intraútero si se realizan técnicas invasivas durante la gestación (reproducción asistida, amniocentesis, biopsia corial...) (68) o si se produce una transfusión materno-fetal.

A pesar de existir varias vías de transmisión demostradas, en uno de cada dos pacientes con infección por el VHC no se puede identificar la vía de adquisición de ésta.

Tabla 1. Vías de transmisión del VHC.

| | |
|---------------|---|
| Parenteral | Transfusiones de sangre o hemoderivados Hemodiálisis Consumidores de drogas vía parenteral (CDVP) Trasplante de órganos sólidos Personal sanitario (pinchazo accidental) Estancia hospitalaria Consumo de cocaína Otros procedimientos (piercing, acupuntura, tatuajes...) |
| No parenteral | Vía sexual Vía vertical (de madre a hijo) |

1.3. Patogenia.

Los mecanismos de persistencia viral y lesión hepatocelular en pacientes con infección por el VHC son diversos y nuestros conocimientos sobre ellos son, por ahora, incompletos.

Son varios los determinantes de la persistencia del virus, entre los que se incluyen su capacidad de generar cuasiespecies (69) que condiciona la evasión del virus de las respuestas inmunes eficaces; una respuesta inmune congénita inadecuada junto con una insuficiente respuesta inmunitaria adaptativa, así como la inducción de tolerancia inmunológica.

1.3.1. Mecanismos virales:

En general, el VHC puede producir una lesión hepatocelular mediante citotoxicidad directa, a través de una lesión celular asociada con la acumulación del virus íntegros o de proteínas víricas, o de forma indirecta, a través de una respuesta inmune asociada con una cepa viral que interviene en la destrucción de los hepatocitos y en la producción de la fibrosis (70).

No siempre se puede demostrar una correlación directa positiva entre el nivel del virus y el grado de lesión hepatocelular aunque en algunos estudios se han detectado niveles séricos de ARN-VHC más altos en pacientes con mayor actividad inflamatoria lobulillar que en los que presentan inflamación mínima. Por otro lado, se han descrito alteraciones graves de la función hepática en pacientes inmunodeprimidos receptores de trasplantes con niveles de ARN-VHC en suero muy elevados en los que la biopsia sólo mostraba una inflamación moderada del hígado, lo que apunta a un efecto citopático directo del VHC (71). Sin embargo, se cree que para que se produzca la lesión del hepatocito es probable que sea necesario un cierto nivel crítico de acumulación de antígenos del VHC dentro de la célula.

1.3.2. Mecanismos mediados por el sistema inmune.

En la hepatitis aguda se desencadena una respuesta inmune intensa frente a múltiples antígenos virales con el fin de modular la inflamación, erradicar el virus y evitar la evolución a la cronicidad (70;72). Entre las distintas reacciones se encuentran una respuesta de anticuerpos específica, así como de células CD8⁺ (supresores citotóxicos), CD4⁺ y células NK (natural killer o células asesinas naturales) (73). También los linfocitos T (LT) no específicos y otras células mononucleares participan en la producción del daño hepatocelular.

El daño histológico y el pronóstico de la lesión hepática depende de la capacidad del virus para evitar la respuesta inmune, del vigor de la respuesta cooperadora y de la reacción de los linfocitos T citotóxicos para producir la lisis de los hepatocitos infectados (74). Cuando la respuesta es potente y multiespecífica se produce la resolución de la hepatitis aguda, sin embargo, una función cooperadora deficiente junto con una respuesta ineficaz de los linfocitos CD8, daría como resultado la perpetuación de la reacción inflamatoria produciendo inevitablemente daño hepatocelular (75).

La respuesta inmune de los linfocitos T cooperadores CD4+ se realiza a través de los linfocitos T helper (Th). Los linfocitos Th1 producen interferón gamma (IFN γ) (76), interleucina 2 (IL2) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y promueven la respuesta citotóxica mediada por los linfocitos T. Las células Th2 sintetizan IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, promueven las respuestas humorales productoras de anticuerpos (75) y disminuyen la respuesta Th1.

La respuesta de las células CD8 específica contra el VHC es policlonal y se dirige contra diferentes epítomos de las regiones estructurales y no estructurales de las proteínas virales (core, envoltura, N53, N54 y N55) (77), produciendo la destrucción de las células infectadas por citolisis directa o mediante inducción de la apoptosis, en este último caso, dando lugar a los cuerpos apoptóticos (cuerpos acidófilos de Councilman) que son fagocitados por los macrófagos (74).

La expresión definitiva del VHC y la consecuente cronificación de la infección, depende del equilibrio porcentual de la respuesta CD4 de tipo 1 (Th 1) frente a la de tipo 2 (Th 2) (78), ya que se ha comprobado que una respuesta inicial multiespecífica con predominio de células CD4 Th1 ocurre de forma más frecuente e intensa en pacientes con infecciones agudas que se resuelven. Por otro lado, se cree que el mantenimiento de la respuesta por parte de las células CD8 determina la evolución benigna de la enfermedad. Se desconocen

las causas principales de estas diferentes respuestas inmunes iniciales en la infección aguda por VHC.

13.3. Citocinas.

La citocinas son mediadores solubles de la inflamación y son decisivas para el comienzo y perpetuación de la lesión hepática asociada a la infección por el VHC (70). Tienen capacidad para mediar apoptosis y reclutar y amplificar los componentes de la respuesta inmunitaria, activando a los linfocitos T y B, a los macrófagos y a los fibroblastos, a la vez que participan en la génesis de fibrosis hepática.

En la siguiente tabla se resume las citocinas más importantes en relación con la patogenia del VHC y sus principales funciones.

Tabla 2. Citocinas y repuesta adaptativa. Efectos biológicos principales.

| Citocina | Efectos biológicos principales |
|---------------|---|
| IL-2 | Induce la proliferación de linfocitos LT, LB y NK. Citotóxica e inflamatoria (Célula productora: Th y LTc, Th1) |
| IFN- γ | Incrementa la expresión de MHC-I y II. Activa macrófagos y NK. Inhibe proliferación de células Th-2 (Célula productora :Th1, Tc, NK) |
| TNF | Proinflamatoria. Pirógeno. Induce moléculas de adhesión (Célula productora: Th1, Tc) |
| IL-1 | Inductor de la diferenciación Th2. Inhibe citocinas y mediadores proinflamatorios. Estimula crecimiento y diferenciación de linfocitos B. Induce IgE e IgG4 (Célula productora: Th-2, mastocitos, basófilos.) |
| IL-10 | Inhibe expresión de citocinas y otros mediadores proinflamatorios y la expresión MHC-II y moléculas de adhesión en monocitos. Estimula a linfocitos B e induce IgG. (Célula productora: Th 2, monocitos, macrófagos y LB) |
| IL-12 | Inductor de la diferenciación Th1. Estimula activación T y NK (Célula productora: Monocitos) |
| TGF- β | Inmunosupresora. Inhibe el crecimiento de muchos tipos celulares, la síntesis de citocinas y la toxicidad natural. Actúa en el desarrollo de fibrosis. (Célula productora: T activados) |
| GM-CSF | Desarrollo y diferenciación de granulocitos y macrófagos. (Célula productora :T activados) |

Se ha demostrado un aumento de la síntesis hepatocelular del TNF α en las hepatitis crónicas virales (76), factor que actúa directamente sobre los receptores de la célula diana (hepatocitos y células de Kupffer) induciendo apoptosis (81) e incrementando la expresión hepática de las moléculas de adhesión celular (ICAM-I) y vascular (VCAM-1). La IL2 y el INF γ son estímulos importantes para la respuesta inmune antiviral del huésped ya que entre sus funciones destaca la activación de las células NK y la actuación sobre las células T facilitando su proliferación y activación. La IL12 es un potente inmunoestimulador de la respuesta Th1, induce la producción de IFN γ por parte de las células NK y de los linfocitos T (82) e inhibe, por otro lado, la replicación de los virus hepatotropos. El IFN γ induce la activación de los fagocitos y la síntesis de quimiocinas incluida la propia IL-12. La IL10 es una citocina con propiedades antiinflamatorias capaz de inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias por los linfocitos T y los macrófagos, por lo que su efecto es antifibrogénico. El factor de transformación del crecimiento β 1 (TGF- β 1) es producido por los macrófagos, induce apoptosis y desempeña un papel en la fibrogénesis hepática promoviendo, en cultivos de fibroblastos, la síntesis de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular (83). Se ha observado en los pacientes con hepatitis crónica C, un aumento de los niveles de TGF β tanto a nivel hepático como en plasma (74;84) así como una correlación positiva entre la concentración tisular de ARNm del TGF- β 1 y la intensidad de la fibrosis hepática, lo que sugiere que el TGF- β 1 participa de forma activa en el desarrollo de ésta (85). Por otro lado, los pacientes que obtienen una RVS tras el tratamiento antiviral presentan tanto una mejoría en el grado de fibrosis como un descenso de los niveles séricos de TGF β 1(86).

13.4. El óxido nítrico (NO).

El óxido nítrico es un potente mediador de la respuesta inflamatoria. Se genera a través de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (ONSi) presente en los hepatocitos y macrófagos tras la activación por citocinas proinflamatorias. La expresión hepatocelular de ONSi está aumentada en pacientes con hepatitis crónica C (87), lo que condiciona la formación de grandes cantidades de ON que actúa como un factor angiogénico con acción citotóxica, esta última, en relación con la formación de peroxinitrito (PNT), un potente agente oxidante que promueve la formación de nitrotirosina (n-TIR). La nitrotirosina está aumentada en los pacientes con hepatitis crónica C y su acumulación se correlaciona con la gravedad de la lesión hepática (88).

1.4. Anatomía Patológica.

Los hallazgos histológicos de la hepatitis crónica van desde la existencia de mínima actividad inflamatoria sin fibrosis hasta la cirrosis hepática.

En la fase de hepatitis aguda, a nivel histológico se observan cuerpos acidófilos, balonización de los hepatocitos y necrosis lítica de predominio centrolobulillar. Por otro lado existe un infiltrado inflamatorio en los espacios porta, infiltración en el lobulillo y signos regenerativos. Con el tiempo se puede desarrollar una cirrosis macronodular donde el hígado tiene una consistencia aumentada. La superficie hepática es nodular, con nódulos de 3 mm a 3 cm de diámetro y con tabiques conjuntivos elásticos que los rodean completamente. Los nódulos están formados por hepatocitos con disposición desordenada que presentan signos regenerativos y los tabiques se forman por colapso del retículo de las zonas necróticas a los que se agrega fibrosis activa.

Las características histológicas que nos sugieren que la enfermedad está evolucionando a situaciones especiales son: a) la necrosis masiva, que ocurre cuando la necrosis compromete

a más del 85% del hígado, lo que condiciona una grave insuficiencia hepática, situación que se da con más frecuencia en las hepatitis fulminantes; b) la necrosis en puentes, donde la necrosis de los hepatocitos sucede en las áreas que unen los espacios porta entre sí (porto-portal) o los espacios porta con las venas centrolobulillares (porto-central) y c) necrosis en sacabocado o necrosis erosiva que es la destrucción de los hepatocitos aislados de la placa limitante periportal, con interrupción de ésta.

La existencia de fibrosis en puentes entre los espacios porta o entre éstos y las venas centrolobulillares representa un estado de fibrosis avanzado previo a la aparición de una cirrosis establecida.

1.5. Historia natural de la infección por VHC.

La infección por el VHC produce una hepatitis aguda que puede evolucionar hacia una hepatitis crónica, hacia una cirrosis y, finalmente, hacia un carcinoma hepatocelular. Es fundamental conocer la historia natural de la infección para comprender su importancia.

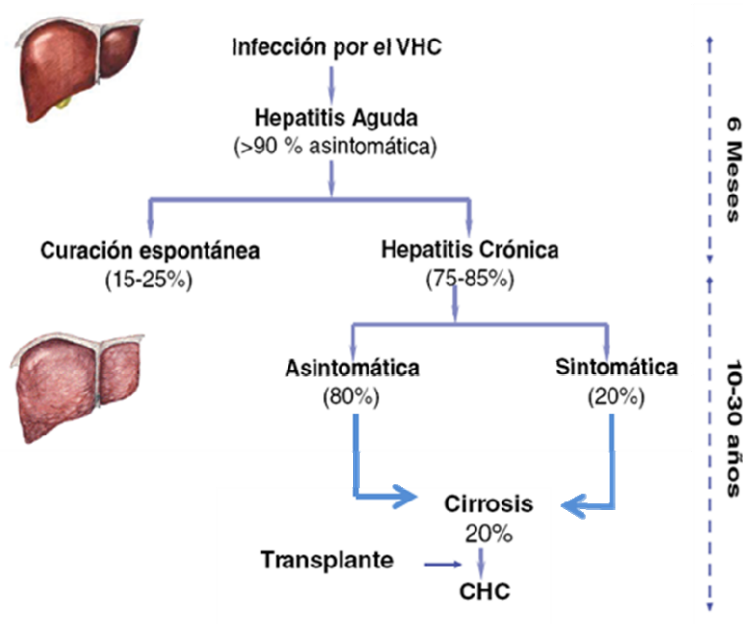


Ilustración 5: Historia natural de la infección por VHC.

1.5.1 Hepatitis aguda por VHC.

La infección aguda es asintomática o subclínica en la mayoría de los casos, por lo que no suele diagnosticarse en esta fase. Aproximadamente un 20-30% de los pacientes presentan síntomas y tan solo el 10-15% desarrollan ictericia.

No es posible realizar un diagnóstico serológico en fases muy precoces de la infección debido a que existe un periodo (periodo ventana) de aproximadamente 10 semanas entre la exposición al virus y la detección de anticuerpos anti-VHC en plasma (89). El ARN-VHC se puede detectar en suero en la primera o segunda semana tras la exposición, no obstante, hasta un 30% de los pacientes continúan con el virus indetectable en sangre durante periodos largos de tiempo, que pueden llegar a ser hasta de 9 meses tras la exposición (90;91). Después de este periodo, la mayoría de los paciente positivizan el ARN-VHC. Los parámetros de lesión hepática se elevan pasadas de 2 a 8 semanas, siendo frecuente encontrar cifras muy altas de ALT y de gamma glutamil transferasa (GGT). Sin embargo, la elevación de transaminasas en estos pacientes suele ser inferior a la observada en el resto de las hepatitis víricas.

Tras la infección aguda pueden ocurrir diferentes situaciones. La primera posibilidad es la erradicación del virus con recuperación total de la lesión hepática. Se da en el 15-45% de los pacientes con hepatitis aguda C y la negativización del ARN-VHC sérico coincide con la normalización de los valores de ALT. Esta circunstancia es más frecuente en enfermos que sufren hepatitis aguda clínicamente manifiesta. La segunda situación es la normalización rápida de las enzimas hepáticas pero con persistencia de la viremia (estado de portador inactivo) y en la tercera, que representa al 40-60% de los casos, tanto el ARN-VHC como las enzimas hepáticas se mantienen elevadas en suero durante más de 6 meses. Este último grupo de pacientes son aquellos que evolucionan hacia una hepatitis crónica(1).

El riesgo de insuficiencia hepática aguda por el VHC es muy bajo y existen pocos casos en la literatura de fallo hepático fulminante debido a esta causa (92).

1.5.2. Hepatitis crónica y cirrosis hepática por el VHC.

La característica más relevante del VHC es su capacidad de inducir una infección crónica en aproximadamente el 60-80% de las personas infectadas. No son bien conocidos los mecanismos o los factores por los que unos pacientes son capaces de aclarar por completo el virus mientras que en otros se produce una infección crónica, aunque parecen ser múltiples y dependientes de factores virales y del huésped (93).

Un estudio realizado en el año 1999 determinó que factores como la raza blanca, la aparición de ictericia en la fase aguda y una baja carga viral se relacionaban con el aclaramiento espontáneo del VHC (94). Otros factores que se han propuesto como predictivos de mayor tasa de aclaramiento del virus podrían ser el sexo femenino, la existencia de clínica de hepatitis aguda, así como títulos altos de anticuerpos contra las proteínas estructurales del VHC (95) y la persistencia de una respuesta VHC-específica de las células T CD4 (96), mientras que no parece determinante de una mejor o peor evolución el genotipo viral.

Recientes estudios han demostrado que existe una correlación entre las respuestas virales obtenidas en los pacientes infectados crónicamente por el VHC y un gran número de polimorfismos genéticos de los que hablaremos más adelante.

La hepatitis crónica por VHC (HCC) cursa de forma asintomática y en el transcurso de muchos años en la mayoría de los pacientes, por lo que en numerosas ocasiones se

diagnostica de forma casual tras un análisis periódico donde se objetiva un aumento de las transaminasas. Un tercio de los casos presentan clínica inespecífica y/o hepatomegalia y un porcentaje menor de pacientes desarrollan ictericia, signo que se considera de mal pronóstico.

La fase de hepatitis crónica se manifiesta analíticamente con aumento de transaminasas, especialmente de ALT, sin embargo, este hallazgo puede estar ausente en pacientes con ARN-VHC presente en suero (57).

Existe un subgrupo de pacientes que presentan transaminasas persistentemente normales con títulos de ARN-VHC detectables en suero (57) y son diagnosticados mediante el cribado de donantes de sangre o por análisis rutinarios en las revisiones de empresa. Estos pacientes, en general, suelen presentar un grado de inflamación muy leve y discreta o nula fibrosis (97), sin embargo, un número muy pequeño de ellos puede presentar fibrosis importante en la biopsia hepática (97;98).

Cuando la fibrosis es muy avanzada y la lesión hepática es irreversible, nos encontramos ante una cirrosis establecida. En las fases iniciales, la cirrosis está compensada y sus síntomas son superponibles a los de los estadios previos de la infección por VHC. Posteriormente, el paciente puede sufrir diferentes grados de insuficiencia hepatocelular e hipertensión portal.

La proporción de enfermos con hepatitis crónica que desarrollan cirrosis hepática es extraordinariamente variable según se consideren unos estudios u otros. Se admite que el porcentaje de pacientes con infección crónica por VHC que desarrolla una cirrosis hepática es del 15% a los 20 años. La coexistencia de factores como el consumo de alcohol o la

coinfección por el virus de la hepatitis B pueden acelerar dicha progresión, así como la situación de inmunosupresión en pacientes VIH o trasplantados (97;99).

Los datos analíticos que nos hacen sospechar que la enfermedad ha evolucionado a cirrosis son el aumento de bilirrubina sérica, la disminución de los niveles de albúmina y el alargamiento del tiempo de protrombina. En las pruebas complementarias como la endoscopia o la ecografía se pueden observar datos indirectos del desarrollo de hipertensión portal, pero es la biopsia hepática la que nos va a dar la certeza de la progresión a cirrosis.

Últimamente se están desarrollando diferentes técnicas para estimar el grado de fibrosis hepática de forma no invasiva y así evitar la realización de una biopsia hepática. Estos procedimientos se dividen principalmente en dos categorías: aquéllos que utilizan la determinación sérica de distintos marcadores biológicos (100) y los basados en métodos de imagen entre las que se encuentran la elastografía transitoria (ET) o Fibroscán (101), la tomografía computerizada (TC) o la resonancia magnética (RM).

Cuando aparece cualquier manifestación grave de la hipertensión portal como es la ascitis, la hemorragia digestiva por varices gastroesofágicas, la encefalopatía hepática o las infecciones bacterianas graves, nos encontramos ante una cirrosis descompensada y el único tratamiento posible, aparte del tratamiento de las complicaciones, es el trasplante hepático.

La incidencia de descompensación de la cirrosis es aproximadamente de un 4 a un 5% anual. La complicación más frecuente es la ascitis, seguida por la hemorragia por varices esofágicas y la encefalopatía (102).

La supervivencia está determinada fundamentalmente por la edad y el grado de Child-Pugh, siendo en pacientes con cirrosis compensada del 92-96%, 83-91% y 79 % a los 3, 5 y 10 años. Cuando la enfermedad está descompensada, aquéllas descienden al 57% y 50% a los 3 y 5 años respectivamente (4).

1.5.3. Carcinoma hepatocelular.

El CHC ha presentado un aumento progresivo de su incidencia en el mundo occidental, siendo actualmente el quinto cáncer a escala mundial y la principal causa de muerte en los pacientes afectados de cirrosis hepática.

La incidencia y prevalencia de CHC en pacientes con cirrosis hepática es mucho mayor que en la población general y se desarrolla en pacientes con infección por el VHC en fases avanzadas (hepatopatías muy evolucionadas o cirrosis hepáticas) después de periodos muy prolongados de exposición al virus (103), hecho que explica que la media de edad de diagnóstico de estos pacientes oscile entre los 65 y 70 años. Se ha estimado que aproximadamente un 2-4% de pacientes con infección crónica por el VHC en estadio cirrótico presenta un CHC y la prevalencia de marcadores del VHC en pacientes con hepatocarcinoma es muy alta. La incidencia varía según el estadio en que se encuentre la hepatopatía, siendo de menos del 1% en pacientes con hepatitis crónica y del 3,7 al 7,1% en los casos de cirrosis establecida (104).

De este modo, se acepta que en nuestro medio el factor de riesgo más importante para el desarrollo de un CHC es la cirrosis por el VHC y que el riesgo de desarrollarlo, si estudiamos el conjunto de enfermos con infección crónica por VHC, es del 1 al 4% anual (104;105). Sin embargo, no se ha demostrado un mecanismo oncogénico directo del VHC (106;107).

Determinados factores como la coinfección por el VHB o el VIH, el consumo de alcohol o la coexistencia de otros procesos como la diabetes mellitus y la obesidad pueden actuar de forma sinérgica y favorecer el desarrollo del CHC en pacientes con infección crónica por el VHC (108).

1.6. Diagnóstico de la infección por VHC.

La clonación y secuenciación del genoma del VHC en 1989 (10) permitió el desarrollo de distintas pruebas para la identificación de fragmentos genómicos y de anticuerpos frente al VHC en el suero de los pacientes infectados.

Los métodos diagnósticos se pueden dividir en: a) métodos diagnósticos directos (análisis moleculares o virológicos) que determinan y cuantifican el ARN viral mediante la detección de los componentes estructurales virales, y b) métodos indirectos, entre los que se encuentran las técnicas serológicas que detectan anticuerpos específicos contra el VHC (109).

1.6.1. Pruebas serológicas.

Estas pruebas se basan en la detección de anticuerpos dirigidos frente a diferentes antígenos estructurales y no estructurales del VHC (110). Las principales pruebas serológicas son el enzimoimmunoanálisis (EIA) y la inmunotransferencia con antígenos recombinantes (RIBA) (109).

a) Enzimoimmunoanálisis o ELISA.

Se trata de una técnica de diagnóstico inicial de la hepatitis C. Detecta anticuerpos frente al VHC que se generan frente a los diferentes epítomos de las proteínas que codifica el genoma viral. Los anticuerpos que se desarrollan son inmunoglobulinas del tipo IgG. Existen tres generaciones de ELISA. Los ELISA de tercera generación detectan anticuerpos dirigidos contra epítomos localizados en el core y proteínas no estructurales (NS3, NS4 y NS5) y tiene una sensibilidad y especificidad mayor del 99% en sujetos inmunocompetentes, siendo inferior en inmunodeprimidos, por lo que un resultado

negativo en estos pacientes no descarta la infección por el virus, lo que hace imprescindible utilizar, en estos sujetos, un test que detecte el ARN-VHC (110).

b) Inmunotransferencia con antígenos recombinantes o “inmunoblot” recombinante (RIBA).

Se trata de una técnica de confirmación. Los antígenos individualizados son enfrentados por separado a la muestra problema, siendo el resultado positivo cuando presenta reactividad frente a dos o más antígenos; negativo, cuando no se detecta reactividad frente a ningún antígeno o indeterminado, cuando no sucede ninguna de las anteriores.

La prueba de RIBA se utiliza cada vez menos como test confirmatorio, ya que en la práctica clínica habitual, para establecer la existencia de una infección activa por VHC, se determina el ARN-VHC tras obtener un resultado positivo del test de ELISA (111).

1.6.2. Pruebas virológicas o moleculares.

Actualmente disponemos de métodos cualitativos y cuantitativos de detección del ARN-VHC (112).

En la infección activa, el ARN-VHC está presente en el suero del paciente y puede detectarse aproximadamente entre la tercera y cuarta semana tras la exposición aguda (113).

Como la cantidad del ARN-VHC en suero de pacientes con hepatitis C es limitada, es necesario amplificar la muestra o la señal de hibridación con distintos métodos, entre los que se encuentran los sistemas de transcriptasa inversa con reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), la transcripción mediada por amplificación (TMA) y el sistema “*Branched*” (bDNA).

a) Pruebas cualitativas.

La detección del ARN se utiliza para poder confirmar la infección en pacientes con anticuerpos positivos, para confirmar/descartar la respuesta al tratamiento y monitorizar dicho tratamiento, en el diagnóstico de la infección en el periodo ventana, en la infección perinatal y en los casos de alta sospecha y anticuerpos negativos en suero que, aunque no es frecuente, es una posibilidad sobre todo en pacientes inmunodeprimidos.

En un primer paso del ensayo cualitativo *RT-PCR*, la transcriptasa convierte el ARN en ADNc (ADN complementario) que es utilizado como molde. Los iniciadores utilizados son secuencias que corresponden a la región 5' UTR. La fase de amplificación viene seguida de la fase de detección mediante una hibridación con sonda específica (114). La prueba de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cualitativa para el ARN del VHC es muy sensible, detectando su presencia a partir de 20 unidades internacionales por mililitro (UI/ml). Un resultado positivo confirma la replicación activa del virus pero un test negativo no excluye viremia y puede reflejar sólo un descenso transitorio de la carga viral por debajo del límite de detección del test.

Los ensayos basados en el sistema *TMA* (*transcripción mediada por amplificación*) utilizan un sistema más complejo de reacciones con participación de la ARN-polimerasa y la transcriptasa inversa bajo condiciones isotérmicas de amplificación del ARN mediante intermediarios del ácido desoxirribonucleico (ADN). Pueden detectar niveles muy bajos de ARN-VHC (5- 10 UI/ml) que son imperceptibles con sistemas RT-PCR (115).

b) Pruebas cuantitativas.

El método del *bADN* (*sistema "Branched"*) de detección del ARN utiliza una sonda de oligonucleótidos en fase sólida que captura el blanco de ARN, seguido de una hibridación secundaria mediante una sonda ramificada. Para poner de manifiesto la reacción, se añade un complejo de enzima conjugada al que posteriormente se le agrega un sustrato (109). El ensayo de *bADN* de tercera generación ofrece una medición semicuantitativa del ARN viral con un límite inferior de detección de 600 UI/ml.

El *método de RT-PCR* también se utiliza para la cuantificación del ARN, añadiendo un control externo o estándar de cantidad de ARN conocida que se amplifica junto con la muestra (PCR competitiva). La comparación de ambas nos permite calcular la concentración de ARN de la muestra (112;116).

En la actualidad la detección del ARN-VHC se realiza por *PCR a tiempo real* que es mucho más sensible y rápida que las pruebas cualitativas, con un límite inferior de detección de 15 UI/ml. Su principal característica es que permite cuantificar la cantidad de ARN presente en la muestra original. Dentro de las técnicas de PCR a tiempo real, se diferencian aquellas basadas en fluorocromos no específicos y las basadas en sondas específicas.

En las técnicas basadas en fluorocromos, el ADN, que se multiplica su cantidad con cada ciclo, se une al fluorocromo produciendo fluorescencia que es medida por el termociclador apto para "RealTime" PCR. Permite cuantificar solo una secuencia por reacción pero tiene la ventaja de utilizar *primers* normales para su realización. Es mucho más económica que la realización de PCR con sondas específicas.

Las técnicas basadas en sondas específicas utilizan una *sonda* unida a dos fluorocromos que hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo (*forward*) y el inverso (*reverse*), cuando

la sonda está intacta, presentan una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET).

La PCR a tiempo real presenta ventajas frente a la PCR tradicional. La fundamental es su mayor sensibilidad lo que disminuye el riesgo de falsos negativos. El hecho de que los datos sean tomados en la fase exponencial del proceso asegura que ningún componente pueda estar limitando el proceso de amplificación. También es más rápida y tiene menos probabilidad de contaminación con lo que disminuyen los falsos positivos (112).

1.6.3. Determinación del genotipo del virus de la hepatitis C.

El análisis filogenético de diferentes aislamientos del VHC nos indica la presencia de genotipos, subtipos y cuasiespecies. Se han identificado 6 genotipos diferentes del VHC y por lo menos 80 subtipos (117). Actualmente se dispone de diferentes alternativas para la detección del genotipo del VHC. Dependiendo de la tecnología empleada, estos sistemas se pueden clasificar en técnicas moleculares de genotipado y técnicas serológicas o de serotipado.

a) Técnicas de genotipado del VHC.

Existen diferentes estrategias para la caracterización, mediante técnicas moleculares, de los diferentes genotipos del VHC. Todas ellas se basan en la realización previa de una técnica de amplificación de regiones específicas del genoma del virus. La posterior identificación de genotipos y subtipos se puede realizar mediante el análisis de la secuencia generada, por el estudio del polimorfismo de la longitud de los fragmentos obtenidos por la actuación de enzimas de restricción o mediante técnicas de hibridación con diferentes sondas específicas para cada genotipo y subtipo del VHC.

b) Técnicas de serotipado del VHC.

Las pruebas de serotipado del VHC se basan en la respuesta serológicas específica a diferentes proteínas antigénicas que corresponden a determinadas regiones del genoma del VHC. Algunas de estas pruebas basadas en técnicas de ELISA o inmunoblot utilizan anticuerpos dirigidos contra epítomos de las regiones NS4 o de la región core del VHC. Estas pruebas de serotipado resultan técnicamente más sencillas y económicas en comparación con las técnicas de genotipado, pero son menos sensibles y específicas y no permiten la diferenciación entre subtipos del VHC (118).

Tabla 3. Diagnóstico de la infección por VHC.

| | |
|-------------------------------------|---|
| Diagnóstico de la infección por VHC | Pruebas serológicas. |
| | EIA |
| | RIBA |
| | Pruebas virológicas. |
| | Cualitativas: RT-CPR; TMA |
| | Cuantitativas: bDNA; PCR a tiempo real. |
| Determinación del genotipo VHC | Genotipado |
| | Serotipado |

1.6.4. Diagnóstico de la infección en fase aguda.

Para establecer el diagnóstico de hepatitis aguda por VHC, se realiza la determinación de Ac anti-VHC (detectables a las 6-12 semanas tras la exposición) mediante una técnica de ELISA para el diagnóstico de la exposición al virus y de ARN-VHC viral mediante una técnica cualitativa para confirmar la infección activa (111;119).

Ante la presencia de ARN-VHC en ausencia de anticuerpos anti-VHC hay muchas probabilidades de que se trate de una hepatitis aguda C y la seroconversión posterior es la

norma. Se puede dar la circunstancia contraria, es decir, que existan niveles de ARN indetectables y anticuerpos positivos. Ante esta situación debemos realizar otra determinación de ARN transcurridas de dos a tres semanas ya que sus niveles sufren oscilaciones y éstas son más frecuentes en la fase aguda de la infección. El hallazgo de anticuerpos específicos en ausencia de ARN-VHC es sugestivo de infección pasada y resuelta, aunque debemos repetir la determinación de ARN-VHC en los siguientes seis meses (111). Nos puede resultar de utilidad analizar estudios previos realizados al paciente, como los datos de laboratorio o pruebas de imagen para determinar si se trata de una hepatitis C aguda o crónica.

Por otra parte, la normalización de los niveles de transaminasas durante el seguimiento de la hepatitis aguda C a menudo se acompaña de la desaparición transitoria del ARN viral durante varias semanas. Para confirmar la resolución espontánea de la infección, se requiere demostrar la ausencia de ARN en varias determinaciones separadas por periodos de, al menos, 3 -6 meses.

1.6.5. Diagnóstico de la infección en fase crónica.

La hepatitis crónica C se caracteriza por la presencia de anticuerpos frente al VHC y niveles de ARN detectables en suero durante un periodo de más de 6 meses (1).

En ocasiones, en pacientes inmunodeprimidos o hemodializados, no se pueden detectar anticuerpos anti-VHC específicos, por lo que el único marcador que nos permite hacer el diagnóstico es el ARN del virus (120).

Normalmente, los niveles de ARN durante la infección crónica son poco estables, no guardando relación con la gravedad de la lesión hepática.

1.7. Evolución y factores determinantes de la progresión.

En numerosas ocasiones se ha intentado clasificar a los pacientes dependiendo de si presentan una progresión rápida, intermedia o lenta a cirrosis hepática, ya que se ha observado que la velocidad de progresión de la enfermedad varía mucho de un individuo a otro. Así, hay pacientes que evolucionan rápidamente a cirrosis, desarrollándola en periodos muy cortos de tiempo (inferior a 10 años), mientras que en otros la progresión es más lenta, pudiendo permanecer en estadios precirróticos durante 30 años o más. En la actualidad se sabe que un 33% de los enfermos desarrollarán cirrosis en menos de 20 años (actividad fibrótica rápida), y un 31% desarrollarán la misma lesión pasados 50 años o más (actividad fibrótica lenta) (121).

Debido a que el grado de fibrosis inicial es un determinante muy importante en la progresión de la enfermedad, se ha tratado de identificar una serie de factores que condicionan una mayor velocidad de desarrollo de ésta. Dichos factores se pueden dividir en aquellos relacionados con el huésped, aquellos dependientes del virus y factores externos.

1.7.1. Factores dependientes del huésped.

a. Edad. Desde los primeros trabajos publicados se observó que la edad en que se adquiere la infección es un factor determinante de la evolución de la fibrosis; a menor edad de adquisición menor probabilidad de progresión de la fibrosis (121;102). Posiblemente, este hecho podría ser consecuencia de las alteraciones inmunológicas y de la pérdida de resistencia de las células hepáticas con la edad.

b. Sexo. En los hombres, la enfermedad progresa más rápidamente que en las mujeres, posiblemente por el papel protector de los estrógenos en el desarrollo de la fibrosis (121;122;123).

c. Raza. Se ha demostrado que los enfermos afroamericanos tienen una evolución más rápida que los blancos.

d. Sustancias tóxicas. La influencia del *alcohol* en la progresión de la enfermedad hepática por VHC es indudable (121;124). Lo que todavía no está establecido es la cantidad de alcohol diaria que constituye un riesgo de progresión de la enfermedad. Se ha observado que ingestas superiores a 50 gramos al día (g/d) empeoran las lesiones hepáticas. Este hecho lo confirmó un estudio donde se evidenció que los pacientes infectados por el VHC que además consumían más de 40-60 gramos (g) de etanol al día durante un periodo igual o superior a 5 años, tenían un mayor grado de fibrosis en la biopsia hepática que aquellos que no consumían alcohol (99). Sin embargo, no está aclarada la influencia de consumos moderados y discontinuos de alcohol en la progresión de la fibrosis.

También se ha sugerido que *fumar* más de 15 cigarrillos al día y fumar cannabis supone un riesgo de progresión de la enfermedad a estadios más avanzados (125).

e. Estados de inmunosupresión. El 30% de los pacientes portadores del VIH están coinfectados por el VHC, ascendiendo este porcentaje a un 70% si solo analizamos a aquéllos que adquirieron el virus mediante el uso de drogas por vía parenteral. Debido a la alteración de la inmunidad en este colectivo, la hepatitis por VHC es más grave, duplicando la progresión a fibrosis e incrementando en 6 veces el riesgo de descompensación de la enfermedad (126). Este efecto se hace mucho más evidente en enfermos con menos de 200 linfocitos CD4+ por milímetro cúbico (mm^3), sobre todo si se adquiere la infección a una edad tardía y si se consume alcohol. Además, frecuentemente se asocian otros factores que empeoran aún más el pronóstico, como son el abuso de drogas, la hepatotoxicidad de los antirretrovirales y el propio VIH (126). Por otro lado, se ha observado que los pacientes que responden al tratamiento antirretroviral tienen una evolución superponible a los enfermos con hepatitis C mono infectados.

Visto lo anterior, es lógico pensar que la evolución de la infección por el VHC en los enfermos sometidos a *inmunosupresión terapéutica* es más agresiva.

f. Esteatosis hepática. Uno de los factores relacionados con la evolución de la hepatitis C es el acúmulo de grasa en el hígado. Un 30-70% de los pacientes con infección por este virus presentan esteatosis macrovacuolar, aunque este hallazgo podría ser debido a la existencia de otras causas concomitantes como son la obesidad o el consumo de alcohol. Hay suficiente evidencia científica para poder afirmar que el grado de esteatosis en la biopsia hepática se correlaciona directamente con el grado de fibrosis (127-129), aunque no se conoce con exactitud si esa asociación se debe a un efecto sinérgico entre el VHC y la esteatosis o a un efecto estimulador de la fibrosis que ejerce el depósito de grasa en el hígado. La esteatosis hepática se ha relacionado de una forma directa con el VHC en los casos infectados por genotipo 3, pero en los casos no infectados por este genotipo se relaciona con factores determinantes de la esteatohepatitis no alcohólica, como son el sobrepeso y la resistencia a la insulina.

g. Sobrecarga férrica. La sobrecarga férrica primaria o secundaria produce una influencia negativa en la lesión producida por el VHC, hecho lógico ya que se sabe la acumulación de hierro colabora al daño oxidativo.

h. Coinfección por VHA y por VHB. Los pacientes con hepatitis C que presentan sobreinfección por el virus de la hepatitis A (VHA) tienen un mayor riesgo de hepatitis fulminante y muerte (130). Por otro lado, la coinfección VHC-VHB se relaciona con un peor pronóstico de la hepatopatía y con un mayor riesgo de progresión a cirrosis hepática y a hepatocarcinoma (131). Este hecho se está revisado actualmente debido a que hay autores que aseguran que la coinfección por otros virus de la hepatitis normalmente condiciona una disminución de la replicación en uno o en ambos virus y, por lo tanto, una progresión más lenta a fibrosis hepática.

1.7.2. Factores dependientes del hígado.

a. *Transaminasas.* La elevación de las transaminasas es un parámetro indicativo de la actividad necroinflamatoria del hígado, sin embargo, no guarda una relación directa con el grado de lesión crónica hepática y está influida por otros factores como son la obesidad, la resistencia a la insulina y la esteatosis asociada, que no se relacionan directamente con la necrosis de las células hepáticas. No obstante, se ha evidenciado en estudios longitudinales que los niveles séricos de ALT tienen un valor predictivo de la progresión de la enfermedad (132), ya que los pacientes con ALT persistentemente normales presentan una progresión más lenta a estadios avanzados y fibrosis (98). Se estima que la probabilidad de progresión de la fibrosis en este grupo de pacientes es de 0,06 a 0,08 unidades de fibrosis por año según la escala METAVIR, habiéndose comunicado una fibrosis mayor de F2 en el 5-30% de todos los casos analizados y una prevalencia de cirrosis del 1 al 6% (37;133). Sin embargo, el tener cifras de ALT normales no asegura que no haya una cirrosis establecida, debido a que en este estadio la actividad inflamatoria es mínima.

Por otro lado, aquellos pacientes que sufren episodios repetidos de elevación de las transaminasas tienen un peor pronóstico.

1.7.3. Factores dependientes del virus.

a. *Genotipo viral.* Dentro de los factores dependientes del propio virus, se intenta definir la influencia que ejerce el genotipo viral en la progresión de la enfermedad. Algunos estudios han apuntado que los pacientes infectados por el genotipo 1 presentan una tendencia mayor a progresar a cirrosis hepática que los pacientes infectados por los genotipos 2 y 3 (134). Sin embargo, el grupo de paciente infectados por el genotipo 1 tiene características demográficas diferentes (son de mayor edad y afectados de hepatopatías más avanzadas) que aquellos infectados por genotipo no 1, por lo que su comparación podría

estar sesgada por factores de confusión (135). Con todo esto, actualmente se admite que el genotipo viral no ejerce ninguna influencia referente a la progresión de la enfermedad ya que no se ha demostrado que, de forma aislada, sea un factor pronóstico en la evolución de la hepatitis crónica C (121).

b. Replicación viral. En la mayoría de los estudios publicados no se ha demostrado que exista una relación entre la replicación viral y el grado de progresión de la enfermedad.

c. Capacidad mutágena del VHC. La gran capacidad mutágena y elevada variabilidad genética del VHC, le permiten escapar del sistema inmune, lo que explicaría la alta tasa de cronicidad de la enfermedad y la diferencia en la respuesta al tratamiento combinado (137).

Los factores que se ha demostrado que mejor se correlacionan con la progresión de la enfermedad son la edad del paciente, los niveles séricos de ALT y el grado de actividad y fibrosis hepática.

Tabla 4. Factores determinantes de la progresión de la enfermedad.

| | |
|--------------------------|---|
| Dependientes del huésped | Mayor edad al contagio |
| | Sexo masculino |
| | Raza (afroamericanos) |
| | Consumo sustancias tóxicas (alcohol, tabaco, cannabis) |
| | Estados de inmunosupresión |
| | Coinfección VIH-VHC /Coinfección VHB |
| | Esteatosis hepática |
| | Sobrecarga férrica |
| Dependientes del hígado | Aumento de transaminasas |
| | Genotipo viral (dudoso) |
| Dependientes del virus | Replicación viral (dudoso) |
| | Capacidad mutágena del VHC |

1.8. Manifestaciones extrahepáticas de la infección por el VHC.

La infección crónica por el VHC se ha asociado epidemiológicamente a diversas manifestaciones extrahepáticas.

Los mecanismos patogénicos involucrados en la mayoría de las manifestaciones son de índole linfoproliferativo, inmunológico y autoinmune, como son las reacciones autoinmunes motivadas por las similitudes entre las proteínas del huésped y los antígenos propios del virus, la formación y el depósito de inmunocomplejos y la expansión clonal de las células B linfoproliferativas (138-140).

Tabla 5a . Manifestaciones extrahepáticas del VHC con clara evidencia científica (I A).

| | |
|------------------------|---|
| | Manifestaciones reumatológicas asociadas a CM |
| Crioglobulinemia mixta | Vasculitis cutánea crioglobulinémica Glomerulonefritis crioglobulinémica |
| Autoanticuerpos | |

Tabla 5b. Manifestaciones extrahepáticas del VHC probables (III-IV C).

| | |
|----------------------|---|
| Hematológicas | Linfoma no-Hodgkin B |
| | Trombocitopenia idiopática |
| | Síndrome antifosfolípido |
| | Anemia hemolítica |
| | Gammapatía monoclonal |
| Endocrinas | Tiroiditis autoinmune |
| | Autoanticuerpos tiroideos |
| | Diabetes mellitus |
| Neurológicas | Síndrome de Guillain-Barré |
| | Leucoencefalopatía multifocal progresiva |
| Oculares y salivares | Sialoadenitis |
| | Úlcera corneal de Mooren |
| | Uveítis |
| Musculoesqueléticas | Gammapatía monoclonal |
| | Artralgias/artritis |
| | Artritis reumatoide |
| | Dermatopolimiositis |
| | Fibromialgia |
| | Síndrome de fatiga crónica |
| Dermatológicas | Porfiria cutánea tarda |
| | Eritema multiforme |
| | Liquen plano |
| | Eritema nodoso |
| | Malacoplaquia |
| | Urticaria /Prurito |
| Pulmonares | Fibrosis pulmonar idiopática |
| Renales | Glomerulonefritis |
| Miscelánea | Poliarteritis nodosa |
| | Lupus eritematoso sistémico, Síndrome CREST |

1.9. Fibrosis hepática.

En los pacientes con infección crónica por el VHC, conocer el estadio de la fibrosis hepática es fundamental para establecer el grado de progresión de la enfermedad, determinar el seguimiento necesario en cada caso, así como la necesidad y el momento idóneo para iniciar el tratamiento antiviral. Además de predecir la respuesta terapéutica, el estadio de fibrosis nos aporta una información decisiva para establecer el pronóstico de la enfermedad.

Cuantificar el tiempo que va a transcurrir hasta el desarrollo de una cirrosis hepática por métodos directos e indirectos, solo puede hacerse ante un caso individual y de forma aproximada. Hoy se sabe que la evolución de la fibrosis hepática es un proceso muy lento en la mayoría de estos pacientes, no siendo uniforme, ya que es de forma más pausada en los primeros años tras la infección, para acelerarse posteriormente de manera progresiva. Se estima, por los estudios realizados con series amplias, que la progresión global de la fibrosis es de 0,133 unidades/año (0,125-0,143), siendo el tiempo medio de evolución a cirrosis de 30 años a partir del inicio de la infección, aunque es de reseñar que existen importantes diferencias individuales. Se ha tratado de establecer la probabilidad de progresión de la enfermedad en razón al grado de fibrosis encontrado en la biopsia hepática basal. Hay evidencia para afirmar que el porcentaje de desarrollo de cirrosis es de un 15% a los 30 años en los casos en los que en la biopsia inicial no se detecta fibrosis, frente a un 51% a los 20 años cuando existe una fibrosis leve (estadio uno). Sin embargo la progresión a cirrosis no es uniforme y varía enormemente entre los pacientes. Poynard y cols describen tres patrones evolutivos: a) fibrosantes lentos son aquellos con un tiempo de progresión a cirrosis no menor a 50 años y representan aproximadamente el 31% de los pacientes; b) fibrosantes intermedios y c) fibrosantes rápidos (33% de los pacientes) con un tiempo de progresión menor de 20 años (121).

1.9.1. Fisiopatología de la fibrosis hepática: La matriz extracelular.

La fibrosis hepática es considerada en la actualidad un proceso de reparación tisular altamente complejo que aparece ante un daño hepatocelular mantenido y en el que intervienen, de manera activa, diversos tipos celulares y citocinas profibrogénicas. La respuesta al estímulo fibrogénico comprende la formación de un infiltrado inflamatorio, la activación, migración y proliferación de las CEH, la alteración de la MEC local y, por último, el depósito de una MEC densa.

19.1.1. Activación celular de las células estrelladas.

Tras la acción estimuladora paracrina de diferentes citocinas y quimiocinas fibrogénicas liberadas por las células de Kupffer, por el infiltrado inflamatorio, por las células endoteliales y por los hepatocitos, se producen cambios morfológicos y funcionales de las CEH (141). Estas células activadas migran y proliferan en los focos de necrosis hepatocelular donde depositan componentes de la matriz extracelular y participan en el reclutamiento de células inflamatorias (142). Todo esto condiciona que se produzcan cambios cualitativos en la MEC predominando el colágeno I sobre el III y el IV, (aunque estos últimos también se encuentren incrementados) (143), lo que conlleva la modificación de una matriz de baja densidad subendotelial a una fibrilar rica en colágeno, afectando al comportamiento de los hepatocitos, las células del endotelio vascular y las CEH.

El incremento de la capacidad contráctil de las CEH activadas, que parece ser proporcional al grado de la lesión hepática, produce un progresivo aumento de la resistencia al flujo de la sangre y finalmente el aumento de la presión portal del hígado cirrótico (141;144). Las células endoteliales y las CEH son los elementos más importantes en la regulación de la resistencia intrahepática.

1.9.1.2. Remodelación tisular y metaloproteinasas.

En el curso de las hepatopatías crónicas no solo se produce un incremento de la síntesis de colágeno, sino una marcada disminución de su degradación. Las principales enzimas encargadas de regular este proceso son las metaloproteinasas (MMPs), cuya actividad es modulada por otras enzimas denominadas inhibidores tisulares de las colagenasas o TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*). Las MMP-2 y MMP-9 son de especial importancia en la fibrogénesis hepática al hallarse involucradas en la degradación de la membrana basal de baja densidad del espacio de Disse (145).

Durante el proceso de fibrogénesis hepática existe un marcado incremento en la expresión de las TIMPs y por tanto una inhibición de la actividad de las MMPs. El principal tipo celular implicado en la síntesis de estas enzimas en el hígado fibrótico es el de las células estrelladas que, tras el proceso de activación celular, secretan grandes cantidades de TIMPs, impidiendo la degradación del colágeno secretado. Por el contrario, durante el proceso de regresión de la fibrosis que acontece una vez eliminada la noxa hepática, la actividad de las TIMPs disminuye y la expresión de las colagenasas aumenta marcadamente, favoreciendo la degradación del colágeno y aumentando los productos de degradación de éste como son el propéptido N-terminal del colágeno tipo III (PIIINP), el propéptido carboxiterminal del colágeno II y IV y la piridinolina o el telopéptido carboxiterminal del colágeno I.

Diversos estudios, tanto a nivel experimental como en muestras de pacientes con hepatitis crónica, han demostrado la existencia de una relación entre el aumento de la expresión y la activación de diferentes MMPs y la progresión de la fibrosis hepática en la hepatopatía crónica por el VHC (146). En las hepatopatías por VHC, el depósito de colágeno se produce en la zona periportal, donde existe una mayor necrosis hepatocitaria.

La fibrosis hepática ha sido considerada tradicionalmente un proceso pasivo e irreversible, concepto que está cambiando en los últimos años. Numerosas observaciones experimentales y clínicas indican que la fibrosis hepática es un proceso potencialmente reversible. Se desconoce, sin embargo, si la capacidad del hígado de eliminar el tejido fibroso es igual en todos los pacientes y de qué factores depende.

1.9.2. Hepatocarcinogénesis

Se han identificado gran variedad de factores de riesgo para desarrollar un CHC. Los más importantes son la infección crónica por el VHB y el VHC (comprenden más del 80% de los casos de CHC en el mundo), existiendo otros factores como son la exposición a la aflatoxina B1, el tabaquismo, el consumo de alcohol, enfermedades genéticas como la hemocromatosis, la porfiria cutánea tarda o el déficit de α 1-antitripsina.

La cirrosis hepática por sí misma, de cualquier etiología, es un factor de riesgo de desarrollar un CHC ya que al menos el 60-80% de los CHC se presentan sobre ella. El daño hepático crónico produce inflamación, muerte celular, regeneración celular y cirrosis, así como daño del ADN, displasia y finalmente transformación a CHC (147). Esta actividad necroinflamatoria en el hígado y el posible desarrollo de cirrosis, producen cambios a nivel genético con activación de protooncogenes e inactivación de genes supresores.

En la infección crónica por el VHC no se conocen bien los posibles mecanismos pro-oncogénicos, aunque es en estos pacientes donde, casi de forma invariable, el CHC se produce sobre una cirrosis establecida. Los efectos que se observan derivados de estos cambios genéticos son defectos en el control de proliferación celular y en la muerte celular programada (apoptosis), resistencia a quimioterápicos, defectos en la diferenciación celular (148) y adquisición de capacidades angiogénicas y metastásicas (149).

La generación de especies reactivas derivadas del estrés oxidativo causa mutaciones en distintos genes y altera la función de proteínas que intervienen en la regulación de la reparación del ADN, en el ciclo celular y en la apoptosis (149).

1.9.3. La biopsia hepática.

La primera biopsia hepática percutánea se realizó en 1923 y posteriormente la técnica fue modificada por Menghini en 1957. Desde entonces y durante los últimos 50 años, el empleo de este procedimiento se ha generalizado y ha permitido conocer mejor las bases anatomopatológicas de las enfermedades hepáticas.

1.9.3.1. Indicaciones de la biopsia hepática en la infección crónica por el VHC.

La biopsia hepática es el procedimiento más específico para evaluar la naturaleza y gravedad de las enfermedades hepáticas. Juega un papel importante en el diagnóstico y manejo de las hepatitis crónicas virales y sigue siendo el patrón oro para determinar el grado de inflamación y el estadio de fibrosis (150). Además proporciona información sobre el pronóstico y probabilidad de respuesta al tratamiento antiviral y nos permite determinar si existen otras causas concomitantes que puedan influir en la progresión de la enfermedad o en la respuesta al tratamiento, como son la sobrecarga férrica o la esteatosis hepática (151).

La indicación de la biopsia en los pacientes con infección crónica por el VHC está siendo revisada en la actualidad (150). Los pacientes infectados por los genotipos 2 y 3 presentan mayores tasas de curación con el tratamiento actual y la duración del mismo es considerablemente menor que en el resto de los genotipos (38), por lo que en estos pacientes no es necesario realizar una biopsia hepática de forma sistemática antes de comenzar el tratamiento. La confirmación de la mejoría histológica con la realización de

una biopsia al finalizar el tratamiento, independiente del genotipo tratado, tampoco es necesaria, ya que es bien conocido que los pacientes con respuesta viral sostenida presentan una mejoría de su lesión hepática en la mayoría de los casos.

Sin embargo, la realización de una biopsia en los pacientes con infección crónica por el VHC está justificada para poder determinar el grado de actividad, necrosis y fibrosis presente en el tejido hepático lo que, en ocasiones, condiciona la indicación del tratamiento combinado.

1.9.3.2. Sistemas de estadiaje.

Se han desarrollado numerosos sistemas de estadiaje para poder realizar una evaluación objetiva de las lesiones anatomopatológicas. Esto permite no solo comparar las lesiones en diferentes grupos de pacientes sino también apreciar la progresión de la enfermedad en un mismo individuo.

En 1981 Knodell y colaboradores publicaron su índice de actividad histológica (IAH) (152) y desde entonces se ha utilizado ampliamente. Posteriormente, se han desarrollados otros sistemas como son el de Scheuer (153), el de Ishak (154) y el METAVIR (155), que fue diseñado para valorar la lesión histológica de los pacientes con hepatitis crónica por el VHC. Utilizando estos sistemas, las diferentes biopsias se pueden comparar más rápidamente.

Cada sistema asigna una puntuación numérica a cada una de las tres principales alteraciones encontradas en la hepatitis crónica viral: inflamación de los tractos portales, necrosis y apoptosis del parénquima y fibrosis hepática.

1. *Puntuación HAI (Histology Activity Index) o Índice de Knodell (Tabla 9) (152)*. Está compuesto por cuatro números que se asignan por criterios individuales y forman una sola puntuación. El primer componente se clasifica de 0-10 y los tres restantes de 0-4. Las tres primeras puntuaciones (necrosis periportal /en puente, degeneración intralobular /necrosis focal, e inflamación portal) son indicativas del grado de inflamación que existe en el hígado. La clasificación de la inflamación, formada por la suma de estos tres componentes, puede ir de 0 a 18. Cero indica ausencia de inflamación; 1-4 significa inflamación mínima, 5-8 muestra una inflamación leve; 9-12 revela inflamación moderada; y 13-18 indica inflamación grave. El cuarto componente señala la cantidad de fibrosis en el hígado, y se clasifica de 0 a 4 (cirrosis). Para mayor capacidad discriminativa, ninguno de los ítems incluye el nivel 2.

2. *Puntuación HAI (Histology Activity Index) Modificada o Índice de Ishak (Tabla 10) (154)*. Amplía a 6 el número de estadios de fibrosis, graduando así las categorías dentro de la cirrosis.

3. *Sistema METAVIR (Tabla 11)* Esta clasificación indica un grado y un estadio. El grado informa sobre la actividad y el estadio indica la cantidad de fibrosis. Al grado se le asigna un número basado en la intensidad de las lesiones inflamatorias. En una escala de 0 a 3 ó 4 (según el anatomopatólogo). Cero indica ausencia de actividad y 3 ó 4 significa actividad intensa. Para clasificar la fibrosis, también se utiliza una escala de 0 a 4, donde 0 es ausencia de fibrosis y 4 es una cirrosis establecida (155).

Tabla 6. Puntuación HAI o Índice de Knodell

| Puntuación HAI o Índice de Knodell | | |
|---|--|----|
| I. Necrosis periportal +/- en puentes | | |
| A. | Ninguna | 0 |
| B. | Necrosis "piecemeal" leve | 1 |
| C. | Moderada necrosis "piecemeal" (afecta a <50% de la circunferencia de la mayoría de los tractos portales) | 3 |
| D. | Marcada necrosis "piecemeal" (afecta a >50% de la circunferencia de la mayoría de los tractos portales) | 4 |
| E. | Moderada necrosis "piecemeal" más necrosis en puentes | 5 |
| F. | Marcada necrosis "piecemeal" más necrosis en puentes | 6 |
| G. | Necrosis multilobular | 10 |
| II. Degeneración intralobular y necrosis focal. | | |
| A. | Ninguna | 0 |
| B. | Leve (cuerpos acidófilos, degeneración en balón y/o focos de necrosis hepatocelular en <1/3 de lóbulos) | 1 |
| C. | Moderada (afectación de 1/3 a 2/3) | 3 |
| D. | Marcada (afectación de >2/3) | 4 |
| III. Inflamación Portal | | |
| A. | Sin inflamación | 0 |
| B. | Leve (células inflamatorias en <1/3 de tractos portales) | 1 |
| C. | Moderada (1/3-2/3) | 3 |
| D. | Marcada (>2/3) | 4 |
| IV. Fibrosis | | |
| A | Sin fibrosis | 0 |
| B | Expansión de fibrosis portal | 1 |
| C | Fibrosis en puentes (porto-portales o porto-centrales) | 3 |
| D | Cirrosis | 4 |

Tabla 7. Puntuación HAI Modificada o Índice de Ishak.

| Puntuación HAI Modificada o Índice de Ishak. | |
|---|---|
| Gradación de la puntuación necroinflamatoria (Puntuación máxima posible 18) | |
| A.- Hepatitis de interfase periportal o periseptal (“piecemeal” necrosis) | |
| Ausente | 0 |
| Leve (focal, pocas áreas portales) | 1 |
| Leve-moderada (focal, la mayoría de áreas portales) | 2 |
| Moderada (<50% de tractos o septos) | 3 |
| Grave (>50% de tractos o septos) | 4 |
| B.- Necrosis confluyente | |
| Ausente | 0 |
| Necrosis focal confluyente | 1 |
| Necrosis de la zona 3 en algunas áreas | 2 |
| Necrosis de la zona 3 en la mayoría de las áreas | 3 |
| Necrosis de la zona 3 y ocasionales puentes portal-central | 4 |
| Necrosis de la zona 3 y múltiples puentes portal-central | 5 |
| Necrosis panacinar o multiacinar | 6 |
| C.- Necrosis lítica focal, apoptosis e inflamación local | |
| Ausente | 0 |
| Un foco o menos por objetivo | 1 |
| Dos a cuatro focos por objetivo | 2 |
| Cinco a 10 focos por objetivo | 3 |
| Más de 10 focos por objetivo | 4 |
| D.- Inflamación Portal | |
| Ninguna | 0 |
| Leve (alguna o todas las áreas portales) | 1 |
| Moderada (alguna o todas las áreas portales) | 2 |
| Moderada/Marcada (todas las áreas portales) | 3 |
| Marcada (todas las áreas portales) | 4 |

Tabla 7. Puntuación HAI Modificada o Índice de Ishak. (continuación)

| Gradación de los cambios arquitecturales, fibrosis y cirrosis (Máxima puntuación posible 6) | |
|---|---|
| Sin fibrosis | 0 |
| Extensión de la fibrosis a algunas áreas portales, con o sin septos fibrosos cortos | 1 |
| Extensión de la fibrosis a la mayoría de las áreas portales, con o sin septos fibrosos cortos | 2 |
| Extensión de la fibrosis a la mayoría de las áreas portales, con ocasionales puentes porto-portales | 3 |
| Extensión de la fibrosis a las áreas portales, con puentes porto-portales y portocentrales | 4 |
| Marcada formación de puentes porto-portales y porto-centrales con ocasionales nódulos (cirrosis incompleta) | 5 |
| Cirrosis probable o definida | 6 |

Tabla 8. Sistema METAVIR.

| Sistema METAVIR | | |
|------------------------|---|-------------------------------------|
| Piecemeal? necrosis | Necrosis lobular | Puntuación de actividad histológica |
| 0 (ninguna) | 0 (ninguna o leve) | 0 (ninguna) |
| 0 | 1 (moderada) | 1 (leve) |
| 0 | 2 (grave) | 2 (moderada) |
| 1 (leve) | 0 | 1 |
| 1 | 2 | 2 |
| 2 (moderada) | 0,1 | 2 |
| 3 (grave) | 0,1,2 | 3 |
| Puntuación de fibrosis | | |
| 0 | Sin fibrosis | |
| 1 | Tractos portales aumentados en forma estrellada, pero sin formación de septos | |
| 2 | Aumento de los tractos portales con rara formación de septos | |
| 3 | Septos numerosos sin cirrosis | |
| 4 | Cirrosis | |

1.9.3.3. Limitaciones de la biopsia hepática.

La biopsia hepática sigue siendo el patrón oro en el estadiaje de la fibrosis hepática, sin embargo, esta técnica presenta varias limitaciones (158;159) entre las que destacan:

- a. *Una probabilidad elevada de error de la muestra.*
- b. *Un tamaño relativamente pequeño.* La muestra no es significativa de todo el tejido hepático y por lo tanto conlleva una disminución de la sensibilidad para el diagnóstico de fibrosis avanzada, siendo difícil de interpretar ya que el tejido que se obtiene solo representa la 1/50.000 parte de la masa total hepática.
- c. *La existencia de morbimortalidad y un elevado coste económico,* ya que precisa ingreso hospitalario.
- d. *Proporciona un resultado estático,* cuando la fibrosis es un proceso claramente dinámico.
- e. La interpretación de la biopsia hepática está sujeta a *variabilidad inter e intraobservador* (176).
- f. Es un *procedimiento cruento,* no exento de *complicaciones* aunque se realice de forma protocolaria y cuidadosa (159).
- h. *Presenta una baja aceptación por parte de los pacientes.*

1.9.3.4. Complicaciones de la biopsia hepática.

Las complicaciones se pueden dividir en *complicaciones menores* (que son las más frecuentes) como son las molestias localizadas y transitorias en el sitio de la punción, dolor que requiere analgesia en el 30% de los casos (20% moderado, y dolor intenso que requiere opiáceos o analgésicos intravenosos en el 3%) o hipotensión transitoria por reacción vasovagal en el 2%; y *complicaciones mayores* que son infrecuentes y se reducen de forma importante al realizar la biopsia con control ecográfico. Se ha descrito hemoperitoneo, neumotórax, peritonitis biliar, punción de víscera hueca (0,57%), hematomas intrahepáticos o subcapsulares, hemobilia, bacteriemias, sepsis y shock.

El 60% de las complicaciones ocurren dentro de las 2 primeras horas tras el procedimiento y el 96% dentro de las primeras 24 horas, llegando a requerir ingreso hospitalario hasta un 2-4% de los pacientes que sufren dichas complicaciones. Aunque la mortalidad está disminuyendo, no es despreciable, puesto que tiene lugar en 1 de 10.000 a 12.000 procedimientos (150).

1.9.4. Métodos incruentos de valoración de la fibrosis hepática.

Debido a las numerosas limitaciones de la biopsia hepática se han desarrollado una serie de procedimientos no invasivos para la determinación de los diferentes estadios de fibrosis.

Las ventajas de estos métodos no invasivos frente a la biopsia son que son mejor tolerados por los pacientes, son menos costosos y más fáciles para los clínicos ya que pueden repetirse de forma periódica.

Estos procedimientos se dividen principalmente en dos categorías: aquéllos que utilizan la determinación sérica de distintos marcadores biológicos (100) y aquellos basados en métodos de imagen (160).

19.4.1. Pruebas basadas en la determinación sérica de marcadores biológicos.

Los biomarcadores séricos tratan de establecer cuál es el estado de fibrosis y de actividad inflamatoria equivalente a la información proporcionada por la biopsia hepática. Dicho marcador, idealmente, debe ser específico del hígado, ser fácil de realizar, ser reproducible, ser barato, estar mínimamente influido por alteraciones en la excreción urinaria y biliar, debe reflejar la fibrosis en todos los tipos de enfermedad hepática crónica, debe presentar una buena correlación con el contenido de la matriz extracelular y ser lo suficientemente sensibles para discriminar entre los diferentes estadios de fibrosis desde hepatitis crónica a cirrosis (141).

Actualmente se utilizan dos tipos de marcadores séricos de fibrosis hepática:

- ✓ *Marcadores indirectos.* Muestran alteraciones de la función hepática pero no reflejan directamente el metabolismo de la matriz extracelular. En la mayoría de las ocasiones utilizan determinaciones que se realizan de forma sistemática en la práctica clínica como el recuento de plaquetas, estudios de coagulación y la determinación de marcadores hepáticos (Tabla 11).
- ✓ *Marcadores directos.* Reflejan cambios cualitativos y cuantitativos en las macromoléculas de la MEC, algunos de los cuales reflejan síntesis y degradación de colágeno (Tabla 12) (161-165).

Tabla 9. Marcadores serológicos indirectos de fibrosis hepática.

| Clasificación | Nombre del marcador |
|------------------------------------|-------------------------|
| Determinaciones clínicas de rutina | Proporción AST/ALT |
| | Recuento plaquetario |
| | GGT |
| | Índice de protrombina |
| | Bilirrubina total |
| | Albúmina |
| | Proteínas de fase aguda |
| Alfa-2- macroglobulina | |
| Haptoglobina | |
| Apolipoproteína | |

Tabla 10. Marcadores serológicos directos de fibrosis hepática.

| Clasificación | Marcador | Observaciones |
|-------------------------------|-------------------|---|
| Componente de la MEC | Ácido hialurónico | Glucosaminglicano |
| | PIINP | Propéptido del colágeno |
| | Procolágeno I | Propéptido del colágeno |
| | Colágeno IV | |
| | Laminina | Glucoproteína |
| Enzimas reguladoras de la MEC | YKL-40 | Quitinasa |
| | MMP | Enzima de degradación |
| | TIMPs | Inhibidores de los enzimas de degradación de la MEC |

1.9.5.1.1. Marcadores séricos indirectos de la fibrosis hepática.

Entre los marcadores séricos indirectos de fibrosis más usados se encuentran:

El *Cociente AST/ALT (166)*. Logra diferenciar a los pacientes cirróticos de los que no lo son con una especificidad (E) del 96% pero con una sensibilidad (S) del 47% [valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) del 74 y del 88% respectivamente].

El *Índice de Forns (167)*. Es un modelo matemático simple basado en un análisis multivariable de diversos parámetros (edad, niveles séricos de colesterol total, GGT y recuento de plaquetas) que predice de forma precisa la ausencia de fibrosis significativa.

El *APRI (AST to Platelet Ratio Index) (168)* hace referencia al cociente entre los niveles de AST y de plaquetas.

El *Fibrotest* se basa en una fórmula matemática que se calcula combinando 5 marcadores bioquímicos indirectos de fibrosis [alfa 2 macroglobulina (A2MG), alfa 2 globulina (o haptoglobina), apolipoproteína A1, GGT, y bilirrubina total] ajustados a la edad y el sexo (169).

El HGM1 y el HGM2 son dos simples índices de diagnóstico de la fibrosis hepática basados en datos de laboratorio que se realizan de rutina. El HGM-1 incluye el análisis del recuento plaquetario, cifras de AST y glucosa sérica en ayunas y el HGM-2 se basa en el recuento plaquetario, cociente internacional normalizado (INR), fosfatasa alcalina (FA) y AST (170). Ladero y colaboradores determinaron que los valores de ferritina sérica y el colesterol están relacionados de forma independiente con el grado de fibrosis hepática y su inclusión en algunos tests como el APRI o el King's score mejoran tanto la sensibilidad como la especificidad de estos últimos (171).

Tabla 11. Principales marcadores biológicos de fibrosis hepática y grado de correlación con diagnóstico histológico de Metavir F3-F4.

| Marcador | Parámetros | Correlación |
|---------------|--|-----------------|
| AST/ALT | AST, ATL | |
| Fibro Test | Edad, sexo, alfa2 macroglobulina, apolipoproteína A1, haptoglobina, bilirrubina, GGT | 0.73-0.87 |
| Forns | Edad, GGT, colesterol, plaquetas | 0.81-0.86 |
| ELF | Edad, AH, procolágeno III, TIMP-1 | 0.81 |
| APRI | AST, plaquetas | 0.78-0.88 |
| SHASTA | AH, ALT, albúmina | 0.88 |
| FIB-4 | Edad, plaquetas, AST, ALT | 0.74 |
| Fibrospect | Plaquetas, colesterol, GGT, alfa 2 macroglobulina | 0.83 |
| Fibro Meter | Edad, urea, plaquetas, protrombina, AST, alfa 2 macroglobulina, AH | |
| HGM1 | Recuento plaquetario, cifras de AST, y glucosa sérica en ayunas | |
| HGM2 | Recuento plaquetario, INR, fosfatasa alcalina (FA), y AST | |
| JHI | AST, plaquetas, albúmina, consumo alcohol | 0.79 |
| King's score | Edad x AST xINR/plaquetas | |
| Ladero y cols | Ferritina sérica y colesterol (+ APRI o el King's score) | |
| Hepascore | Edad, sexo, alfa 2 macroglobulina, AH, bilirrubina, GGT | 0.85>F2;0.94:F4 |

19.5.1.2. Marcadores séricos directos de fibrosis hepática.

En el proceso de fibrogénesis hepática se detectan cambios tanto cualitativos como cuantitativos en diversos componentes de la matriz extracelular. Entre los potenciales biomarcadores se encuentran los productos de la síntesis o degradación del colágeno, enzimas involucradas en la síntesis o degradación de la MEC, así como glicoproteínas, proteoglicanos y citocinas profibrogénicas. Los valores de dichas sustancias están aumentados en el tejido hepático con fibrogénesis activa. En casos de fibrosis moderada-grave, sus concentraciones aumentan también en sangre periférica, por lo que pueden utilizarse para diagnosticar de una manera sencilla la fibrosis hepática. Sin embargo, en los pacientes con una fibrosis hepática leve es posible que estas sustancias solo estén aumentadas en el hígado o su concentración en plasma sea muy baja, por lo que estos marcadores son particularmente útiles en pacientes con fibrosis avanzada (F3-F4), en los que la actividad fibrogénica suele ser mayor.

Tabla 12. Marcadores de fibrogénesis utilizados para estimar el grado de fibrosis hepática.

| Fisiopatología | Marcadores séricos |
|--|---|
| Aumento de expresión citocinas fibrogénicas | TGFβ1 FGF PDGF |
| Aumento de la síntesis de MEC | Colágeno I, IV y VI AH Laminina y Elastina Udulina YKL-40 |
| Aumento de las enzimas implicadas en el turnover de colágeno | TIMP-1 MMP2 PZ peptidasa Lisil oxidasa Prolil hidroxilasa |
| Aumento de productos de degradación del colágeno | PIINP Propéptidos colágenos III y IV |

Tabla 13. Ventajas e inconvenientes de los marcadores biológicos de fibrosis hepática.

| Ventajas | Inconvenientes |
|----------------------------|---|
| No invasivos | Sólo validos para fibrosis avanzada(F3-F4) |
| Sin error por observador | Validados en hepatiits C |
| Sin error de muestreo | Afectados por factores de confusión (VIH, fármacos) |
| Sin errores técnicos | Algunos parámetros de uso no habitual |
| Reproducibles | No adecuados para diferenciar el estadio de fibrosis F0 de F1 |
| Útiles para el seguimiento | |
| Bajo coste | |
| Estadaje objetivo | |

1.9.5.2. Métodos de imagen (Basados en métodos instrumentales).

Otras de las aproximaciones racionales para estimar el grado de fibrosis hepática es mediante la utilización de técnicas de imagen. La ultrasonografía, la tomografía computerizada (TC) o la resonancia magnética (RM) son capaces de detectar cambios en el parénquima hepático cuando hay una fibrosis significativa.

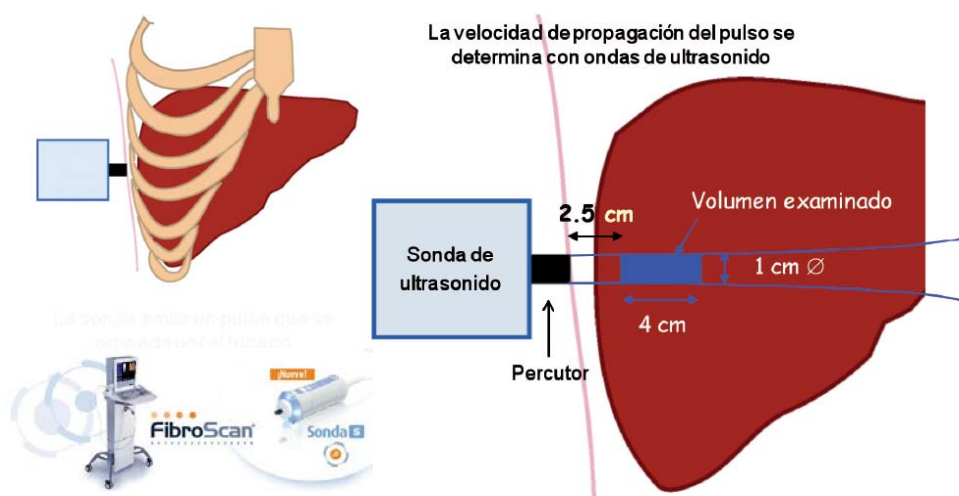
19.5.2.1. Elastografía transitoria (Fibroscan®).

La elastografía transitoria (ET) o Fibroscan se ha empezado a utilizar en hospitales de tercer nivel debido a que es un método sencillo, inocuo, rápido, reproducible y objetivo (101;172).

Este método se basa en la estrecha correlación entre la rigidez y la fibrosis hepática y utiliza una sonda que emite y recibe ondas de ultrasonidos. El transductor de ultrasonidos genera una vibración de baja frecuencia y amplitud que provoca una onda elástica de propagación a través de los tejidos siendo la velocidad de transmisión de estos ultrasonidos distinta según la densidad y la elasticidad, de manera que cuanto mayor es la velocidad, menor la

elasticidad y mayor la rigidez del hígado (fibrosis), cualidad opuesta a la elasticidad (173). Estima el grado de fibrosis hepática basándose en la rigidez hepática (RH) (101;172). Esta técnica mejora su rendimiento si se combina con los índices serológicos de fibrosis (174). Castera y cols (108), han señalado que, cuando el resultado del FibroTest se combina con el de la elastometría transitoria y los resultados son coincidentes, lo que sucede en un 70-80% de los pacientes, éstos concuerdan a su vez con los proporcionado por la biopsia en un 84% de los pacientes en estadio F2, un 95% de los F3 y el 94% de los F4. Combinando estos dos métodos, la realización de la biopsia hepática se podría haber evitado en el 77% de los pacientes con fibrosis clínicamente significativa.

Ilustración 6. Elastografía transitoria (Fibroscan®).



Varios estudios han demostrado que la determinación del grado de la RH por medio de ET (medida en kilopascales, KPa), se correlaciona con el estadio de fibrosis hepática en pacientes con hepatitis crónica por el VHC (175;176).

La ET ofrece *ventajas* frente a la biopsia hepática como que es más representativa del tejido hepático, porque explora un volumen 100 veces mayor que la biopsia. Es una técnica no invasiva, y, por consiguiente, es bien tolerada y apropiada para determinaciones secuenciales. Aunque tiene *limitaciones* como su escasa capacidad para discriminar entre

fibrosis hepática leve (F1) y moderada-avanzada (F2- F3), así como la obesidad (175;177), la falta de experiencia del examinador; la edad del paciente (175;177) y la presencia de ascitis o derrame pleural, entre otros (175;177). Por otro lado, la ET no facilita datos sobre la inflamación hepática o la necrosis.

Tabla 14. Utilidad clínica de la ET para la estimación de la fibrosis hepática (ventajas e inconvenientes).

| Ventajas | Inconvenientes |
|---|--|
| No invasiva | No validado para la fibrosis intermedia (F2) |
| Sencilla | Interferencia de la inflamación y esteatosis hepática |
| Escasa variación interindividual (2%) | Interferencia de granulomas, calcificaciones o hemangiomas |
| Heterogeneidad de la fibrosis | |
| Control interno | Limitaciones en niños y pacientes obesos |
| Validado en diversos tipos de hepatopatía crónica | |
| Estadaje objetivo | |

1.9.5.2.2. Software específico de Resonancia magnética nuclear (RMN).

La RMN ha sido evaluada para la detección de fibrosis hepática. Resultados preliminares han mostrado una buena precisión (109) así como una buena correlación con el grado de disfunción hepática en un pequeño número de pacientes con cirrosis (179). Sin embargo es una técnica en la que no se han definido los puntos de corte, por lo que no es útil actualmente en la práctica diaria.

1.9.5.2.3. Software específico de TC (Fibro-TC).

Los datos preliminares indican que esta técnica podría ser eficaz para determinar tanto el estadio como la distribución de la fibrosis hepática en pacientes con hepatitis crónica por VHC. La correlación entre la fibrosis hepática y las mediciones de Fibro-TAC es mayor en los pacientes que presentan una distribución homogénea de la fibrosis hepática (180).

Capítulo 2. Hepatitis C y genética: polimorfismos del *gen IL28B*.

El proyecto Genoma Humano, iniciado en 1990, ha conseguido identificar aproximadamente 20000-25000 genes, logrando un mapa genético prácticamente completo en 2001. Posteriormente, surgió el proyecto HapMap con el objetivo fundamental de examinar el genoma en relación con los distintos fenotipos (181).

2.1. Genética. Polimorfismos del *gen IL28B*.

2.1.1. Conceptos básicos en genética.

A continuación se explican algunos conceptos básicos en genética necesarios para comprender los estudios que se citan a continuación:

- ✓ ***Polimorfismo***. Es la variante genética derivada de las distintas mutaciones en el ADN.
- ✓ ***Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP; single nucleotide polymorphism)***. Es la sustitución de una base por otra en un lugar específico del genoma que, por definición, se encuentra en más del 1 % de la población (182). Es la forma más común de variación genética, con más de nueve millones identificados en las bases de datos públicas (183). Los SNPs ocurren aproximadamente cada 300 nucleótidos.
- ✓ ***Locus***. Posición fija en un cromosoma. Dos *loci* se encuentran ligados genéticamente si se heredan juntos de forma más frecuente que por azar, lo que

implica que se sitúen cerca en el mismo cromosoma. La distancia genética entre *loci* está determinada por la frecuencia con que se producen recombinaciones meióticas.

- ✓ **Alelo.** Cada una de las formas de un gen. Los diferentes alelos producen variaciones en las características hereditarias.
- ✓ **Haplotipos.** Son las combinaciones de alelos para *loci* ligados o para un mismo *locus* en una población determinada.
- ✓ **Desequilibrio de ligamiento (*linkage disequilibrium*).** Propiedad de algunos genes de no segregarse de forma independiente ya que poseen una frecuencia de recombinación menor del 50% debido a que los 2 *loci* implicados se encuentran en el mismo cromosoma, lo que imposibilita su transferencia de manera aleatoria.
- ✓ **Epistasis.** Es la interacción génica entre diferentes genes para una determinada característica. Sucede cuando la acción de un gen se ve modificada por la acción de uno o varios genes.

2.1.2. Estudios de amplitud genómica y características de los SNPs.

Los *SNPs* forman hasta el 90% de todas las variaciones genómicas humanas, pudiéndose encontrar en regiones codificantes (con poder de alterar la estructura de la proteína) o en regiones no codificantes (181). Algunos estudios epidemiológicos han demostrado que diversos polimorfismos funcionales están implicados en la susceptibilidad individual a padecer enfermedades autoinmunes, degenerativas o neoplásicas. Además, los polimorfismos genéticos pueden explicar las variaciones individuales en la progresión de diversas enfermedades o la diferente respuesta a los tratamientos aplicados.

Todo esto hace que los SNPs habitualmente se utilicen como marcadores genéticos de enfermedad (184). En los últimos años se ha descrito aproximadamente un millón y medio

de polimorfismos genéticos que pueden encontrarse en una base de datos accesible vía Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).

Los *estudios de amplitud genómica* buscan establecer la relación estadística entre variables genéticas poblacionales y un fenotipo determinado. No parten de una hipótesis previa y requieren la comparación entre casos y controles. Si existe una diferencia significativa en la prevalencia de un SNP al comparar los casos con los controles, se asume que hay un factor de riesgo genético en esa región cromosómica. La *técnica de amplitud genómica (GWA, wide genome association)* está siendo utilizada para la realización del cribado del genoma completo con el fin de establecer posibles sitios de asociación.

2.1.3. Polimorfismos del gen *IL28B*.

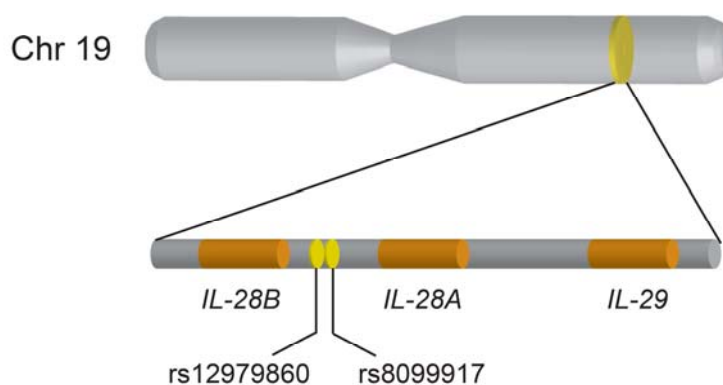


Ilustración 7. Representación del cromosoma 19 y localización de las distintas mutaciones del gen *IL28B*.

Con la suposición de que ciertos polimorfismos del gen *IL28B* podrían modular la respuesta endógena de los genes estimulados por IFN, se han llevado a cabo numerosos estudios de de amplitud genómica (GWAS) que han confirmado que algunos polimorfismos localizados en el cromosoma 19 (19q13), en la región del gen de la interleucina 28B están directamente relacionados con el aclaramiento del virus, tanto de forma espontánea como después del tratamiento combinado. Siguiendo esta hipótesis, se

han identificado varios sitios de asociación, siendo mayor para el rs12979860 y el rs8099917, que se encuentran en desequilibrio de ligamiento y se localizan a 3 kb y a 7,5 kb, respectivamente, del codón de inicio del gen *IL28B* (185).

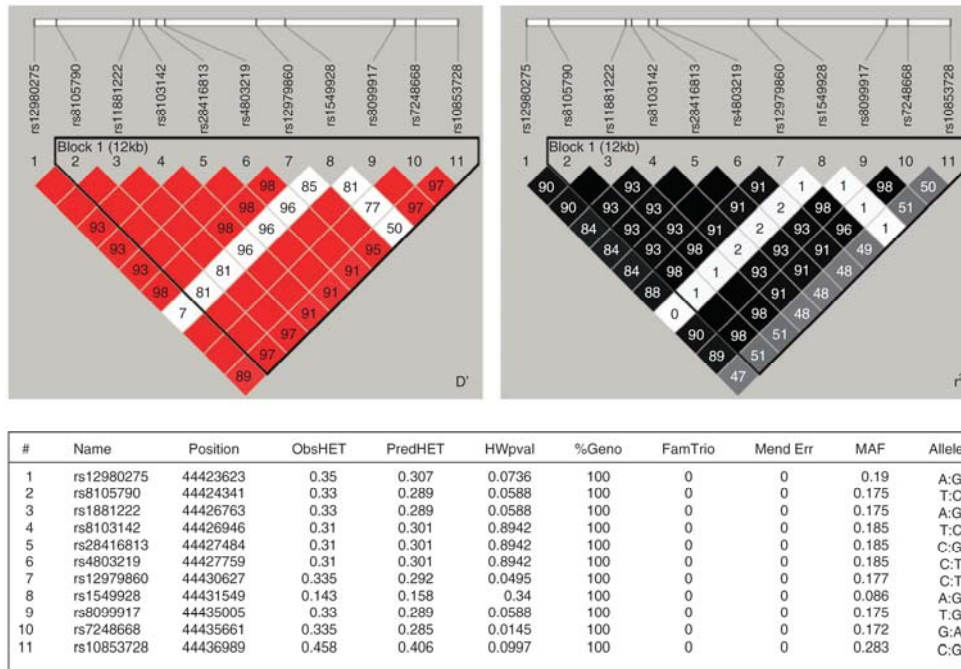


Ilustración 8. Desequilibrio de ligamiento en pares (D' y R^2) diagramas para la región de 13,4 kb (cromosoma 19) incluyendo *IL-28B* con un total de 255 pacientes japoneses con hepatitis C tratados con interferón pegilado más ribavirina. (186)

2.1.3.1. Resumen funcional de la *IL28B*.

Los genes *IL28*, que se encuentran en el cromosoma 19, codifican una potente citocina que presenta dos isoformas con un 96% de homología: la *IL28A* y la *IL28B*. Tanto la *IL28A* como la *IL28B* pertenecen a la familia de tipo III de interferón o IFN- λ (187). Dicha familia está formada por el IFN- λ 1, IFN- λ 2 e IFN- λ 3 (codificados respectivamente por los genes *IL29*, *IL28A* e *IL28B*). Su clasificación como interferones se debe a su capacidad de inducir un estado antiviral, mientras que su clasificación adicional como interleucina se debe a su localización cromosómica, así como por el hecho de que son codificadas por exones múltiples, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría IFNs de tipo I. Los IFNs son poderosas citocinas endógenas que actúan induciendo una respuesta antiviral intracelular e

inhibiendo de forma eficaz la replicación del VHC *in vitro*, siendo capaces de activar diversas vías de señalización que controlan la replicación viral intracelular como la representada por los genes estimulados por interferón (*interferon stimulated genes o ISG*), las proteínas Mx o la 2'-5'-oligoadenilato sintetasa (2-5 OAS) (188; 189). Se ha demostrado que la expresión de los ISG está aumentada de forma significativa en tejido hepático de individuos que son portadores de un genotipo rs12979860 desfavorable (CT/TT) versus favorable (CC) (190). Por otro lado existe mayor prevalencia del genotipo CC del SNP rs12979860 en individuos sanos en comparación con aquellos con hepatitis crónica C (5). La enzima 2'-5' oligoadenilato sintetasa juega un papel antiviral clave en el aclaramiento viral por su actividad catalítica (191), ya que posee actividad frente a ARN de cadena simple (192).

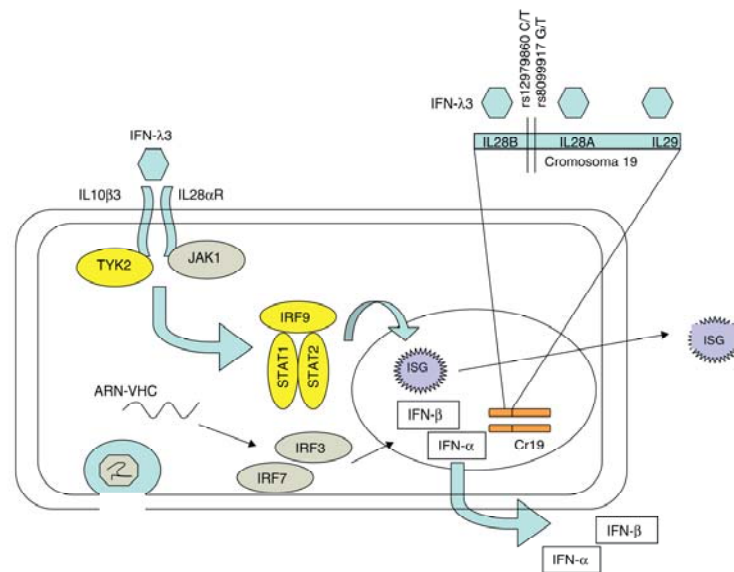


Ilustración 9: Mecanismo de acción del IFN-λ. La unión de IFN-α/IFN-β e IFN-γ a sus receptores lleva a la formación de factor génico 3 estimulado por IFN (ISGF3), que induce la formación de heterodímeros entre STAT1, STAT2 y p48. Estos complejos producen una regulación transcripcional de los miembros de la familia 2-5 OAS, de la proteína cinasa dependiente de dsARN (PKR) y de la proteína MxA entre otras (188;189).

2.2. Estudios genéticos en relación con la hepatitis crónica C.

La selección de los genes para el estudio de la infección crónica por el VHC se basa principalmente en el conocimiento sobre el ciclo de vida del virus o de los genes que intervienen en el funcionamiento del sistema inmunológico como el sistema HLA y las citocinas relacionadas con la inmunidad natural y adquirida entre las que se encuentran el IFN, el factor de crecimiento $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) o las interleucinas (IL). Numerosos polimorfismos en genes de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento se han relacionado con la replicación, la respuesta al tratamiento combinado, la persistencia de la infección y la gravedad de la enfermedad inducida por la infección crónica por el VHC (193; 194).

Actualmente existen distintas líneas de investigación para intentar esclarecer algunos aspectos de la infección por el VHC, que son las siguientes:

- ✓ **Genética y resolución espontánea del VHC.** La resolución de la hepatitis aguda C ocurre sólo en un 14% y 46% de los pacientes que se infectan, siendo una mayoría los que cronifican la infección. Es importante conocer los factores implicados en la resolución espontánea de la infección por el VHC.
- ✓ **Genética y respuesta al tratamiento del VHC.** Después del tratamiento combinado, la RVS no se alcanza en la totalidad de los pacientes tratados. Se han determinado una serie de factores basales predictores de respuesta pero sabemos que existen muchos otros que no han sido todavía identificados.
- ✓ **Genética y curso de la enfermedad.** Se ha realizando algún estudio sobre factores genéticos del huésped para establecer si determinados polimorfismos específicos están asociados con la progresión de la hepatitis C, aunque son pocos y sin resultados categóricos.

2.2.1. Polimorfismos del gen *IL28B* y resolución espontánea del VHC.

Distintos SNPs del gen *IL28B* se han asociado con la eliminación espontánea del VHC. El rs12979860 CC del gen *IL28B* es más frecuente en los pacientes que presentan un aclaramiento espontáneo del VHC en la fase aguda que en aquellos que cronifican la infección (7;5), siendo los pacientes portadores del alelo mutado (T) y sin ictericia durante la fase aguda los que menor tasa de aclaramiento espontáneo presentan (6). Así mismo, se ha confirmado que la prevalencia del genotipo CC en rs12979860 en pacientes con aclaramiento espontáneo del VHC es aproximadamente dos veces mayor que en los portadores crónicos del virus de la hepatitis C (195).

De manera similar, en el estudio realizado por Montes-Cano y colaboradores (195), existía una mayor representación del genotipo rs12979860 CC tanto en pacientes con resolución espontánea de la infección (72%) como en pacientes con respuesta viral al tratamiento (60%). Es de reseñar que el 44% de la muestra de los pacientes control sin infección viral presentaban el genotipo rs12979860 CC.

Se ha demostrado que los pacientes de raza blanca tienen 5 veces más probabilidades de aclarar espontáneamente la infección aguda por VHC que los pacientes afroamericanos (196). Esto hecho se podría explicar por la diferente distribución de los SNPs en los distintos grupos étnicos. La genotipificación del SNP rs12979860 realizada en 2371 sujetos de 51 poblaciones distintas demuestra que la población del Este Asiático presenta la mayor prevalencia de alelos asociados al aclaramiento del virus, mientras que los individuos de origen africano-subsahariano tienen la menor prevalencia del alelo favorable. La población europea presenta una prevalencia intermedia (5; 196).

El SNP en rs8099917 (G/T) también ha sido estudiado en cohortes de pacientes con infección aguda por VHC en relación con el aclaramiento viral (6; 195). Los pacientes con aclaramiento espontáneo (con o sin VIH asociado) presentan con mayor frecuencia el alelo T (mayoritario) de este polimorfismo (197).

Ningún otro SNP distinto de aquellos en la región de la IL28/A se ha asociado con un mayor aclaramiento del virus de la hepatitis C según un estudio de GWAS realizado por Rauch y colaboradores (197).

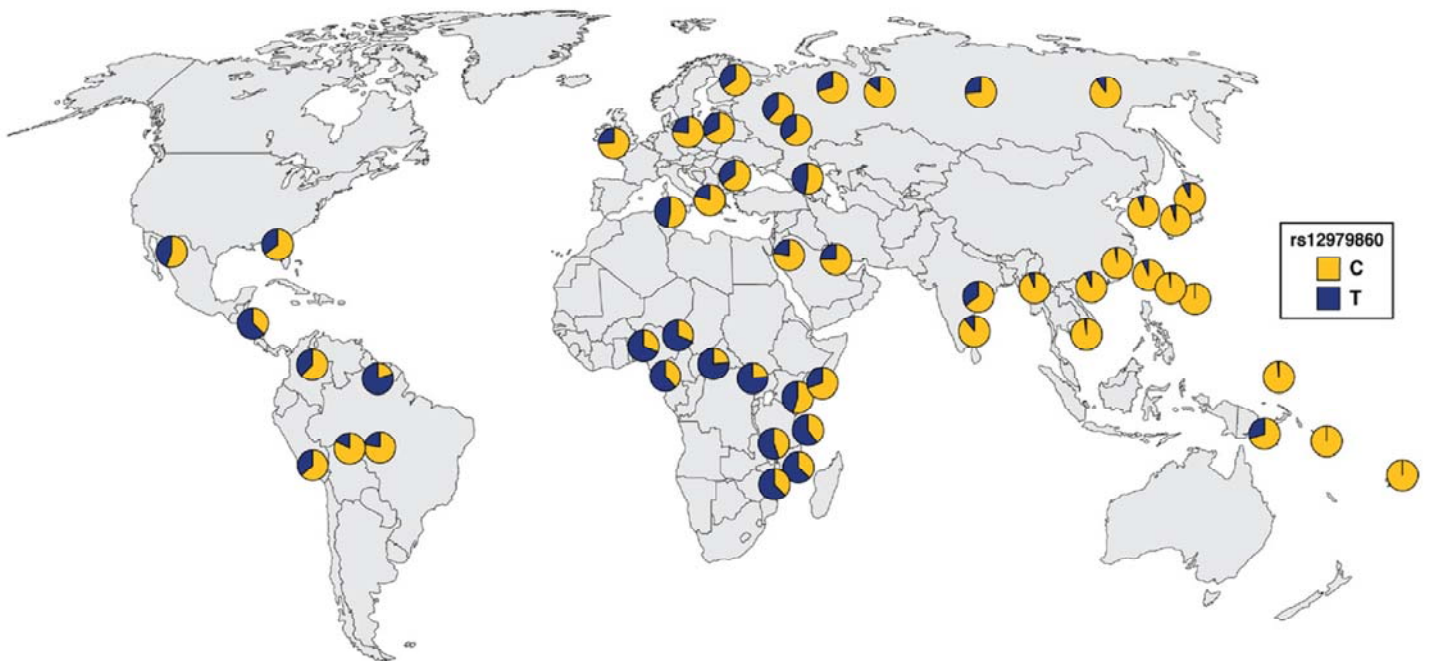


Ilustración 10. Frecuencias alélicas de los SNP rs12979860 entre los diferentes grupos étnicos.

La región HLA, que se encuentra en el cromosoma 6p21, comprende varios de los genes implicados en el reconocimiento de antígenos y la inmunidad del huésped. Se ha observado una relación entre los alelos HLA-DQB1*0301 y el HLA-DQB*1101 y el aclaramiento espontáneo del virus de la hepatitis aguda C en varios estudios independientes con individuos de diferentes grupos étnicos (166-199). Las diferencias interindividuales en la resolución espontánea de la infección por el VHC podrían ser explicadas por la existencia de interacción génica entre la región HLA y otros loci no ligados. Una hipótesis es que la existencia de epistasis entre MHC de clase I y el receptor de las células asesinas naturales o *natural killer* (KIR) podrían modular la eliminación espontánea del VHC. En particular, los portadores homocigotos de combinaciones genotípicas de KIR (2DL3/2DL3) y su ligando natural, HLA-C (haplotipo C1/C1), podrían estar protegidos contra la infección por el VHC (200). Se ha postulado que una reducción terapéutica de las señales inhibitorias de las células asesinas naturales puede ayudar a la eliminación espontánea del VHC, sin embargo, los estudios realizados con este propósito han producido resultados contradictorios con asociación positiva algunas series (201;202) y negativa en otras (203).

Distintos polimorfismos en el factor de necrosis tumoral (TNF) podría contribuir al aclaramiento espontáneo del VHC actuando conjuntamente con otros polimorfismos dentro de la región HLA (204), así como aquellos dentro y cerca de los genes que codifican para la IL (como los genes IL1, IL6, IL-4, IL-10, IL12B, IL18, IL19/IL20, IL22) y sus receptores naturales (IL10RA) (205;206). Los niveles altos de IL-10 se han relacionado con la progresión de la enfermedad (200) y los polimorfismos del gen *IL-10* con el aclaramiento espontáneo del virus de la hepatitis C en algunos estudios (206;207).

En general, estos estudios no han sido sistemáticamente confirmados (208-212) y siguen siendo controvertidos.

2.2.2. Polimorfismos del gen *IL28B* y respuesta al tratamiento combinado.

Existe una correlación entre la respuesta viral sostenida en pacientes infectados crónicamente por el VHC y un gran número de polimorfismos genéticos.

El polimorfismo en rs12979860 del gen *IL28B* se asocia con una variable respuesta al tratamiento combinado (5;8). Muchas de las primeras publicaciones que vinculaban los polimorfismos *IL28B* y la RVS se realizaron a raíz de estudios de grandes cohortes de pacientes con infección crónica por VHC tratados con interferón pegilado y ribavirina. Estas cohortes fueron investigadas en estudios de GWA, realizando un muestreo de numerosos SNPs en todo el genoma. El primer GWAS se realizó utilizando un Human610Quad Illumina Bead- Chip (San Diego, CA) con pacientes pertenecientes al estudio IDEAL, todos infectados por el genotipo 1 del VHC y aleatorizados en dos grupos según fueran tratados con interferón pegilado α -2a o interferón pegilado α - 2b. Aunque se consideraron más de 500.000 SNPs, los investigadores hallaron que el predictor más fuertemente asociado con la RVS era el SNP rs12979860 *IL28B*. Después de ajustar dicha asociación, el siguiente SNP que se relacionó de forma más importante con la RVS fue el rs8099917 (5).

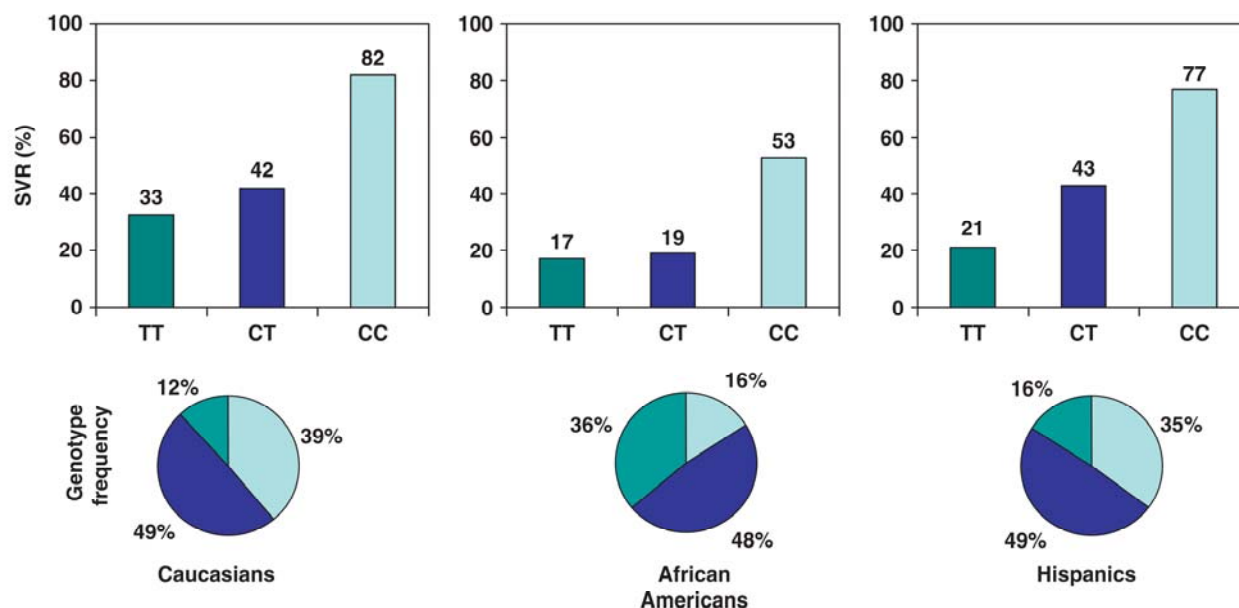


Ilustración 11. Efecto del polimorfismo IL28BRS 12979860 (C/T) en la tasa de RVS en los pacientes adherentes del estudio IDEAL (5).

Este estudio mostró una asociación significativa entre el alelo C del SNP rs 12979860 y la RVS en todos los grupos étnicos estudiados (69% europeos/americanos, 48% afroamericanos y 56% hispanos) (5). Los pacientes con rs 12979860 CC también respondieron más rápidamente al tratamiento dentro de cada grupo étnico, observándose este genotipo en el 77% de los pacientes con respuesta viral rápida (RVR).

En otra cohorte distinta incluso se calculó que el genotipo rs12979860 CC confería una odds ratio 6 veces mayor de lograr una RVS en comparación con los genotipos CT y TT (213).

Estos hallazgos se confirmados en un estudio posterior donde se observó que los sujetos de raza blanca con genotipo CC rs12979860 tenían 5 veces más probabilidades de alcanzar una RVS que los sujetos de la misma raza con los genotipos CT y TT (214). Se sabe que existen diferencias notables en la respuesta al tratamiento antiviral en pacientes con infección crónica por VHC entre grupos raciales diferentes (215), hecho que podría estar

en relación con la distribución desigual de los SNPs del gen *IL28B* en los distintos grupos étnicos, como ya hemos mencionado anteriormente (215;216). Es bien conocido que el origen afroamericano es una variable asociada a peor respuesta al tratamiento.

Por otro lado, el genotipo CC predice la RVS en pacientes de raza blanca que no presentan una RVR. En el estudio anteriormente mencionado (5), el 66% de los pacientes con el genotipo CC sin RVR obtuvieron una respuesta sostenida, comparado con el 31% de los TC y el 24% de los genotipos TT. Este hallazgo pone de manifiesto que el conocimiento del polimorfismo *IL28B* es de utilidad en aquellos pacientes con hepatitis C genotipo 1 que no logran RVR ya que es capaz de predecir qué pacientes tienen más probabilidades de responder al tratamiento aunque solo sea uno de los muchos factores que pueden influir en las tasas de respuesta (217).

El polimorfismo *IL28B* rs8099917 también se ha revelado como un predictor independiente de respuesta al tratamiento, siendo los pacientes que presentan mayor tasa de fracaso al tratamiento combinado aquellos portadores del alelo minoritarios (genotipos G/G o G/T) (197). Este hecho fue demostrado por Suppiah y colaboradores en una cohorte de pacientes australianos de ascendencia europea con infección crónica por VHC genotipo 1 tratados con interferón pegilado y ribavirina (218). Determinaron que varios SNPs estaban asociados con la RVS, siendo la asociación más fuerte con el rs8099917. En comparación con el alelo T, la heterocigosidad para el alelo G se asoció con un aumento de 1,64 veces del riesgo de no responder al tratamiento y la homocigosis con un aumento del riesgo de aproximadamente 2,39 veces (218). Estos datos fueron corroborados en el GWAS realizado por Rauch y colaboradores en una cohorte con pacientes suizos VHC positivos infectados por los genotipos 1 (48%), 2 (10%), 3 (29%) y 4 (9%) que recibieron tratamiento combinado. El 73,9% de los pacientes homocigotos para el alelo T alcanzó una

RVS. Los pacientes con el alelo G (minoritario) tenían una probabilidad 5 veces menor de responder a la terapia (197; 213).

La mayoría de los estudios que demuestran la asociación entre los polimorfismos del gen *IL28B* y la respuesta al tratamiento antiviral se han realizado en pacientes infectados por el genotipo 1. Los estudios en pacientes infectados por genotipos distintos al 1 han producido datos contradictorios.

El mayor estudio incluyó a 268 pacientes infectados por VHC genotipos 2 y 3 que fueron aleatoriamente asignados a dos grupos según recibieran el tratamiento con interferón pegilado y ribavirina según la pauta actual (24 semanas) o de duración variable (12 semanas si tenían una RVR o 24 semanas si no la tenían) (217). En pacientes con genotipos 2 y 3 se observó una asociación entre los SNPs del gen *IL28B* y la respuesta al tratamiento, pero solamente en los pacientes que no obtenían una RVR y recibieron el tratamiento durante 24 semanas (217). Por otro lado, se ha demostrado en varios estudios que el genotipo protector rs12979860 CC es más frecuente entre los pacientes con genotipos 2 y 3 frente a los pacientes con genotipo 1, lo que podría explicar en parte, las diferencias en la tasa de RVS entre los distintos genotipos virales (195; 214; 219).

Los mecanismos que regulan la influencia del polimorfismo *IL28B* en la tasa de éxito del tratamiento de la hepatitis crónica por VHC siguen siendo desconocidos. Este rasgo genético no está relacionado con los niveles de expresión génica intrahepática de *IL28B* pero la expresión basal de genes de interferón (ISGs) es significativamente mayor en los pacientes portadores del alelo menor rs8099917G (193; 194), que a su vez se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el alelo rs12979860T (220). En un estudio donde se genotiparon 91 SNPs presentes en los genes de rutas de señalización del IFN [los (BPI) y los genes estimulados por interferón (ISGs)], se observó que la presencia de 3 SNPs se

asociaba con RVS en pacientes infectados crónicamente por el VHC y tratados con terapias basadas en IFN (221).

Muchos grupos de investigadores han realizado distintos estudios genéticos para determinar si otro u otros SNPs del gen *IL28B* distintos a los ya descritos están relacionados con la RVS describiéndose varios como son el rs12980275, rs 11881222, rs 8103142, entre otros, aunque se necesitan más estudios que confirmen estos hallazgos (5;218).

Queda por determinar si dichos polimorfismos van a seguir teniendo valor predictivo sobre la respuesta al tratamiento con las nuevas terapias antivirales que combinan el peg-IFN y la RBV con un antiviral directo (como telaprevir y boceprevir) (222).

2.2.3. Polimorfismos del gen *IL28B* y progresión de la enfermedad.

Hay pocos datos sobre la influencia del polimorfismo del gen *IL28B* y la historia natural de la infección crónica por el VHC.

Abe y colaboradores (9) analizaron una cohorte de pacientes con hepatitis C crónica para estudiar el efecto de los polimorfismos de *IL28B* sobre las características bioquímicas, virales e histológicas. Encontraron que los niveles plasmáticos de GGT eran significativamente menores y la actividad necroinflamatoria y la fibrosis del hígado significativamente más graves en pacientes homocigotos para el alelo *IL28* mayoritario (rs 8099917 T). El análisis multivariado mostró que el polimorfismo *IL28B*, el sexo, el consumo de alcohol y la fibrosis hepática se asociaban de forma independiente con los niveles de GGT.

Thompson y cols. (8) confirmaron que los niveles de ALT y la actividad necroinflamatoria son mayores en los pacientes crónicamente infectados por el VHC portadores del genotipo rs12979860 CC en comparación con los portadores del alelo T rs12979860, pero no encontraron ninguna relación entre este polimorfismo y el estadio de fibrosis.

Fabris y cols. (223) determinaron la distribución de los genotipos rs12979860 CT en pacientes con cirrosis por VHC, hepatitis B o etanol. El alelo T del polimorfismo *IL28B* rs12979860 fue más frecuente en pacientes con cirrosis inducida por VHC que en pacientes con cirrosis de otras etiologías o en pacientes con hepatitis crónica por VHC de curso leve. Por otro lado, la existencia de este alelo parece aumentar el riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular, independientemente de la etiología de la patología subyacente. Este estudio es muy débil metodológicamente y lo único que permite sugerir es que el alelo T es más frecuente en la hepatopatía crónica por VHC que en las de otras etiologías, algo ya sabido anteriormente.

La esteatosis hepática es frecuente en la hepatitis crónica C como consecuencia de alteraciones del metabolismo lipídico inducidas por el propio VHC. Recientemente, Tillmann y cols. (224) detectaron una asociación significativa entre el estado de portador de alelo C del rs12979860 y la prevalencia de esteatosis hepática en la infección crónica por el VHC.

2.2.4. Estudios genéticos en relación con el carcinoma hepatocelular.

La base genética de la susceptibilidad al carcinoma hepatocelular es poco conocida. Distintos polimorfismos implicados en la respuesta inflamatoria e inmune podrían estar asociados con el riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular (CHC) en pacientes con

infección crónica por el VHC. Se ha encontrado relación entre la asociación de respuesta Th1 débil con una potente respuesta Th2 y con el desarrollo de CHC en poblaciones de alto riesgo (principalmente relacionados con el VHB), pero no en poblaciones de bajo riesgo (principalmente relacionadas con el VHC) (225). Asahina y cols. (226) observaron que el genotipo *IL28B* rs8099917 TT se asociaba con una menor incidencia de carcinoma hepatocelular, tanto en pacientes que presentaban una respuesta viral sostenida tras recibir tratamiento combinado como en los no respondedores. En este estudio, el efecto del polimorfismo *IL28B* se asoció con niveles ligeramente más bajos de ALT y AFP.

Se ha relacionado diferentes variantes genéticas en los genes del interferón gamma, factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) y diversas interleucinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 y IL-18) con el carcinoma hepatocelular. El polimorfismo TNF α -308GG se ha asociado con una disminución no significativa en el riesgo de carcinoma hepatocelular, independiente de la raza (asiáticos o caucásicos) (227;228) y el haplotipo con baja producción de interleucina-6 (IL-6 AC / AC) con la ausencia de CHC en pacientes con cirrosis hepática (229).

Otros SNPs se han relacionado con el riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular como la mutación H63D del gen HFE que se asocia con un mayor riesgo de CHC independientemente de su enfermedad hepática subyacente, no así la mutación C282Y que tampoco parece asociarse con la gravedad histológica de la enfermedad. (230). La posesión del alelo T en la posición rs2148356 del gen TLR4 se ha asociado a un menor riesgo de carcinoma hepatocelular inducido por VHC (231). Sin embargo, existen otros estudios donde no se ha encontrado ninguna relación con el carcinoma hepatocelular, como aquéllos realizados con polimorfismos de los genes *GSTM1* y *GSTT1*, *GSTP1*, *GSTA1* y *GSTM3* de la glutatión S-transferasa en una población española de alto riesgo (232) .

Hipótesis.

Los datos disponibles sugieren que el polimorfismo del gen *IL28B* puede modular la respuesta endógena de los genes estimulados por IFN y no dejan lugar a dudas de que influye en la evolución clínica y virológica de la infección crónica por el virus de la hepatitis C. Por lo tanto es una hipótesis coherente que dicho polimorfismo también repercuta sobre los parámetros analíticos, bioquímicos e histológicos en los sujetos crónicamente infectados por el virus, así como sobre el riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular.

Objetivos.

El objetivo principal de este estudio es investigar la distribución del SNP del gen *IL28B*, rs12979860 CT, en una población de pacientes crónicamente infectados por el VHC que cubre todo el espectro de gravedad de la enfermedad, de fibrosis nula-leve a carcinoma hepatocelular, para dilucidar si este rasgo polimórfico puede influir en el curso de la infección crónica por el VHC.

Los objetivos se pueden dividir en los siguientes:

1. Analizar las diferencias en los parámetros bioquímicos que reflejan alteración hepática en función del polimorfismo del gen *IL28B* en un grupo representativo de enfermos con infección crónica por el VHC.
2. Comprobar si el polimorfismo del gen *IL28B* guarda relación con los diferentes aspectos de la alteración histológica (necroinflamación, fibrosis, esteatosis y siderosis) en la hepatitis crónica por VHC.
3. Comprobar si existen diferencias en la distribución del polimorfismo del gen *IL28B* entre pacientes con infección crónica por VHC con y sin carcinoma hepatocelular que puedan indicar una posible relación de riesgo entre este polimorfismo y la carcinogénesis hepática.

Pacientes y métodos.

1. Diseño del estudio.

1.1. Tipo y ámbito del estudio.

Se trata de un estudio retrospectivo. El período de reclutamiento ha sido de octubre de 1997 a febrero de 2012.

La recogida de muestras se realizó en la Unidad de Hígado del Servicio de Aparato Digestivo (Prof. Manuel Díaz-Rubio) del Hospital Clínico San Carlos (HCSC) de Madrid.

Todos los pacientes incluidos dieron su consentimiento informado de acuerdo con la Declaración de Helsinki. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España.

El HCSC es un hospital terciario, con acreditación para la docencia de pregrado y postgrado, adscrito a la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

1.2. Descripción de la muestra a estudio

Se han incluido dos series de pacientes:

Grupo 1: Enfermos con infección crónica por VHC en los que se ha determinado el polimorfismo del gen *IL28B* y se dispone del estudio clínico, bioquímico y virológico previo al inicio de cualquier tratamiento antiviral.

- ✓ *Subgrupo 1.1:* Pacientes del grupo 1 en los que se dispone del estudio histológico hepático en biopsia obtenida antes de iniciar tratamiento antiviral. En estos pacientes la realización de la biopsia hepática es simultánea con la práctica de los estudios analíticos y virológicos.

Grupo 2: Pacientes diagnosticados de carcinoma hepatocelular sobre hepatopatía crónica por VHC en los que se ha determinado el polimorfismo del gen *IL28B*.

Las muestras se obtuvieron para los exámenes habituales de laboratorio y para la extracción de ADN el mismo día de la biopsia en los pacientes del subgrupo 1.1, y tras un diagnóstico de certeza de carcinoma hepatocelular en los pacientes del grupo 2.

En los pacientes no sometidos a biopsia los datos analíticos analizados en el estudio fueron los obtenidos inmediatamente antes de iniciar tratamiento antiviral, si lo recibieron, y los obtenidos simultáneamente a la extracción para el ADN en los no tratados.

Se creó una base de datos con las características demográficas y clínicas de los pacientes y los resultados bioquímicos, virales e histológicos. Los casos con infección concomitante por VIH o VHB fueron excluidos.

2. Estudio basal.

2.1. Datos demográficos y epidemiológicos.

Se analizaron la edad, el sexo, la raza y la nacionalidad. Se consideró la edad que tenían los enfermos en el momento de la obtención de la biopsia hepática (en el subgrupo 1.1.) o antes de iniciar el tratamiento en los que lo recibieron. En los restantes casos, tanto de hepatitis como de carcinoma hepatocelular, se consideró la edad en el momento de la toma de muestra para la extracción del ADN.

2.2. Determinaciones de laboratorio.

En los Servicios de Análisis Clínicos y Microbiología del HCSC se realizaron, respectivamente, una analítica general y las determinaciones virológicas habituales (genotipo y carga viral).

2.2.1. Detección de anticuerpos anti-VHC.

Se realizó un inmunoanálisis de diagnóstico *in vitro* para la determinación cualitativa de anticuerpos IgG frente al VHC en suero con el sistema ADVIA Centaur®. Es un método de análisis indirecto de tipo doble lavado que utiliza dos antígenos del VHC codificados recombinantes, el c200 (procedente de las secuencias NS3 y NS4 y el NS5), y un péptido del core sintético (c22). El método tiene una especificidad del 99,9% (IC del 95%: 99,78-99,97%) y una sensibilidad del 98%.

La confirmación de la presencia de anticuerpos se realizó mediante el test CHIRON® RIBA® HVC 3.0 SIA, enzimoimmunoanálisis cualitativo *in vitro* que utiliza antígenos recombinantes VHC codificados (c33c y NS5) y péptidos sintéticos VHC codificados (c100p, 5-1-1p, c22p) que han sido inmovilizados como bandas individuales en las tiras de ensayo.

2.2.2. Determinación del ARN-VHC.

El análisis cuantitativo de ARN-VHC se realizó con el Cobas Amplicor HCV Monitor versión 2.0 (Roche Diagnóstico Molecular). El rango de detección fue de 600 UI / ml a $8,5 \times 10^5$ UI / ml. A partir de julio de 2005, el ARN viral se extrajo de forma automática utilizando Cobas AmpliPrep, y la carga viral se detectó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando Cobas TaqMan (Roche Diagnostics), que tiene un alcance de

detección de 10 UI / ml y 2×10^8 UI / ml. La carga viral fue clasificada como baja (<400.000 UI / ml) o alta (≥ 400.000 UI / ml), de acuerdo con Withhöft y cols (233).

2.2.3. Determinación del genotipo viral.

Los genotipos del VHC se determinaron mediante un ensayo de hibridación inversa (Inno-Lipa, Innogenetics). Los genotipos se asignan sobre la base de variaciones en la secuencia de la región 5' no codificante de la amplificación génica del VHC después de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR).

2.2.4. Análisis del polimorfismo rs12979860.

El procedimiento utilizado fue PCR a tiempo real (qPCR), el volumen total de reacción fue de 7 μ l. Se utiliza 1 μ l de DNA a una concentración aproximada de 10 ng/ μ l, 0,33 μ l de mezcla de cebadores específicos para detectar el polimorfismo rs12979860 comercializados por Applied Biosystems, y que contiene cuatro cebadores, dos de ellos para realizar la amplificación de la región de interés y otros dos marcados con sondas TaqMan (VIC y FAM).

Uno de estos últimos hibrida con la secuencia no mutada y el otro con la mutada. El marcaje TaqMan es diferente en estos dos últimos cebadores, de modo que evaluando el incremento de fluorescencia en la longitud de onda de cada marcador se puede definir la presencia o ausencia de la mutación.

La mezcla de reacción se completa con 2,33 μ l de agua y 3,33 μ l de mezcla de reacción comercial (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems). Posteriormente se amplifican en el termociclador Mastercycler ep realplex real-time PCR system o en el Applied Biosystems 7500, con un ciclo a 94 °C durante 10 min, seguido de

45 ciclos de 92 °C durante 15 seg, 60 °C durante 90 seg y 60 °C durante 5 min; termina con otro ciclo de 60 °C durante 5 min.

Finalizada la reacción, se evalúan los resultados en el ordenador utilizando el software de identificación genética (RealPlex 2.0, Eppendorf) así como los valores de ciclo de inicio de la amplificación para cada curva de fluorescencia utilizando el algoritmo CalQplex (Eppendorf) (234).

2.3. Biopsia hepática bajo control ecográfico.

A los pacientes del subgrupo 1.1 (hepatitis crónica por VHC) se les realizó una biopsia hepática en la Unidad de Hígado del Servicio de Aparato Digestivo del HCSC, y las muestras se remitieron para estudio histológico al Servicio de Anatomía Patológica. Las muestras de biopsia de hígado obtenidas fueron examinadas por el mismo patólogo.

- ✓ El grado necroinflamatorio y estadio de fibrosis se evaluaron utilizando el sistema METAVIR (173). La fibrosis se codificó como ausencia de fibrosis (F0) vs fibrosis (F1-F4), o bien como fibrosis ausente-leve (F0-F1) vs fibrosis moderada-avanzada (F2-F4), o también como fibrosis ausente-moderada (F0-F2) vs fibrosis avanzada (F3-F4).
- ✓ La esteatosis hepática se evaluó de acuerdo con la puntuación Brunt (235): ausente o de grado 0 (<5% de los hepatocitos afectados), grado 1 (5-33% de los hepatocitos afectados), grado 2 (33-66% de los hepatocitos afectados) y grado 3 (> 66% de los hepatocitos afectados).

La biopsia se llevó a cabo mediante Trucut hasta el año 2000, y posteriormente con BioPince® de 18 o 16G, que permite obtener cilindros de 15 mm o más de forma habitual.

3. Análisis estadístico.

Los datos fueron recogidos en una base de datos en la Unidad de Hígado del HCSC. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS, versión 15.0.

3.1. Descripción de las variables cuantitativas.

Las variables cuantitativas se expresaron como media y se desviación estándar (DE) e intervalo, y fueron comparadas con el test de la t de Student o el de la U de Mann-Whitney, según procediera de acuerdo con el tipo de distribución. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo.

Las variables cuantitativas analizadas han sido las siguientes:

- ✓ Edad: expresada en años.
- ✓ Hemoglobina: expresada en g/dl.
- ✓ Plaquetas: expresada en $10^9/l$.
- ✓ AST: expresada en UI/l.
- ✓ ALT: expresada en UI/l.
- ✓ GGT: expresada en UI/l.
- ✓ Cociente AST/ALT: adimensional.
- ✓ Fosfatasa alcalina: expresada en UI/l.
- ✓ Bilirrubina: expresada en mg/dl.
- ✓ Colesterol: expresado en mg/dl

3.2. Descripción de las variables cualitativas.

Para comparar las variables cualitativas se utilizaron los test de la χ^2 o de Fisher, dependiendo del tamaño muestral. El efecto de las diferencias entre variables dicotómicas se estableció calculando la odds ratio con un intervalo de confianza (IC) del 95%.

Para el polimorfismo del *gen IL28B* se realizó un análisis multivariado, basado en un modelo de regresión logística, y se incluyeron variables con $p < 0,05$ en el análisis univariado, para identificar las variables relacionadas de forma independiente a los dos SNP (rs12979860 y rs8099917) en la vecindad del *gen IL28B*.

Las variables cualitativas analizadas han sido las siguientes:

- ✓ Sexo: expresada como varón o mujer.
- ✓ Genotipo viral: expresado como 1, no 1 o indeterminado.
- ✓ Carga viral: se consideró la cifra de 400.000 UI/ml el límite entre carga alta y baja (233).
- ✓ Necroinflamación: expresada como ausente-mínima (A0-A1) vs significativa-grave (A2-A3).
- ✓ Fibrosis: expresada como no fibrosis (F0) vs fibrosis (F1-F4), o bien como fibrosis ausente-leve (F0-F1) vs fibrosis moderada-avanzada (F2-F4), o también como fibrosis ausente-moderada (F0-F2) vs fibrosis avanzada (F3-F4).
- ✓ Esteatosis hepática expresada como: ausente o de grado 0 (<5% de los hepatocitos afectados), grado 1 (5-33% de los hepatocitos afectados), grado 2 (33-66% de los hepatocitos afectados) y grado 3 (> 66% de los hepatocitos afectados).
- ✓ Distribución de *ILB 28* rs12979860: expresada como CC, CT y TT.

Resultados.

1. Grupo 1. Hepatitis crónica C.

Fueron incluidos quinientos doce pacientes. Las características basales de los pacientes se muestran en la Tabla 1.

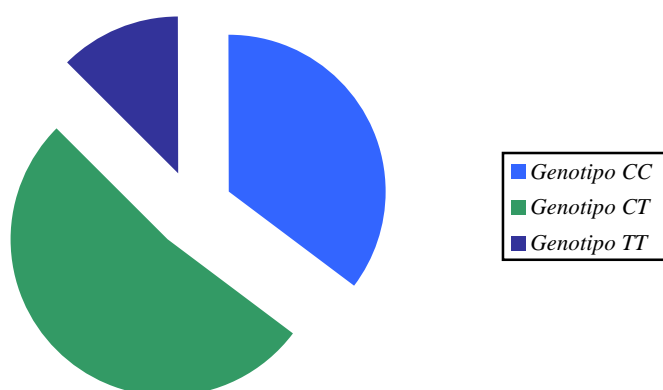
La mayoría de los pacientes eran de sexo masculino (55,66%), todos eran de raza blanca y, en su mayoría, españoles.

Hay que señalar que en los sujetos que posteriormente fueron sometidos a tratamiento antiviral, los datos analizados corresponden al estudio basal, previo a cualquier tratamiento, mientras que en los no tratados los datos corresponden al estudio en el que se incluyó la toma de muestra para la determinación del polimorfismo del gen *IL28B*.

1.1. Distribución del polimorfismo rs12979860 CT

Ciento ochenta (35,15%) eran homocigotos para el alelo C (genotipo CC) del rs12979860, mientras que los restantes trescientos treinta y dos (64,84%) eran homocigotos (64 pacientes, 12,5%) o heterocigotos (268 pacientes, 52,34%) para el alelo T. El estudiado polimorfismo estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Gráfico 1. Distribución del polimorfismo rs12979860 CT



En la Tabla 1 se muestra la distribución de los sujetos en dos grupos: portadores del genotipo rs12979860 CC (homocigoto no mutado) y portadores en homo o heterocigosis el alelo T (genotipos TT y CT, respectivamente). Para un primer análisis no se ha considerado subclasificar a los portadores de alelo T en homo o heterocigotos para este alelo.

1.2. Influencia del polimorfismo del gen IL28B sobre los parámetros clínicos, bioquímicos y virológicos en la hepatitis crónica por VHC.

En el análisis univariado se comprobó que los portadores del alelo T tienen más edad, existe un predominio femenino, los valores de ALT son más bajos y los de GGT más elevados, el cociente AST/ALT es mayor y las cifras de colesterol son más bajas. En este

mismo grupo se aprecia un exceso de sujetos infectados por el genotipo viral 1b que roza la significación estadística. Tras el correspondiente análisis multivariado todas estas diferencias persisten con alto nivel de significación, excepto el cociente AST/ALT que la pierde por completo. El exceso del genotipo viral 1b detectado en el análisis multivariado se aleja ampliamente de la significación estadística.

A continuación se realizó un análisis comparativo de los mismos parámetros entre sujetos homo (64 casos) y heterocigotos (268 casos) para el alelo T sin que exista ninguna diferencia significativa ni próxima a la significación (no se muestran estos datos de forma pormenorizada).

1.3. Influencia del polimorfismo del gen IL28B sobre las características anatomopatológicas en los enfermos de hepatitis C sometidos a biopsia hepática antes de recibir tratamiento antiviral.

Este análisis se ha limitado al subgrupo de 294 pacientes que cumplen la condición de haber sido sometidos a una biopsia hepática evaluable antes de haber recibido cualquier tipo de tratamiento antiviral.

En la Tabla 2 se resumen los hallazgos más significativos.

En un primer análisis se compararon los sujetos clasificados en dos grupos: portadores del genotipo CC (no mutado) y portadores en homo (TT) o heterocigosis (CT) del alelo T. Se comprueba que no existen diferencias significativas en el grado de necroinflamación ni en el estadio de fibrosis con una distribución prácticamente superponible en ambos grupos.

Sin embargo, al comparar la distribución por grado de esteatosis se comprueba que la esteatosis es más frecuente (odds ratio. = 1,789; 95 % I.C. = 1,085 – 2,950) e intensa ($\chi^2 = 5,194$, $P = 0,023$) en los portadores del alelo T que en los homocigotos CC. Al comparar entre sí los sujetos homo y heterocigotos para el alelo T no se aprecia ninguna diferencia estadísticamente significativa.

2. Grupo 2. Carcinoma hepatocelular.

Ciento treinta y cuatro pacientes (97 varones, edad media al diagnóstico de 67,4 años, SD 9.4, intervalo 41-88) fueron incluidos en este grupo. Todos eran españoles de raza blanca.

El diagnóstico de CHC se basó en el examen patológico de la biopsia quirúrgica o aspirado citológico en 73 pacientes, y de acuerdo con los criterios de imagen actuales (226) en los restantes 61. Todos los pacientes fueron considerados como cirróticos, porque la mayoría de ellos habían sido diagnosticados de cirrosis hepática antes del diagnóstico de CHC y el estudio clínico de los restantes fue consistente con la cirrosis. Por otra parte, el carcinoma hepatocelular es excepcional en el VHC sin cirrosis inducida por la enfermedad hepática crónica (104). Todos los pacientes de este grupo tenían títulos detectables de anticuerpos anti-VHC en el suero. Sólo dos pacientes habían sido tratados con interferón más ribavirina antes de desarrollar carcinoma hepatocelular.

2.1. Distribución del polimorfismo rs12979860 CT

Cincuenta y dos pacientes (38,8 %) eran homocigotos para el alelo C (genotipo CC) del rs12979860, mientras que los restantes 82 eran homocigotos (16 pacientes, 11,9%) o heterocigotos (66 pacientes, 49,3 %) para el alelo T (Gráfico 2).

Gráfico 2. Distribución del polimorfismo rs12979860 CT en el carcinoma hepatocelular



El consumo de etanol ≥ 40 g / día fue reportado por 52 pacientes (50 varones). La distribución del SNPs analizado en estos pacientes era muy similar al compararlos con la de los bebedores moderados o abstemios (valores de $p > 0.80$ para cada comparación, datos no mostrados).

2.2. Análisis comparativo de pacientes infectados por VHC con y sin CHC.

Para evaluar la posible relación entre los SNPs analizados del *gen IL28B* y la etapa de la enfermedad hepática inducida por el VHC, los 249 pacientes con HCC en el grupo de la hepatitis crónica que no habían recibido tratamiento antiviral después de realizar la biopsia hepática se compararon con el grupo de pacientes con carcinoma hepatocelular. No se aprecian diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los genotipos del *gen IL28B* ni en la frecuencia del alelo T entre ambos grupos (Tabla 3).

Tabla 1. Análisis de los parámetros bioquímicos, virológicos e histológicos en relación con el genotipo rs12979860 TC en 512 pacientes con hepatitis C crónica. Alelo Mayor: C. Alelo Menor: T.

| Parámetro | Todos los pacientes (512 casos) | Genotipo CC (180 casos) | Portadores alelo T (332 casos) | P (univariante) | P (multivariante) |
|--|------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|---|----------------------|
| Edad (años) | 49,8 (111,0) | 48,1(10,6) | 50,7 (11,2) | 0.009 | 0,038 |
| Sexo (H/M) | 285/227 | 114/66 | 171/161 | OR = 1,626 95 % C.I. = 1,121 – 2,359 | 0,003 |
| Carga viral ≤/> 400.000 IU/mL/n.a. | 94/407/11 | 33/142/5 | 61/265/6 | OR = 1,010 95 % C.I. = 0,631-1,615 | |
| Genotipo viral 1/non 1/n.a. | 429/72/11 | 142/32/6 | 287/40/5 | OR = 0,618 95 % C.I. = 0,373-1,026 | 0,859 |
| Hb (g/dL) | 15,0 (1,5) | 15,0 (1,4) | 15,0 (1,6) | 0,892 | |
| Plaquetas (109/L) | 200 (66) | 199 (68) | 201 (65) | 0,721 | |
| Bilirrubina(mg/dL) | 0,84 (0,41) | 0,80 (0,36) | 0,85 (0,44) | 0,204 | |
| AST (IU) | 64 (45) | 67(51) | 62 (42) | 0,239 | |

| | | | | | |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------------|-------------------|
| ALT (IU) | 97 (82) | 115 (96) | 87 (71) | 0.012 | <0.001 |
| AST/ALT | 0,77 (0,32) | 0,70 (0,31) | 0,82 (0,32) | <0.001 | 0,996 |
| GGT (IU) | 77 (99) | 52 (65) | 90 (111) | < 0.001 | < 0.001 |
| Fosfatasa alcalina (IU) | 103 (54) | 99 (48) | 105 (58) | 0.190 | |
| Colesterol (mg/dL) | 177 (36) | 182 (39) | 174 (34) | 0.022 | 0.009 |
| Respuesta al tratamiento (G1) RVS/F1°/Rec/Int) | 80/81/37/21 | 51/10/11/7 | 29/71/26/14 | | |

Tabla 2. Análisis de los rasgos histológicos en relación con el genotipo rs12979860 en 294 enfermos con hepatitis crónica C. Alelo mayor: C. Alelo menor: T

| Rasgo histológico | Genotipo CC (113 casos) | Portadores del alelo T (181 casos) | Estadística CC vs. portadores T | Genotipo CT (144 casos) | Genotipo TT (37 casos) | Estadística CT vs. TT |
|---|----------------------------|---------------------------------------|---|----------------------------|---------------------------|--|
| Grado necroinflamatorio METAVIR (0/1/2/3) | 2/18/42/51 | 2/34/77/68 | Chi ² TL = 1,649 (P = 0,438) | 1/25/65/53 | 1/9/12/15 | Chi ² TL = 0,148 (P = 0,701) |
| Estadio de fibrosis METAVIR (0/1/2/3/4) | 23/34/19/29/8 | 38/55/31/40/17 | Chi ² TL = 0,0012 (P = 0,973) | 28/45/26/31/14 | 10/10/5/9/3 | Chi ² TL = 0,231 (P = 0,631) |
| Esteatosis (escala de Brunt 0/1/2/3/n.d.) | 79/28/6/0/0 | 100/63/10/4/4 | Chi² TL = 5,194 (P = 0,023) | 82/47/9/4/2 | 18/16/1/0/2 | Chi ² TL = 0,044 (P = 0,834) |
| Esteatosis (escala de Brunt) 0/>0/n.d. | 79/34/0 | 100/77/4 | O.R. = 1,789 95 % I.C. 1,085 – 2,950 | 82/60/2 | 18/17/2 | O.R. = 1,291 95 % I.C. 0,615 – 2,710 |

Tabla 3. Distribución del gen IL28B rs12979860CT en 249 pacientes con hepatitis C crónica (HCC) y en 134 pacientes con carcinoma hepatocelular inducido por VHC (CHC)

| Genotipo IL28B | Grupo | | Estadística |
|--------------------|--------------------------|--------------------------|---|
| | HCC 249 pacientes (%) | CHC 134 pacientes (%) | |
| CC | 80 (32,1) | 52 (38,8) | $\chi^2 = 1,715$ $P = 0,424$ |
| CT | 136(54,6) | 66 (49,3) | |
| TT | 33(13,3) | 16 (11,9) | |
| Frecuencia alelo T | 0,406 | 0,366 | O.R. = 1,184 95 % C.I. = 0,872 – 1,608 |

a = χ^2 with 2 v; b = odds ratio (95 % intervalo de confianza); c = χ^2 with 3 v.

Discusión.

Es un hecho universalmente admitido y unánimemente demostrado por numerosos estudios en grupos étnicos diferentes, como confirma un reciente metaanálisis (236) que el polimorfismo del gen *IL28B* es el factor de predicción más potente de respuesta al tratamiento combinado de la hepatitis crónica C con interferón pegilado y ribavirina de entre los que afectan al huésped, en tanto que el genotipo viral es el factor vírico más directamente relacionado con la probabilidad de obtener respuesta a este tratamiento.

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) identificados en la vecindad del gen *IL28B* constituyen un haplotipo cuyos dos elementos más definitorios son los situados en rs12979860 y rs8099917. En la mayoría de los grupos étnicos estudiados estos dos SNP están en un marcado desequilibrio de ligamiento, por lo que algunos autores consideran

que son intercambiables en lo relativo a su capacidad predictiva. En la experiencia de nuestro grupo, sin embargo, rs12979860 tiene mayor capacidad predictiva de la respuesta viral sostenida, especialmente si se compara con el grupo de pacientes que sufren fracaso terapéutico primario (237) por lo que hemos adoptado la determinación de este SNP como prueba de aplicación clínica en el laboratorio de nuestro centro.

Existe un claro paralelismo entre la frecuencia del alelo asociado a respuesta viral sostenida (que es el *wild type* o no mutado en ambos SNP) y la tasa de RVS en las distintas poblaciones (5). La tasa de RVS disminuye progresivamente y en forma paralela a como aumenta la frecuencia del alelo mutado desde asiáticos (máxima tasa de respuesta), blancos, hispanos y negros. Además, los portadores homocigotos del alelo favorable aclaran espontáneamente el VHC en fase aguda de la infección con una frecuencia que duplica a la que experimentan los portadores del alelo desfavorable (6; 7;195).

El efecto del genotipo *IL28B* favorable se refleja en un descenso más acelerado de la carga viral en la primera fase del tratamiento, de modo que los portadores de dicho genotipo consiguen con mucha mayor frecuencia respuesta viral rápida, es decir, desaparición de la viremia en la semana 4ª del tratamiento combinado, tanto en los enfermos monoinfectados por VHC (238) como en los pacientes coinfectados por VHC y VIH (239). A su vez, la respuesta viral rápida es el principal factor de respuesta viral sostenida una vez iniciado el tratamiento (240).

Los dos polimorfismos citados anteriormente no están en la región codificante del gen, sino que señalan la existencia de una variante funcional que hasta ahora no ha sido identificada. Existe un SNP no sinónimo en rs8103142 en el exón 2 del gen pero el desequilibrio de ligamiento con los demás SNP que constituyen el haplotipo es tan estrecho que no se ha podido detectar en cuál reside la clave diferencial mediante pruebas de asociación (240). No se ha detectado relación entre el genotipo *IL28B* y la expresión del

gen en el hígado (241,242) pero sí se ha detectado que el genotipo *IL28B* se asocia con patrones diferentes de expresión de genes estimulados por interferón (ISG: *interferon stimulated genes*) y son los genotipos portadores de los alelos desfavorables los que se asocian con niveles más altos de expresión de ISG (241, 242, 243). Antes del descubrimiento de este polimorfismo ya se sabía que un nivel elevado de expresión hepática de ISG se asocia con una mayor frecuencia de fracasos terapéuticos, ya que el interferón exógeno encuentra un menor margen de activación suplementaria de los ISG y éstos, a pesar de estar sobreexpresados, han sido incapaces de aclarar el virus.

La hipótesis del presente estudio es que si el polimorfismo *IL28B* influye sobre la modulación de la respuesta inmune contra el VHC, ello puede además repercutir sobre la historia natural de la infección por este virus, como sugiere el hecho de que los portadores del haplotipo *IL28B* favorable se curen con mayor frecuencia en la fase aguda de la infección, como se ha señalado anteriormente, y lo hagan tras desarrollar una hepatitis aguda clínicamente manifiesta que indica la puesta en marcha de una respuesta inmune más potente y no de forma subclínica, como es habitual cuando la infección pasa a la cronicidad.

A continuación analizamos pormenorizadamente nuestros resultados en relación con los objetivos planteados en este estudio.

1.1. Influencia del polimorfismo *IL28B* sobre los parámetros bioquímicos en la hepatitis crónica por VHC.

El primer estudio publicado al respecto y que nos dio la idea para llevar a cabo el que se presenta en esta tesis doctoral es el de Abe et al. (244) publicado en 2010. Estos autores estudiaron el polimorfismo en rs8099917 en 364 pacientes japoneses residentes en

Hiroshima entre 2002 y 2008. Se trata por tanto de un estudio retrospectivo ya que el polimorfismo no se identificó hasta 2009. Los alelos identificados en rs8099917 son T y G. El genotipo asociado a respuesta viral sostenida es TT y el alelo menor o mutado, que se asocia con una menor tasa de RVS, es G, ya sea en heterocigosis (TG) o en homocigosis (GG).

Estos autores comprobaron que la concentración plasmática de gammaglutamiltransferasa (GGT) era significativamente más baja en los portadores del genotipo TT, y ello independientemente de otros factores que se sabe influyen sobre la concentración de GGT. En el análisis de regresión múltiple los factores relacionados de forma independiente con concentraciones más elevadas de GGT fueron el genotipo *IL28B* GG (y probablemente el estado de portador heterocigoto del alelo G, aunque esto no lo aclaran los autores del estudio), un estadio más avanzado de fibrosis hepática en la biopsia, el sexo masculino y un consumo mayor de alcohol.

Los resultados de nuestro estudio concuerdan los de Abe et al. (244) en lo relativo a la asociación del genotipo *IL28B* no mutado (rs12979860CC en nuestro estudio) con concentraciones más bajas de GGT. Además hemos identificado una relación de signo inverso entre el genotipo *IL28B* y la concentración de alaninoaminotransferasa (ALT) que es significativamente más alta en los portadores del genotipo rs12979860CC. Este hallazgo concuerda con el comunicado por Thompson et al. (5) quienes, como nosotros, estudiaron el polimorfismo en rs12979860 en un grupo de 1364 pacientes con hepatitis crónica C, la mayoría de ellos (1047) de raza blanca. La ALT se considera un marcador indirecto de necroinflamación hepática, como avala nuestro hallazgo de su relación directa con dicho grado en la escala METAVIR. Por el contrario, en el estudio anteriormente citado, Abe et al. (244) detectaron una correlación de signo contrario: valores más bajos de ALT y de aspartatoaminotransferasa (AST) en los portadores del genotipo rs8099917TT (recordemos

que este genotipo está en estrecho desequilibrio de ligamiento con el rs12979860CC). En su artículo estos autores no comentan este hallazgo.

En nuestro estudio hemos detectado otras diferencias significativas en relación con el polimorfismo *IL28B* no señaladas por otros autores. El colesterol plasmático es más bajo en los portadores del alelo T que en los homocigotos CC, lo cual se explica porque este parámetro analítico está en relación inversa con la probabilidad de respuesta al tratamiento como hemos demostrado en un estudio previo (245), lo mismo que la posesión del alelo T. Este hallazgo se ha visto corroborado por Petta et al. (246) en un grupo de 434 pacientes de raza blanca infectados por VHC genotipo 1, en quienes comprobaron que el genotipo rs12979860CC se asocia con concentraciones más altas de colesterol total y LDL y más bajas de triglicéridos y, lo que es más significativo desde el punto de vista fisiopatológico, con una menor prevalencia de resistencia a la insulina, valorada mediante el índice HOMA. Similar significado tiene el hallazgo por parte de Aizawa et al. (247) de concentraciones más altas de apoB-100 y de colesterol LDL en pacientes infectados por genotipo 1 y portadores del genotipo rs8099917TT.

También hemos detectado una diferencia en el límite de la significación estadística ($p = 0,035$) en la edad a la que fueron incluidos los sujetos del estudio aunque este dato es probablemente irrelevante, ya que desconocemos en la mayoría de los casos a qué edad se produjo el contagio y por lo tanto el tiempo de evolución de la enfermedad.

Más marcada es la diferencia en la distribución por sexos del genotipo CC y de los portadores del alelo T. La proporción de mujeres en el grupo de sujetos con genotipo CC es del 36,7 %, cuando conserva la igualdad con el sexo masculino en el grupo de portadores del alelo T (48,5 %). Como este rasgo genético es mendeliano simple, la explicación de esta marcada diferencia ($p = 0.003$) hay que buscarla en posibles diferencias en la distribución de los genotipos virales o en la historia natural de la enfermedad entre ambos sexos.

El primer supuesto está avalado en parte por el mayor porcentaje de mujeres infectadas por genotipo viral 1 (91,4 % en mujeres y 81,0 % en varones), y dentro de éste, por el subtipo 1b (84,7% en mujeres y 68,6% en varones). Estas diferencias son algo más marcadas en los portadores del alelo T, pero no alcanzan significación estadística y por sí solas no bastan para explicar esta diferencia.

La segunda posible explicación es que las mujeres con genotipo CC tengan una mayor probabilidad de aclarar espontáneamente el virus que los varones con el mismo genotipo, algo que encuentra algún apoyo en la bibliografía que hemos revisado.

De todos modos no podemos explicar plenamente este hallazgo que sin embargo no parece debido a un tamaño muestral insuficiente ya que se ha establecido en una serie de más de 500 casos.

1.2. Relación entre el polimorfismo *IL28B* y la carga viral en la hepatitis crónica C.

Algunos estudios previos habían detectado cifras significativamente más bajas de carga viral basal en sujetos portadores de los genotipos *IL28B* asociados con menor probabilidad de respuesta al tratamiento (248). Este hallazgo paradójico se explicaba por la mayor presión inmune sobre el virus en sujetos con genotipos desfavorables, que tiene una expresión mayor de ISG.

En este estudio no hemos comprobado esta diferencia, aunque hemos clasificado la carga viral de forma categórica (alta/baja) de acuerdo con Withoff et al. (233) que consideran carga viral alta la que supera las 400.000 u.i./ml. Lo hemos hecho así, en parte, porque hasta 2002 el laboratorio no cuantificaba la carga viral por encima de 500.000 u.i., considerándola alta en cualquier caso. Para mayor seguridad hemos analizado los datos de

los enfermos incluidos desde 2002 y no hemos comprobado diferencias significativas en la carga viral basal entre los sujetos con genotipo CC y los portadores del alelo T ($p = 0.307$).

1.3. Necroinflamación.

En el estudio inicial de Abe et al. (244) se comunicó un grado mayor de necroinflamación en los sujetos portadores del genotipo rs8099917TT que en los portadores del alelo mutado G. Thompson et al. (240) obtuvieron resultados similares con mayor grado necroinflamatorio en los portadores del genotipo rs12979860CC.

En este estudio no hemos confirmado esta relación, lo que es discordante con los hallazgos analíticos antes señalados en relación con la concentración de ALT, si consideramos que esta enzima es un marcador indirecto de actividad necroinflamatoria en la hepatitis crónica C. Bochud et al (248) comprobaron una asociación en el límite de la significación estadística ($p = 0,04$) entre el estado de portador del alelo rs8099917G y grados más leves de actividad necroinflamatoria en enfermos infectados por genotipos virales distintos del 1, pero nuestra serie está constituida muy mayoritariamente por enfermos infectados por genotipo 1, lo que no nos ha permitido comprobar este hallazgo.

1.4. Fibrosis.

En este estudio no hemos detectado relación alguna entre el estadio de fibrosis y el polimorfismo *IL28B* en los 294 pacientes incluidos en la serie y en los que se dispone de biopsia hepática. En su estudio inicial, Abe et al. (244) observaron que el estadio de fibrosis, valorado con la escala METAVIR, era más avanzado en los sujetos con genotipo rs8099917TT (el que se asocia con mejor probabilidad de respuesta al tratamiento). Sin embargo, Di Marco et al. (249) en un estudio realizado en 131 enfermos con hepatitis

crónica C y talasemia mayor, comprobaron que solo una edad más avanzada y la posesión de los alelos mutados de ambos polimorfismos (rs8099917G y rs12979860T) eran los factores asociados con estadios más avanzados de fibrosis, con un alto grado de significación estadística. En este mismo sentido, aunque con menor significación estadística, se inscriben los resultados de Falletti et al. (250) obtenidos en una serie de 629 enfermos con hepatitis crónica por VHC en la que comprobaron que los portadores homocigotos de alelo mutado (genotipo rs12979860TT) tenían estadios más avanzados de fibrosis que los genotipos CC y CT. Por el contrario, los resultados del estudio de Thompson et al. (5) coinciden con los nuestros al no detectar relación entre el polimorfismo *IL28B* y el estadio de fibrosis hepática. Resulta muy interesante el hallazgo por parte de El-Awady et al. (251) de la total ausencia del genotipo rs12979860CC en un grupo de pacientes egipcios, infectados por VHC genotipo 4 y afectados de hepatopatía en fase terminal, por tanto todos ellos con cirrosis y la mayoría con hepatoma, en clara discordancia con los enfermos con grados menos avanzados de hepatopatía y en controles sanos. No obstante las diferencias virales y epidemiológicas entre esta población y la caucásica de origen europeo no permiten extrapolar sin más estos hallazgos a nuestro medio.

Ante estos resultados contradictorios no es posible concluir si la fibrosis hepática guarda relación con el polimorfismo del gen *IL28B*. En un intento de incrementar la potencia estadística de nuestra serie hemos realizado este análisis añadiendo a los 294 enfermos con biopsia hepática los casos en los que se dispone de estudio con fibroscán aunque no de biopsia hepática y sobre un total de 390 casos seguimos sin apreciar relación alguna entre el polimorfismo y el estadio de fibrosis (datos no incluidos en este estudio).

1.5. Esteatosis hepática

Probablemente el hallazgo más interesante de este estudio es la constatación de que el estado de portador del alelo rs12979860T se asocia con mayor frecuencia e intensidad con la esteatosis hepática. La esteatosis es frecuente en la hepatitis crónica C y está relacionada con la capacidad del VHC para interferir con la excreción de lípidos por los hepatocitos a través de diversos mecanismos que actúan en grado diferente según cual sea el genotipo viral. El genotipo 3 se asocia con un grado mayor de esteatosis que el resto de genotipos y probablemente actúa por un mecanismo directo, ya que la eliminación terapéutica del virus mejora la esteatosis de forma muy evidente (252) mientras que en el resto de los casos la esteatosis está ligada a factores metabólicos del huésped y su respuesta al tratamiento antiviral, aunque presente, es menos evidente (253).

No debe sorprender esta relación entre el estado de portador del alelo mutado de *IL28B* y la esteatosis hepática en la hepatitis crónica por VHC genotipo 1 porque ambos son factores que predicen una mala respuesta al tratamiento. La cuestión está en dilucidar si esta relación es casual o causal. Ya se ha señalado que el nivel basal de activación de los genes estimulados por interferón es menor en los portadores del genotipo rs12979860CC, a lo que hay que añadir que este genotipo se asocia con una intensa y prolongada expresión de una amplia gama de genes relacionados con la respuesta al tratamiento antiviral a lo largo de toda la duración de éste. La esteatosis hepática en la hepatitis crónica por VHC genotipo 1 es consecuencia de la resistencia a la insulina que a su vez facilita la replicación viral (254). Por el momento no hemos detectado en la bibliografía datos que indiquen que el polimorfismo *IL28B* influya sobre la expresión de los genes relacionados con el desarrollo de esteatosis hepática o de resistencia a la insulina en la hepatitis C, pero un estudio muy reciente (255) pone de manifiesto que el estado de portador de los alelos rs8099917G y rs12979860T se acompaña de valores más elevados de insulinemia propios

de un estado de resistencia a la insulina. A favor de esta posibilidad está la posible relación entre el bajo nivel de actividad de los ISG con concentraciones elevadas de colesterol LDL en el hepatocito por inhibición de la actividad de lipoproteínlipasa (256) que a su vez se asocian a una mayor probabilidad de respuesta al tratamiento antiviral (257).

La relación entre esteatosis y polimorfismo *IL28B* ha sido detectada muy recientemente por otros dos grupos, uno japonés (258) y otro europeo (224), aunque estos autores no informan sobre posibles diferencias en la intensidad del trastorno en relación con el genotipo *IL28B*, como sí hemos comprobado en este estudio.

1.6. Carcinoma hepatocelular.

El carcinoma hepatocelular (CHC) representa el paso más avanzado en el curso natural de la infección crónica de hepatitis C que afortunadamente sólo se alcanza por una minoría de pacientes. Si la hipótesis de la existencia de ninguna relación entre el polimorfismo genético *IL28B* y la gravedad de la enfermedad hepática inducida por el VHC es cierta, el hallazgo más lógico debería ser la existencia de diferencias en las frecuencias genotípicas entre las diferentes etapas de la enfermedad. No hemos encontrado diferencias en las frecuencias de los genotipos *IL28B* al comparar un grupo de pacientes con HCC inducida por infección crónica por VHC con un grupo de pacientes no tratados con diagnóstico de CHC. Nuestros resultados son coincidentes con los reportados por otros grupos, tanto en población caucásica (258) como en japonesa (259,260). Sin embargo, Asahina y cols (226) informaron de que los portadores del genotipo rs8099917 TT tuvieron una mayor tasa de RVS al tratamiento con interferón (como se esperaba) y que este genotipo se asoció con una menor incidencia de CHC, tanto en pacientes con RVS como en no respondedores. De estos hallazgos no puede deducirse un efecto directo del polimorfismo *IL28B* en el riesgo de CHC, ya que la RVS mejora claramente el curso natural de la infección crónica por el

VHC (261,262) y, entre los no respondedores, el efecto del polimorfismo *IL28B* estaba asociado a niveles ligeramente más bajos de ALT y alfa-feto proteína. Más concluyente es el estudio citado anteriormente de El-Awady et al. (251) en el que ninguno de los 75 enfermos infectados por VHC genotipo 4 que habían desarrollado hepatoma era portador del genotipo rs12970860CC, indicando que la posesión del alelo T en homo o heterocigosis es un factor que favorece la carcinogénesis hepática en estos pacientes.

En un estudio de pacientes que recibieron un injerto de hígado debido a enfermedad grave hepática inducida por el VHC (263), se encontró que el genotipo 12979860TT fue más frecuente en los 61 pacientes con CHC en el hígado explantado que en los 106 pacientes sin CHC ($p = 0,041$), lo que sugiere que el alelo C mayor juega un papel protector contra el desarrollo de CHC. El posible papel del polimorfismo del gen *IL28B* podría ser indirecto y por ello de baja influencia sobre la carcinogénesis. Es sabido que un cambio de aminoácido en la posición 70 de la región del core viral del VHC, que solo se produce en el genotipo 1b, se asocia con una tasa más elevada de aparición de hepatoma en el curso de la infección crónica por el VHC. La sustitución de arginina por glutamina en la posición 70 es la responsable de este mayor riesgo y se produce con una tasa variable a lo largo de la evolución de la enfermedad. Akuta et al. (264) han comprobado que la probabilidad de que se produzca este cambio desfavorable de aminoácido es mayor en pacientes portadores del alelo G en posición rs8099917; es decir, el alelo mutado jugaría un papel permisivo o facilitador de la aparición de variantes virales con mayor capacidad carcinógena.

En otro orden de cosas, Ren y cols (265) encontraron que el alelo T rs12979860 estaba relacionado con la susceptibilidad de padecer un CHC inducido por la infección crónica por el virus de la hepatitis B en un grupo de pacientes chinos. Por lo tanto, la controversia se mantiene sobre la posible relación entre el polimorfismo del gen *IL28B* y el riesgo de desarrollar CHC.

Conclusiones.

- ✓ Los resultados de este estudio muestran que el genotipo del *gen IL28B* rs12979860CC, que se asocia con una mayor tasa de respuesta al tratamiento en pacientes con hepatitis C crónica, también está relacionado con mayores niveles séricos de ALT, que se considera como un marcador de necroinflamación hepática.
- ✓ Se ha observado una relación entre el genotipo del *gen IL28B* rs12979860CC con menores valores de GGT, que es un marcador indirecto de la fibrosis hepática y un factor predictivo negativo de la respuesta al tratamiento.
- ✓ No se han encontrado diferencias en la distribución del polimorfismo estudiado entre los diferentes grados y etapas de daño hepático mostradas directamente por la biopsia hepática.
- ✓ No hemos encontrado diferencias en las frecuencias del polimorfismo del *gen IL28B* rs12979860CC entre pacientes con CHC inducido por VHC y pacientes con hepatitis crónica por VHC.
- ✓ Hemos encontrado una asociación entre el estado de portador del alelo T del rs12979860 con una mayor frecuencia y severidad de la esteatosis hepática en la hepatitis crónica C.
- ✓ Debido a que el polimorfismo del *gen IL28B* está claramente relacionado con la respuesta inmune contra la infección por VHC, son necesarios más estudios sobre su posible influencia en el curso natural de la enfermedad.

Relation of *IL28B* gene polymorphism with biochemical and histological features in hepatitis C virus- induced liver disease.

1. Introduction.

The natural history of the infection with hepatitis C virus (HCV) is variable and difficult to define. Firstly, the proportion of infected patients that clear the virus in the acute phase of the infection broadly oscillates between 14 % and 46 % of cases. Long-term follow up studies in patients with chronic hepatitis C have shown a great variability in the rate of progression of the liver disease, although after 2 or more decades many infected persons develop progressive hepatic fibrosis and cirrhosis, that is related to a high risk of suffering from hepatocellular carcinoma (HCC). There are some well-known host-related factors that are clearly associated with a more rapid and severe progression of the liver disease, as when it is acquired at an older age, and the metabolic syndrome complex (non-alcoholic liver steatosis, obesity and type II diabetes mellitus). Data on a more benign course in female gender are controversial. There are some reports on host genetic factors related to the risk of acute HCV infection becoming chronic and to the rate of progression in the chronic phase, as are some human leukocyte antigen class II antigens and polymorphisms in the genes of transforming growth factor- β_1 and angiotensin II.

A genome wide association study (GWAS) has identified a non-coding single nucleotide polymorphism (SNP), rs12979860, that resides 3 kb upstream of the *IL28B* gene, located in the long arm of chromosome 19, which encodes IFN- λ_3 . Two other GWAS identified a

second non-coding SNP, rs8099917, located 7.5 kb upstream of the *IL28B* start codón. Both SNPs are in partial linkage disequilibrium and are part of an *IL28B* haplotype that shows ethnic variations and is a strong determinant of response (or lack of response) to therapy for HCV chronic infection.

The mechanisms that regulate the influence of *IL28B* polymorphisms on the success rate of therapy in chronic hepatitis C remain unknown. These genetic traits are not related with levels of intrahepatic *IL28B* gene expression but the baseline expression of interferon stimulated genes (ISGs) is significantly higher in patients carrying the minor rs8099917G allele, that is in linkage disequilibrium with the minor rs12979860T allele, thus letting a narrower margin of response when HCV acutely infects the liver or when interferon-based therapy is instituted in chronically infected patients. These findings may explain why the spontaneous clearance of HCV virus is more frequent in subjects with the rs12979860CC genotype and that this genotype and the linked rs8099917TT genotype are predictors of SVR, as unanimously confirm several studies .

In spite of the high number of studies mentioned above, data on the influence of the *IL28B* gene polymorphism on the natural history of untreated chronic HCV infection are scarce. Abe *et al.* found that Japanese patients carrying the rs8099917TT genotype had lower plasma levels of gamma glutamyl transferase (GGT) and showed more severe necro-inflammation and fibrosis scores in liver biopsies as compared to carriers of the minor G allele, but the weak ($0.01 < p < 0.05$) association of the histological scores with the *IL28B* polymorphism needs independent confirmation.

IL28B polymorphism-related differences in the baseline immune response to HCV infection may influence the severity of liver necro-inflammation, the main stimulus for fibrogenesis that is the hallmark of an unfavourable course of chronic hepatitis C.

The aim of this study was to investigate the distribution of the rs12979860 SNP upstream of the *IL28B* gene in a well-phenotyped population of chronically HCV-infected patients covering the whole spectrum of disease severity, from null-mild fibrosis to hepatocellular carcinoma, to elucidate whether this polymorphic trait may be related with the course of chronic HCV infection.

2. Materials and methods.

Starting by October 1997 we collected and stored peripheral blood for DNA extraction from all HCV-infected patients referred to our Liver Unit who gave informed consent according with the Declaration of Helsinki. The study was approved by the local ethics committee of the Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain. The study design included two series of patients: 1) patients with a diagnosis of chronic hepatitis C and positive HCV viremia who were scheduled for their first liver biopsy and naïve for antiviral therapy; and 2) patients with a diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC) on HCV-induced liver cirrhosis in accordance with current criteria. All HCC patients were considered as cirrhotic because most of them were diagnosed with liver cirrhosis before the diagnosis of CHC and the clinical study of the remaining ones was consistent with cirrhosis. Moreover, hepatocellular carcinoma is exceptional in HCV-induced non-cirrhotic chronic liver disease. A blood sample was taken for standard laboratory tests and DNA extraction on the same day of the liver biopsy in patients of the group 1, and when a definite HCC diagnosis was established in patients of the group 2. Patients with HIV or active HBV infections were excluded. A database was created to include clinical and demographical data, and baseline biochemical, virological and histological results.

Ethics statement.

All patients provided informed consent according with the Declaration of Helsinki. The study was approved by the local ethics committee of the Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain. This consent was verbal, after providing to patients with full explanation of the objectives and methods of the study, guarantying them absolute privacy in accordance with the Spanish legal rules, that are more strict than those in other European countries. This circumstance was communicated to the Ethics Committee before obtaining its authorization. In addition, the determination of the IL28B polymorphism is a routine method at the clinical laboratory of our centre since april 2011.

Laboratory methods

Quantitative analysis of HCV-RNA was performed with the Cobas Amplicor HCV Monitor version 2.0 (Roche Molecular Diagnostic). The detection range was 600 IU/mL to 8.5×10^5 IU/mL.

Liver biopsy specimens obtained from patients of group 1 were examined by the same pathologist. Necroinflammation grade and fibrosis stage were scored using the METAVIR system. To perform some analysis, necroinflammation was classified as null-significant (0-2) versus severe (3). Fibrosis was coded as non-mild fibrosis (F0-F1) versus moderate-advanced fibrosis (F2-F4). Steatosis of the liver was evaluated according with the Brunt score: absent or grade 0 (<5% of hepatocytes affected), grade 1 (5–33% of hepatocytes affected), grade 2 (33–66% of hepatocytes affected); and grade 3 (>66% of hepatocytes affected).

IL28B genotyping was carried out by means of custom TaqMan Assay (Applied Biosciences Hispania, Alcobendas, Madrid, Spain) designed to detect the rs12979860 SNP.

Statistical analysis

Continuous variables, expressed as mean (SD), were compared with the Student' *t* test or the Mann-Whitney *U* test, each when adequate, depending on their Gaussian distribution. A *p* value < 0.05 was considered significant. Categorical variables were compared with the χ^2 or the Fisher exact tests, each when appropriate, and the effect of differences was established by calculating the odds ratio with the 95% confidence interval.

The variables different at a *p* value < 0.05 in the univariate analysis were included in a multivariate analysis based on a logistic regression model to identify which ones were independently related to the determined SNP in the vicinity of the *IL28B* gene.

3. Results

Group 1 (Chronic hepatitis C)

Five hundred and twelve patients were included. Patient profiles are shown in Table 1. Most patients were men (55,66%). All patients were Caucasian, mostly Spaniards. One hundred eighty (35.15%) carried the rs12979860CC homozygous genotype, whereas the remaining 332 (64,84%) were homo- (64 patients, 12.5%) or heterozygotes (268 patients, 52.34%) for the T allele. The studied polymorphism was in Hardy-Weinberg equilibrium.

Biochemical baseline data that showed differences at a *p* value < 0.05 when comparing carriers of the rs12979860CC genotype with carriers of the rs12979860CT/TT genotypes were ALT (0.012), AST/ALT ratio (<0.001) , GGT (*p* < 0.001), and serum cholesterol (*p* = 0.022). In the multivariate analysis only lower values for GGT (*p* <0.001) and higher values for ALT (*p* = 0.001) were related with the 12979860CC genotype. (Table 1)

Necroinflammatory grade and fibrosis stage were not related with the rs12979860 genotype. (Table 2).

Liver steatosis was present in a greater percentage of carriers of the T allele than in CC homozygotes (odds ratio. = 1,789; 95 % I.C. = 1,085 – 2,950) and there was a significant trend towards higher grades of steatosis in carriers of the T allele (Chi2 TL = 5,194, $P = 0,023$) (Table 2).

Group 2 (HCV-related hepatocellular carcinoma)

One hundred and thirty four patients (97 males, mean age at diagnosis 67.4 years, SD 9.4, range 41-88) were included in this group. All were white Spaniards. The diagnosis of HCC was based on the pathological exam of surgical biopsy or cytological aspirate in 73 patients, and according with current imaging criteria in the remaining 61. All patients in this group had detectable titers of anti-HCV antibodies in serum. Only two patients had been previously treated with interferon-ribavirin before developing HCC.

Fifty two patients (38.8 %) carried the rs12979860CC homozygous genotype, whereas the remaining 82 were homo- (16 patients, 11.9 %) or heterozygotes (66 patients, 49.3 %) for the T allele. (Table 3).

Former ethanol use ≥ 40 g/day was reported by 52 patients (50 men). The distribution of the analyzed SNP was very similar as comparing these patients with moderate drinkers or teetotallers ($P > 0.80$ for each comparison, data not shown).

Comparative analysis of HCV-infected patients with and without HCC

To evaluate the possible relation between the analyzed *IL28B* SNP and the stage of the HCV-induced liver disease, the CHC patients in the chronic hepatitis group who had not received antiviral therapy after performing the liver biopsy were compared with the group of patients with hepatocellular carcinoma. No significant differences were found between both groups in the distribution of the studied *IL28B* gene SNP (Table 3).

4. Discussion.

The relation between genetic polymorphisms in the vicinity of the *IL28* gene and the response to pegylated interferon and ribavirin combined therapy for hepatitis C has been clearly demonstrated since the rs12979860 SNP was identified. Several GWAS studies independently disclosed that the possession of any of the homozygous genotypes rs12979860CC or rs8099917TT, which are in strong linkage disequilibrium, greatly increases the probability to obtain sustained viral response after antiviral treatment. However, information on the possible influence of these polymorphisms on the course of hepatitis C infection is presently very limited and incomplete. It has been shown that the carriers of the favourable genotypes have a higher rate of spontaneous clearance of HCV during the acute phase of the infection. In this study we have shown that GGT levels are lower in patients with chronic hepatitis C that carry the rs12979860CC genotype than in homo- or heterozygotes for the T mutated allele. Abe *et al.*, in a cohort of 364 adult Japanese patients with chronic HCV infection, reported a similar and highly significant ($p = 0.001$) association between the rs8099917TT genotype and GGT lower values, a link that could be explained because both traits are predictive of a favourable response to therapy.

In addition, we have found that rs12979860CC genotype is associated with higher serum ALT than the remaining genotypes, a finding that is in agreement with data of Thompson *et al.* obtained from a GWAS study that disclosed that only the rs12979860 SNP was significantly associated with baseline ALT levels. Serum ALT is considered as a marker of necroinflammatory activity in the liver as confirms the analysis of our data that shows a linear increase of ALT levels related to METAVIR activity score. These findings are contradictory with those reported by Abe *et al.* who found that ALT and AST levels were lower in carrier of the rs8099917TT genotype, although these authors do not provide the level of significance for this association.

However, our results do not confirm the suggested relation between the *IL28B* gene polymorphism and the histological necroinflammatory activity reported by Abe *et al.* and Thompson *et al.* Most patients included in the present study were infected with HCV genotype 1. Hence, we have not been able to confirm the interesting results reported by Bochud *et al.* linking the rs8099917G allele, that is associated with poor response to therapy, with lower necroinflammatory activity ($p = 0.04$) and milder fibrosis ($p = 0.02$) in patients infected with non-1 HCV genotypes.

The relation between *IL28B* polymorphism and the stage of fibrosis is controversial. Abe *et al.* found higher fibrosis METAVIR scores among carriers of the rs8099917TT genotype. However, Di Marco *et al.* in a group of 131 patients with thalassemia major and chronic HCV infection who underwent a liver biopsy reported that older age and the carrier state of the minor alleles at rs12979860 and rs8099917 sites were associated with more severe liver fibrosis ($p < 0.001$ and $p < 0.005$, respectively). Falletti *et al.* in a group of 629 HCV-positive patients, disclosed that subjects with the rs12979860TT homozygous genotype had a mean fibrosis score higher than the remaining CC or CT genotypes ($p < 0.05$). Nevertheless, Thompson *et al.* reported that the rs12979860 polymorphism was not associated with advanced hepatic fibrosis in CHC, a finding that is in agreement with our results that are far from the statistical significance for the determined SNP.

Fabris *et al.* analysed the distribution of rs12979860 C and T alleles in a miscellaneous group of Italian patients with chronic liver diseases, most HCV-related, including patients with mild hepatitis (Ishak staging score ≤ 2), cirrhosis and HCC. They concluded that the T allele is more prevalent in HCV-induced cirrhosis than in cirrhosis from other causes ($p < 0.005$) but not when comparing HCV-induced cirrhosis with milder hepatitis C ($p = 0.09$).

Hepatic steatosis is a frequent finding in chronic hepatitis C, as a probable consequence of a disturbance of lipid metabolism. Our study shows that steatosis is significantly more

frequent in CHC patients carrying the mutated T allele, in agreement with two previous studies. Tillmann et al analysed two independent cohorts of patients with a global size of 325 patients with chronic hepatitis C; steatosis was present in 28 of 88 rs12979860CC genotype patients (31.8%) and in 139 of 237 patients carrying the rs12979860T allele (58.6%). These differences were highly significant when each group was analysed separately (as did the authors) or when considering them as a unique group (Odds ratio = 3.04, 95 % C.I. = 1.81-5.10). In the second study that included 153 Japanese patients, the analysis of the rs8099917 genotype yielded similar results. A new aspect disclosed in our study is that steatosis is not only more frequent, but also more severe in patients carrying the mutated T allele.

Hepatocellular carcinoma (CHC) represents the most advanced step in the natural course of chronic hepatitis C infection that fortunately is reached only by a minority of patients. If the hypothesis of the existence of any relationship between the *IL28B* genetic polymorphism and the severity of HCV-induced liver disease holds true, the most logical finding should be the existence of differences in the genotype frequencies among the different stages of the disease. We have found no differences in the frequencies of the *IL28B* genotypes as comparing a group of HCV-induced HCC patients with a group of untreated patients with CHC. Our results are coincidental with those reported by other groups, both in Caucasian and in Japanese populations. However, Asahina *et al.* reported that carriers of the rs8099917 TT genotype had a higher rate of sustained viral response to interferon-based therapy (as expected) and that this genotype was associated with a lower incidence of HCC, both in sustained viral responders and in non-responders. A direct effect of the *IL28B* polymorphism on the risk of HCC may not be inferred from these results, as SVR clearly improves the natural course of chronic HCV infection and, among non-responders, the effect of the *IL28B* polymorphism was indirect and associated with

slightly lower levels of ALT and alpha-feto protein. Eurich et al., in a study of patients who received a liver graft due to severe HCV-induced liver disease, found that the 12979860TT genotype was more frequent in the 61 patients with HCC on the explanted liver than in the 106 patients without HCC ($p = 0.041$), suggesting that the major C allele plays a protective role against the development of HCC. In addition, Ren *et al.* found that the rs12979860 T allele was related to the susceptibility of both chronic hepatitis B virus (HBV) infection and HBV-related HCC in a group of Chinese patients. Thus, controversy remains about the possible relation between the *IL28B* gene polymorphism and the risk of developing HCC.

We conclude that the *IL28B* rs12979860CC genotype in patients with chronic hepatitis C is related with higher serum ALT, that is considered as a marker of hepatic necroinflammation, and with lower values of GGT, which increase is a surrogate marker of liver fibrosis and a negative predictive factor of response to therapy. In addition, the carrier state of the rs12979860 T allele is associated with greater frequency and severity of hepatic steatosis in chronic hepatitis C. However, we have not found any relation among this polymorphism and necroinflammatory grade and fibrosis stage directly shown by the liver biopsy, neither with the risk of developing HCV-related hepatocellular carcinoma.

Bibliografía.

- (1) Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, Kaslow RA, Margolis HS. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 1999; 341(8):556-62.
- (2) Wiese M, Grungreiff K, Guthoff W, Lafrenz M, Oesen U, Porst H. Outcome in a hepatitis C (genotype 1b) single source outbreak in Germany--a 25-year multicenter study. *J Hepatol* 2005;43(4):590-8.
- (3) Thein HH, Yi Q, Dore GJ, Krahn MD. Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression. *Hepatology*. 2008;48(2):418
- (4) Hu KQ, Tong MJ. The long-term outcomes of patients with compensated hepatitis C virus-related cirrhosis and history of parenteral exposure in the United States. *Hepatology*. 1999;29(4):1311.
- (5) Thompson AJ, Clark PJ, Fellay J, Muir AJ, Tillmann HL, Clark PJ, Naggie S, Fellay I, Ge D, McCarthy JJ, Goldstein DB, McHutchison JG. IL28B genotype is not associated with advanced hepatic fibrosis in chronic hepatitis C patients enrolled in the IDEAL study. *Hepatology* 2010; 52 (Suppl): 437A-438A.
- (6) Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, Kidd J, Kidd K, Khakoo SI, Alexander G, Goedert JJ, Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG, Goldstein DB, Carrington M. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009;461(7265):798-801.

(7) Tillmann HL, Thompson AJ, Patel K, Wiese M, Tenckhoff H, Nischalke HD, Lokhnygina Y, Kullig U, Göbel U, Capka E, Wiegand J, Schiefke I, Güthoff W, Grüngreiff K, König I, Spengler U, McCarthy J, Shianna KV, Goldstein DB, McHutchison JG, Timm J, Nattermann J; A polymorphism near IL28Bis associated with spontaneous clearance of acute hepatitis C virus and jaundice. *Gastroenterology* 2010;139(5):1586-92, 1592.

(8) Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, Ge D, Fellay J, Shianna KV, Urban T, Afdhal NH, Jacobson IM, Esteban R, Poordad F, Lawitz EJ, McCone J, Shiffman ML, Galler GW, Lee WM, Reindollar R, King JW, Kwo PY, Ghalib RH, Freilich B, Nyberg LM, Zeuzem S, Poynard T, Vock DM, Pieper KS, Patel K, Tillmann HL, Noviello S, Koury K, Pedicone LD, Brass CA, Albrecht JK, Goldstein DB, McHutchison JG. Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2010;139(1):120-9.

(9) Abe H, Hayes CN, Ochi H, Maekawa T, Tsuge M, Miki D, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Kubo M, Nakamura Y, Chayama K. IL28 variation affects expression of interferon stimulated genes and peg-interferon and ribavirin therapy. *J Hepatol* 2011 Jun;54(6):1094-101.

(10) Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244(4902):359-62.

(11) Shimizu YK, Feinstone SM, Kohara M, Purcell RH, Yoshikura H. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology* 1996; 23(2):205-9.

(12) Wong DK, Dudley DD, Dohrenwend PB, Lauer GM, Chung RT, Thomas DL, Walker BD. Detection of diverse hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes in peripheral blood of infected persons by screening for responses to all translated proteins of HCV. *J Virol* 2001; 75(3):1229-35.

(13) Shepherd RJ, Francki RI, Hirth L, Hollings M, Inouye T, MacLeod R, Purcifull DE, Sinha RC, Tremaine JH, Valenta V, Wetter C. New groups of plant viruses approved by the

International Committee on Taxonomy of Viruses, September 1975. *Intervirology* 1975;6(3):181-4.

(14) Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2000; 81(Pt 7):1631-48.

(15) Li X, Jeffers LJ, Shao L, Reddy KR, De Medina M, Scheffel J, Moore B, Schiff ER. Identification of hepatitis C virus by immunoelectron microscopy. *J Viral Hepat* 1995;2(5):227-34.

(16) Major ME, Feinstone SM. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 25(6):1527-38.

(17) Rosenberg S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J Mol Biol* 2001; 313(3):451-64.

(18) Kato N. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* 2001; 55(3):133-59.

(19) Carrick RJ, Schlauder GG, Peterson DA, Mushahwar IK. Examination of the buoyant density of hepatitis C virus by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1992; 39(3):279-89.

(20) Kolykhalov AA, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol* 2000; 74(4):2046-51.

(21) Shimoike T, Mimori S, Tani H, Matsuura Y, Miyamura T. Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *J Virol* 1999; 73(12):9718-25.

(22) Lai MM. Hepatitis C virus proteins: direct link to hepatic oxidative stress, steatosis, carcinogenesis and more. *Gastroenterology* 2002; 122(2):568-71.

(23) McLauchlan J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* 2000; 7(1):2-14.

(24) Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 ; 96(22):12766-71.

- (25) Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; 282(5390):938-41.
- (26) Kmiecik D, Biernacka-Lukanty J, Migdalski P, Turek-Plewa J, Wierzbicki A, Juszczyk J, Trzeciak WH. A correlation between the heterogeneity of hypervariable region 1 of E2 glycoprotein of Hepatitis C virus (HCV) and HCV antibody profile: a case study. *Acta Virol* 2005;49(2):97-103.
- (27) Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J Virol* 1993; 67(5):2832-43.
- (28) Kim JL, Morgenstern KA, Griffith JP, Dwyer MD, Thomson JA, Murcko MA, Lin C, Caron PR. Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure* 1998; 6(1):89-100.
- (29) Gale M, Jr., Blakely CM, Kwieciszewski B, Tan SL, Dossett M, Tang NM, Korth MJ, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol* 1998; 18(9):5208-18.
- (30) Arima N, Kao CY, Licht T, Padmanabhan R, Sasaguri Y, Padmanabhan R. Modulation of cell growth by the hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *J Biol Chem* 2001; 276(16):12675-84.
- (31) Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, Vona G, Topilco A, Chretien Y, Koike K, Pessayre D, Chapman J, Barba G, Bréchet C. Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. *FASEB J* 2002 Feb;16(2):185-94.
- (32) Lesburg CA, Radfar R, Weber PC. Recent advances in the analysis of HCV NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Curr Opin Investig Drugs* 2000; 1(3):289-96.
- (33) Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5(6):453-63.

- (34) Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995; 15(1):41-63.
- (35) Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, Hall JE, Mason TJ, Saracco G, Bonino F, Crawford K, Marion CD, Crawford KA. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(8):3468-72.
- (36) Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, Strazzer 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; 288(5464):339-44.
- (37) Alberti A. Towards more individualised management of hepatitis C virus patients with initially or persistently normal alanineaminotransferase levels. *J Hepatol* 2005; 42(2):266-74.
- (38) National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C: 2002--June 10-12, 2002. *Hepatology* 2002; 36(5 Suppl 1):S3-20.
- (39) Kim WR. The burden of hepatitis C in the United States. *Hepatology* 2002; 36(5 Suppl 1):S30-S34.
- (40) Sola R, Cruz De CE, Hombrados M, Planas R, Coll S, Jordi R, Sunyer J, Covas MI, Marrugat J. Prevalence of hepatitis B and hepatitis C viruses in different counties of Catalonia, Spain: cross-sectional study. *Med Clin (Barc)* 2002;119(3):90-5.
- (41) Briggs ME, Baker C, Hall R, Gaziano JM, Gagnon D, Bzowej N, Wright TL. Prevalence and risk factors for hepatitis C virus infection at an urban Veterans Administration medical center. *Hepatology* 2001; 34(6):1200-5.
- (42) Cheung RC, Hanson AK, Maganti K, Keeffe EB, Matsui SM. Viral hepatitis and other infectious diseases in a homeless population. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34(4):476-80.
- (43) Lau JY, Davis GL, Prescott LE, Maertens G, Lindsay KL, Qian K, Mizokami M, Simmonds P. Distribution of hepatitis C virus genotypes determined by line probe assay in patients with chronic hepatitis C seen at tertiary referral centers in the United States. Hepatitis Interventional Therapy Group. *Ann Intern Med* 1996; 124(10):868-76.

- (44) Alter MJ. Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36(5 Suppl 1):S93-S98.
- (45) Pereira BJ, Milford EL, Kirkman RL, Levey AS. Transmission of hepatitis C virus by organ transplantation. *N Engl J Med* 1991; 325(7):454-60.
- (46) van der Poel CL. Hepatitis C virus and blood transfusion: past and present risks. *J Hepatol* 1999; 31 (Suppl 1):101-6.
- (47) Esteban JI, Gonzalez A, Hernandez JM, Viladomiu L, Sanchez C, Lopez-Talavera JC, Lucea D, Martin-Vega C, Vidal X, Esteban R. Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a study of transfusion-associated hepatitis. *N Engl J Med* 1990; 323(16):1107-12.
- (48) Vrieling H, Reesink HW, van den Burg PJ, Zaaijer HL, Cuypers HT, Lelie PN, van der Poel CL. Performance of three generations of anti-hepatitis C virus enzyme-linked immunosorbent assays in donors and patients. *Transfusion* 1997; 37(8):845-9.
- (49) Fornis X, Fernandez-Llama P, Pons M, Costa J, Ampurdanes S, Lopez-Labrador FX, Olmedo E, López-Pedret J, Darnell A, Revert L, Sánchez-Tapias JM, Rodés J. Incidence and risk factors of hepatitis C virus infection in a haemodialysis unit. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12(4):736-40.
- (50) Sanchez-Tapias JM. Nosocomial transmission of hepatitis C virus. *J Hepatol* 1999; 31 (Suppl 1):107-12.
- (51) Sulkowski MS, Ray SC, Thomas DL. Needlestick transmission of hepatitis C. *JAMA* 2002; 287(18):2406-13.
- (52) Esteban JI, Gomez J, Martell M, Cabot B, Quer J, Camps J, González A, Otero T, Moya A, Esteban R. Transmission of hepatitis C virus by a cardiac surgeon. *N Engl J Med* 1996; 334(9):555-60.
- (53) Hernandez ME, Bruguera M, Puyuelo T, Barrera JM, Sanchez Tapias JM, Rodes J. Risk of needle-stick injuries in the transmission of hepatitis C virus in hospital personnel. *J Hepatol* 1992; 16(1-2):56-8.

- (54) Suzuki K, Mizokami M, Lau JY, Mizoguchi N, Kato K, Mizuno Y, Sodeyama T, Kiyosawa K, Gojobori T. Confirmation of hepatitis C virus transmission through needlestick accidents by molecular evolutionary analysis. *J Infect Dis* 1994; 170(6):1575-8.
- (55) Allander T, Gruber A, Naghavi M, Beyene A, Soderstrom T, Bjorkholm M, Grillner L, Persson MA. Frequent patient-to-patient transmission of hepatitis C virus in a haematology ward. *Lancet* 1995; 345(8950):603-7.
- (56) Martinez-Bauer E, Fornis X. Antiviral treatment in liver cirrhosis due to hepatitis C virus. *Gastroenterol Hepatol* 2003; 26(5):303-6.
- (57) Conry-Cantilena C, VanRaden M, Gible J, Melpolder J, Shakil AO, Viladomiu L, Cheung L, DiBisceglie A, Hoofnagle J, Shih JW. Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1996 Jun 27;334(26):1691-6.
- (58) Terrault NA. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36(5 Suppl 1):S99-105.
- (59) Wejstal R. Sexual transmission of hepatitis C virus. *J Hepatol* 1999; 31(Suppl 1):92-5.
- (60) Meisel H, Reip A, Faltus B, Lu M, Porst H, Wiese M, Roggendorf M, Krüger DH. Transmission of hepatitis C virus to children and husbands by women infected with contaminated anti-D immunoglobulin. *Lancet* 1995; 345(8959):1209-11.
- (61) Power JP, Davidson F, O'Riordan J, Simmonds P, Yap PL, Lawlor E. Hepatitis C infection from anti-D immunoglobulin. *Lancet* 1995; 346(8971):372-3.
- (62) Zarski JP, Leroy V. Counselling patients with hepatitis C. *J Hepatol* 1999; 31(Suppl 1):136-40.
- (63) Okamoto M, Nagata I, Murakami J, Kaji S, Iitsuka T, Hoshika T, Matsuda R, Tazawa Y, Shiraki K, Hino S. Prospective reevaluation of risk factors in mother-to-child transmission of hepatitis C virus: high virus load, vaginal delivery, and negative anti-NS4 antibody. *J Infect Dis* 2000; 182(5):1511-4.
- (64) Roberts EA, Yeung L. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2002; 36(5 Suppl 1):S106-S113.

- (65) Zanetti AR, Tanzi E, Newell ML. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *J Hepatol* 1999; 31 (Suppl 1):96-100.
- (66) Ohto H, Terazawa S, Sasaki N, Sasaki N, Hino K, Ishiwata C, Kako M, Ujii N, Endo C, Matsui A. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. The Vertical Transmission of Hepatitis C Virus Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 1994; 330(11):744-50.
- (67) Rodriguez-Luna H, Vargas HE, Sharma P, Ortiz J, De PG, Balan V, Byrne T, Moss A, Mulligan D, Rakela J, Douglas DD. Hepatitis C virus recurrence in living donor liver transplant recipients. *Dig Dis Sci* 2004 Jan;49(1):38-41.
- (68) Levy R, Tardy JC, Bourlet T, Cordonier H, Mion F, Lornage J, Guerin JF. Transmission risk of hepatitis C virus in assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000; 15(4):810-6.
- (69) Farci P, Purcell RH. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin Liver Dis* 2000; 20(1):103-26.
- (70) Cerny A, Chisari FV. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* 1999; 30(3):595-601.
- (71) McCaughan GW, Zekry A. Mechanisms of HCV reinfection and allograft damage after liver transplantation. *J Hepatol* 2004; 40(3):368-74.
- (72) Desmet VJ. Immunopathology of chronic viral hepatitis. *Hepatogastroenterology* 1991; 38(1):14-21.
- (73) Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(2):351-66.
- (74) Nelson DR, Marousis CG, Davis GL, Rice CM, Wong J, Houghton M, Lau JY. The role of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C. *J Immunol* 1997; 158(3):1473-81.
- (75) Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, Hoffmann R, Schirren CA, Santantonio T, Pape GR. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 1999; 117(4):933-41.

- (76) Gonzalez-Amaro R, Garcia-Monzon C, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R, Alonso JL, Yague E, Pivel JP, López-Cabrera M, Fernández-Ruiz E, Sánchez-Madrid F. Induction of tumor necrosis factor alpha production by human hepatocytes in chronic viral hepatitis. *J Exp Med* 1994; 179(3):841-8.
- (77) Heydtmann M, Shields P, McCaughan G, Adams D. Cytokines and chemokines in the immune response to hepatitis C infection. *Curr Opin Infect Dis* 2001; 14(3):279-87.
- (78) 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(2):449-58.
- (79) Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1999; 19(2):129-40.
- (80) Luster AD. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338(7):436-45.
- (81) Zhu N, Khoshnan A, Schneider R, Matsumoto M, Dennert G, Ware C, Lai MM. Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol* 1998; 72(5):3691-7.
- (82) Lee JH, Teuber G, von WM, Roth WK, Zeuzem S. Antiviral effect of human recombinant interleukin-12 in patients infected with hepatitis C virus. *J Med Virol* 2000; 60(3):264-8.
- (83) Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 2000; 342(18):1350-8.
- (84) Verma V, Chakravarti A, Kar P. Cytokine levels of TGF-beta, IL-10, and sTNFalphaRII in type C chronic liver disease. *Dig Dis Sci* 2008; 53(8):2233-7.
- (85) Garcia-Monzon C, Sanchez-Madrid F, Garcia-Buey L, Garcia-Arroyo A, Garcia-Sanchez A, Moreno-Otero R. Vascular adhesion molecule expression in viral chronic hepatitis: evidence of neoangiogenesis in portal tracts. *Gastroenterology* 1995; 108(1):231-41.
- (86) Neuman MG, Benhamou JP, Bourliere M, Ibrahim A, Malkiewicz I, Asselah T, Martinot-Peignoux M, Shear NH, Katz GG, Akremi R, Benali S, Boyer N, Lecomte L, Le Breton V, Le Guludec G, Marcellin P. Serum tumour necrosis factor-alpha and transforming growth

factor-beta levels in chronic hepatitis C patients are immunomodulated by therapy. *Cytokine* 2002; 17(2):108-17.

(87) Majano PL, Garcia-Monzon C, Lopez-Cabrera M, Lara-Pezzi E, Fernandez-Ruiz E, Garcia-Iglesias C, Borque MJ, Moreno-Otero R. Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis. Evidence for a virus-induced gene upregulation. *J Clin Invest* 1998; 101(7):1343-52.

(88) Garcia-Monzon C, Majano PL, Zubia I, Sanz P, Apolinario A, Moreno-Otero R. Intrahepatic accumulation of nitrotyrosine in chronic viral hepatitis is associated with histological severity of liver disease. *J Hepatol* 2000; 32(2):331-8.

(89) Seeff LB. Natural history of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26(3 Suppl 1):21S-8S.

(90) Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PY, Miller JK, Gerber MA, Sampliner RE. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med* 1992; 327(27):1899-905.

(91) Tremolada F, Casarin C, Alberti A, Drago C, Tagger A, Ribero ML, Realdi G. Long-term follow-up of non-A, non-B (type C) post-transfusion hepatitis. *J Hepatol* 1992; 16(3):273-81.

(92) Farci P, Alter HJ, Shimoda A, Govindarajan S, Cheung LC, Melpolder JC, Sacher RA, Shih JW, Purcell RH. Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure. *N Engl J Med* 1996; 335(9):631-4.

(93) Large MK, Kittleson DJ, Hahn YS. Suppression of host immune response by the core protein of hepatitis C virus: possible implications for hepatitis C virus persistence. *J Immunol* 1999; 162(2):931-8.

(94) Villano SA, Vlahov D, Nelson KE, Cohn S, Thomas DL. Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. *Hepatology* 1999; 29(3):908-14.

(95) Ishii K, Rosa D, Watanabe Y, Katayama T, Harada H, Wyatt C, Kiyosawa K, Aizaki H, Matsuura Y, Houghton M, Abrignani S, Miyamura T. High titers of antibodies inhibiting

the binding of envelope to human cells correlate with natural resolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998; 28(4):1117-20.

(96) Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han JH, Hanson HL, Ghayeb J, Murthy KK, Rice CM, Walker CM. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 2003 ; 302(5645):659-62.

(97) Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 1997; 26(3 Suppl 1):15S-20S.

(98) Persico M, Persico E, Suozzo R, Conte S, De SM, Coppola L, Palmentieri B, Sasso FC, Torella R. Natural history of hepatitis C virus carriers with persistently normal aminotransferase levels. *Gastroenterology* 2000; 118(4):760-4.

(99) Donato F, Tagger A, Chiesa R, Ribero ML, Tomasoni V, Fasola M, Gelatti U, Portera G, Boffetta P, Nardi G. Hepatitis B and C virus infection, alcohol drinking, and hepatocellular carcinoma: a case-control study in Italy. *Brescia HCC Study. Hepatology* 1997 Sep;26(3):579-84.

(100) Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le BB, Chanteloup E, Haaser M, Darriet M, Couzigou P, De Lédighen V. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005; 128(2):343-50.

(101) Gomez-Dominguez E, Mendoza J, Rubio S, Moreno-Monteagudo JA, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R. Transient elastography: a valid alternative to biopsy in patients with chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24(3):513-8.

(102) Fattovich G, Giustina G, Degos F, Tremolada F, Diodati G, Almasio P, Nevens F, Solinas A, Mura D, Brouwer JT, Thomas H, Njapoum C, Casarin C, Bonetti P, Fuschi P, Basho J, Tocco A, Bhalla A, Galassini R, Noventa F, Schalm SW, Realdi G. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 1997; 112(2):463-72.

(103) Di Bisceglie AM. Natural history of hepatitis C: its impact on clinical management. *Hepatology* 2000; 31(4):1014-8.

- (104) Ikeda K, Saitoh S, Koida I, Arase Y, Tsubota A, Chayama K, Kumada H, Kawanishi M. A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis: a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis. *Hepatology* 1993; 18(1):47-53.
- (105) Tsukuma H, Hiyama T, Tanaka S, Nakao M, Yabuuchi T, Kitamura T, Nakanishi K, Fujimoto I, Inoue A, Yamazaki H. Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med* 1993; 328(25):1797-801.
- (106) Di Bisceglie AM. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997; 26(3 Suppl 1):34S-8S.
- (107) Shibata M, Morizane T, Uchida T, Yamagami T, Onozuka Y, Nakano M, Mitamura K, Ueno Y. Irregular regeneration of hepatocytes and risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis and cirrhosis with hepatitis-C-virus infection. *Lancet* 1998; 351(9118):1773-7.
- (108) El-Serag HB, Richardson PA, Everhart JE. The role of diabetes in hepatocellular carcinoma: a case-control study among United States Veterans. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(8):2462-7.
- (109) Scott JD, Gretch DR. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: a systematic review. *JAMA* 2007; 297(7):724-32.
- (110) Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244(4902):362-4.
- (111) Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology* 2002; 122(6):1554-68.
- (112) Morishima C, Gretch DR. Clinical use of hepatitis C virus tests for diagnosis and monitoring during therapy. *Clin Liver Dis* 1999; 3(4):717-40.
- (113) Seeff LB, Hoofnagle JH. National Institutes of Health Consensus Development Conference: management of hepatitis C: 2002. *Hepatology* 2002; 36(5 Suppl 1):S1-S2.
- (114) Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Pawlotsky JM. Performance of the Abbott real-time PCR assay using m2000sp and m2000rt for hepatitis C virus RNA quantification. *J Clin Microbiol* 2009; 47(6):1726-32.

- (115) Ross RS, Viazov SO, Hoffmann S, Roggendorf M. Performance characteristics of a transcription-mediated nucleic acid amplification assay for qualitative detection of hepatitis C virus RNA. *J Clin Lab Anal* 2001;15(6):308-13.
- (116) Caliendo AM, Valsamakis A, Zhou Y, Yen-Lieberman B, Andersen J, Young S, Ferreira-Gonzalez A, Tsongalis GJ, Pyles R, Bremer JW, Lurain NS. Multilaboratory comparison of hepatitis C virus viral load assays. *J Clin Microbiol* 2006 May;44(5):1726-32.
- (117) Davis GL. Hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Am J Med* 1999; 107(6B):21S-6S.
- (118) Lee JH, Roth WK, Zeuzem S. Evaluation and comparison of different hepatitis C virus genotyping and serotyping assays. *J Hepatol* 1997; 26(5):1001-9.
- (119) Puoti M, Zonaro A, Ravaggi A, Marin MG, Castelnuovo F, Cariani E. Hepatitis C virus RNA and antibody response in the clinical course of acute hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1992; 16(4):877-81.
- (120) 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; 38(2):575-7.
- (121) Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997; ;349(9055):825-32.
- (122) Freeman AJ, Dore GJ, Law MG, Thorpe M, Von OJ, Lloyd AR, Marinos G, Kaldor JM. Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001; 34(4 Pt 1):809-16.
- (123) Khan MH, Farrell GC, Byth K, Lin R, Weltman M, George J, Samarasinghe D, Kench J, Kaba S, Crewe E, Liddle C. Which patients with hepatitis C develop liver complications? *Hepatology* 2000; 31(2):513-20.
- (124) Wiley TE, McCarthy M, Breidi L, McCarthy M, Layden TJ. Impact of alcohol on the histological and clinical progression of hepatitis C infection. *Hepatology* 1998; 28(3):805-9.

- (125) Pessione F, Ramond MJ, Njapoum C, Duchatelle V, Degott C, Erlinger S, Rueff B, Valla DC, Degos F. Cigarette smoking and hepatic lesions in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001; 34(1):121-5.
- (126) Benhamou Y, Bochet M, Di M, V, Charlotte F, Azria F, Coutellier A, Vidaud M, Bricaire F, Opolon P, Katlama C, Poynard T. Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multivirc Group. *Hepatology* 1999; 30(4):1054-8.
- (127) Adinolfi LE, Gambardella M, Andreana A, Tripodi MF, Utili R, Ruggiero G. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology* 2001; 33(6):1358-64.
- (128) Hourigan LF, Macdonald GA, Purdie D, Whitehall VH, Shorthouse C, Clouston A, Powell EE. Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis. *Hepatology* 1999; 29(4):1215-9.
- (129) Ong JP, Younossi ZM, Speer C, Olano A, Gramlich T, Boparai N. Chronic hepatitis C and superimposed nonalcoholic fatty liver disease. *Liver* 2001; 21(4):266-71.
- (130) Vento S, Garofano T, Renzini C, Cainelli F, Casali F, Ghironzi G, Ferraro T, Concia E. Fulminant hepatitis associated with hepatitis A virus superinfection in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 1998; 338(5):286-90.
- (131) Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med* 1999; 341(1):22-6.
- (132) Pradat P, Alberti A, Poynard T, Esteban JI, Weiland O, Marcellin P, Badalamenti S, Trépo C. Predictive value of ALT levels for histologic findings in chronic hepatitis C: a European collaborative study. *Hepatology* 2002; 36(4 Pt 1):973-7.
- (133) Ghany MG, Kleiner DE, Alter H, Doo E, Khokar F, Promrat K, Herion D, Park Y, Liang TJ, Hoofnagle JH. Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003; 124(1):97-104.

- (134) El-Serag HB, Mason AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 1999; 340(10):745-50.
- (135) Lopez-Labrador FX, Ampurdanes S, Forns X, Castells A, Saiz JC, Costa J, Bruix J, Sánchez Tapias JM, Jiménez de Anta MT, Rodés J. Hepatitis C virus (HCV) genotypes in Spanish patients with HCV infection: relationship between HCV genotype 1b, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1997; 27(6):959-65.
- (136) Benvegnu L, Pontisso P, Cavalletto D, Noventa F, Chemello L, Alberti A. Lack of correlation between hepatitis C virus genotypes and clinical course of hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatology* 1997; 25(1):211-5.
- (137) Ray SC, Wang YM, Laeyendecker O, Ticehurst JR, Villano SA, Thomas DL. Acute hepatitis C virus structural gene sequences as predictors of persistent viremia: hypervariable region 1 as a decoy. *J Virol* 1999; 73(4):2938-46.
- (138) Medina J, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R. Hepatitis C virus-related extra-hepatic disease--aetiopathogenesis and management 1. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20(2):129-41.
- (139) Cacoub P, Ratziu V, Myers RP, Ghillani P, Piette JC, Moussalli J, Poynard T; Multivirc Group. Impact of treatment on extra hepatic manifestations in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2002; 36(6):812-8.
- (140) Sansonno D, Dammacco F. Hepatitis C virus, cryoglobulinaemia, and vasculitis: immune complex relations. *Lancet Infect Dis* 2005; 5(4):227-36.
- (141) Friedman SL. Liver fibrosis - from bench to bedside. *J Hepatol* 2003;38 (Suppl 1):S38-S53.
- (142) Atzori L, Poli G, Perra A. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41(8-9):1639-42.
- (143) Solis Herruzo JA. Factors involved in hepatic fibrogenesis. *Gastroenterol Hepatol* 2000; 23(4):186-99.
- (144) Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275(4):2247-50.

- (145) Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21(3):373-84.
- (146) Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K, Oshita M, Katayama K, Kato M, Masuzawa M, Yoshihara H, Naito M, Miyamoto T, Inoue A, Asai A, Hijioka T, Fusamoto H, Kamada T. Circulating matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as serum markers of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Relationship to interferon response. *J Hepatol* 1997; 26(3):574-83.
- (147) Tannapfel A, Wittekind C. Genes involved in hepatocellular carcinoma: deregulation in cell cycling and apoptosis. *Virchows Arch* 2002; 440(4):345-52.
- (148) Colombo M. Hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 1999;19(3):263-9.
- (149) Wang XW, Hussain SP, Huo TI, Wu CG, Forgues M, Hofseth LJ, Brechot C, Harris CC. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology* 2002; 181-182:43-7.
- (150) Dienstag JL. The role of liver biopsy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36(5 Suppl 1):S152-S160.
- (151) Gebo KA, Herlong HF, Torbenson MS, Jenckes MW, Chander G, Ghanem KG, El-Kamary SS, Sulkowski M, Bass EB. Role of liver biopsy in management of chronic hepatitis C: a systematic review. *Hepatology* 2002; 36(5 Suppl 1):S161-S172.
- (152) Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1(5):431-5.
- (153) Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991; 13(3):372-4.
- (154) Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De GJ, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22(6):696-9.

- (155) Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996; 24(2):289-93.
- (156) Siddique I, El-Naga HA, Madda JP, Memon A, Hasan F. Sampling variability on percutaneous liver biopsy in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38(4):427-32.
- (157) Colloredo G, Guido M, Sonzogni A, Leandro G. Impact of liver biopsy size on histological evaluation of chronic viral hepatitis: the smaller the sample, the milder the disease. *J Hepatol* 2003; 39(2):239-44.
- (158) Regev A, Berho M, Jeffers LJ, Milikowski C, Molina EG, Pyrsopoulos NT, Feng ZZ, Reddy KR, Schiff ER. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol* 2002; 97(10):2614-8.
- (159) Maharaj B, Bhoora IG. Complications associated with percutaneous needle biopsy of the liver when one, two or three specimens are taken. *Postgrad Med J* 1992; 68(806):964-7.
- (160) Saito H, Tada S, Nakamoto N, Kitamura K, Horikawa H, Kurita S, Saito Y, Iwai H, Ishii H. Efficacy of non-invasive elastometry on staging of hepatic fibrosis. *Hepatol Res* 2004; 29(2):97-103.
- (161) Fortunato G, Castaldo G, Oriani G, Cerini R, Intriери M, Molinaro E, Gentile I, Borgia G, Piazza M, Salvatore F, Sacchetti L. Multivariate discriminant function based on six biochemical markers in blood can predict the cirrhotic evolution of chronic hepatitis. *Clin Chem* 2001; 47(9):1696-700.
- (162) Lok AS, Ghany MG, Goodman ZD, Wright EC, Everson GT, Sterling RK, Everhart JE, Lindsay KL, Bonkovsky HL, Di Bisceglie AM, Lee WM, Morgan TR, Dienstag JL, Morishima C. Predicting cirrhosis in patients with hepatitis C based on standard laboratory tests: results of the HALT-C cohort. *Hepatology* 2005; 42(2):282-92.
- (163) Nunes D, Fleming C, Offner G, O'Brien M, Tumilty S, Fix O, Heeren T, Koziel M, Graham C, Craven DE, Stuver S, Horsburgh CR Jr. HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 40(5):538-44.

- (164) Sud A, Hui JM, Farrell GC, Bandara P, Kench JG, Fung C, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, McCaughan GW, George J. Improved prediction of fibrosis in chronic hepatitis C using measures of insulin resistance in a probability index. *Hepatology* 2004; 39(5):1239-47.
- (165) Zeng MD, Lu LG, Mao YM, Qiu DK, Li JQ, Wan MB, Chen CW, Wang JY, Cai X, Gao CF, Zhou XQ. Prediction of significant fibrosis in HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B by a noninvasive model. *Hepatology* 2005; 42(6):1437-45.
- (166) Park GJ, Lin BP, Ngu MC, Jones DB, Katelaris PH. Aspartate aminotransferase: alanine aminotransferase ratio in chronic hepatitis C infection: is it a useful predictor of cirrhosis? *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15(4):386-90.
- (167) Forns X, Ampurdanes S, Llovet JM, Aponte J, Quinto L, Martinez-Bauer E, Bruguera M, Sánchez-Tapias JM, Rodés J. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002; 36(4 Pt 1):986-92.
- (168) Wai CT, Greenon JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok AS. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38(2):518-26.
- (169) Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T, MULTIVIRC Group. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001; 357(9262):1069-75.
- (170) Berenguer J, Bellon JM, Miralles P, Alvarez E, Sanchez-Conde M, Cosin J, López JC, Alvarez F, Catalán P, Resino S. Identification of liver fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients using a simple predictive model based on routine laboratory data. *J Viral Hepat* 2007; 14(12):859-69.
- (171) Ladero JM, Delkader J, Ortega L, Fernandez C, Devesa MJ, Lopez-Alonso G, Mayol J, Cuenca F, Suárez A, Taxonera C, Díaz-Rubio M. Non-invasive evaluation of the fibrosis stage in chronic hepatitis C: a comparative analysis of nine scoring methods. *Scand J Gastroenterol* 2010;45(1):51-9.
- (172) Rockey DC, Bissell DM. Noninvasive measures of liver fibrosis. *Hepatology* 2006; 43(2 Suppl 1):S113-S120.

- (173) Mendoza J, Gomez-Dominguez E, Moreno-Otero R. Transient elastography (Fibroscan), a new non-invasive method to evaluate hepatic fibrosis]. *Med Clin (Barc)* 2006; 126(6):220-2.
- (174) Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneh A, Christidis C, Mal F, Kazemi F, de Lédínghen V, Marcellin P, Dhumeaux D, Trinchet JC, Beaugrand M. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41(1):48-54.
- (175) Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, Castera L, Le BB, Adhoute X, Bertet J, Couzigou P, de Lédínghen V. Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut* 2006; 55(3):403-8.
- (176) Shaheen AA, Wan AF, Myers RP. FibroTest and FibroScan for the prediction of hepatitis C-related fibrosis: a systematic review of diagnostic test accuracy. *Am J Gastroenterol* 2007; 102(11):2589-600.
- (177) Kettaneh A, Marcellin P, Douvin C, Poupon R, Ziol M, Beaugrand M, de Lédínghen V. Features associated with success rate and performance of FibroScan measurements for the diagnosis of cirrhosis in HCV patients: a prospective study of 935 patients. *J Hepatol* 2007; 46(4):628-34.
- (178) Aguirre DA, Behling CA, Alpert E, Hassanein TI, Sirlin CB. Liver fibrosis: noninvasive diagnosis with double contrast material-enhanced MR imaging. *Radiology* 2006; 239(2):425-37.
- (179) Aube C, Racineux PX, Lebigot J, Oberti F, Croquet V, Argaud C, Calès P, Caron C. Diagnosis and quantification of hepatic fibrosis with diffusion weighted MR imaging: preliminary results. *J Radiol* 2004; 85(3):301-6.
- (180) Romero-Gomez M, Gomez-Gonzalez E, Madrazo A, Vera-Valencia M, Rodrigo L, Perez-Alvarez R, Pérez-López R, Castellano-Megias VM, Nevado-Santos M, Alcón JC, Solá R, Pérez-Moreno JM, Navarro JM, Andrade RJ, Salmerón J, Fernández-López M, Aznar R, Diago M. Optical analysis of computed tomography images of the liver predicts fibrosis stage and distribution in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2008; 47(3):810-6.

- (181) Zhao Z, Yu N, Fu YX, Li WH. Nucleotide variation and haplotype diversity in a 10-kb noncoding region in three continental human populations. *Genetics* 2006; 174(1):399-409.
- (182) Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999; 234(2):177-86.
- (183) Rocha D, Gut I, Jeffreys AJ, Kwok PY, Brookes AJ, Chanock SJ. Seventh international meeting on single nucleotide polymorphism and complex genome analysis: 'ever bigger scans and an increasingly variable genome'. *Hum Genet* 2006; 119(4):451-6.
- (184) Liu Q, Yang J, Chen Z, Yang MQ, Sung AH, Huang X. Supervised learning-based tagSNP selection for genome-wide disease classifications. *BMC Genomics* 2008; 9 (Suppl 1):S6.
- (185) De AD, Jr., de Andrade DR. The influence of the human genome on chronic viral hepatitis outcome. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2004; 46(3):119-26.
- (186) Lin CY, Chen JY, Lin TN, Jeng WJ, Huang CH, Huang CW, Chang SW, Sheen IS. IL28B SNP rs12979860 Is a Critical Predictor for On-Treatment and Sustained Virologic Response in Patients with Hepatitis C Virus Genotype-1 Infection. *PLoS One*. 2011; 6(3): e18322.
- (187) Kelly C, Klenerman P, Barnes E. Interferon lambdas: the next cytokine storm. *Gut* 2011; 60(9):1284-93.
- (188) Hovanessian AG, Justesen J. The human 2'-5'oligoadenylate synthetase family: unique interferon-inducible enzymes catalyzing 2'-5' instead of 3'-5' phosphodiester bond formation. *Biochimie* 2007 Jun;89(6-7):779-88.
- (189) Suzuki F, Arase Y, Suzuki Y, Tsubota A, Akuta N, Hosaka T, et al. Single nucleotide polymorphism of the MxA gene promoter influences the response to interferon monotherapy in patients with hepatitis C viral infection. *J Viral Hepat* 2004 May;11(3):271-6.
- (190) Urban TJ, Thompson AJ, Bradrick SS, Fellay J, Schuppan D, Cronin KD, et al. IL28B genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon-stimulated genes in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2010 Dec;52(6):1888-96.
- (191) Hartmann R, Justesen J, Sarkar SN, Sen GC, Yee VC. Crystal structure of the 2'-specific and double-stranded RNA-activated interferon-induced antiviral protein 2'-5'-oligoadenylate synthetase. *Mol Cell* 2003; 12(5):1173-85.

- (192) Marques J, Anwar J, Eskildsen-Larsen S, Rebouillat D, Paludan SR, Sen G, Williams BR, Hartmann R. The p59 oligoadenylate synthetase-like protein possesses antiviral activity that requires the C-terminal ubiquitin-like domain. *J Gen Virol* 2008; 89(Pt 11):2767-72.
- (193) Gao QJ, Liu DW, Zhang SY, Jia M, Wang LM, Wu LH, Wang SY, Tong LX. Polymorphisms of some cytokines and chronic hepatitis B and C virus infection. *World J Gastroenterol* 2009; 15(44):5610-9.
- (194) Jeng JE, Tsai HR, Chuang LY, Tsai JF, Lin ZY, Hsieh MY, Chen SC, Chuang WL, Wang LY, Yu ML, Dai CY, Chang JG. Independent and additive interactive effects among tumor necrosis factor-alpha polymorphisms, substance use habits, and chronic hepatitis B and hepatitis C virus infection on risk for hepatocellular carcinoma. *Medicine (Baltimore)* 2009; 88(6):349-57.
- (195) Montes-Cano MA, Garcia-Lozano JR, bad-Molina C, Romero-Gomez M, Barroso N, Aguilar-Reina J, Núñez-Roldán A, González-Escribano MF. Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *Hepatology* 2010 Jul;52(1):33-7.
- (196) Thomas DL, Astemborski J, Rai RM, Anania FA, Schaeffer M, Galai N, Nolt K, Nelson KE, Strathdee SA, Johnson L, Laeyendecker O, Boitnott J, Wilson LE, Vlahov D. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. *JAMA* 2000; 284(4):450-6.
- (197) Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di IJ, Mueller T, Bochud M, Battegay M, Bernasconi E, Borovicka J, Colombo S, Cerny A, Dufour JF, Furrer H, Günthard HF, Heim M, Hirschel B, Malinverni R, Moradpour D, Müllhaupt B, Witteck A, Beckmann JS, Berg T, Bergmann S, Negro F, Telenti A, Bochud PY; Swiss Hepatitis C Cohort Study; Swiss HIV Cohort Study. Genetic variation in IL28Bis associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology* 2010; 138(4):1338-45, 1345.
- (198) Alric L, Fort M, Izopet J, Vinel JP, Charlet JP, Selves J, Puel J, Pascal JP, Duffaut M, Abbal M. Genes of the major histocompatibility complex class II influence the outcome of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 1997; 113(5):1675-81.

- (199) Hong X, Yu RB, Sun NX, Wang B, Xu YC, Wu GL. Human leukocyte antigen class II DQB1*0301, DRB1*1101 alleles and spontaneous clearance of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2005; 11(46):7302-7.
- (200) Kakumu S, Okumura A, Ishikawa T, Yano M, Enomoto A, Nishimura H, Yoshioka K, Yoshika Y. Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in type C chronic liver disease. *Clin Exp Immunol* 1997; 109(3):458-63.
- (201) Knapp S, Warshaw U, Hegazy D, Brackenbury L, Guha IN, Fowell A, Little AM, Alexander GJ, Rosenberg WM, Cramp ME, Khakoo SI. Consistent beneficial effects of killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL3 and group 1 human leukocyte antigen-C following exposure to hepatitis C virus. *Hepatology* 2010; 51(4):1168-75.
- (202) Zuniga J, Romero V, Azocar J, Terreros D, Vargas-Rojas MI, Torres-Garcia D, Jiménez-Alvarez L, Vargas-Alarcón G, Granados-Montiel J, Husain Z, Chung RT, Alper CA, Yunis EJ. Protective KIR-HLA interactions for HCV infection in intravenous drug users. *Mol Immunol* 2009; 46(13):2723-7.
- (203) Montes-Cano MA, Caro-Oleas JL, Romero-Gomez M, Diago M, Andrade R, Carmona I, Aguilar Reina J, Núñez-Roldán A, González-Escribano MF. HLA-C and KIR genes in hepatitis C virus infection. *Hum Immunol* 2005; 66(11):1106-9.
- (204) Dickson SP, Wang K, Krantz I, Hakonarson H, Goldstein DB. Rare variants create synthetic genome-wide associations. *PLoS Biol* 2010; 8(1):e1000294.
- (205) An P, Thio CL, Kirk GD, Donfield S, Goedert JJ, Winkler CA. Regulatory polymorphisms in the interleukin-18 promoter are associated with hepatitis C virus clearance. *J Infect Dis* 2008; 198(8):1159-65.
- (206) Lio D, Caruso C, Di SR, Colonna RG, Ferraro D, Scola L, Crivello A, Licata A, Valenza LM, Candore G, Craxì A, Almasio PL. IL-10 and TNF-alpha polymorphisms and the recovery from HCV infection. *Hum Immunol* 2003; 64(7):674-80.
- (207) Mangia A, Santoro R, Piattelli M, Paziienza V, Grifa G, Iacobellis A, Andriulli A. IL-10 haplotypes as possible predictors of spontaneous clearance of HCV infection. *Cytokine* 2004; 25(3):103-9.

- (208) Barrett S, Collins M, Kenny C, Ryan E, Keane CO, Crowe J. Polymorphisms in tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma, and outcome of hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 2003; 71(2):212-8.
- (209) Constantini PK, Wawrzynowicz-Syczewska M, Clare M, Boron-Kaczmarek A, McFarlane IG, Cramp ME, Donaldson PT. Interleukin-1, interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms in hepatitis C virus infection: an investigation of the relationships with spontaneous viral clearance and response to alpha-interferon therapy. *Liver* 2002; 22(5):404-12.
- (210) Kusumoto K, Uto H, Hayashi K, Takahama Y, Nakao H, Suruki R, Stuver SO, Ido A, Tsubouchi H. Interleukin-10 or tumor necrosis factor-alpha polymorphisms and the natural course of hepatitis C virus infection in a hyperendemic area of Japan. *Cytokine* 2006; 34(1-2):24-31.
- (211) Minton EJ, Smillie D, Smith P, Shipley S, McKendrick MW, Gleeson DC, Underwood JC, Cannings C, Wilson AG; Trent Hepatitis C Study Group. Clearance of hepatitis C virus is not associated with single nucleotide polymorphisms in the IL-1, -6, or -10 genes. *Hum Immunol* 2005; 66(2):127-32.
- (212) Mueller T, Mas-Marques A, Sarrazin C, Wiese M, Halangk J, Witt H, Ahlenstiel G, Spengler U, Goebel U, Wiedenmann B, Schreier E, Berg T. Influence of interleukin 12B (IL12B) polymorphisms on spontaneous and treatment-induced recovery from hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2004; 41(4):652-8.
- (213) Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009; 41(10):1105-9.
- (214) McCarthy JJ, Li JH, Thompson A, Suchindran S, Lao XQ, Patel K, Tillmann HL, Muir AJ, McHutchison JG. Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. *Gastroenterology* 2010; 138(7):2307-14.

- (215) Yan KK, Guirgis M, Dinh T, George J, Dev A, Lee A, Zekry A. Treatment responses in Asians and Caucasians with chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol* 2008; 14(21):3416-20.
- (216) Liu CH, Liu CJ, Lin CL, Liang CC, Hsu SJ, Yang SS, Hsu CS, Tseng TC, Wang CC, Lai MY, Chen JH, Chen PJ, Chen DS, Kao JH. Pegylated interferon-alpha-2a plus ribavirin for treatment-naïve Asian patients with hepatitis C virus genotype 1 infection: a multicenter, randomized controlled trial. *Clin Infect Dis* 2008; 47(10):1260-9.
- (217) Mangia A, Thompson AJ, Santoro R, Piazzolla V, Tillmann HL, Patel K. An IL28B polymorphism determines treatment response of hepatitis C virus genotype 2 or 3 patients who do not achieve a rapid virologic response. *Gastroenterology* 2010; 139(3):821-7.
- (218) Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E, Riordan S, Sheridan D, Smedile A, Fragomeli V, Müller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 2009; 41(10):1100-4.
- (219) Sarrazin C, Susser S, Doehring A, Lange CM, Muller T, Schlecker C, Herrmann E, Löttsch J, Berg T. Importance of IL28B gene polymorphisms in hepatitis C virus genotype 2 and 3 infected patients. *J Hepatol* 2011; 54(3):415-21.
- (220) Li CZ, Kato N, Chang JH, Muroyama R, Shao RX, Dharel N, Sermsathanasawadi R, Kawabe T, Omata M. Polymorphism of OAS-1 determines liver fibrosis progression in hepatitis C by reduced ability to inhibit viral replication. *Liver Int* 2009; 29(9):1413-21.
- (221) Su X, Yee LJ, Im K, Rhodes SL, Tang Y, Tong X, Howell C, Ramcharran D, Rosen HR, Taylor MW, Liang TJ, Yang H; Virahep-C Study Group. Association of single nucleotide polymorphisms in interferon signaling pathway genes and interferon-stimulated genes with the response to interferon therapy for chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2008; 49(2):184-91.
- (222) Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Chayama K. Amino acid substitution in hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin. *Hepatology* 2010; 52(2):421-9.

- (223) Fabris C, Falleti E, Cussigh A, Bitetto D, Fontanini E, Bignulin S, Cmet S, Fornasiere E, Fumolo E, Fangazio S, Cerutti A, Minisini R, Pirisi M, Toniutto P. IL-28B rs12979860 C/T allele distribution in patients with liver cirrhosis: role in the course of chronic viral hepatitis and the development of HCC. *J Hepatol* 2011; 54(4):716-22.
- (224) Tillmann HL, Patel K, Muir AJ, Guy CD, Li JH, Lao XO, Thompson A, Clark PJ, Gardner SD, McHutchison JG, McCarthy JJ. Beneficial IL28B genotype associated with lower frequency of hepatic steatosis in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2011; 55: 1195-200.
- (225) Ognjanovic S, Yuan JM, Chaptman AK, Fan Y, Yu MC. Genetic polymorphisms in the cytokine genes and risk of hepatocellular carcinoma in low-risk non-Asians of USA. *Carcinogenesis* 2009; 30(5):758-62.
- (226) Asahina Y, Tanaka K, Suzuki Y, Tamaki N, Hoshioka T. Association between IL28B gene variation and development of hepatocellular carcinoma after interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2011; 54 (Suppl 1): S37
- (227) Qin H, Liu B, Shi T, Liu Y, Sun Y, Ma Y. Tumour necrosis factor-alpha polymorphisms and hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Int Med Res* 2010; 38(3):760-8.
- (228) Yang Y, Luo C, Feng R, Bi S. The TNF-alpha, IL-1B and IL-10 polymorphisms and risk for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137(6):947-52.
- (229) Falleti E, Fabris C, Toniutto P, Fontanini E, Cussigh A, Bitetto D, Fumolo E, Fornasiere E, Bragagnini W, Pinato DJ, Minisini R, Pirisi M. Interleukin-6 polymorphisms and gender: relationship with the occurrence of hepatocellular carcinoma in patients with end-stage liver disease. *Oncology* 2009; 77(5):304-13.
- (230) Ropero P, Briceño O, López-Alonso G, Agúndez JA, González Fernández FA, García-Hoz F, Villegas Martínez A, Díaz-Rubio M, Ladero JM. The H63D mutation in the HFE gene is related to the risk of hepatocellular carcinoma. *Rev Esp Enferm Dig.* 2007; 99(7):376-81

(231) Agúndez JA, García- Martín E, Devesa MJ, Carballo M, Martínez C, Lee-Brunner A, Fernández C, Díaz-Rubio M, Ladero JM. Polymorphism of the TLR4 gene reduces the risk of hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2012; 82(1):35-40.

(232) Ladero JM, Martínez C, Fernández JM, Martín F, García-Martín E, Ropero P, Villegas A, Díaz-Rubio M, Agúndez JA. Glutathione S-transferases pi 1, alpha 1 and M3 genetic polymorphisms and the risk of hepatocellular carcinoma in humans.. *Pharmacogenomics*. 2007; 8: 895-9.

(233) Witthoft T, Moller B, Wiedmann KH, Mauss S, Link R, Lohmeyer J, Lafrenz M, Gelbmann CM, Hüppe D, Niederau C, Alshuth U. Safety, tolerability and efficacy of peginterferon alpha-2a and ribavirin in chronic hepatitis C in clinical practice: The German Open Safety Trial. *J Viral Hepat* 2007; 14(11):788-96.

(234) Mitchell KA, Lawrence BP. T cell receptor transgenic mice provide novel insights into understanding cellular targets of TCDD: suppression of antibody production, but not the response of CD8(+) T cells, during infection with influenza virus. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 192(3):275-86.

(235) Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA, Oliver D, Wehmeier KR, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: histologic features and clinical correlations with 30 blinded biopsy specimens. *Hum Pathol*. 2004; 35(9):1070-82

(236) Chen Y, Chu H-X, Wang L-J, Liu X-X, Mahato RI, Zhao Y-R. Meta-analysis: IL28B polymorphisms predict sustained viral response in HCV patients treated with pegylated interferon- α and ribavirin. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 36(2):91-103.

(237) Ladero JM, García-Martín E, Fernández C, Carballo M, Devesa MJ, Martínez C, Suárez A, Díaz-Rubio M, Agúndez JA. Predicting response to therapy in chronic hepatitis C: An approach combining interleukin-28B gene polymorphisms and clinical data. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27: 279-85.

(238) Stättermayer AF, Stauber R, Hofer H, Rutter K, Beinhardt S, Scherzer TM, Zinober K, Datz C, Maieron A, Dulic-Lakovic E, Kessler HH, Steindl-Munda P, Strasser M, Krall C,

Ferenci P. Impact of IL28B genotype on early and sustained virologic response in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011; 9: 344-50.

(239) Rivero-Juarez A, Camacho A, Perez-Camacho I, Neukam K, Caruz A, Mira JA, Mesa P, García-Lázaro M, Torre-Cisneros J, Pineda JA, Rivero A. Association between the IL28B genotype and hepatitis C viral kinetics in the early days of treatment with pegylated interferon plus ribavirin in HIV/HCV co-infected patients with genotype 1 or 4. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 202-5.

(240) Thompson AJ. Genetic factors and hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2012; 142: 1335-9.

(241) Honda M, Sakai A, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shirasaki T, Horimoto K, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in IL28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2010; 139: 499-509.

(242) Urban TJ, Thompson AJ, Braddick SS, Fellay J, Schuppan D, Cronin KD, Hong L, McKenzie A, Patel K, Shianna KV, McHutchison JG, Goldstein DB, Afdhal N. IL28B Genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon stimulated genes in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2012; 52: 1888-96.

(243) Dill MT, Duong FH, Vogt JE, Bibert S, Bochud PY, Terracciano L, Papassotiropoulos A, Roth V, Heim MH. Interferon-induced gene expression is a stronger predictor of treatment response than IL28B genotype in patients with hepatitis C. *Gastroenterology* 2011; 140: 1021-1031.

(244) Abe H, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tsuge M, Miki D, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Ohishi W, Arihiro K, Kubo M, Nakamura Y, Chayama K. Common variation of IL28 affects gamma-GTP levels and inflammation of the liver in chronically infected hepatitis C virus patients. *J Hepatol* 2010; 53(3):439-43.

- (245) Cuenca F, Fernandez C, Devesa MJ, Lopez-Alonso G, Mayol J, Suarez A, Ortega L, Díaz-Rubio M, Ladero JM. Predictive baseline criteria of primary therapeutic failure in chronic hepatitis C genotype 1. *Rev Esp Enferm Dig* 2010; 102(4):234-8.
- (246) Petta S, Rosso C, Laung R, Abate ML, Booth D, Salomone F, Gambino R, Rizzetto M, Caviglia P, Smedia A, Grimaudo S, Cammà C, George J, Bugianessi C. Effects of *IL28B* rs12979860CC genotype on metabolic profile and sustained virologic response in patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11(3): 311-317.
- (247) Aizawa Y, Yohizawa K, Aida Y, Ishiguro H, Abe H, Tsubota A. Genotype rs8099917 near the *IL28B* gene and aminoacid substitution at position 70 in the core region of the hepatitis C virus are determinants of serum apoprotein B-100 concentration in chronic hepatitis C. *Molecular and cellular biochemistry* 2012; 360(1-2): 9-14.
- (248) Bochud P-Y, Bibert S, Kutalik Z, Patin E, Guergnon J, Nalpas B, Goossens N, Kuske L, Müllhaupt B, Gerlach T, Heim MH, Moradpour D, Cerny A, Malinverni R, Regenass S, Dollenmaier G, Hirsch H, Martinetti G, Gorgiewski M, Bourlière M, Poynard T, Theodorou I, Abel L, Pol S, Dufour JF, Negro F; Swiss Hepatitis C Cohort Study Group; ANRS HC EP 26 Genoscan Study Group. *IL28B* alleles associated with poor hepatitis C virus (HCV) clearance protect against inflammation and fibrosis in patients infected with non-1 HCV genotypes. *Hepatology* 2012; 55: 384-94.
- (249) Di Marco V, Bronte F, Calvaruso V, Capra M, Borsellino Z, Maggio A, Renda MC, Pitrolo L, Lo Pinto MC, Rizzo M, Fiorenza F, Gerardi C, Grimaudo S, Di Cristina A, Levrero M, Craxì A. *IL28B* polymorphisms influence stage of liver fibrosis and spontaneous or interferon-induced viral clearance in thalassemia patients with hepatitis C virus infection. *Haematologica* 2012; 97(5):679-86.
- (250) Falletti E, Bitetto D, Fabris C, Cussigh A, Fornasiere E, Cmet S, Fumolo E, Bignulin S, Fontanini E, Cerutti A, Minisini R, Pirisi M, Toniutto P. Role of interleukin 28B rs12979860 C/T polymorphism on the histological outcome of chronic hepatitis C: relationship with gender and viral genotype. *J Clin Immunol* 2011; 31: 891-899.

- (251) El-Awady MK, Mostafa L, TabllAA, Abdelhafez TH, Bader-el-Din NG, Zayed N, El Shenawy R, El Abd Y, Hasan RM, Zaghlol H, El Khayat H, Abdel-Aziz AO. Association of IL28B SNP with progression of Egyptian HCV genotype 4 patients to end stage liver disease. *Hepatitis Monthly* 2012; 12(4): 271-277.
- (252) Reddy KR, Govindarajan S, Marcellin P, Bernstein D, Dienstag JL, Bodenheimer H, Rakela J, Messinger D, Schmidt G, Ackrill A, Hadziyannis SJ. Hepatic steatosis in chronic hepatitis C: baseline host and viral characteristics and influence on response to therapy with interferon alpha-2a plus ribavirin. *J Viral Hep* 2008; 15: 129-136.
- (253) Eslam M, Aparcero R, Mousa YI, Grande L, Shaker Y, Ali A, Del Campo JA, Khattab MA, Romero-Gomez M. Insulin resistance impairs viral dynamics independently of ethnicity or genotypes. *J Clin Gastroenterol.* 2012; 46(3):228-34.
- (254) Del Campo JA, Romero-Gómez M. Steatosis and insulin resistance in hepatitis C: a way out for the virus?. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5014-9.
- (255) Rosso C, Abate ML, Leung R, Booth D, Mezzabotta L, Carezzi S, Caviglia GP, Salamone F, Gambino R, Cassader M, Rizzetto M, Smedile A, George E, Bugianesi E. *IL28B* gene variants and metabolid profile in patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2012; 56: S925.
- (256) Li JH, Lao XQ, Tillmann HL Rowell J, Patel K, Thompson A, Suchindran S, Muir AJ, Guyton JR, Gardner SD, McHutchison JG, McCarthy JJ. Interferon-lambda genotype and low serum low-density lipoproteína cholesterol levels in patients with chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 2010; 51: 1904-11.
- (257) Saito H, Ito K, Sugiyama M, Matsui T, Aoki Y, Imamura M, Murata K, Masaki N, Nomura H, Adachi H, Hige S, Enomoto N, Sakamoto N, Kurosaki M, Mizokami M, Watanabe S. Factors responsible for the discrepancy between *IL28B* polymorphism prediction and the viral response to peginterferon plus ribavirin therapy in Japanese chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res* 2012; 42(10):958-965.

- (258) Ohnishi M, Tsuge M, Kohno T, Zhang Y, Abe H, Hyogo H, Kimura Y, Miki D, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Ochi H, Hayes CN, Tanaka S, Arihiro K, Chayama K. IL28B polymorphism is associated with fatty change in the liver of chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol* 2012; 47(7):834-44.
- (259) Miura M, Maekawa S, Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Ohmori T, Kanayama A, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Kitamura T, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Enomoto N. Analysis of viral amino acids sequences and the IL28B SNP influencing the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Hepatol Int* 2011; 6: 386-396.
- (260) Joshita S, Umemura T, Katsuyama Y, Ichikawa Y, Kimura T, Morita S, Kamijo A, Komatsu M, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Kamijo N, Ota M, Tanaka E. Association of IL28B gene polymorphism with development of hepatocellular carcinoma in Japanese patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hum Immunol* 2011; 73:298-300.
- (261) Trapero-Marugán M, Mendoza J, Chaparro M, González-Moreno L, Moreno-Monteagudo JA, Borque MJ, Moreno-Otero R. Long-term outcome of chronic hepatitis C patients with sustained virological response to interferon plus ribavirin. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 493-498.
- (262) Maruoka D, Imazeki F, Arai M, Kanda T, Fujiwara K, Yokosuka O. Long-term cohort study of chronic hepatitis C according to interferon efficacy. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27: 291-299.
- (263) Eurich D, Boas-Knoop S, Bahra M, Neuhaus R, Somasundaram R, Neuhaus P, Neumann U, Seehofer D. Role of IL28B polymorphism in the development of hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma, graft fibrosis, and posttransplant antiviral therapy. *Transplantation* 2012; 393: 644-649.
- (264) Akuta N, Suzuki F, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Complicated

relationships of amino acid substitution in hepatitis C virus core region and *IL28B* genotype influencing hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2012; 56 (6):2134-41.

(265) Ren S, Lu J, Du X, Huang Y, Ma L, Huo H, Chen X, Wei L. Genetic variation in *IL28B* is associated with the development of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61(9):1433-9.

