

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Microbiología I (Inmunología)



TESIS DOCTORAL

**Importancia de la elastografía de transición y de los
polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en la evolución de
la enfermedad hepática de pacientes con hepatitis crónica C**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana Zaida Gómez Moreno

Directores

Salvador Resino García
Daniel Pineda Tenor
María Ángeles Jiménez Sousa

Madrid, 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Doctorado en Investigación Biomédica

Departamento de Microbiología I (Inmunología)



TESIS DOCTORAL

**IMPORTANCIA DE LA ELASTOGRAFÍA DE TRANSICIÓN Y DE LOS
POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNPs) EN LA
EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD HEPÁTICA DE PACIENTES CON
HEPATITIS CRÓNICA C**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Ana Zaida Gómez Moreno

DIRECTORES

Salvador Resino García

Daniel Pineda Tenor

María Ángeles Jiménez Sousa

Madrid, 2018



El Dr. Salvador Resino García, Científico Titular del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid); el Dr. Daniel Pineda Tenor, Facultativo del Servicio de Laboratorio Clínico (Hospital Universitario de Fuenlabrada, Madrid); y la Dra. María Ángeles Jiménez Sousa, Investigadora del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid).

CERTIFICAN QUE,

La investigación y la redacción de la Tesis Doctoral titulada **“IMPORTANCIA DE LA ELASTOGRAFÍA DE TRANSICIÓN Y DE LOS POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNPS) EN LA EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD HEPÁTICA DE PACIENTES CON HEPATITIS CRÓNICA C”** ha sido realizado por Dña. Ana Zaida Gómez Moreno en las instalaciones del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid) bajo nuestra dirección. Revisado el trabajo, los que suscriben consideran el trabajo como satisfactorio y autorizan su presentación y defensa para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que quede constancia de ello, firmamos el presente documento.

Madrid, a 06 de junio de 2018.

Dr. Salvador Resino García Dr. Daniel Pineda Tenor Dra. M^a Ángeles Jiménez Sousa

Sé perseverante,
porque el agua horada la roca
a base de caer sobre ella.
Prosigue y no desmayes,
y ten en mucho lo poco conseguido,
pues la llovizna no es abundante,
y sin embargo, cala.
Aben Hazam

A Dios

A mis padres y hermana

Agradecimientos

La finalización de la tesis es un momento especial que invita a reflexionar sobre el camino realizado durante estos 4 años, y sobre las personas que me han acompañado todo este tiempo de esfuerzo y dedicación ofreciéndome su cariño, colaboración, paciencia y ayuda desinteresada, sin los cuales no habría sido posible la llegada a la meta. Me siento muy afortunada y agradecida.

En primer lugar, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a los directores de la tesis. Al Dr. Daniel Pineda Tenor quien, con su gran talento investigador, optimismo y vitalidad, hace ya 4 años, me abrió las puertas al que por entonces era su grupo de investigación en el ISCIII, invitándome a participar en su proyecto y despertando en mí una ilusión por el mundo científico que hasta entonces desconocía. Agradezco especialmente sus consejos y su disponibilidad. Al Dr. Salvador Resino, por darme esta oportunidad, por su cercanía, por su calidad humana y por transmitirme siempre su espíritu de trabajo y la sensación de que, con esfuerzo y dedicación, esta tesis doctoral sería posible. A la Dra. María Ángeles Jiménez Sousa, por la confianza depositada en mí, por sus enseñanzas, su paciencia y disponibilidad a pesar de las dificultades, por su esfuerzo y dedicación en este trabajo.

A José Saura Montalbán por la recogida y conservación de las muestras. A las personas del grupo de Investigación del ISCIII que han participado en este estudio y a los que han contribuido de forma externa. Destacar a José María Bellón, por la ayuda en el análisis estadístico y asesoramiento metodológico.

A todos y cada uno de los miembros del equipo de Aparato Digestivo del Hospital Virgen de la Salud de Toledo, por su cercanía y apoyo en los momentos más difíciles. Agradecer en especial la colaboración de los doctores Tomás Artaza y Juan José Sánchez Ruano, por su aportación clínica al proyecto, por sus sabios consejos, su disponibilidad y cariño. Ellos han sido mis compañeros de aventura en el apasionante mundo de la Hepatitis C, habiendo compartido muy buenos momentos en distintas reuniones. Sin su participación no habría sido posible la realización de esta tesis. También quería expresar mi agradecimiento a mis residentes mayores y amigas que continúan trabajando conmigo codo con codo, las doctoras Marta Romero Gutiérrez y Almudena García Vela, a las que estoy muy agradecida por la gran amistad que nos une más allá de la relación

laboral, por su ayuda desinteresada y por haberme hecho la vida más fácil sobre todo en la fase final de este trabajo.

A mi familia; a mis padres, a mi abuela y a mi hermana, por su apoyo incondicional, por enseñarme con su ejemplo que la vida es lucha, y por darme el aliento necesario para seguir adelante cuando más lo necesito.

A mis amigos; especialmente a María Ángeles Fernández y a María del Mar Lombera, por la incondicional amistad que nos une desde el principio de la residencia, que ha ido *"in crescendo"* día a día. Muy agradecida por su ayuda, por su cariño, bondad y disponibilidad. Por la alegría compartida en tantos momentos felices y por la cercanía y paciencia en los que no lo eran tanto, animándome a seguir adelante con la tesis a pesar de las "piedras en el camino". A Marta Santos y a Naboz Minaya por su calidad humana, su cariño y sus consejos; por su tiempo y por disculpar mis ausencias en la fase final del trabajo. A Miguel Gómez, Edelmiro Mateos, Carmen Velasco, Verónica Lacunza y Elena Capilla por la amistad especial que tenemos, por sus oraciones que con seguridad han contribuido a la finalización de este proyecto y por demostrarme con su ejemplo que en la vida no hay nada imposible. A Pilar Toledano, Arancha Sánchez, Sandra Murcia y Lorena Hidalgo, por compartir conmigo los momentos de "catarsis" mezclados con risas.

A Juan Carlos Gómez Martín, mi "amigo informático", por su inestimable ayuda incluso en horas intempestivas. Por su generosidad y cariño. Por todos los buenos momentos compartidos.

A los pacientes, por su participación en el estudio y por contribuir de forma desinteresada a la investigación en el campo de la hepatitis C.

A las personas que, aunque no aparecen aquí con nombres y apellidos, han estado presentes de alguna forma durante el desarrollo de este trabajo y han hecho posible que hoy vea la luz.

A todos, mi eterno agradecimiento.

Índice

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1	Resumen	1
2	Summary.....	9
3	Abreviaturas.....	17
4	Introducción	21
4.1	Virus de la hepatitis C	21
4.2	Estructura y genoma	21
4.2.1	<i>Regiones no codificantes: región terminal 5' no codificante (5'UTR) y región terminal 3' no codificante (3'UTR).</i>	23
4.2.2	<i>Región codificante.</i>	23
4.2.2.1	Región estructural: codifica la proteína C y las glucoproteínas E1 y E2.	23
4.2.2.2	Región no estructural: codifica las siguientes proteínas: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B.	24
4.3	Ciclo de infección del VHC	25
4.4	Respuesta inmune frente al VHC.....	26
4.4.1	<i>Respuesta inmune innata</i>	26
4.4.2	<i>Respuesta inmune adaptativa</i>	27
4.5	Epidemiología	28
4.5.1	<i>Vías de transmisión del VHC</i>	30
4.5.2	<i>Genotipo viral</i>	31
4.6	Diagnóstico de la infección por VHC.....	32
4.7	Historia natural de la infección por VHC.....	35
4.7.1	<i>Infeción aguda</i>	35
4.7.2	<i>Infeción crónica</i>	36
4.7.3	<i>Fibrosis hepática</i>	37
4.7.3.1	Métodos invasivos para evaluación de fibrosis hepática: biopsia hepática.	39
4.7.3.2	Métodos no invasivos para evaluación de fibrosis hepática	41
4.7.4	<i>Cirrosis hepática y sus complicaciones</i>	45
4.7.4.1	Cirrosis compensada.....	45
4.7.4.2	Hipertensión portal.....	45
4.7.4.3	Cirrosis descompensada	46
4.7.5	<i>Hepatocarcinoma</i>	49
4.7.6	<i>Manifestaciones extrahepáticas</i>	51
4.8	Tratamiento antiviral	51

4.8.1	<i>Interferón-α</i>	51
4.8.2	<i>Antivirales de acción directa</i>	53
4.8.2.1	Inhibidores de la proteasa (NS3)	54
4.8.2.2	Inhibidores de la polimerasa (NS5B)	54
4.8.2.3	Inhibidores de la proteína NS5A.....	55
4.8.3	<i>Pautas de tratamiento</i>	55
4.9	Genética, polimorfismos y VHC	57
4.9.1	<i>Polimorfismos de un solo nucleótido</i>	59
4.9.2	<i>Conceptos de genética sobre SNPs</i>	61
4.9.2.1	Equilibrio de Hardy- Weinberg (HWE)	61
4.9.2.2	Desequilibrio de ligamiento.....	62
4.9.2.3	Haplotipos.....	62
4.9.3	<i>Estudios de asociación genética</i>	62
4.9.4	<i>Aplicaciones de SNPs en relación con infección por hepatitis C</i>	64
5	Hipótesis y objetivos	71
5.1	Hipótesis	71
5.2	Objetivos	71
6	Material y métodos. Publicaciones	75
6.1	La medición de la elasticidad hepática predice el desarrollo de eventos hepáticos en pacientes con hepatitis crónica por VHC: un estudio retrospectivo.	75
6.2	Los polimorfismos de <i>CXCL9-11</i> se asocian con fibrosis hepática en pacientes con hepatitis crónica por VHC: un estudio transversal.....	89
6.3	El polimorfismo <i>IL7RA</i> rs6897932 se asocia con la progresión de la fibrosis hepática en pacientes con hepatitis C crónica: diseño de medidas repetidas.	101
7	Discusión	119
7.1	La medición de la elasticidad hepática predice el desarrollo de eventos hepáticos en pacientes con hepatitis crónica por VHC: un estudio retrospectivo... ..	120
7.2	Los polimorfismos de <i>CXCL9-11</i> se asocian con fibrosis hepática en pacientes con hepatitis crónica por VHC: un estudio transversal.....	122
7.3	El polimorfismo <i>IL7RA</i> rs6897932 se asocia con la progresión de la fibrosis hepática en pacientes con hepatitis C crónica: diseño de medidas repetidas.	126
7.4	Limitaciones del estudio	128
8	Conclusiones	133
9	Bibliografía	137

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Estructura del virus de la hepatitis C. Adaptado de Llanes MS et al. (6).</i>	21
Figura 2.	<i>Esquema de la organización genómica del VHC y las proteínas virales. Tomado de Moradpour D et al. (7).</i>	22
Figura 3.	<i>Modelo de ciclo infectivo del VHC. Tomado de Koutsoudakis, G et al. (22).</i>	25
Figura 4.	<i>Representación esquemática de la prevalencia de la viremia del VHC y del número de personas infectadas en el mundo. Adaptada de Manns MP et al. (42).</i>	29
Figura 5.	<i>Distribución de los distintos genotipos del VHC en el mundo. Tomado de Hajarizadeh B et al. (62).</i>	31
Figura 6.	<i>Comportamiento del RNA viral en infección aguda y crónica por VHC. Adaptado de https://www.hepwebstudy.org.</i>	33
Figura 7.	<i>Algoritmo diagnóstico de infección por VHC. *En personas que pudieron estar expuestas al VHC en los últimos 6 meses y en pacientes inmunodeprimidos, se debe solicitar ARN del VHC como parte del diagnóstico.</i>	34
Figura 8.	<i>Historia natural de la enfermedad.</i>	36
Figura 9.	<i>Proceso de fibrogénesis y cirrosis hepática. Adaptado de Friedman, SL (83).</i>	38
Figura 10.	<i>Biopsia hepática. Escala Metavir. F1: Fibrosis portal sin septos. F2: Fibrosis portal con algún septo. F3: Numerosos septos de fibrosis sin cirrosis. F4: Cirrosis. Tomado de Gil Parada FL et al. (96).</i>	40
Figura 11.	<i>Técnica de elastografía de transición. Adaptado de Castera L et al. (99).</i>	42
Figura 12.	<i>Puntos de corte del FibroScan® para el diagnóstico de fibrosis en pacientes VHC según el sistema METAVIR. Adaptado de Castera L et al. (99).</i>	43
Figura 13.	<i>Varices esofágicas. A: Sistema porta normal. B: Hipertensión portal: hígado cirrótico con varices esofágo-gástricas. Tomado de Costaguta A et al (117).</i>	48
Figura 14.	<i>Escala de Child-Pugh. Adaptado de Christensen, E et al. (119).</i>	49
Figura 15.	<i>Escala MELD. Adaptado de Kamath, P. S (120).</i>	49
Figura 16.	<i>Algoritmo diagnóstico para el estudio de nódulo hepático detectado por ecografía abdominal- Tomado de Forner, A et al. (126).</i>	50
Figura 17.	<i>Evolución del tratamiento de la hepatitis C.</i>	52
Figura 18.	<i>Diana terapéutica de los distintos tipos de antivirales de acción directa aprobados en la actualidad.</i>	54
Figura 19.	<i>Síntesis de proteínas mediante transcripción y traducción del ADN. Tomado de Nature Education 2013. https://www.nature.com/scitable/topicpage/translation-dna-to-mrna-to-protein-393#.</i>	57

Figura 20. Complejo de iniciación en la traducción del ADN. Tomado de Nature Education 2013. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/translation-dna-to-mrna-to-protein-393#58>

Figura 21. Representación gráfica de SNP. Autor: David Hall. Tomado de Nature Education. <https://www.nature.com/scitable/content/snp-4815>..... 60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores asociados y no asociados a la progresión de la fibrosis. Adaptado de Poynard et al. (88).....	39
Tabla 2. Escala METAVIR. Adpatado de Bedossa, P et al. (95).....	41
Tabla 3. Diagnóstico de fibrosis hepática por elastografía de transición según el sistema METAVIR en pacientes con hepatitis crónica por VHC. Adaptado de Castera L et al. (99).	43
Tabla 4. Resumen de las recomendaciones de tratamiento de la Hepatitis C realizado según genotipo y estadio de la enfermedad (AEEH y SEIMC 2017) (151).	56
Tabla 5. Genes y SNPs relacionados con fibrosis hepática en pacientes con infección VHC. ..	66

Resumen

1 Resumen

TITULO:

Importancia de la elastografía de transición y de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en la evolución de la enfermedad hepática de pacientes con hepatitis crónica C.

INTRODUCCIÓN

Se calcula que entre 0,6% y 1% de la población española se encuentra infectada por el virus de la hepatitis C (VHC). La historia natural de la infección por VHC se caracteriza por la cronificación de la infección en más de un 80% de los individuos, con el consiguiente desarrollo de fibrosis hepática y progresión a cirrosis. La fibrosis hepática es el resultado del proceso de respuesta biológica ante el daño crónico y la posterior remodelación hepática. Tras una hepatitis aguda se produce una rápida respuesta de los hepatocitos que sustituyen el tejido necrótico restableciendo la arquitectura hepática normal. Durante este proceso de reparación, existe una reacción inflamatoria junto a un depósito de matriz extracelular que servirá de tejido de sostén para los hepatocitos regenerados. Cuando se mantiene la necrosis, este proceso reparativo se perpetúa y aumenta la producción de la matriz extracelular que se deposita de manera desorganizada en el lobulillo hepático sustituyendo a la población normal de hepatocitos, comenzando así el desarrollo de fibrosis hepática. Sin embargo, la tasa de progresión de fibrosis hepática es muy variable y difícil de predecir. Algunos individuos experimentan progresión rápida de fibrosis con una evolución precoz hacia la enfermedad hepática terminal, mientras que otras personas experimentan una progresión lenta, lo que hace menos probable la descompensación hepática. Esta variabilidad en la progresión de la fibrosis, así como el desarrollo de carcinoma hepatocelular, descompensación hepática y muerte es debido a interacciones multifactoriales entre factores virales y del huésped. A pesar de los conocimientos sobre la historia natural de la hepatitis crónica C, los métodos actuales para predecir la progresión de la fibrosis no son lo suficientemente precisos como para identificar qué pacientes evolucionarán a fibrosis avanzada, cirrosis o descompensación hepática.

OBJETIVOS

- 1) Determinar si la rigidez hepática medida mediante elastografía de transición (FibroScan®) se asocia con el riesgo de desarrollar eventos hepáticos en pacientes cirróticos.
- 2) Determinar la influencia de polimorfismos genéticos de un solo nucleótido en los genes de las quimiocinas *CXCL9-11* y de la cadena α del receptor de la interleucina 7 (*IL7RA*) sobre la progresión de la fibrosis hepática en pacientes infectados por el VHC.

METODOLOGÍA Y RESULTADOS. PUBLICACIONES

1.-La medición de la elasticidad hepática predice el desarrollo de eventos hepáticos en pacientes con hepatitis crónica por VHC: un estudio retrospectivo.

Métodos: Estudio retrospectivo realizado en 343 pacientes infectados por VHC a los que se les determinó la rigidez hepática (LSM, *liver stiffness measurement*). La variable desenlace fue el desarrollo de un evento hepático, definido como descompensación de cirrosis hepática (ascitis, hemorragia por varices, peritonitis bacteriana espontánea, encefalopatía hepática y síndrome hepatorenal), hepatocarcinoma o muerte por causa hepática. Si los pacientes presentaron varios eventos hepáticos, en el análisis sólo se incluyó el primero. La evaluación de la fibrosis hepática fue realizada mediante FibroScan®. Utilizamos los puntos de corte establecidos: <7,1 kPa (F0-F1), 7,1–9,4 kPa (F2), $\geq 9,5$ –12,4 kPa (F3 (fibrosis en puentes)), $\geq 12,5$ kPa (F4 (cirrosis); y ≥ 25 kPa (predictivo del desarrollo de varices esofágicas). Los pacientes fueron estratificados de la siguiente forma: <12,5 kPa (F0-F3) y $\geq 12,5$ kPa (F4), dividiendo el último grupo en <25 kPa y ≥ 25 kPa.

Resultados: De los 343 pacientes, 60 fueron cirróticos ($\geq 12,5$ kPa), el 57,4% varones, la mediana de edad fue de 49 años, y el 18% reconocieron ingesta elevada de alcohol. El 85% fueron infectados con VHC genotipo 1 y el 22,7% fueron no respondedores al tratamiento antiviral (interferón pegilado/ribavirina - peg-IFN/RBV). En todos los pacientes estudiados, cada incremento en una unidad del logaritmo natural (Ln) del valor de LSM se asoció con 14,76 veces más riesgo de desarrollar un evento hepático ($p < 0,001$). Cuando analizamos sólo los pacientes cirróticos, cada unidad incrementada en el Ln de LSM se asoció con 10,56 veces más riesgo de desarrollar un evento hepático ($p = 0,010$). Los pacientes con ≥ 25 kPa tuvieron 3,65 veces más riesgo de desarrollar eventos hepáticos comparado con los que

tuvieron <25 kPa ($p=0,045$). El AUROC del LSM para predecir el desarrollo de eventos hepáticos fue de 0,87 en todos los pacientes y de 0,73 en los pacientes cirróticos.

2.-Los polimorfismos de *CXCL9-11* se asocian con fibrosis hepática en pacientes con hepatitis crónica por VHC: un estudio transversal.

Método: Estudio transversal realizado en 389 pacientes infectados por VHC con una muestra de ácido desoxirribonucleico (DNA) disponible y con valores de LSM. Los polimorfismos *CXCL9-11* (*CXCL9* rs10336, *CXCL10* rs3921, and *CXCL11* rs4619915) se determinaron empleando la plataforma MassARRAY de Agena Bioscience y la tecnología iPLEX® Gold assay en el Centro Nacional de Genotipado (CEGEN). La variable desenlace fue la rigidez hepática, siendo los pacientes clasificados de acuerdo con los valores de LSM; $\geq 7,1$ kPa (F ≥ 2 – fibrosis significativa), $\geq 9,5$ kPa (F ≥ 3 – fibrosis avanzada), y $\geq 12,5$ kPa (F4 - cirrosis).

Resultados: Los modelos de herencia recesivo, sobredominante y codominante mostraron valores significativos, pero el modelo sobredominante fue el que mejor se ajustó a nuestros datos. En este caso, observamos que los genotipos *CXCL9* rs10336 AG, *CXCL10* rs3921 CG y *CXCL11* rs4619915 AG se asociaron con valores más bajos de LSM [(ratio de media geométrica ajustada (aRMG)=0,85 ($p=0,005$), aRMG=0,84 ($p=0,003$), y aRMG=0,84 ($p=0,003$), respectivamente]. Además, los pacientes con genotipo *CXCL9* rs10336 AG tuvieron menor probabilidad de tener fibrosis significativa ($\geq 7,1$ kPa) [Odds ratio ajustada (aOR)=0,59 ($p=0,016$)], fibrosis avanzada ($\geq 9,5$ kPa) [aOR=0,54 ($p=0,010$)], y cirrosis ($\geq 12,5$ kPa) [aOR=0,56 ($p=0,043$)]. Asimismo, los pacientes que presentaron los genotipos *CXCL10* rs3921 CG o *CXCL11* rs4619915 AG tuvieron menor probabilidad de tener fibrosis significativa ($\geq 7,1$ kPa) [(aOR)=0,56 ($p=0,008$)], fibrosis avanzada ($\geq 9,5$ kPa) [aOR=0,55 ($p=0,013$)], y cirrosis ($\geq 12,5$ kPa) [aOR=0,57 ($p=0,051$)]. Además, los polimorfismos de *CXCL9-11* se relacionaron con una menor rigidez hepática bajo un modelo de herencia codominante, siendo los genotipos heterocigotos también protectores para el desarrollo de fibrosis. En el modelo de herencia recesivo, los genotipos *CXCL9* rs10336 AA, *CXCL10* rs3921 CC y *CXCL11* rs4619915 AA se asociaron con mayores valores de LSM [(aRMG)=1,19 ($p=0,030$), aRMG=1,21 ($p=0,023$) y aRMG=1,21 ($p=0,023$), respectivamente]. Asimismo, los pacientes con genotipo *CXCL9*

rs10336 AA tenían mayores probabilidades de fibrosis significativa (LSM \geq 7,1 kPa) [(aOR)=1,83 (p=0,044)] y fibrosis avanzada (LSM \geq 9,5 kPa) [(aOR)=1,85 (p=0,045)]. Igualmente, los pacientes con genotipos *CXCL10* rs3921 CC o *CXCL11* rs4619915 AA tenían mayores probabilidades de fibrosis avanzada (LSM \geq 9,5 kPa) [aOR=1,89 (p=0,038)].

3. El polimorfismo *IL7RA* rs6897932 se asocia con la progresión de la fibrosis hepática en pacientes con hepatitis C crónica: diseño de medidas repetidas.

Métodos: Realizamos un estudio retrospectivo de medidas repetidas en 187 pacientes infectados por el VHC para estudiar mediante factores genéticos la predicción del riesgo de progresión de fibrosis hepática. Se genotiparon los polimorfismos de *IL7RA* rs6897932, rs987106 y rs3194051 utilizando la plataforma MassARRAY de Agena Bioscience y la tecnología iPLEX® Gold assay (CEGEN). La variable desenlace fue la rigidez hepática, siendo los puntos de corte utilizados para el valor de LSM: <7,1 kPa (F0-F1), 7,1-9,4 kPa (F2, fibrosis significativa), 9,5-12,4 kPa (F3, fibrosis avanzada) y \geq 12,5 kPa (F4; cirrosis).

Resultados: La mediana del tiempo de seguimiento fue 47,9 meses. Los valores basales de LSM no mostraron diferencias significativas para los distintos genotipos de *IL7RA* (p>0,05). En el análisis univariante, el alelo rs6897932 T tuvo una relación positiva con el aumento de LSM (ratio de la media aritmética (RMA)=1,21; p=0,001), progresión a fibrosis avanzada (F \geq 3) (OR=2,51; p=0,006) y progresión a cirrosis (F4) (OR=2,71; p=0,069). En el análisis multivariante, el alelo rs6897932 T también se relacionó con un aumento de LSM durante el seguimiento (RMA ajustada (aRMA)=1,27; p<0,001) y con mayor probabilidad de tener progresión a fibrosis avanzada (aOR=4,46; p=0,001) y a cirrosis (aOR=3,92; p=0,015). Respecto a los polimorfismos rs987106 and rs3194051, no se obtuvieron resultados significativos excepto para la asociación entre rs987106 y el incremento de los valores de LSM (aOR=1,12; p=0,015).

CONCLUSIONES

- 1) Los valores elevados de rigidez hepática determinados por elastografía de transición se asociaron con un incremento del riesgo de desarrollar eventos hepáticos en pacientes con hepatitis C, sobre todo dentro del grupo de pacientes cirróticos.
- 2) Los polimorfismos *CXCL9-11* se relacionaron con los valores de la elastografía de transición y con el estadio de fibrosis hepática en pacientes infectados por el VHC. Los pacientes heterocigotos para *CXCL9* rs10336, *CXCL10* rs3921 y *CXCL11* rs4619915 presentaron menos riesgo de desarrollar fibrosis hepática.
- 3) El polimorfismo *IL7RA* rs6897932, en especial el alelo T, parece estar relacionado con un mayor riesgo de progresión de fibrosis hepática en pacientes infectados por el VHC. Por lo tanto, el polimorfismo rs6897932 podría estar relacionado con la fisiopatología de hepatitis crónica C y podría usarse para estratificar el riesgo de progresión de la fibrosis hepática.

Summary

2 Summary

TITLE:

Importance of transition elastography and single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the evolution of liver disease in patients with chronic hepatitis C.

INTRODUCTION

It is estimated that between 0.6% and 1% of the Spanish population is infected with the hepatitis C virus (HCV). The natural history of HCV infection is characterized by the chronification of the infection in more than 80% of individuals, with the consequent development of liver fibrosis and progression to cirrhosis. Liver fibrosis is the result of the biological response process to chronic damage and subsequent liver remodeling. After acute hepatitis C, there is a rapid response of the hepatocytes that replace the necrotic tissue, restoring the normal hepatic architecture. During this repair process, there is an inflammatory reaction together with an extracellular matrix deposit that will serve as a supporting tissue for the regenerated hepatocytes. When necrosis is maintained, this reparative process is perpetuated and increases the production of the extracellular matrix that is deposited in a disorganized manner in the hepatic lobule, replacing the normal population of hepatocytes, thus beginning the development of liver fibrosis. However, the rate of progression of liver fibrosis is very variable and difficult to predict. Some individuals experience rapid progression of fibrosis with an early progression towards terminal liver disease, while others experience a slow progression, which makes liver decompensation less likely. This variability in the progression of fibrosis, as well as the development of hepatocellular carcinoma, hepatic decompensation and death is due to multifactorial interactions between viral and host factors. Despite knowledge of the natural history of chronic hepatitis C, current methods for predicting the progression of fibrosis are not accurate enough to identify which patients will progress to advanced fibrosis, cirrhosis, or liver decompensation.

OBJECTIVES

1) To determine whether the liver stiffness measurement (LSM) measured by FibroScan® is associated with the risk of developing liver-related events (LREs), particularly in cirrhotic patients.

2) To determine the influence of different SNPs on the progression of hepatic fibrosis in patients infected with HCV. We mainly focus on the study of polymorphisms of the chemokine genes *CXCL9-11* and the gene of the α -chain of the interleukin 7 receptor (*IL7RA*).

METHODOLOGY AND RESULTS. PUBLICATIONS**1.- Liver stiffness measurement predicts liver-related events in patients with chronic hepatitis C: a retrospective study**

Methods: We carried out a retrospective study on 343 HCV-infected patients stratified according to cirrhosis (LSM<12.5 kPa vs. LSM≥12.5 kPa). The cirrhotic patient group (LSM≥12.5 kPa) was divided according to risk of esophageal varices (LSM <25 kPa vs. LSM≥25 kPa). The evaluation of hepatic fibrosis was performed using FibroScan®. The outcome variable was the development of liver-related events (LRE), defined as decompensation of liver cirrhosis (ascites, variceal hemorrhage, spontaneous bacterial peritonitis, hepatic encephalopathy and hepatorenal syndrome), hepatocarcinoma or death of liver.

Results: Sixty out of 343 patients were cirrhotic (LSM ≥12.5 kPa). For all patients, each incremental unit in the natural logarithm (Ln) of LSM was associated with 14.76 times higher risk of developing LREs ($p<0.001$). Patients with cirrhosis (LSM≥12.5 kPa) had a higher risk of LREs than patients without cirrhosis (LSM<12.5 kPa) [adjusted hazard ratio (aHR)=30.97; $p<0.001$]. When only cirrhotic patients were analyzed ($n=60$), each incremental unit in the Ln of LSM was associated with 10.56 times higher risk of developing LREs ($p=0.010$). Patients with LSM≥25 kPa had a greater risk for LRE development compared to those with LSM<25 kPa (aHR=3.65; $p=0.045$). The AUROC for predicting the onset of LREs was 0.876 in all patients and 0.729 in cirrhotic patients.

2.- *CXCL9-11* polymorphisms are associated with liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a cross-sectional study

Methods: We performed a cross-sectional study in 389 patients who were genotyped for *CXCL9-11* polymorphisms (*CXCL9* rs10336, *CXCL10* rs3921, and *CXCL11* rs4619915) using the Sequenom's MassARRAY platform. The primary outcome variable was the LSM. We established three cut-offs of LSM: LSM \geq 7.1 kPa (F \geq 2 – significant fibrosis), LSM \geq 9.5 kPa (F \geq 3 – advanced fibrosis)), and LSM \geq 12.5 kPa (F4 - cirrhosis).

Results: Recessive, overdominant and codominant models of inheritance showed significant values, but the overdominant model was the best fitting our data. In this case, *CXCL9* rs10336 AG, *CXCL10* rs3921 CG and *CXCL11* rs4619915 AG were mainly associated with lower values of LSM [(adjusted geometric mean ratio (aGMR)=0.85 (p=0.005), aGMR=0.84 (p=0.003), and aGMR=0.84 (p=0.003), respectively]. Patients with *CXCL9* rs10336 AG genotype had lower odds of significant fibrosis (LSM \geq 7.1 kPa) [adjusted odds ratio (aOR)=0.59 (p=0.016)], advanced fibrosis (LSM \geq 9.5 kPa) [aOR=0.54 (p=0.010)], and cirrhosis (LSM \geq 12.5 kPa) [aOR=0.56 (p=0.043)]. Patients with *CXCL10* rs3921 CG or *CXCL11* rs4619915 AG genotypes had lower odds of significant fibrosis (LSM \geq 7.1 kPa) [adjusted OR (aOR)=0.56 (p=0.008)], advanced fibrosis (LSM \geq 9.5 kPa) [aOR=0.55 (p=0.013)], and cirrhosis (LSM \geq 12.5 kPa) [aOR=0.57 (p=0.051)]. Additionally, *CXCL9-11* polymorphisms were related to lower liver stiffness under a codominant model of inheritance, being the heterozygous genotypes also protective against hepatic fibrosis. In the recessive inheritance model, the *CXCL9* rs10336 AA, *CXCL10* rs3921 CC and *CXCL11* rs4619915 AA were associated with higher LSM values [aGMR=1.19 (p=0.030), aGMR=1.21 (p=0.023), and aGMR=1.21 (p=0.023), respectively]. Moreover, patients with *CXCL9* rs10336 AA genotype had higher odds of significant fibrosis (LSM \geq 7.1 kPa) [aOR=1.83 (p=0.044)] and advanced fibrosis (LSM \geq 9.5 kPa) [aOR=1.85 (p=0.045)]. Furthermore, patients with *CXCL10* rs3921 CC or *CXCL11* rs4619915 AA genotypes had higher odds of advanced fibrosis (LSM \geq 9.5 kPa) [aOR=1.89 (p=0.038)].

3.- *IL7RA* rs6897932 polymorphism is associated with progression of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: repeated measures design

Methods: We carried out a retrospective study with a design consisting of repeated measurements in 187 HCV-infected patients, to study the risk prediction of liver fibrosis progression using genetic factors. We genotyped the rs6897932, rs987106 and rs3194051 *IL7RA* polymorphisms using the Agena Bioscience's MassARRAY. Transient elastography was used to measure liver stiffness. The used cut-offs were: <7.1 kPa (F0-F1), 7.1-9.4 kPa (F2; significant fibrosis), 9.5-12.4 kPa (F3; advanced fibrosis), and ≥ 12.5 kPa (F4; cirrhosis). All HCV genotypes were analyzed.

Results: The median of follow-up time was 47.9 months. Baseline LSM values did not show significant statistical differences for *IL7RA* genotypes ($p > 0.05$). In univariate analysis, the rs6897932 T allele had a positive relationship with an increase in LSM (arithmetic mean ratio (AMR)=1.21 (95%CI=1.08; 1.36); $p=0.001$), progression to advanced fibrosis ($F \geq 3$) (OR=2.51 (95%CI=1.29; 4.88); $p=0.006$) and progression to cirrhosis (F4) (OR=2.71 (95%CI=0.94; 5.03); $p=0.069$). In multivariable analysis, the rs6897932 T allele was related to a higher increase of LSM values during follow-up (adjusted AMR=1.27 (95%CI=1.13; 1.42); $p < 0.001$) and higher odds of progression to advanced fibrosis [aOR=4.46 (95%CI=1.87; 10.62); $p=0.001$], and progression to cirrhosis [aOR=3.92 (95%CI=1.30; 11.77); $p=0.015$]. Regarding *IL7RA* rs987106 and rs3194051 polymorphisms, we did not find significant results except for the relationship between *IL7RA* rs987106 and the increase in LSM values [aOR=1.12 (95%CI=1.02; 1.23); $p=0.015$].

CONCLUSIONS

- 1) High LSM was associated with an increased risk of developing LREs in HCV-infected patients, even within the group of cirrhotic patients.
- 2) *CXCL9-11* polymorphisms were related to LSM and the stage of liver fibrosis in patients infected with HCV. Patients who were heterozygous for *CXCL9* rs10336, *CXCL10* rs3921 and *CXCL11* rs4619915 had less risk of developing hepatic fibrosis.
- 3) The *IL7RA* rs6897932 polymorphism, especially the T allele, seems to be related to increased risk of liver fibrosis progression in HCV-infected patients. Thus, the rs6897932

polymorphism could be related to the physiopathology of chronic hepatitis C and might be used to successfully stratify the risk of chronic hepatitis C progression.

Abreviaturas

3 Abreviaturas

AAD	Antivirales de acción directa
ADN	Acido desoxirribonucleico
AMR	Ratio de la media aritmética
aAMR	Ratio de la media aritmética ajustada
ARN	Ácido ribonucleico
CEGEN	Centro Nacional de Genotipado
EIA	Enzimoimmunoanálisis
Es	Especificidad
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GMR	Ratio de la media geométrica
aGMR	Ratio de la media geométrica ajustada
GPVH	Gradiente de Presión Venosa Hepática
GWAS completo	<i>Genome Wide Association Studies</i> , Estudios de asociación del genoma completo
HLA	Antígeno leucocitario humano
HNANB	Hepatitis no A no B
HSH	Hombres que tienen sexo con hombres
HTPCS	Hipertensión portal clínicamente significativa
IFN	Interferon
IQR	Rango intercuartílico
IRES	<i>Internal ribosome entry sites</i>
kPa	KiloPascales
LSM	Medida de rigidez hepática (<i>Liver stiffness measurement</i>)
M	Mediana
MELD	<i>Model for End Stage Liver Disease</i> , modelo para enfermedad hepática en estadio avanzado
NK	Células <i>Natural Killer</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
aOR	<i>Odds ratio</i> ajustada

peg-IFN α	Interferon Pegilado
pSWE/ARFI	<i>point Shear Wave Elastography/acoustic radiation force impulse</i> , Elastografía de onda de cizallamiento por fuerza de radiación acústica
RBV	Ribavirina
RM	Resonancia Magnética
RVS	Respuesta viral sostenida
Se	Sensibilidad
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SR-B1	<i>Scavenger receptor B1</i>
TC	Tomografía computarizada
UI	Unidades internacionales
UTR	Región no codificante (<i>Untranslated región</i>)
VC	Velocidad de propagación de la onda de cizallamiento
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VHC	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo

Introducción

4 Introducción

4.1 Virus de la hepatitis C

El virus de la hepatitis C (VHC), fue descrito originariamente en 1989 por Michael Houghton y cols. como principal agente responsable de la denominada hepatitis no A no B (HNANB) (1). Previamente a su descubrimiento, se había observado que el virus de HNANB se podría transmitir en pacientes receptores de transfusiones de hemoderivados, así como en los usuarios de drogas parenterales; y que en la mayoría de los pacientes infectados, la infección progresaba a hepatitis crónica y en algunos casos a hepatocarcinoma (2).

Después de la identificación del VHC, se ha ido ampliando conocimientos sobre su estructura molecular, epidemiología e historia natural, lo que ha permitido crear métodos diagnósticos y sistemas de cribado para evitar su transmisión, así como el desarrollo de nuevos tratamientos (3).

4.2 Estructura y genoma

El VHC pertenece al género hepacivirus, perteneciente a la familia *Flaviviridae*. Además del género hepacivirus, esta familia contiene virus de los géneros pestivirus (virus de la diarrea bovina), flavivirus (virus del dengue y de la fiebre amarilla) y otros aún sin clasificación designada (GBV-A y GBV-C) (4, 5).

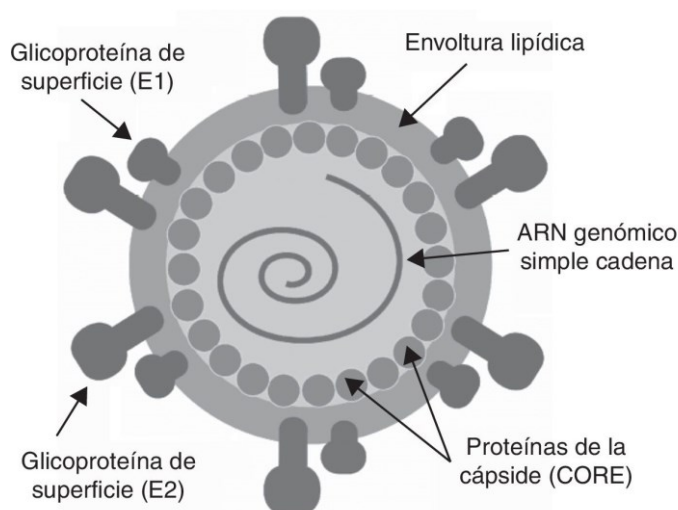


Figura 1. Estructura del virus de la hepatitis C. Adaptado de Llanes MS et al. (6).

El virión del VHC tiene un genoma de ácido ribonucleico (ARN) de aproximadamente 10.000 nucleótidos, rodeado por una cápside icosaédrica (core) y una envoltura que contiene 2 glucoproteínas, E1 y E2. Las partículas virales tienen 55-65 nm de diámetro, y el core en torno a los 30 nm (**Figura 1**).

El genoma (**Figura 2**) contiene un marco abierto de lectura único de, aproximadamente, 3000 aminoácidos, flanqueado por regiones no traducidas y altamente conservadas, denominadas 5' y 3' UTR (*untranslated region*).

El ARN del virus es de polaridad positiva, monocatenario y lineal. Funciona como ARN mensajero y su traducción conduce a un precursor poliproteico a partir del cual se producen las distintas proteínas funcionales, estructurales y no estructurales, por la acción de proteasas celulares y de codificación vírica. Por tanto, el marco de lectura presenta dos regiones: una estructural y otra no estructural. La región estructural es capaz de codificar las proteínas de la cápside o core (C) y las gp31 y gp70 (E1 y E2) de la envuelta. La región no estructural codifica siete proteínas no estructurales o NS (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B).

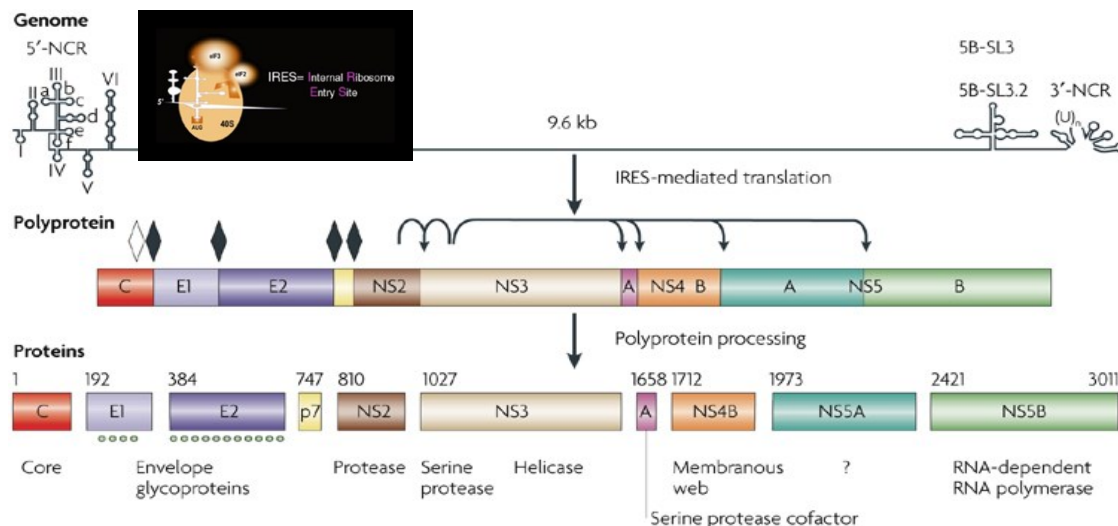


Figura 2. Esquema de la organización genómica del VHC y las proteínas virales. Tomado de Moradpour D et al. (7).

Los genes estructurales (C, E1 y E2), están localizados en la zona próxima al extremo 5' del genoma, mientras que los genes no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) son adyacentes a 3'. Los extremos 5' y 3' son secuencias no codificantes que

flanquean el marco abierto de lectura y son esenciales para la replicación y la traducción del ARN.

4.2.1 Regiones no codificantes: región terminal 5' no codificante (5'UTR) y región terminal 3' no codificante (3'UTR).

- a) **Extremo 5'** (341 pares de bases): tiene una estructura de ARN muy compleja. Es la mejor conservada, la que menos varía, con analogías superiores al 98%, y cuya principal función es permitir la unión del ribosoma de las células hospedadoras al ARN vírico en la estructura conocida como IRES (*internal ribosome entry sites*). Esta estructura se une a la subunidad 40S del ribosoma de la célula huésped para iniciar la traducción del ARN; por tanto se trata de una región esencial para la síntesis de proteínas virales y para la replicación viral. También contiene señales esenciales para la síntesis de intermediarios que servirán como moldes para la replicación viral. Se ha descrito que el micro-ARN-122 (miARN-122, específico de hígado) se une al extremo 5' promoviendo la replicación y la traducción del virus (8, 9).
- b) **Extremo 3'** (aproximadamente 225 pares de bases). Es esencial para la replicación (10). Consta de 3 partes: una primera región de longitud variable de unos 30-40 pares de bases, una cola poliU/polipirimidinas de tamaño variable y una secuencia terminal muy conservada denominada 3'X que contiene alrededor de 100 nucleótidos.

4.2.2 Región codificante.

4.2.2.1 Región estructural: codifica la proteína C y las glucoproteínas E1 y E2.

- **Proteína del core.** Se une al ARN viral para formar la nucleocápside. El core interacciona con diversas proteínas y vías de señalización celulares que podrían ser importantes para el ciclo del VHC (apoptosis, transcripción de genes, metabolismo lipídico, respuesta inmunitaria...).
- **Glucoproteínas de la envuelta, E1 (gp 31) y E2 (gp 70).** Son componentes esenciales de la envuelta del virión y se relacionan físicamente entre sí para desempeñar la función de fusión viral y entrada a las células diana. La proteína E2 se desdobra en dos proteínas, la E2 y la p7. La p7 es una proteína integral de membrana de función

poco conocida. Pertenece a la familia de las viroporinas y podría actuar formando poros en las membranas promoviendo la infectividad del virus (11, 12).

4.2.2.2 Región no estructural: codifica las siguientes proteínas: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B.

- Proteína NS2. Junto con el dominio aminoterminal de NS3, forma la proteasa NS2-NS3, que procesa el lugar de corte entre NS2 y NS3. Además NS2 interacciona molecularmente con p7 y E2, y tiene un papel crucial en la producción de viriones (13-15).
- Proteína NS3. Contiene un dominio serin-proteasa en el extremo aminoterminal y un dominio helicasa/ATPasa en el extremo carboxiterminal. Es la principal proteasa del VHC.
- Proteína NS4A. Es un cofactor que se asocia a la NS3, indispensable para que la proteasa NS3 ejerza su acción catalítica. El complejo NS3-NS4A es esencial para el ciclo del VHC catalizando además el procesamiento del resto de las proteínas no estructurales en los sitios NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A y NS5A/NS5B. Por ello, la proteasa NS3-NS4A es una de las dianas virales más interesantes en la terapia contra el VHC.
- Proteína NS4B. Es una proteína integral de membrana. Su principal función es alterar las membranas intracelulares y formar una red de membranas tipo “andamio”, esencial para la formación del complejo de replicación (16).
- Proteína NS5A. Es una fosfoproteína que interviene en la replicación, ensamblaje y liberación del VHC.
- Proteína NS5B. Es la ARN polimerasa viral dependiente de ARN, capaz de sintetizar ARN de novo y dependiente del cebador (*primer*) (17).

Una característica muy importante del VHC es la variabilidad genética, es decir, el alto grado de heterogeneidad en las secuencias genómicas y, por tanto, de las proteínas codificadas. Esta característica tiene implicaciones en la patogenia y persistencia del virus, diseño de vacunas, selección de mutantes resistentes durante el tratamiento, y diseño e interpretación de los métodos diagnósticos. Además, da lugar a una población de genomas con variantes del ARN conocida como cuasiespecies. Es decir, que un solo aislamiento del VHC, comprende muchos millones de secuencias diferentes, pero

íntimamente relacionadas. El genoma viral de una cuasiespecie difiere de un 1 a 2% en el sujeto infectado.

4.3 Ciclo de infección del VHC

El VHC replica preferentemente en el citoplasma de los hepatocitos, aunque también se ha descrito la presencia del VHC en otros compartimentos o tipos celulares, tales como células mononucleares de sangre periférica (18, 19), células dendríticas (20) o del sistema nervioso central (21).

Los estudios de la cinética viral en pacientes han mostrado una alta producción de virus *in vivo*, del orden de 10^{10} - 10^{12} viriones por día, lo que explicaría la rápida aparición de diversidad viral en pacientes con infección crónica y la frecuente persistencia de la infección por escape inmunológico tras la exposición aguda.

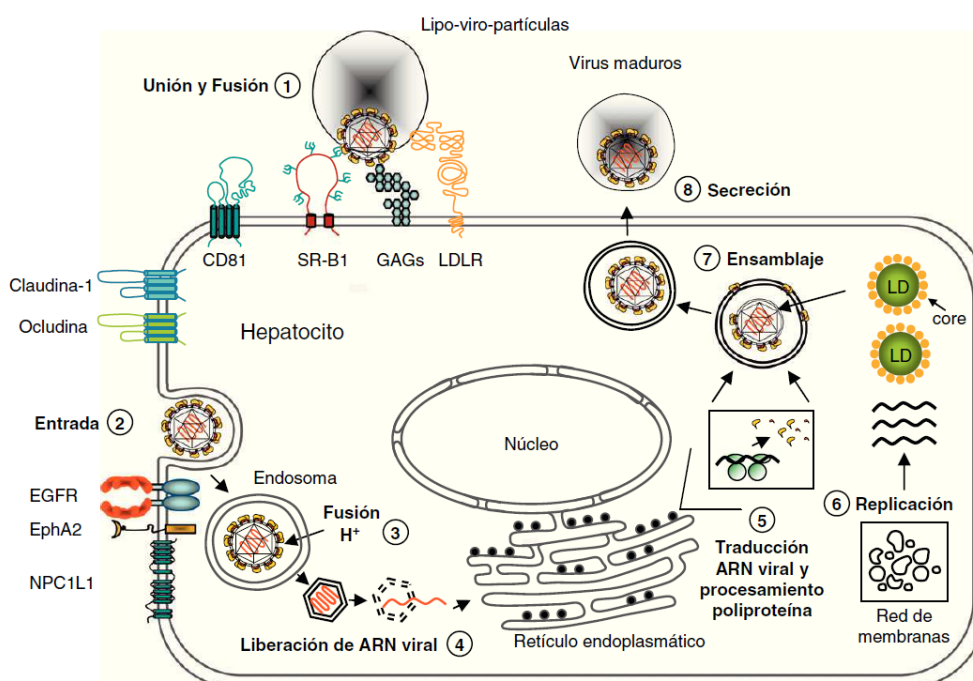


Figura 3. Modelo de ciclo infeccioso del VHC. Tomado de Koutsoudakis, G et al. (22).

El mecanismo exacto mediante el cual el VHC alcanza el citoplasma e inicia la replicación no se conoce con precisión. La partícula viral circula libre o asociada a lipoproteínas. La interacción inicial del virión con la membrana celular está mediada por glucosaminoglucanos. Se han identificado algunos receptores involucrados en la unión del virus a la superficie celular para facilitar su entrada (23, 24). El VHC interacciona

secuencialmente con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), el *scavenger receptor* B1 (SR-B1), la tetraspanina CD81 y las proteínas de las uniones estrechas claudina-1 y ocludina. Los receptores EGFR y EphA2 (y probablemente NPCL1L1) regulan la asociación entre CD81 y Claudina-1 y la fusión de la envuelta viral con la membrana plasmática (22) (**Figura 3**).

La internalización del VHC en la célula ocurre por endocitosis, y es tanto clatrina como pH dependiente por acidificación del endosoma. Posteriormente, se desencapsida y se libera el ARN viral en el citoplasma, el cual es traducido por los ribosomas de la célula huésped, proceso mediado por la acción de IRES y de las secuencias situadas en el extremo 5'UTR.

La traducción da lugar a una poliproteína precursora de unos 3.000 aminoácidos. El procesamiento comienza en el extremo N-terminal, con la acción de los enzimas celulares, que liberan primero las proteínas estructurales y la proteína p7, y a continuación las proteínas no estructurales. Los productos derivados de este proceso se asocian a las membranas del retículo endoplasmático formando el complejo de replicación del VHC. La ARN-polimerasa viral (NS5B) es el componente clave para la replicación del genoma. A continuación, se forma la cápside y el ensamblaje de los nuevos viriones. El ensamblaje comienza con la interacción de la proteína core con el ARN viral. Esta unión parece que, de alguna forma, es un mecanismo que funcionaría como un interruptor: apagaría el proceso de traducción/replicación y encendería el de ensamblaje. Finalmente, el virión es liberado mediante la ruta de secreción mediada por el aparato de Golgi (22).

4.4 Respuesta inmune frente al VHC

4.4.1 Respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata es el primer mecanismo de defensa inmunológica frente a antígenos extraños. Se caracteriza por ser muy rápida, no específica y no conservar memoria inmunológica. Cuando los mecanismos de esta respuesta innata no son capaces de erradicar el antígeno extraño, se pone en marcha la respuesta adaptativa, que tarda más tiempo en ser operativa.

En el momento de la infección aguda por VHC, el VHC puede ser detectado por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que identifican patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) del VHC, activándose así los factores de transcripción (IRF3 y NF κ B) que dirigen la expresión de genes antivirales y citoquinas (25). Así, el huésped reacciona con una respuesta rápida mediada por IFN. Por un lado, se secreta IFN tipo I (IFN α/β) que activa la expresión de más de 300 “genes estimulados por interferón”, los cuales tienen funciones antivirales, y/o IFN tipo III (IFN λ) ó IL28/IL29, con actividad biológica similar a IFN tipo I (26). Por otro lado, el IFN tipo II (γ) es producido por linfocitos CD4 Th1 y tiene un papel fundamental en el paso de la inmunidad innata a la adquirida (27). A pesar de que estos IFNs promueven la respuesta antiviral frente al VHC, en un porcentaje elevado de casos no consiguen eliminar el virus y se cronifica la infección (27). Varias proteínas del VHC, incluyendo la proteína *core*, E2 y proteínas no estructurales NS3, NS4A, NS5A están implicadas en la inhibición de genes inducibles por IFN y/o componentes clave de las vías de señalización del IFN a través de múltiples mecanismos.

Los leucocitos y macrófagos son células efectoras y reguladoras de la inflamación. Estas células son reclutadas en el lugar de la infección por la actividad de múltiples quimiocinas y receptores de quimiocinas (28). Los monocitos, macrófagos, células dendríticas y células B son células presentadoras de antígenos que inician la respuesta inmune adaptativa mediante la concentración y el procesamiento de los antígenos extraños unidos al complejo mayor de histocompatibilidad ó antígenos leucocitarios humanos (HLA) de clase I o II, estimulando de este modo a los linfocitos T CD8+ o TCD4+ respectivamente (29). Otras células implicadas en la inmunidad innata son las células “*Natural Killer*” (NK) que reconocen y destruyen patógenos e interaccionan con las células infectadas por el virus, los linfocitos T y las células dendríticas (27).

4.4.2 Respuesta inmune adaptativa

El reconocimiento de patógenos virales por la interacción coordinada de las células del sistema inmune innato, promueve la inmunidad adaptativa que reconoce los antígenos virales específicos para la eliminación de los patógenos. Se diferencia de la respuesta inmune innata en que es más lenta y específica frente a un antígeno determinado y crea memoria.

En la infección por VHC, la respuesta adaptativa se realiza a través de la la respuesta humoral por anticuerpos neutralizantes y la respuesta celular por medio de linfocitos CD8+ citotóxicos (CTL) específicos del virus y células auxiliares T CD4+, que desempeñan funciones efectoras y reguladoras respectivamente (29). Los mecanismos de acción van, desde la destrucción directa de las células infectadas a la producción de factores solubles capaces de eliminar el virus de manera no citolítica, pero que pueden atraer a células inflamatorias no específicas perpetuando la inflamación del hígado (29).

Durante la infección aguda del VHC, la respuesta adaptativa se caracteriza por una respuesta inmune celular que en una minoría de los pacientes puede conducir al aclaramiento espontáneo del VHC. En la fase crónica de la infección, el VHC escapa tanto a la inmunidad innata como a la adaptativa por mecanismos aún desconocidos y por tanto, el aclaramiento espontáneo es raro en el caso de la hepatitis crónica (29). Parece necesario, para la resolución de la infección, que se produzca una respuesta precoz, vigorosa, mantenida en el tiempo y multiepítopo específica (30, 31). Sin embargo, en los pacientes que desarrollan hepatitis crónica por VHC, la respuesta de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ se encuentra funcionalmente debilitada y presentan una actividad no sostenida en el tiempo (31). Se han propuesto varios mecanismos posibles, siendo los más probables las mutaciones genéticas del virus en los epítomos que son reconocidos por las células T CD8+ y el fracaso o agotamiento de las células T (32).

Por otra parte, parece que los linfocitos T, además de fallar en la erradicación del virus, pueden producir daño hepático, pues tras ejercer su función efectora frente al VHC, los linfocitos T experimentan apoptosis. La muerte de células inflamatorias en el hígado, la lisis de hepatocitos infectados y la secreción de citocinas inflamatorias de forma mantenida en el tiempo (33), podrían activar las células estrelladas hepáticas, que son la fuente principal de la matriz extracelular en la fibrosis hepática (34).

4.5 Epidemiología

En 1989, cuando se descubrió la infección por VHC, no se consideró una infección de importancia mayor pues se creía que afectaba únicamente a una pequeña proporción de la población: usuarios de drogas por vía parenteral y receptores de transfusiones (35). Años después, se comprobó que la infección por VHC era un problema de salud mundial.

Un informe reciente de la Organización Mundial de la Salud estima que en 2015, la prevalencia global de infección por VHC fue 1.0 % (71 millones de personas infectadas por VHC en todo el mundo), cifras inferiores a las estimadas en estudios previos (36). No obstante, la prevalencia de la infección por el VHC tiene gran variabilidad geográfica oscilando entre menos del 1 % hasta más del 10 % de infectados en diferentes regiones del mundo (37) (**Figura 4**).

En particular, se han estimado cifras de 2,3 millones de sujetos infectados en EEUU, 1,5 en Japón y 11,5-19 millones en Europa (36). En España, se considera que la población con anticuerpos frente al VHC se encuentra entre 0,6% y 1% (38), cifras inferiores a lo estimado en estudios anteriores (39). En EEUU se ha descrito una mayor prevalencia en personas entre los 30 y 49 años y un ligero predominio en varones (40), mientras que en el Sur de Europa, la mayor prevalencia se ha detectado en mayores de 65 años (41).

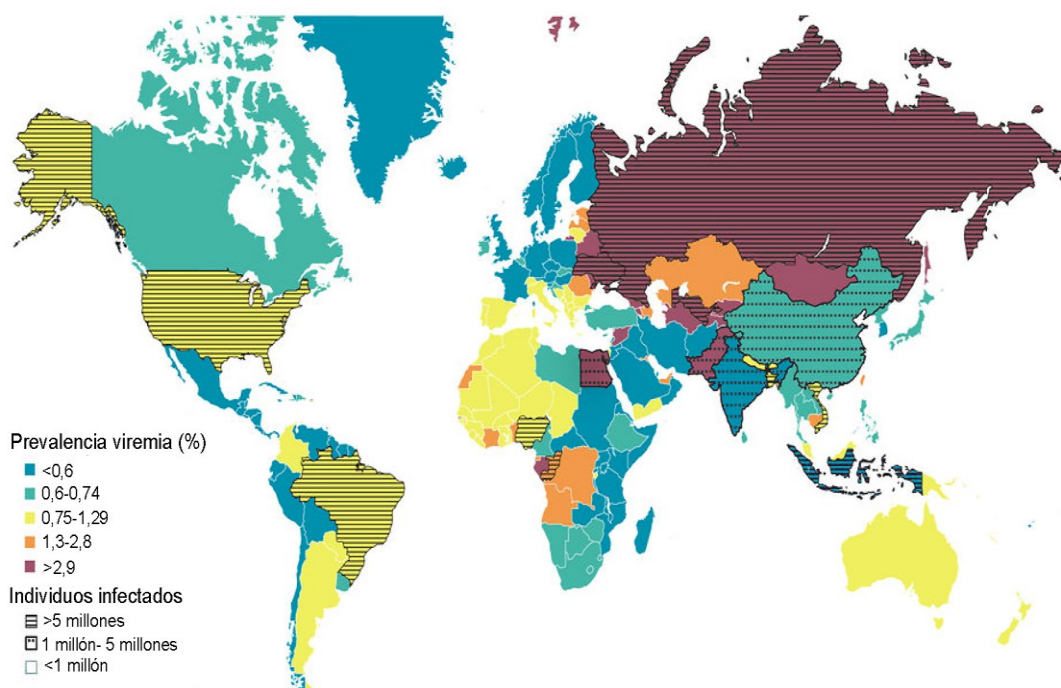


Figura 4. Representación esquemática de la prevalencia de la viremia del VHC y del número de personas infectadas en el mundo. Adaptada de Manns MP et al. (42).

La infección aguda por VHC se cronifica en hasta el 80% de los casos, dando lugar al desarrollo de cirrosis hepática y sus complicaciones: hipertensión portal, descompensaciones hepáticas y hepatocarcinoma. Es la principal causa de hepatopatía crónica, cirrosis (43, 44) y trasplante hepático en el mundo occidental (40, 45). Además

la infección crónica por VHC puede asociar manifestaciones extrahepáticas como crioglobulinemia y linfoma no Hodking, fundamentalmente causados por la continua estimulación del sistema inmune (46, 47).

El descubrimiento de los antivirales de acción directa (AADs) en los últimos años, con tasas de RVS en torno al 85%-100%, ha cambiado el escenario de la infección por VHC, con una reducción muy significativa de la incidencia de cirrosis y sus descompensaciones, demanda de trasplante hepático y mortalidad en los pacientes que han eliminado el VHC. Sin embargo, debido al elevado coste de estos medicamentos, no todos los países afectados tienen acceso a estos nuevos fármacos, por lo que es difícil establecer conclusiones de futuro de la epidemiología y de la evolución de la infección por VHC a nivel mundial (48).

4.5.1 Vías de transmisión del VHC

La principal vía de transmisión de la infección a nivel mundial es la vía parenteral: transfusiones de sangre y uso de drogas inyectadas.

En los países en vías de desarrollo, el uso de jeringuillas no esterilizadas, la reutilización de agujas con fines terapéuticos y la ausencia de cribado de infecciones en donaciones de sangre, son las causas principales de la transmisión del VHC.

En países desarrollados, el mecanismo de transmisión más frecuente es la utilización de drogas intravenosas mediante intercambio de jeringuillas contaminadas, siendo la prevalencia de infección del 64-94% en usuarios que llevan 6 años o más inyectándose drogas. Las transfusiones de sangre, causa fundamental de transmisión del VHC hace 30 años, actualmente son seguras con la implementación del cribado de donantes en los bancos de sangre (49). Se han descrito casos de transmisión nosocomial (50) durante procedimientos técnicos como colonoscopia (51), diálisis (52), manipulación inadecuada de catéteres anestésicos (53), así como durante intervenciones quirúrgicas, en las que se ha descrito el contagio médico-paciente (54).

El papel de la transmisión sexual del VHC no ha sido bien definido. El riesgo es muy bajo en parejas monógamas. En la última década, se ha descrito la transmisión sexual del VHC entre los hombres que tiene sexo con hombres (HSH), siendo más frecuente entre los varones portadores del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (55). Otra vía de

transmisión menos relevante es la materna (embarazo, parto o lactancia). La transmisión perinatal se estima que es menor al 10% entre los recién nacidos de madres infectadas, aunque la proporción es mayor en los hijos de madres coinfectadas (VIH/VHC) (56, 57). No se descartan otros modelos de transmisión, incluyendo tatuajes, piercings, acupuntura, e incluso es posible que existan otras rutas no conocidas, ya que hasta un 10% de los individuos infectados no presentan factores de riesgo.

4.5.2 Genotipo viral

La heterogeneidad genética es una de las características biológicas más relevantes del VHC (58), la cual puede ser intragenoma, dando lugar a **cuasiespecies** víricas, e intergenoma, dando lugar a **genotipos** y **subtipos** (59).

Se han identificado 7 genotipos principales denominados del 1 al 7, y numerosos subtipos con las letras de “a” a la “k”. Los subtipos 1a, 1b, 2a, 2b, 2c y 3a se encuentran en el 90% de las infecciones por el VHC en América del Norte y en Sudamérica, Europa, Rusia, China, Japón, Australia y Nueva Zelanda. El genotipo 1b produce la mayoría de las infecciones del Este y Sur de Europa, China y Japón. El genotipo 3 es muy frecuente en América y Europa y el genotipo 4 es más común en Egipto y varias áreas del Medio Este. El genotipo 5 se encuentra principalmente en Sudáfrica y el 6 en Hong Kong y otras áreas del Sudeste asiático (60, 61) (**Figura 5**).

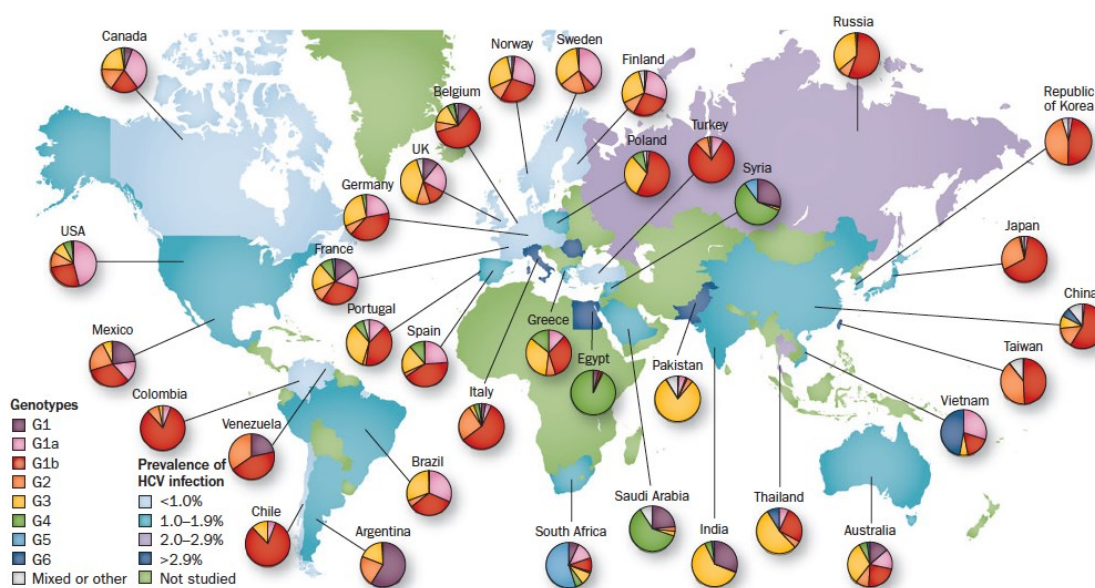


Figura 5. Distribución de los distintos genotipos del VHC en el mundo. Tomado de Hajarizadeh B et al. (62).

En España, el genotipo 1 es el más frecuente (60-70%), seguido por el genotipo 3 (20-30%), y más raramente se identifica el genotipo 2 (2-5%) y el 4 (5-7%).

4.6 Diagnóstico de la infección por VHC

En cuanto al diagnóstico serológico, los niveles de ARN viral típicamente preceden a la detección de anticuerpos aproximadamente 5-6 semanas. Del mismo modo, la detección de ARN viral precede a la elevación de la alanina aminotransferasa (ALT) (**Figura 6**).

La detección de **anticuerpos anti-VHC** es el primer paso en el algoritmo diagnóstico del cribado del VHC, dada su simplicidad, bajo coste y adecuada sensibilidad. Los anticuerpos anti-VHC son detectables en suero o plasma, por enzimoimmunoanálisis (EIA), en la mayoría de los pacientes con infección por VHC. La detección de anticuerpos anti-VHC puede indicar infección aguda, infección crónica o infección pasada que se ha resuelto (63). Después del aclaramiento viral espontáneo o inducido por el tratamiento, los anticuerpos anti-VHC persisten en ausencia de ARN del VHC, pero pueden disminuir y finalmente desaparecer en algunos individuos después varios años (64). En la fase aguda temprana de la infección por VHC, y en pacientes inmunodeprimidos, los resultados de la EIA pueden ser negativos. En estos casos, debe determinarse además el ARN del VHC (o antígeno del core) puesto que puede ser detectados con anterioridad al desarrollo de los anticuerpos anti-VHC (63).

Además, debe realizarse la **detección de ARN del VHC** para confirmar el diagnóstico en todos los casos en los que se detecta anticuerpos anti-VHC. Por tanto, el diagnóstico definitivo de infección aguda y crónica por el VHC se basa en la **detección de ARN del VHC** en suero o plasma por un método molecular sensible, cualitativo o cuantitativo. Se recomienda un test con un límite inferior de detección ≤ 15 unidades internacionales (UI)/ml. Para el diagnóstico a gran escala en determinadas áreas sanitarias o en países de renta baja, se pueden emplear métodos cualitativos con coste menor y con un límite inferior de detección $\leq 1,000$ UI/ml. Dado que la gran mayoría de pacientes con una indicación de terapia anti-VHC tienen un nivel de ARN del VHC por encima de 50,000 UI/ml, el riesgo de un falso negativo con estos test es excepcionalmente bajo (0,16%), y

se ve superado por el beneficio de ampliar el acceso al diagnóstico y atender a una población mayor (65).

En la fase aguda de la enfermedad, los niveles de ARN pueden variar hasta hacerse indetectables (**Figura 6**), por lo que en pacientes con hepatitis aguda y determinaciones de anticuerpos anti-VHC positivo y ARN negativo, se recomienda repetir la determinación de ARN 12 y 24 semanas después para confirmar el aclaramiento definitivo del VHC (66).

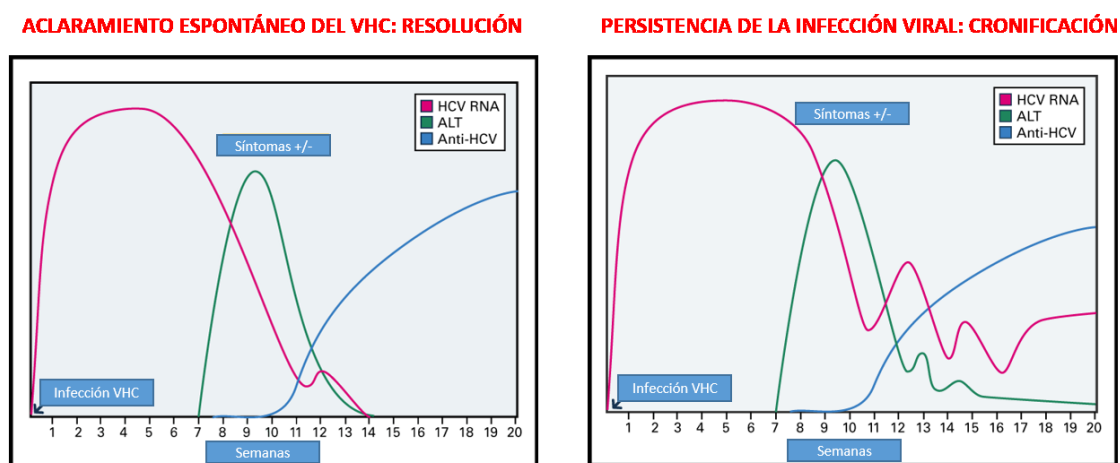


Figura 6. Comportamiento del RNA viral en infección aguda y crónica por VHC. Adaptado de <https://www.hepwebstudy.org>.

El antígeno del core del VHC en suero o plasma es un marcador de replicación del virus. Se podría utilizar el test de detección del antígeno del core en lugar de la determinación del ARN del VHC para diagnosticar infección aguda o crónica por VHC. Sin embargo, estos test son menos sensibles (el límite inferior de detección sería el equivalente entre 500 y 3.000 UI/ml de ARN aproximadamente), quedando reservados para cuando no es posible la determinación del ARN viral (67).

La reinfección por VHC puede ocurrir después del aclaramiento espontáneo o inducido por el tratamiento, especialmente en pacientes con alto riesgo de infección por re-exposición. La reinfección se define por la reaparición del ARN del VHC (o del antígeno del core del VHC) después de la RVS y por la demostración de que la infección es causada por una cepa de VHC diferente. La reinfección debe ser sospechada en casos de recurrencia 12 o 24 semanas posterior a la respuesta viral tras finalizar el tratamiento, si los comportamientos de riesgo han continuado (66).

El diagnóstico de hepatitis C se basa en la detección tanto de anticuerpos anti-VHC como de ARN viral (o antígeno del core) (**Figura 7**). El aclaramiento espontáneo raramente ocurre más allá de 4 a 6 meses después de una infección recién adquirida (68), por lo que el diagnóstico de la hepatitis C crónica se puede hacer después de este período de tiempo.

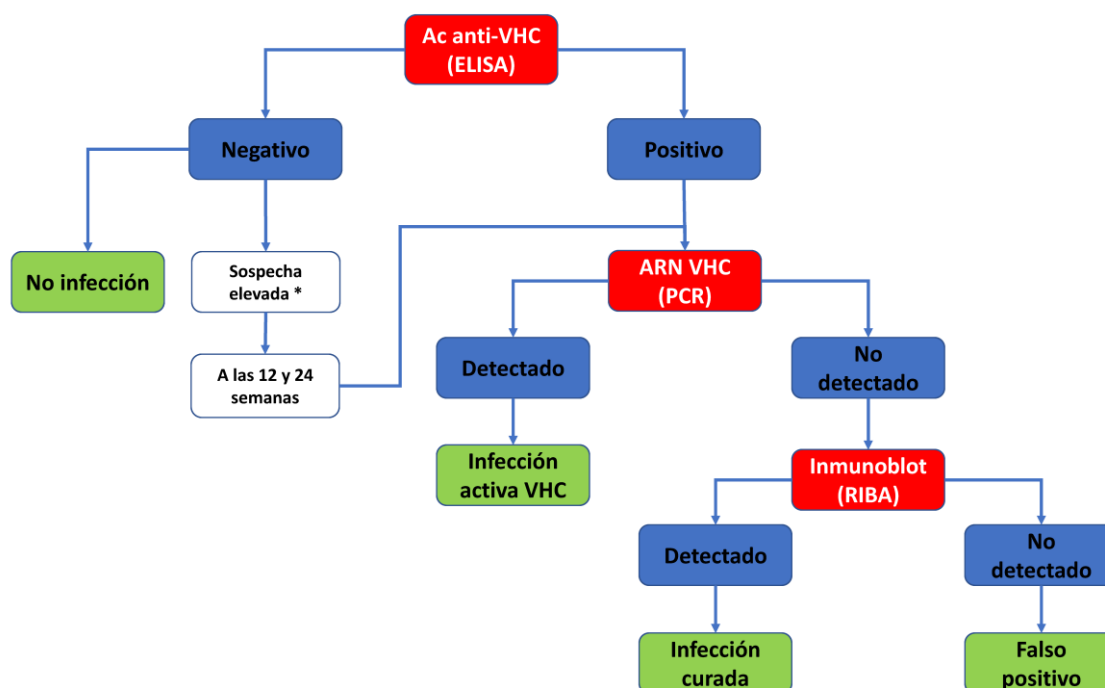


Figura 7. Algoritmo diagnóstico de infección por VHC. *En personas que pudieron estar expuestas al VHC en los últimos 6 meses y en pacientes inmunodeprimidos, se debe solicitar ARN del VHC como parte del diagnóstico.

Recientemente, la Organización Mundial de la Salud ha propuesto como meta la eliminación del VHC en el año 2030 (69). Para ello, es necesario implementar estrategias de screening adecuadas a la epidemiología local (cribado poblacional), así como a colectivos de alto riesgo de infección (presidarios, inmigrantes procedentes de zonas endémicas, HSH y usuarios de drogas). Con el objetivo de facilitar el screening del VHC se están empleando nuevas técnicas diagnósticas:

- El test de detección rápida de VHC (Oralquick®), detecta anticuerpos anti-VHC y puede emplearse en fluidos orales, punción digital, sangre, suero o plasma. Es una prueba de diagnóstico rápido muy útil para cribado, puesto que se puede emplear en la consulta (70).

- La técnica de la gota de sangre seca que se aplica sobre una tarjeta de papel, también permite detectar anticuerpos anti-VHC y ARN del VHC por EIA y PCR (71). Este método permite la recogida de muestra en poblaciones de difícil acceso y el traslado de la muestra al laboratorio de forma fácil.

4.7 Historia natural de la infección por VHC

4.7.1 Infección aguda

La mayoría de las hepatitis agudas (70-75%) son asintomáticas y/o cursan como un síndrome pseudogripal sin ictericia, lo que condiciona que su diagnóstico sea infrecuente. Un curso grave o fulminante es raro, aunque puede producirse, ocurriendo predominantemente en pacientes con inmunodeficiencia, enfermedad hepática preexistente o en presencia de otros cofactores (infección concomitante por virus A, virus B, virus E o toma de fármacos hepatotóxicos).

Al igual que en otras infecciones virales, en el curso de la infección por el VHC se distinguen cuatro períodos o fases: incubación, prodrómico, estado y convalecencia.

- I. El período de incubación es el tiempo que transcurre entre la exposición al virus y la aparición de síntomas. En el caso del VHC, el período medio de incubación es de 7-8 semanas, pero el intervalo puede variar ampliamente, con un rango de 2 a 26 semanas. Este período es clínicamente silente.
- II. Durante el período prodrómico, el paciente puede referir distintos síntomas inespecíficos, sin evidencia de ictericia. Los más frecuentes son cansancio, inapetencia, intolerancia a las grasas, náuseas, vómitos, molestias en hipocondrio derecho, *discomfort* abdominal y ocasionalmente diarrea. Este período suele durar 3-5 días, pero puede prolongarse varias semanas o, incluso, puede no estar presente.
- III. Cuando aparece la ictericia se habla de fase de estado. Paradójicamente, en este momento el paciente suele encontrarse clínicamente mejor, aunque habitualmente persiste la astenia. La duración e intensidad de la ictericia, que se presenta en menos del 25% de los pacientes, son variables. Habitualmente suele durar de 2 a 6 semanas.
- IV. Con la desaparición de la ictericia se entra en la fase de convalecencia, durante la cual se produce la recuperación progresiva del paciente. Su duración también es

variable. La exploración física suele revelar una hepatomegalia moderada, blanda y dolorosa, y en el 10-25% de los casos una esplenomegalia.

El 18%-35% de los individuos infectados suelen aclarar el VHC de forma espontánea. El aclaramiento es más frecuente en mujeres jóvenes y en pacientes que han presentado síntomas específicos de hepatitis aguda (ictericia, coluria...). La probabilidad de resolución espontánea del VHC se asocia con factores genéticos, incluyendo los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) de *IL28B* y el alelo DQB1*0301 del HLA de clase II, entre otros (72-75). Tras 6 meses de infección persistente (ARN del VHC positivo en sangre periférica), se convierte en infección crónica. La transición de aguda a crónica suele ser asintomática (2).

4.7.2 Infección crónica

Una vez establecida la infección crónica (aproximadamente en el 80% de los casos), el VHC ocasiona en la mayoría de los pacientes una lesión hepática con diferentes grados de actividad inflamatoria y fibrosis (2). Generalmente, la progresión de la enfermedad es lenta. La inflamación hepática conduce al desarrollo de cirrosis en aproximadamente 10%-20% de los pacientes pasados 20-30 años de la infección aguda, aunque en algunos estudios publicados, los datos varían indicando tasas de cirrosis que oscilan entre 2% y 51% a los 22 años (76, 77) (**Figura 8**).

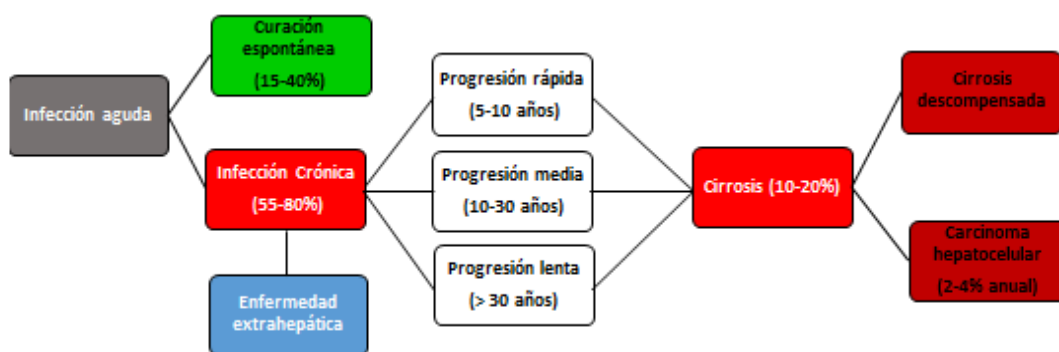


Figura 8. Historia natural de la enfermedad.

En gran parte de los casos, los pacientes permanecen sin diagnosticar de la infección hasta que presentan complicaciones de la enfermedad en fases avanzadas (2). Una vez establecida la fase de cirrosis, la progresión es impredecible: en algunos pacientes

permanece indolente por muchos años, mientras que en otros progresa más rápido a hepatocarcinoma, descompensación hepática y muerte (2). Una vez que la cirrosis se ha descompensado, el riesgo estimado de muerte en el siguiente año es del 15% al 20%.

El desarrollo de fibrosis hepática en hepatitis crónica C es multifactorial, constatando que existe un riesgo individual de desarrollar fibrosis significativa y cirrosis (78). Entre los factores de riesgo se encuentran edad superior a 40 años, género masculino, consumo de alcohol, obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, coinfección con el virus de la hepatitis B (VHB) o el VIH, tratamiento inmunosupresor y factores genéticos.

4.7.3 Fibrosis hepática

La fibrosis hepática es el resultado del proceso de respuesta biológica ante el daño hepático crónico y la posterior remodelación hepática (79, 80). En los pacientes con infección crónica por VHC, el hígado reacciona a la agresión viral mediante una respuesta inflamatoria, siendo esta reacción uno de los componentes del desarrollo de la fibrosis hepática (81). Inicialmente la fibrogénesis es un proceso dinámico que intenta reparar el daño de la agresión externa. Se caracteriza por la síntesis de matriz extracelular, constituida por un conjunto de moléculas proteicas (colágeno y elastina), glicoproteicas (fibronectina y laminina) y proteoglicanos que se organizan e interconectan en una red tridimensional. La fibrogénesis se compensa a la vez por mecanismos de fibrinólisis que intentan destruir esta matriz. La fibrosis es el resultado neto de ambos procesos (destrucción/reparación) (80) en los que intervienen una serie de proteínas como las metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular y los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas que bloquean a estas proteínas impidiendo su acción fibrolítica (80).

En todo este proceso, las células estrelladas hepáticas están directamente implicadas (79). En el hígado sano, estas células se encuentran en el espacio de Disse, entre los hepatocitos y la pared sinusoidal y representan entre el 5-8% del total de las células. Ante un daño hepático, la células estrelladas sufren un proceso de activación (transdiferenciación), adquiriendo un fenotipo similar al de los miofibroblastos, con un

citoesqueleto contráctil, y se encargan de la producción y remodelación de la matriz extracelular (79, 80, 82).

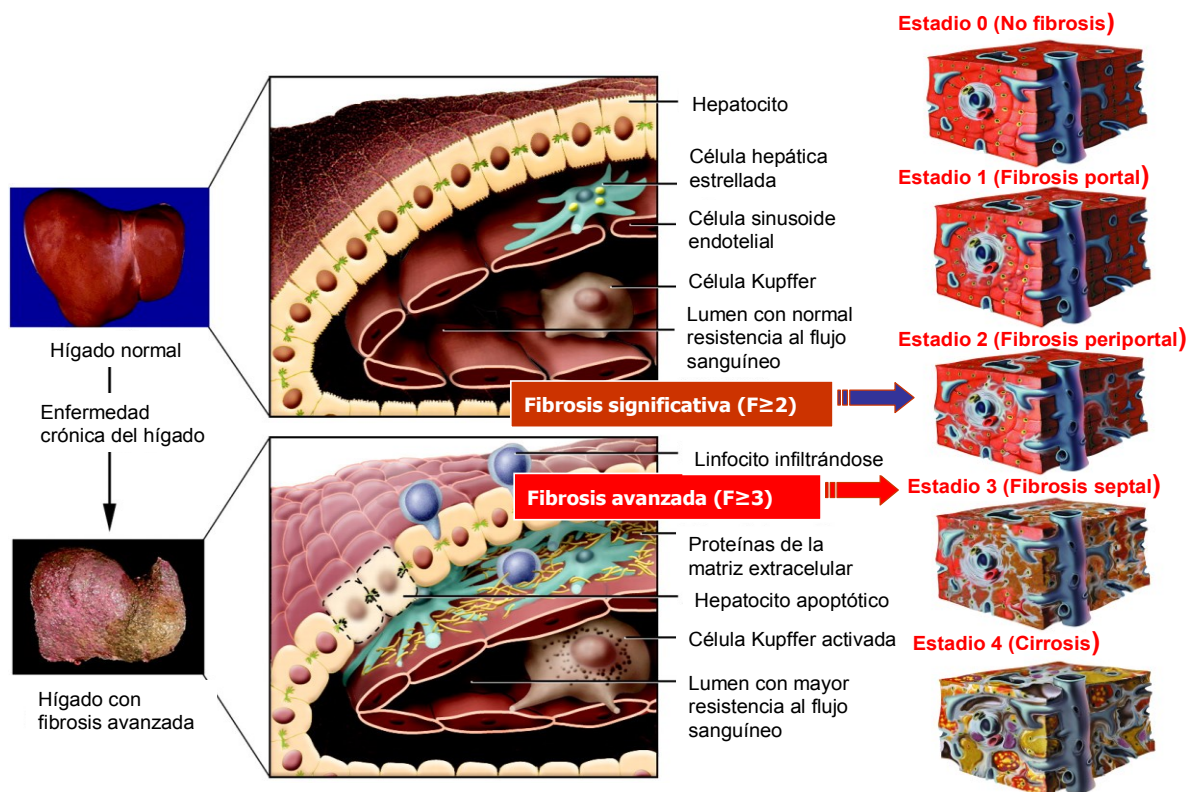


Figura 9. Proceso de fibrogénesis y cirrosis hepática. Adaptado de Friedman, SL (83).

En la hepatitis C, la fibrosis debuta alrededor de los espacios porta (fibrosis periportal) y se extiende hacia los espacios vecinos y las venas centrolobulillares formando septos y puentes fibrosos. El estadio final de la fibrosis es la cirrosis caracterizada por la existencia de bandas de tejido fibroso que hacen confluir la mayoría de las estructuras mesenquimales portales y centrolobulillares y aíslan nódulos hepatocitarios (79, 80) (**Figura 9**).

En relación con la historia natural de la infección por VHC, en 1997 Poynard y cols (84), definieron la progresión de la fibrosis por año como el cociente entre el estadio de fibrosis (según el sistema METAVIR) y la duración de la infección, obteniendo una mediana de 0,133 unidades/año. Esta lenta evolución identificó tres factores independientes asociados a una progresión más rápida: consumo de alcohol superior a 50 g/día, edad a la que se adquiere la infección superior a 40 años, y sexo masculino.

Además estimó una media de duración de la infección de 30 años para la progresión a cirrosis. Así mismo sugirió la presencia de tres grupos de pacientes: fibrosadores rápidos, fibrosadores intermedios y fibrosadores lentos, considerando diferencias interindividuales, de forma que el 33% progresarán a cirrosis en menos de 20 años y el 31% no progresarán a cirrosis durante al menos 50 años (84). Trabajos posteriores corroboraron estos datos, no encontrando clara relación entre la carga viral y genotipo del VHC con la velocidad de progresión de fibrosis. Sin embargo, factores metabólicos como la esteatosis, la obesidad y la diabetes, se han relacionado estrechamente con la progresión de la hepatitis crónica C (85, 86) (**Tabla 1**), habiendo incluso establecido una relación entre el genotipo 3 y una mayor progresión de la fibrosis que podría deberse a su asociación con la esteatosis (87). Por otro lado numerosos estudios constatan que la coinfección con el VIH se asocia a una progresión más rápida, especialmente en aquellos casos con un bajo recuento de células T CD4+ (88, 89).

Tabla 1. Factores asociados y no asociados a la progresión de la fibrosis. Adaptado de Poynard et al. (88).

Factores asociados	Factores dudosamente asociados	Factores no asociados
Estadio de fibrosis	Grado de inflamación	Carga viral
Edad a la que se adquiere la infección	Hemocromatosis	Genotipo no 3
Duración de la infección	Tabaquismo	Vías de transmisión
Consumo de alcohol \geq 50 g/día	Consumo de alcohol moderado	
Coinfección VIH	Genotipo 3	
Recuento de CD4+ < 200	Esquistosomiasis	
Sexo masculino		
Necrosis		
Obesidad y/o diabetes y/o esteatosis		

4.7.3.1 Métodos invasivos para evaluación de fibrosis hepática: biopsia hepática

La biopsia hepática se considera “el patrón de oro” para la valoración de la fibrosis hepática, sin embargo se trata de una técnica invasiva dolorosa, no exenta de complicaciones como sangrado, infecciones o perforación de otros órganos (90, 91).

Se han establecido diferentes clasificaciones para evaluar las lesiones histológicas. En 1981 Knodell publicó su índice de actividad histológica (92), con un rango que variaba entre 0 y 22. Tenía como inconveniente que no separaba la puntuación de la fibrosis (estadio) de la lesión necroinflamatoria (grado). Posteriormente se desarrollaron otros sistemas como el índice de Sheuer (93) ó de Ishak (94), destacando en 1996 el sistema METAVIR, diseñado para evaluar la lesión histológica de los pacientes con hepatitis crónica C de forma específica (95), siendo el más empleado en la actualidad. Se trata de un sistema más simple, que describe cuatro estadios teniendo en cuenta la actividad histológica (lesión necroinflamatoria) y el grado de fibrosis (**Figura 10**), según la clasificación de la **Tabla 2**.

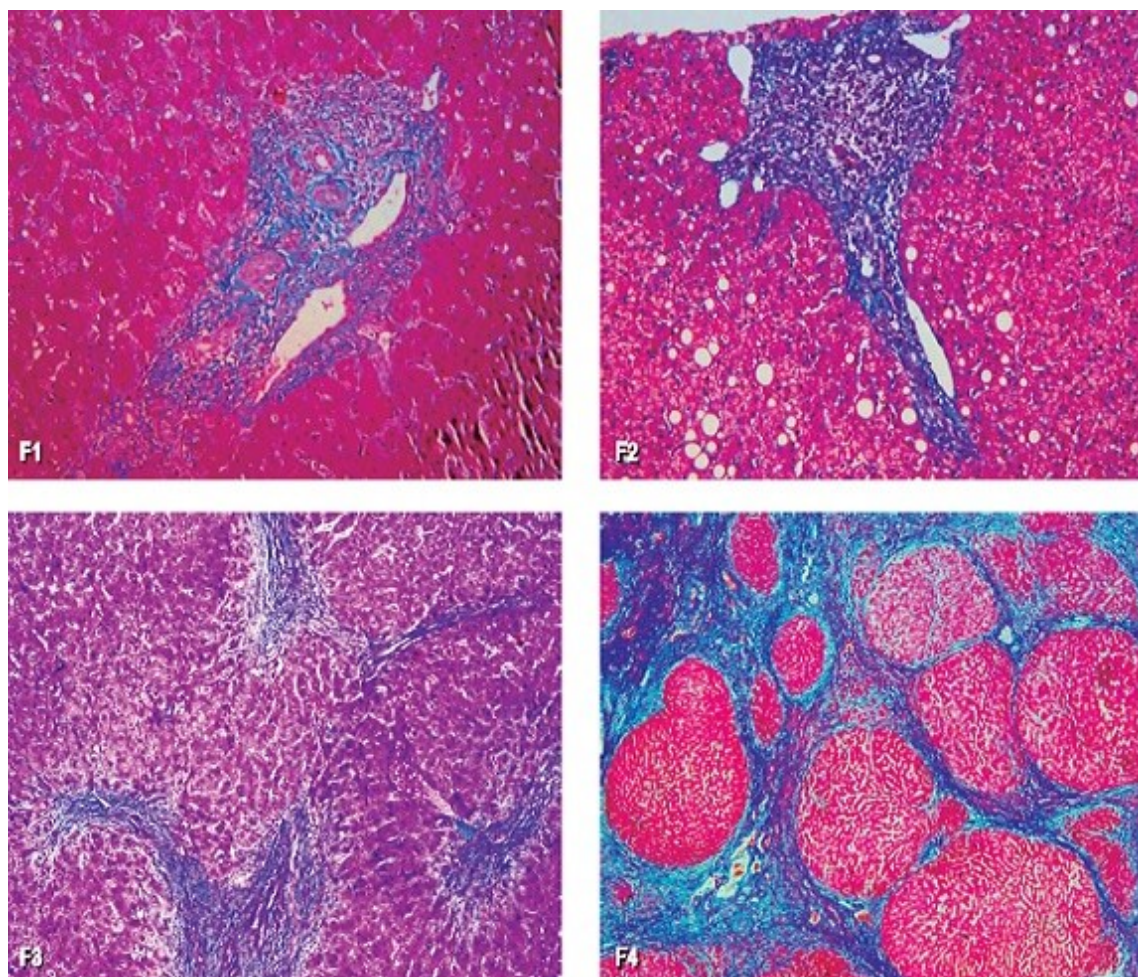


Figura 10. Biopsia hepática. Escala Metavir. F1: Fibrosis portal sin septos. F2: Fibrosis portal con algún septo. F3: Numerosos septos de fibrosis sin cirrosis. F4: Cirrosis. Tomado de Gil Parada FL et al. (96).

Debido a la precisión diagnóstica de los métodos no invasivos en la determinación de la fibrosis (FibroScan® y marcadores séricos principalmente) (90, 91), extensamente validados en el caso de hepatitis virales, la biopsia hepática ha quedado relegada para casos muy concretos: pacientes con valores discordantes de los métodos no invasivos o necesidad de evaluación de otras enfermedades concomitantes (hepatitis autoinmune, enfermedad de Wilson, hemocromatosis, esteatosis) pues son factores que se asocian a una progresión de la fibrosis más rápida y que pueden condicionar la respuesta al tratamiento (97, 98).

Tabla 2. Escala METAVIR. Adpatado de Bedossa, P et al. (95).

A. Actividad histológica	F. Fibrosis
A0: No actividad	F0: No fibrosis
A1: Actividad leve	F1: Fibrosis portal sin septos
A2: Actividad moderada	F2: Fibrosis portal con algún septo
A3: Actividad grave	F3: Numerosos septos de fibrosis sin cirrosis
	F4: Cirrosis

4.7.3.2 Métodos no invasivos para evaluación de fibrosis hepática

4.7.3.2.1 Elastografía de transición (FibroScan®)

La elastografía de transición se trata de un método no invasivo de cuantificación de la fibrosis hepática mediante la medición de la rigidez hepática (90, 91). El FibroScan® consta de un transductor de ultrasonidos que genera una vibración de baja amplitud y frecuencia (50 Hz), induciendo una onda de cizallamiento que se propaga a través de los tejidos. La velocidad de propagación está directamente relacionada con la rigidez del tejido, denominada módulo de elasticidad (expresado como $E=3 \rho v^2$, donde v es la velocidad de cizallamiento y ρ es la densidad del tejido, que se asume como constante). Cuanto más rígido es el tejido, más rápido se propagará la onda.

La elastografía de transición se realiza con el paciente en decúbito supino, con el brazo derecho elevado para facilitar el acceso al lóbulo hepático derecho. La punta de la sonda se pone en contacto con la piel con gel de acoplamiento, entre los espacios intercostales 9º a 11º. El operador presiona el botón de la sonda para iniciar las mediciones (“disparos”). La elastografía de transición mide la rigidez hepática en un volumen de

aproximadamente un cilindro de 1 cm de ancho y 4 cm de largo, entre 25 mm y 65 mm debajo de la piel (**Figura 11**).

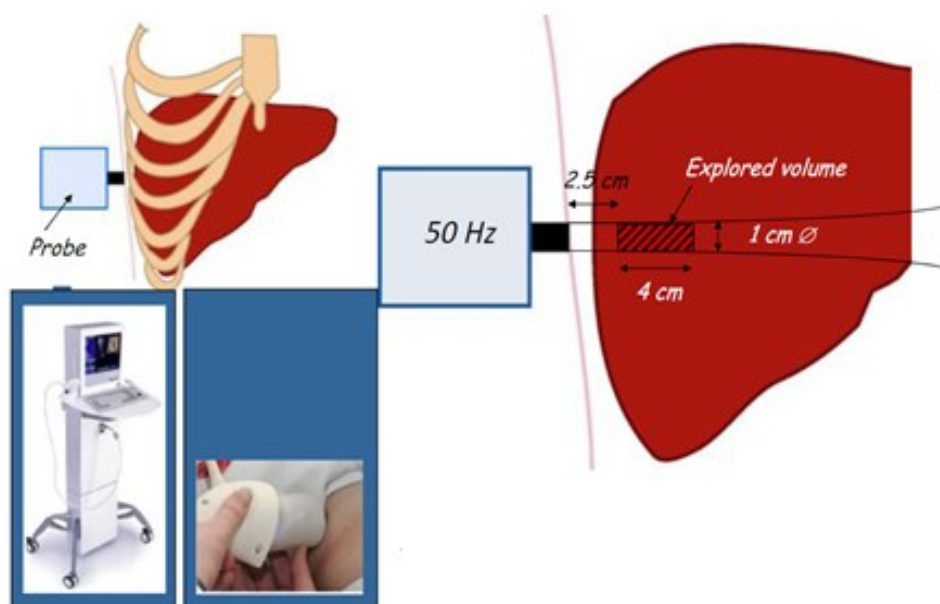


Figura 11. Técnica de elastografía de transición. Adaptado de Castera L et al. (99).

El *software* determina si cada medida es satisfactoria o no. Cuando un disparo es insatisfactorio, la máquina no devuelve un valor. Se considera que el procedimiento completo ha fallado cuando no se obtiene ningún valor después de diez disparos.

Se puede considerar como válido el resultado final de una elastografía de transición, si se cumplen los siguientes criterios: 1) al menos 10 disparos válidos; 2) una tasa de éxito (relación de disparos válidos respecto al número total de disparos) por encima de 60%; y 3) un rango intercuartílico (IQR, reflejo de la variabilidad de las medidas) menor de 30% de la mediana (M) de los valores de rigidez hepática ($IQR/M \leq 30\%$) (99). Los resultados se expresan en kilopascales (kPa), y oscilan entre 1,5 y 75 kPa (**Figura 12**), siendo los valores normales en torno a 5 kPa, más elevados en hombres y en pacientes con bajo o elevado índice de masa corporal (distribución en forma de U).

Los valores óptimos de punto corte establecidos para pacientes con hepatitis crónica C son muy diversos. Los valores recomendados por Castera et al. (100) son los siguientes: <7,1 kPa (F0-F1, ausencia de fibrosis o fibrosis leve), 7,1–9,4 kPa (F2, fibrosis significativa),

≥9,5–12,4 kPa (F3, fibrosis avanzada)), ≥12,5 kPa (F4, cirrosis) (**Figura 12**). Además, se ha identificado el punto de corte en ≥20-25 kPa para predecir el desarrollo de hipertensión portal clínicamente significativa (HTPCS) (101).

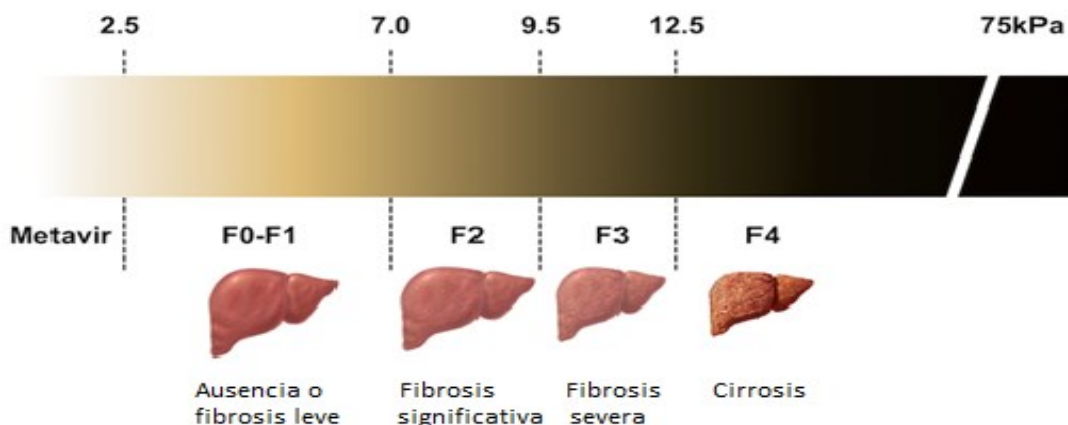


Figura 12. Puntos de corte del FibroScan® para el diagnóstico de fibrosis en pacientes VHC según el sistema METAVIR. Adaptado de Castera L et al.(99).

El FibroScan® obtiene mejores resultados en la diferenciación de grados avanzados de fibrosis (F2-F4) frente a estadios iniciales (F0-F1) (**Tabla 3**), lo que permite detectar de forma precoz a los pacientes con riesgo elevado de tener complicaciones como la hipertensión portal y el hepatocarcinoma (99).

Tabla 3. Diagnóstico de fibrosis hepática por elastografía de transición según el sistema METAVIR en pacientes con hepatitis crónica por VHC. Adaptado de Castera L et al. (99).

VALOR	F≥2	F≥3	F≥4
Punto de corte (kPa)	7,1	9,5	12,5
Sensibilidad (%)	67	73	87
Especificidad (%)	89	91	91
Valor predictivo positivo (%)	95	87	77
Valor predictivo negativo (%)	48	81	95

F≥2, fibrosis significativa; F≥3, Fibrosis avanzada; F≥4, cirrosis

La elastografía de transición tiene bastantes ventajas: el tiempo de procedimiento es corto (unos 5 min por paciente), los resultados son inmediatos y se puede realizar en la consulta o a pie de cama (102). Sin embargo, esta técnica también tiene sus limitaciones:

no es valorable en individuos con obesidad (índice de masa corporal superior a 28 Kg/m²), habiendo obtenido resultados más fiables mediante el empleo de sondas XL, 2,5 MHz, a pesar de lo cual los resultados no son óptimos en el 25% de los casos (103, 104). Se encuentran también otras limitaciones en los pacientes con espacios intercostales estrechos y en los pacientes con ascitis.

4.7.3.2.2 Marcadores serológicos de fibrosis

La manera más sencilla de evaluar la presencia de fibrosis es utilizar los marcadores serológicos indirectos (90, 91), que son parámetros bioquímicos o hematológicos sencillos que miden alteraciones funcionales hepáticas, sin reflejar necesariamente cambios en la matriz extracelular ni en las células implicadas en su recambio. Entre estos marcadores, las transaminasas, las plaquetas, el colesterol, la haptoglobina o la bilirrubina han sido los parámetros más frecuentemente asociados a la presencia de fibrosis hepática.

Otra opción para evaluar la presencia de fibrosis son los marcadores serológicos directos (90, 91), que son parámetros serológicos que permiten medir productos de la síntesis o degradación de la matriz extracelular (colágeno, TGF-β, ácido hialurónico), o bien valores de las enzimas que regulan estos procesos (metaloproteasas o sus inhibidores). Los marcadores directos de fibrosis son más sensibles que los indirectos, pero como desventaja presentan falta de especificidad, ya que pueden estar aumentados en procesos fibrogénicos de otros órganos o en alteraciones funcionales como la insuficiencia renal.

Los *scores* más frecuentemente utilizados en hepatitis crónica C son el índice de Forns, APRI (*AST-to-platelets ratio index*), FibroTest® y ELF® (*enhanced liver fibrosis*) (90, 91). Entre ellos, el índice de Forns, APRI y FibroTest® están basados en combinaciones de marcadores indirectos: **APRI**: ratio (AST [aspartato alanintransferasa]/AST (upper limit of normal)/plaquetas; **Índice de Forns**: $7,811 - 3,131 \times \ln [n.º \text{ plaquetas}] + 0,781 \times \ln [\text{GGT -gammaglutamil transpeptidasa-}] + 3,467 \times \ln [\text{edad}] - 0,014 \times [\text{colesterol}]$; **FibroTest®**: fórmula patentada que combina alfa-2-macroglobulina, apolipoproteína A1, GGT, haptoglobina, bilirrubina total, edad y sexo. **ELF®**, en cambio es un algoritmo compuesto por tres marcadores directos: ácido hialurónico, propéptido aminoterminal de procolágeno III e inhibidor tisular de metaloproteasas tipo 1 (105).

En general los marcadores séricos tienen una precisión diagnóstica aceptable para diferenciar pacientes sin o con mínima fibrosis (F0-F1) y pacientes con cirrosis (F4) (90, 91). Sin embargo, son menos fiables para identificar grados intermedios de fibrosis.

4.7.4 Cirrosis hepática y sus complicaciones.

La cirrosis constituye el estadio tardío de la hepatopatía crónica en el que se observa el grado más avanzado de fibrosis (78). Se caracteriza por la distorsión de la arquitectura hepática y la formación de nódulos de regeneración. En general se considera irreversible en sus etapas avanzadas.

4.7.4.1 Cirrosis compensada

Es el período asintomático u oligosintomático, de duración variable, en el que los pacientes pueden tener hipertensión portal y varices esofagogástricas (78). Durante esta fase aproximadamente el 40% de los pacientes puede presentar síntomas inespecíficos como astenia, anorexia, pérdida de peso o molestias en hipocondrio derecho. En la exploración física se pueden encontrar hepatomegalia (80%), esplenomegalia (30%) o estigmas cutáneos de hepatopatía evolucionada (30-40%) como son las arañas vasculares, telangiectasias o eritema palmar.

Estos pacientes requieren seguimiento periódico (cada 6 meses) con control clínico, analítico y ecográfico. El objetivo primordial es establecer un programa de vigilancia para el diagnóstico precoz del hepatocarcinoma, permitiendo también detectar la aparición de hipertensión portal y el desarrollo de descompensaciones.

4.7.4.2 Hipertensión portal

La hipertensión portal es la alteración hemodinámica asociada con las complicaciones más severas de la cirrosis (78). Se produce por una combinación de factores mecánicos y hemodinámicos. Debido a la fibrogénesis progresiva en el parénquima hepático con infección crónica por VHC, la vasculatura intrahepática es remodelada, lo que conduce a un incremento en la resistencia intrahepática. Por otro lado se produce un aumento en la secreción de sustancias vasodilatadoras endógenas lo que da lugar al incremento del flujo sanguíneo en el sistema venoso portal (106). La combinación entre la fibrosis hepática y la vasodilatación del lecho esplácnico da lugar al desarrollo de hipertensión portal (107).

La hipertensión portal aparece cuando el gradiente de presión venosa hepática (GPVH) aumenta por encima de 5 mmHg (límite alto de la normalidad) (107). Se define hipertensión portal leve cuando GPVH es >5 y <10 mmHg. Se considera hipertensión portal clínicamente significativa (HTPCS) cuando alcanza valores iguales o superiores a 10 mmHg, aumentando el riesgo de desarrollo de varices y de las complicaciones derivadas de la hipertensión portal (ascitis, encefalopatía hepática y hemorragia por varices). Cuando la presión portal supera los 12 mmHg, el paciente se encuentra en riesgo de hemorragia variceal, que aumenta de manera muy significativa con gradientes superiores a 20 mmHg. La prevalencia de HTPCS en pacientes con cirrosis es muy elevada, siendo del 100% en pacientes con enfermedad descompensada, superior al 70% en pacientes con enfermedad compensada (con o sin varices) y del 50% en los pacientes con enfermedad compensada y sin varices (107). Identificar los pacientes con HTPCS en la fase compensada de la cirrosis permite una mejor estratificación pronóstica.

4.7.4.3 Cirrosis descompensada

A medida que la enfermedad evoluciona, pueden desarrollarse las complicaciones relacionadas con la hipertensión portal (ascitis, hemorragia por varices o encefalopatía hepática) o con la insuficiencia hepatocelular (ictericia) señalando el inicio de la fase de enfermedad descompensada (78). Una vez alcanzada esta fase, el pronóstico con respecto a la supervivencia empeora ostensiblemente. En estos pacientes, el único tratamiento efectivo es el trasplante hepático por lo que deberán ser evaluados como posibles candidatos.

4.7.4.3.1 Ascitis

La ascitis es la complicación más frecuente de la cirrosis (la siguen en frecuencia la encefalopatía hepática y el sangrado variceal). Así, el 50%-60% de los pacientes cirróticos compensados presentarán un episodio de ascitis en los siguientes 10 años de seguimiento (108). La ascitis sólo ocurre cuando se ha desarrollado hipertensión portal (109). La hipertensión portal secundaria a la cirrosis, da lugar a un incremento de la síntesis de sustancias vasodilatadoras (principalmente óxido nítrico, monóxido de carbono y cannabinoides endógenos) produciendo vasodilatación de la circulación esplénica. Como consecuencia de esto, se produce una reducción de las resistencias vasculares sistémicas, activándose los sistemas vasoconstrictores (sistema renina-

angiotensina-aldosterona, sistema nervioso simpático y hormona antidiurética) que conllevan una retención de sodio y una expansión del líquido extracelular acumulándose en la cavidad abdominal (ascitis) y en el espacio intersticial de los miembros inferiores (edema) (110, 111). El desarrollo de ascitis se asocia con un mal pronóstico y un deterioro de la calidad de vida de los pacientes con cirrosis (112). Por este motivo, los pacientes con ascitis deben ser considerados generalmente para ser derivados a centros de referencia con programa de trasplante hepático (113).

4.7.4.3.2 Encefalopatía hepática

La encefalopatía hepática es un síndrome neuropsiquiátrico complejo, generalmente reversible y de intensidad variable, que puede manifestarse con diferentes alteraciones, tanto a nivel cognitivo, de comportamiento, motor o en el nivel de consciencia (78). Se produce secundariamente a insuficiencia hepatocelular (aguda o crónica) y/o a *shunts* portosistémicos. Constituye una de las complicaciones más frecuentes en los pacientes cirróticos (16%-21% en cirróticos descompensados y 10%-50% en pacientes con derivación portosistémica percutánea intrahepática), conocida por las siglas en inglés TIPS (*“transjugular intrahepatic portosystemic shunt”*).

Generalmente se presenta como un deterioro cognitivo-conductual, que oscila entre alteraciones leves de la consciencia (sólo alteración en los test psicométricos en relación con la atención, memoria de trabajo, velocidad psicomotora) y el coma, pasando por apatía, irritabilidad y desinhibición. A menos que la enfermedad hepática subyacente se trate con éxito, la encefalopatía hepática se asocia a peor supervivencia y tiene un alto riesgo de recurrencia (114). Incluso en su forma más leve, la encefalopatía hepática reduce la calidad de vida relacionada con la salud y es un factor de riesgo para episodios de encefalopatía hepática severa (115).

4.7.4.3.3 Hemorragia por varices esofagogástricas

Las varices esofágicas son dilataciones venosas patológicas en la submucosa del esófago que se producen habitualmente en pacientes con hipertensión portal (**Figura 13**).

La hemorragia por rotura de varices esofagogástricas es una complicación frecuente que aparece en el 25-35% de los pacientes cirróticos (107). Es la complicación más grave de la hipertensión portal y se asocia a una elevada mortalidad, que ronda el 15-20% a las 6

semanas. Los factores de riesgo más importantes para presentar hemorragia por varices son el tamaño de las varices (varices grandes >5 mm), la presencia de signos rojos en las mismas y el grado de insuficiencia hepática avanzada (107). Los principales factores pronósticos de la hemorragia por varices son el grado de insuficiencia hepática (Child-Pugh C), la presencia de comorbilidades (trombosis portal, hepatocarcinoma, hepatitis alcohólica, diabetes, insuficiencia respiratoria), la magnitud de la hemorragia (shock hipovolémico al ingreso) y el desarrollo de complicaciones (infecciones, broncoaspiración, fallo renal y encefalopatía hepática) (116).

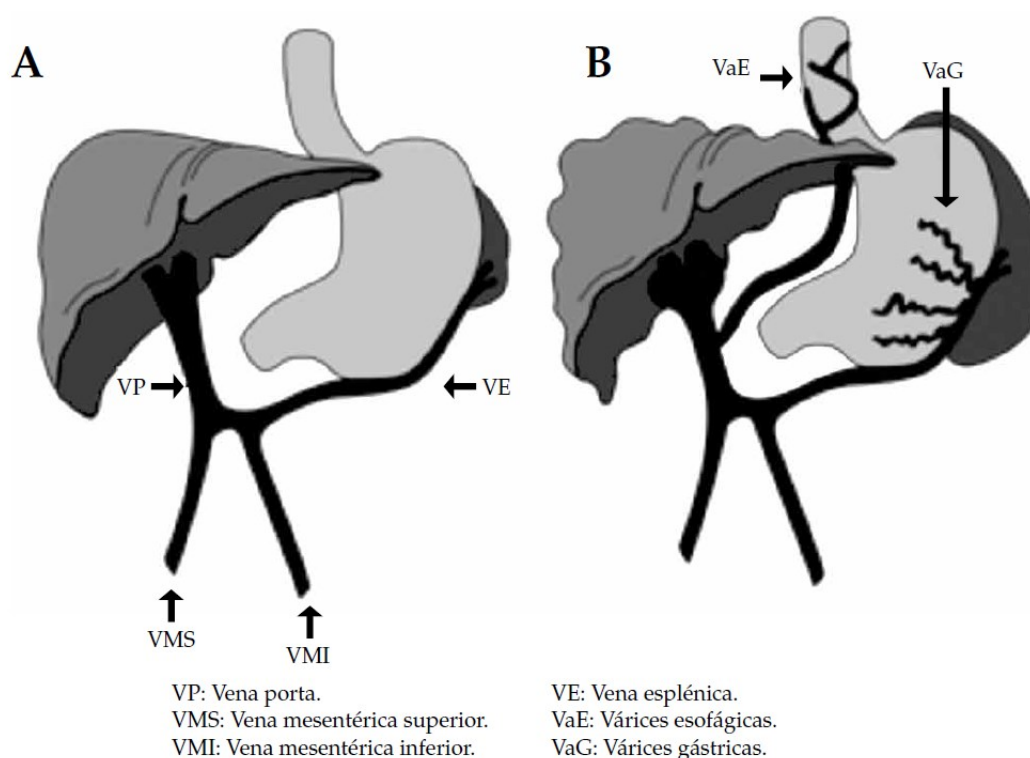


Figura 13. Varices esofágicas. A: Sistema porta normal. B: Hipertensión portal: hígado cirrótico con varices esofágo-gástricas. Tomado de Costaguta A et al (117).

Los pacientes que presentan estas complicaciones tienen una supervivencia disminuida de forma significativa.

Para evaluar el pronóstico del paciente con cirrosis hepática, se han elaborado dos escalas que se utilizan en la práctica clínica: la escala de Child–Pugh y MELD score.

La **clasificación modificada Child-Pugh** de severidad de enfermedad hepática se realiza de acuerdo al grado de ascitis, las concentraciones plasmáticas de bilirrubina y

albúmina, el tiempo de protrombina, y el grado de encefalopatía (**Figura 14**). Es un buen predictor pronóstico de severidad de hepatopatía en fase de cirrosis, muy usado por su fácil manejo (118, 119). Los pacientes con Child A se consideran compensados, mientras que los que se encuentran en estadio B/C están en su mayoría descompensados.

Parámetros	Puntos asignados		
	1	2	3
Ascitis	Ausente	Leve	Moderada
Bilirrubina, mg/dL	</= 2	2-3	>3
Albúmina, g/dL	>3,5	2,8-3,5	<2,8
Tiempo de protrombina * Segundos sobre el control	1-3	4-6	>6
* INR	<1,8	1,8-2,3	>2,3
Encefalopatía	No	Grado 1-2	Grado 3-4

Grado	Puntos	Sobrevida al año (%)	Sobrevida a 2 años (%)
A: enfermedad bien compensada	5-6	100	85
B: compromiso funcional significativo	7-9	80	60
C: enfermedad descompensada	10-15	45	35

Figura 14. Escala de Child-Pugh. Adaptado de Christensen, E et al. (119).

El MELD score (“Model for End Stage Liver Disease”) es un modelo matemático de predicción de la supervivencia de una persona con enfermedad hepática basado en simples valores de laboratorio rutinarios (bilirrubina, INR y creatinina) (**Figura 15**). Es más objetivo y más preciso que la clasificación de Child-Pugh. La puntuación puede oscilar entre 6 y 40; a menor puntuación, mejor pronóstico. Actualmente, el mayor uso del MELD es para dar prioridad en la lista de trasplante hepático (pacientes con mayor puntuación tienen prioridad para recibir un órgano)(120).

$$\begin{aligned}
 \text{MELD}_{\text{UNOS}} &= [(0.957 * \text{Ln Cr}) + (0.378 * \text{Ln Bili}) \\
 &\quad + (1.12 * \text{Ln INR}) + (0.643) * 10] \\
 \text{MELD-Na} &= \text{MELD} - \text{Na}^+ - (0.025 * \text{MELD} \\
 &\quad * (140 - \text{Na}^+)) + 140
 \end{aligned}$$

Figura 15. Escala MELD. Adaptado de Kamath, P. S (120).

4.7.5 Hepatocarcinoma

El hepatocarcinoma es la neoplasia primaria de hígado más frecuente. Actualmente constituye la sexta neoplasia más frecuente en el mundo. En Europa, incluyendo España,

presenta una incidencia intermedia de 5-10 casos/100.000 habitantes/año, desempeñando un papel predominante la infección por VHC y el alcoholismo (121). El riesgo de hepatocarcinoma en pacientes con VHC varía según el grado de afectación hepática, siendo menor al 1% anual en pacientes con hepatitis crónica sin fibrosis significativa, incrementándose al 3,5% anual en pacientes con cirrosis (122, 123). Por este motivo, para poder efectuar un diagnóstico precoz, los pacientes con cirrosis deben participar en programas de cribado mediante ecografía abdominal realizada cada 6 meses por personal experto (124).

En el paciente cirrótico en programa de cribado (**Figura 16**), es posible establecer el diagnóstico no invasivo de hepatocarcinoma por una técnica de imagen dinámica (RM o TC con contraste) si un nódulo muestra una intensa captación de contraste en fase arterial seguida de lavado precoz en fase portal o venosa. Este diagnóstico no sirve para nódulos menores de 1 cm ni en pacientes no cirróticos (125).

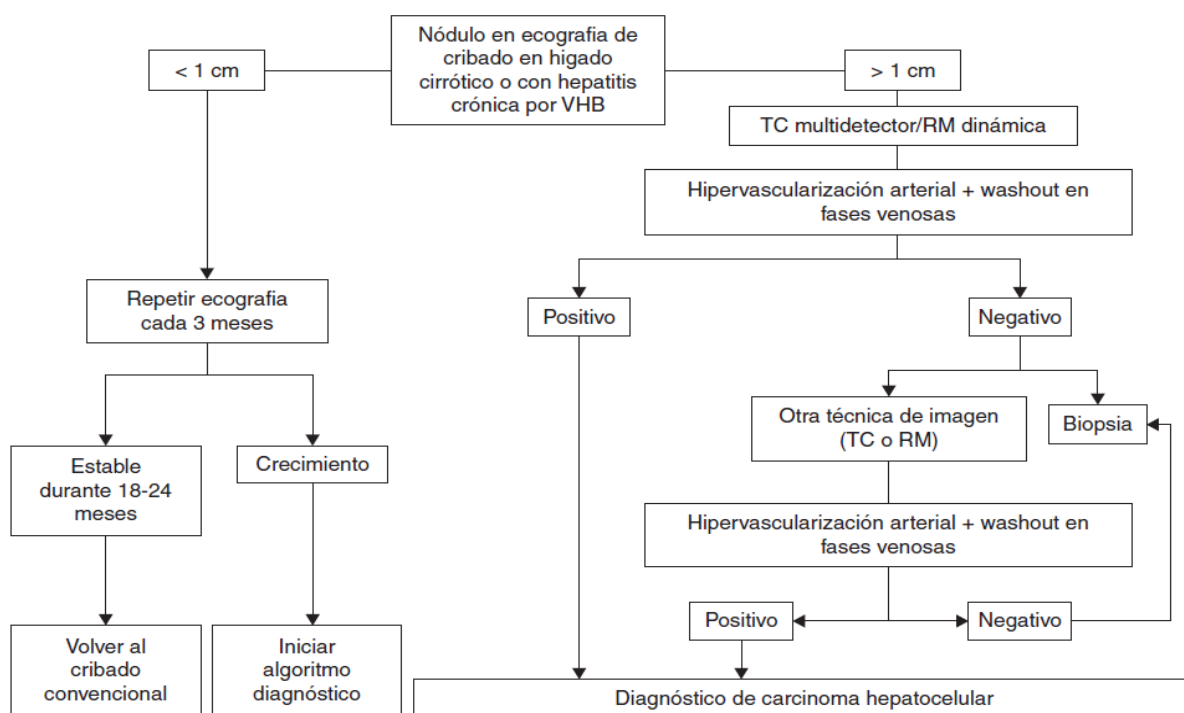


Figura 16. Algoritmo diagnóstico para el estudio de nódulo hepático detectado por ecografía abdominal- Tomado de Forner, A et al. (126).

Con el advenimiento de los nuevos AAD, con tasas de RVS en torno al 90% en el global de pacientes, las expectativas de la disminución en la incidencia de hepatocarcinoma

eran elevadas debido a la reducción de la inflamación crónica hepática una vez obtenida la RVS. Esto sucede en los pacientes con fibrosis inicial F1 y F2, sin embargo, en los pacientes con fibrosis avanzada (F3) y cirrosis (F4), el riesgo de desarrollar hepatocarcinoma todavía se mantiene más elevado de lo esperado, a pesar de obtener la RVS (127), y por tanto se recomienda mantener las estrategias de diagnóstico precoz del hepatocarcinoma en estos pacientes (128).

Por otro lado, en el año 2016, Reig y cols, elaboraron un estudio que advierte sobre la posibilidad de un aumento de la recurrencia del hepatocarcinoma en pacientes con cirrosis por VHC y hepatocarcinoma tratado con éxito, que posteriormente han recibido tratamiento con AAD (129). Sin embargo, otros autores cuestionan esta afirmación, aportando nuevos estudios en los cuales no se observa este incremento del riesgo (122, 130). Se necesitan, por tanto, ensayos clínicos randomizados sobre la evolución de la histología hepática de los pacientes con hepatocarcinoma por VHC tratados con AAD para poder establecer conclusiones.

4.7.6 Manifestaciones extrahepáticas

La infección por VHC puede afectar a otros órganos también, y así los pacientes pueden presentar además manifestaciones extrahepáticas (crioglobulinemia, Linfoma no Hodking de células B, resistencia a la insulina, glomerulonefritis membranoproliferativa, etc.). La mayoría están asociadas al desarrollo de autoinmunidad, depósito de inmunocomplejos y trastornos linfoproliferativos. Las que más impacto clínico tienen incluyen la vasculitis por crioglobulinemia mixta, linfoma no Hodking de células B, la resistencia a la insulina y la glomerulonefritis por depósito de inmunocomplejos (131). Son más frecuentes en pacientes del sexo femenino, edad avanzada, infección de larga evolución y cuando existe cirrosis hepática. En todos los casos está indicado el tratamiento antiviral.

4.8 Tratamiento antiviral

4.8.1 Interferón- α

La historia del empleo de Interferón (IFN)- α para el tratamiento de la hepatitis C se remonta a hace más de 30 años (**Figura 17**). El primer estudio con IFN- α para el tratamiento de la HANB se realizó en 1983 por Hoofnan y col., los cuales utilizaron el

IFN- α -2b en 10 pacientes con HNANB, observando normalización de transaminasas en 8 de ellos, así como mejoría de la histología hepática (132). Seis años después, en 1989, Davis y col. publicaron el primer estudio prospectivo, randomizado y controlado que evaluaba el papel del tratamiento con IFN- α en 166 pacientes con HNANB (133). El segundo gran avance en el tratamiento de la hepatitis C vino con la utilización de Ribavirina (RBV), al observar que cuando se combinaba con IFN- α , se incrementaban las tasas de respuesta viral sostenida (RVS) al 40%-50%, dos o tres veces superiores a las obtenidas con IFN- α en monoterapia (134, 135). El tratamiento de IFN- α combinado con RBV fue aprobado en 1998 para su uso en clínica.

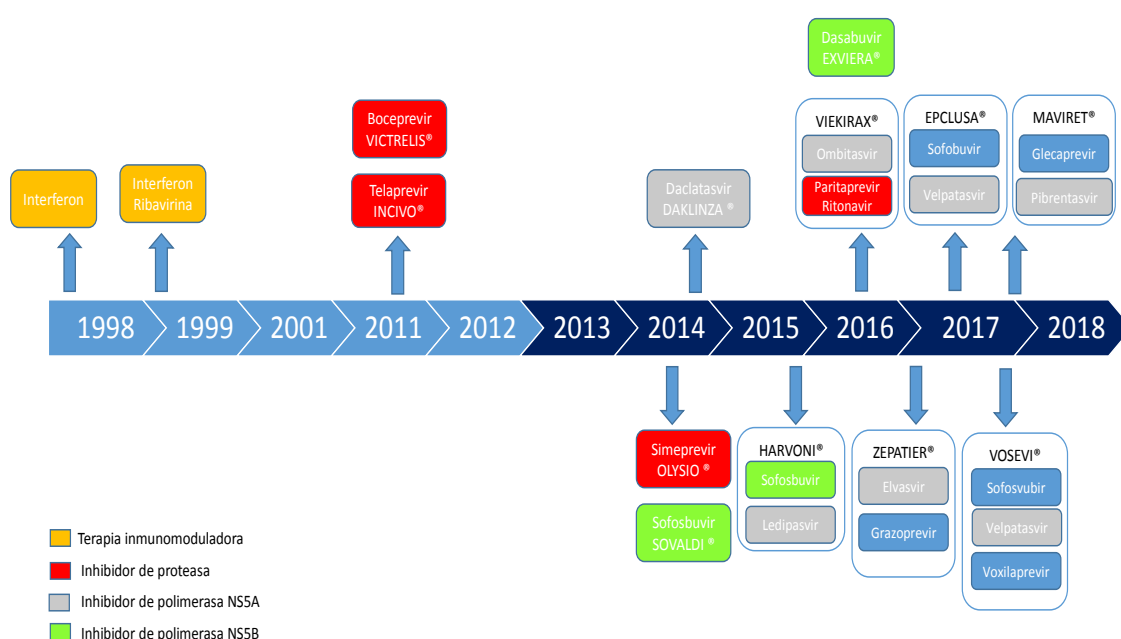


Figura 17. Evolución del tratamiento de la hepatitis C.

El tercer gran avance en el tratamiento de hepatitis C ocurrió en el año 2000 con el desarrollo de la forma pegilada de IFN- α , que incrementó la vida media de IFN- α , permitiendo así la administración semanal de una inyección de IFN- α pegilado (peg-IFN α) en lugar de tres veces en semana (136). Desde entonces, y hasta hace pocos años, la terapia estándar se ha basado en la combinación de peg-IFN α y RBV, obteniéndose una tasa de RVS del 42-46% para los genotipos 1 y 4 tratados durante 48 semanas, y del 76-82% para los genotipos 2 y 3 tratados durante 24 semanas de tratamiento (137, 138). Sin embargo, este tratamiento suponía una elevada tasa de efectos adversos, tales como

fiebre, escalofríos, mialgias, cefaleas, anemia, hipotiroidismo, hipertiroidismo y depresión, entre otros, por lo que tenía escasa aplicabilidad en determinados subgrupos de pacientes (137). Con el objetivo de mejorar los resultados se optó por individualizar el tratamiento en función de las características del paciente, del genotipo del virus y de la respuesta al tratamiento, variando la duración del mismo entre las 12-72 semanas.

4.8.2 Antivirales de acción directa

En 2011, la asociación de AADs de primera generación, (boceprevir y telaprevir) con peg-IFN α y RBV (**Figura 17**), aumentó la tasa de RVS global al 67-75% en pacientes naïve, 85-97% en recidivantes, 50-55% en respondedores parciales y 30-37% en respondedores nulos, a consta de mayores efectos secundarios, interacciones y coste económico (139-147). La duración prolongada del tratamiento y la escasa tolerabilidad de los fármacos, sobre todo en pacientes cirróticos, condujo a la búsqueda de nuevos tratamientos (148).

Los avances en el conocimiento de las diferentes etapas del ciclo de vida del VHC han permitido que el desarrollo de fármacos contra la infección por el VHC aumente de forma exponencial durante los últimos años (48). En diciembre de 2013, fue aprobado por la “*Food and Drug Administration*” (FDA) Sofosbuvir; primer AAD de segunda generación. Desde entonces, se dispone de una variedad de regímenes antivirales basados en AADs capaces de eliminar de forma sostenida la replicación viral en un porcentaje elevado de pacientes (85-100%) en períodos de tiempo cortos y sin efectos secundarios relevantes (**Figura 17**). Estos tratamientos suelen tener una duración limitada a 8 o 12 semanas en la mayoría de los casos, en función del genotipo viral y de las características basales del paciente.

Existen tres dianas principales de los AADs que corresponden a la proteasa NS3, la polimerasa (NS5B) y la proteína NS5A que estabiliza el complejo de replicación (**Figuras 18**). Estos fármacos bloquean dos fases del ciclo vital del VHC fundamentales: la replicación viral con los inhibidores de NS5A y NS5B, y la fragmentación de la poliproteína del VHC con los inhibidores de la NS3 (149).

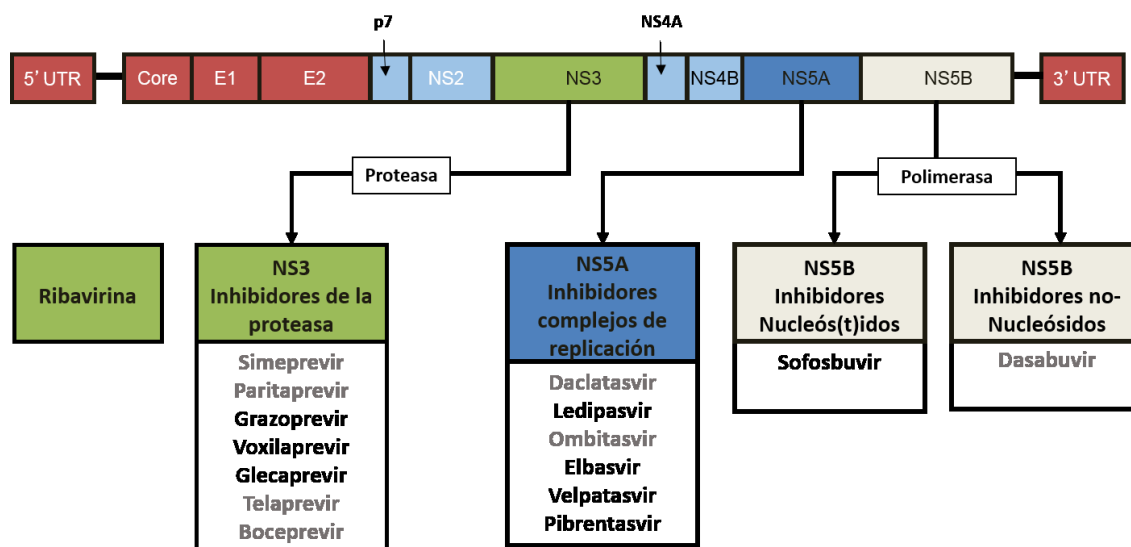


Figura 18. Diana terapéutica de los distintos tipos de antivirales de acción directa aprobados en la actualidad.

4.8.2.1 Inhibidores de la proteasa (NS3)

Terminación en “previr”: Telaprevir, Boceprevir, Simeprevir, Paritaprevir, Grazoprevir, Voxilaprevir, Glecaprevir.

Se unen en el sitio catalítico de la NS3 y bloquean el procesamiento post-traslacional de la poliproteína del virus a nivel de los sitios de escisión de NS3/NS4A, NS4A/N4B, NS4B/NS5A y NS5A/NS5B. La primera generación de inhibidores de proteasa, Telaprevir y Boceprevir, se aprobaron para la combinación con peg-IFN α y RBV. Se indicaron para el genotipo 1, pero tenían una barrera genética muy baja al desarrollo de resistencias y numerosos efectos adversos asociados. La segunda generación de inhibidores de la proteasa (Simeprevir, Paritaprevir, Grazoprevir, Voxilaprevir, Glecaprevir) tiene grandes ventajas con respecto a la primera: elevada barrera genética frente al desarrollo de resistencias; no necesitan tratamiento con peg-IFN α y prácticamente carecen de efectos secundarios (150).

4.8.2.2 Inhibidores de la polimerasa (NS5B)

Terminación en “buvir”: Sofosbuvir y Dasabuvir. Se clasifican en dos categorías atendiendo a su estructura química.

Inhibidores análogos de nucleós(t)idos: actúan como falsos sustratos para la ARN polimerasa dependiente de ARN del VHC. Intervienen como terminadores de la cadena

de ARN naciente después de haberse incorporado al nuevo ARN viral. Son efectivos frente a todos los genotipos y ofrecen una elevada barrera genética al desarrollo de resistencias. Destaca Sofosbuvir, que ha demostrado una extraordinaria eficacia frente a todos los genotipos en combinación inicialmente con Daclatasvir, Simeprevir y Ledipasvir y actualmente también con Velpatasvir y Voxilaprevir (66, 150).

Inhibidores no análogos de nucleós(t)idos: se unen a uno de los cuatro sitios alostéricos de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), alterando su conformación y bloqueando su función catalítica. Tienen poca cobertura genotípica (únicamente genotipo 1) y una baja barrera genética para el desarrollo de resistencias. Actualmente, sólo Dasabuvir ha sido aprobado para su uso en clínica, pero en terapia combinada con otros AAD (150).

4.8.2.3 Inhibidores de la proteína NS5A

Terminación en “asvir”: Ledipasvir, Daclatasvir, Ombitasvir, Elbasvir, Velpatasvir, Pibrentasvir.

Se unen al dominio 1 de la proteína NS5A y bloquean su capacidad para regular la replicación del VHC a través de la red membranosa del complejo de replicación, proceso en el que NS5A desempeña un papel esencial. Además, inhiben los procesos de ensamblaje y secreción de partículas virales. Los inhibidores de primera generación (Daclatasvir, Ledipasvir, Elbasvir, Velpatasvir y Ombitasvir) se han aprobado para su uso en terapia combinada pues presentan baja barrera genética. Estos fármacos son muy activos frente a genotipo 1 y 4, pero no tan activos frente a genotipo 2 y 3 (150).

4.8.3 Pautas de tratamiento

Cada día el VHC se replica en millones de copias (10^{12} aproximadamente). Fruto de esta replicación incontrolada, algunos de los nuevos virus podrían presentar mutaciones lo que conferiría resistencia al fármaco y fracaso al tratamiento. Por este motivo, todo tratamiento debe constar de al menos dos AADs de diferente familia de inhibidores. Estas pautas de tratamiento varían en función de los genotipos virales, de tratamientos previos recibidos, presencia de cirrosis e insuficiencia renal (**Tabla 4**).

Tabla 4. Resumen de las recomendaciones de tratamiento de la Hepatitis C realizado según genotipo y estadio de la enfermedad (AEEH y SEIMC 2017) (151).

		SIN CIRROSIS	CON CIRROSIS COMPENSADA
1b	PREF	EBR/GZR 12 sem (AI) LDV/SOF 12 sem (AI), 8 sem en naïve y CV<6 mill UI/ml (AII) OBV/PTV/rtv+DSV 12 sem (AI), 8 sem en pacientes naïve F0-F2 (AI) SOF+DCV 12 sem (AI) SOF+SMV 12 sem (AI) SOF/VEL 12 sem (AI) ^a	EBR/GZR 12 sem (AI) ^b LDV/SOF 12 sem en naïve (AI) OBV/PTV/rtv+DSV 12 sem (AI) ^b SOF/VEL 12 sem (AI) ^a
	ALT		LDV/SOF+RBV 12 sem en no respondedores, 24 sem en intolerantes a RBV (AI) SOF+DCV+RBV 12 sem (BII) SOF+SMV+RBV 12 sem (BII) ^b
1a	PREF	EBR/GZR 12 sem si ARN-VHC ≤ 800 000 UI/ml (AI) LDV/SOF 12 sem (AI), 8 sem en naïve y CV<6 mill UI/ml (AII) SOF+SMV 12 sem (AI) SOF/VEL 12 sem (AI) ^a	EBR/GZR 12 sem si ARN-VHC ≤ 800 000 UI/ml (AI) ^b LDV/SOF 12 sem en naïve (AI) SOF/VEL 12 sem (AI) ^a
	ALT	EBR/GZR+RBV 16 sem si ARN-VHC > 800 000 UI/ml (AI) OBV/PTV/rtv+DSV+RBV 12 sem (AI) ^b SOF+DCV 12 sem (BI)	EBR/GZR+RBV 16 sem si ARN-VHC > 800 000 UI/ml (AI) ^b LDV/SOF+RBV 12 sem en no respondedores, 24 sem en intolerantes a RBV (AI) OBV/PTV/rtv+DSV+RBV 12 sem en naïve y recaedores, 24 sem en no respondedores (AI) ^b SOF+DCV+RBV 12 sem (AI) SOF+SMV+RBV 12 sem si no tiene Q80K (AII) ^b
1a/1b FALLO TEL/BOC	PREF	EBR/GZR+RBV 12 sem (AI), 16 sem con factores desfavorables de respuesta (BIII) ^{b,c} LDV/SOF+/-RBV 12 sem (AI), 24 sem en intolerantes a RBV (AI) SOF/VEL 12 sem (AI)	
2	PREF	SOF/VEL 12 sem (AI) ^a	SOF/VEL 12 sem (BIII) ^a
	ALT	SOF+DCV 12 sem (AI) SOF+RBV 12 sem (AI)	SOF+DCV 12 sem (AI) SOF+RBV 16 sem (BII)
No respondedores a PR o SOF+RBV: SOF/VEL* 12 sem (AI)			
3	PREF	SOF+DCV 12 sem (AI) SOF/VEL 12 sem (AI) ^a	SOF/VEL 12 sem (AI) ^a
	ALT		SOF+DCV+RBV 12 sem (AI) SOF+DCV+/-RBV 24 sem (BI)
4	PREF	EBR/GZR 12 sem en naïve, pretatados con PR y ARN-VHC ≤ 800 000 UI/ml (AI) EBR/GZR+RBV 16 sem en pretatados con PR y ARN-VHC > 800 000 UI/ml (AI) LDV/SOF 12 sem (BII) OBV/PTV/rtv+RBV 12 sem (AI) SOF+DCV+/-RBV 12 sem (BII) SOF+SMV 12 sem (AI) SOF/VEL 12 sem (AI) ^a	EBR/GZR 12 sem en naïve, pretatados con PR y ARN-VHC ≤ 800 000 UI/ml (AI) EBR/GZR+RBV 16 sem en pretatados con PR y ARN-VHC > 800 000 UI/ml (AI) LDV/SOF + RBV 12 sem (BII) OBV/PTV/rtv+RBV 12 sem (AI) ^b SOF+DCV+RBV 12 sem, 24 sem en intolerantes a RBV (BI) SOF+SMV+RBV 12 sem (BII) ^b SOF/VEL 12 sem (AI) ^a
	ALT		
5 y 6	PREF	LDV/SOF 12 sem (AI) SOF/VEL 12 sem (AI) ^a	
	ALT	SOF+DCV 12 sem (BI)	

4.9 Genética, polimorfismos y VHC

El ácido desoxirribonucleico (ADN) está organizado en pares de cromosomas, siendo cada uno heredado de uno de los progenitores. Cada gen de un individuo, posee por tanto dos copias, llamadas alelos, uno en cada cromosoma de un par.

Los genes están diseminados a lo largo de los cromosomas y están formados por secuencias codificadoras (exones) separadas por intrones. Estos últimos no llevan información para codificar proteínas, pero en ocasiones desempeñan un papel en la regulación de la expresión génica.

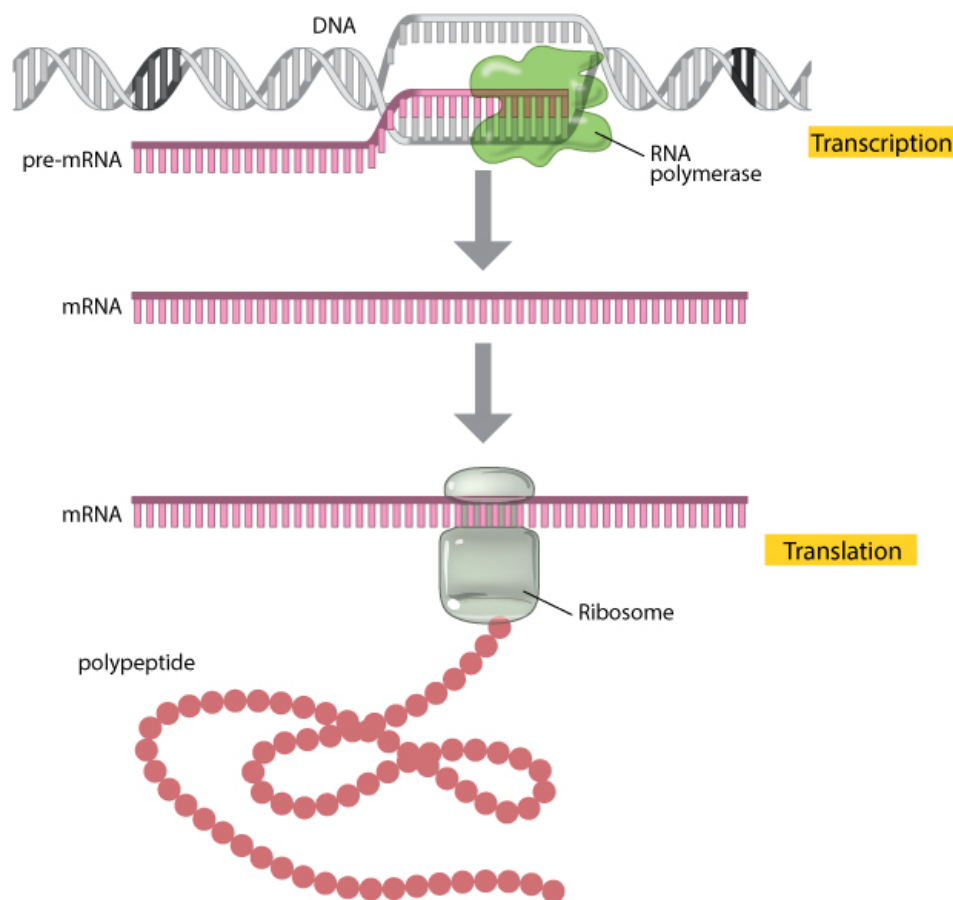


Figura 19. Síntesis de proteínas mediante transcripción y traducción del ADN. Tomado de Nature Education 2013. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/translation-dna-to-mrna-to-protein-393#>

Las instrucciones codificadas por los genes se activan mediante dos procesos (**Figura 19**). El primero es la **transcripción** (copia) de información genética a ARN. Tanto los exones como los intrones se transcriben a una molécula de ARN mensajero primario (ARNm).

Dicha molécula es modificada en un proceso que conlleva la eliminación de los intrones, la unión de los exones y la adición de características únicas a cada extremo de ARNm. Se crea así una molécula de ARNm madura ó ARNm secundario, que se transporta al citoplasma, donde se encuentran los ribosomas. Los ribosomas están formados por ARN ribosómico y proteínas, y proporcionan sitios de unión para el segundo proceso: la traducción.

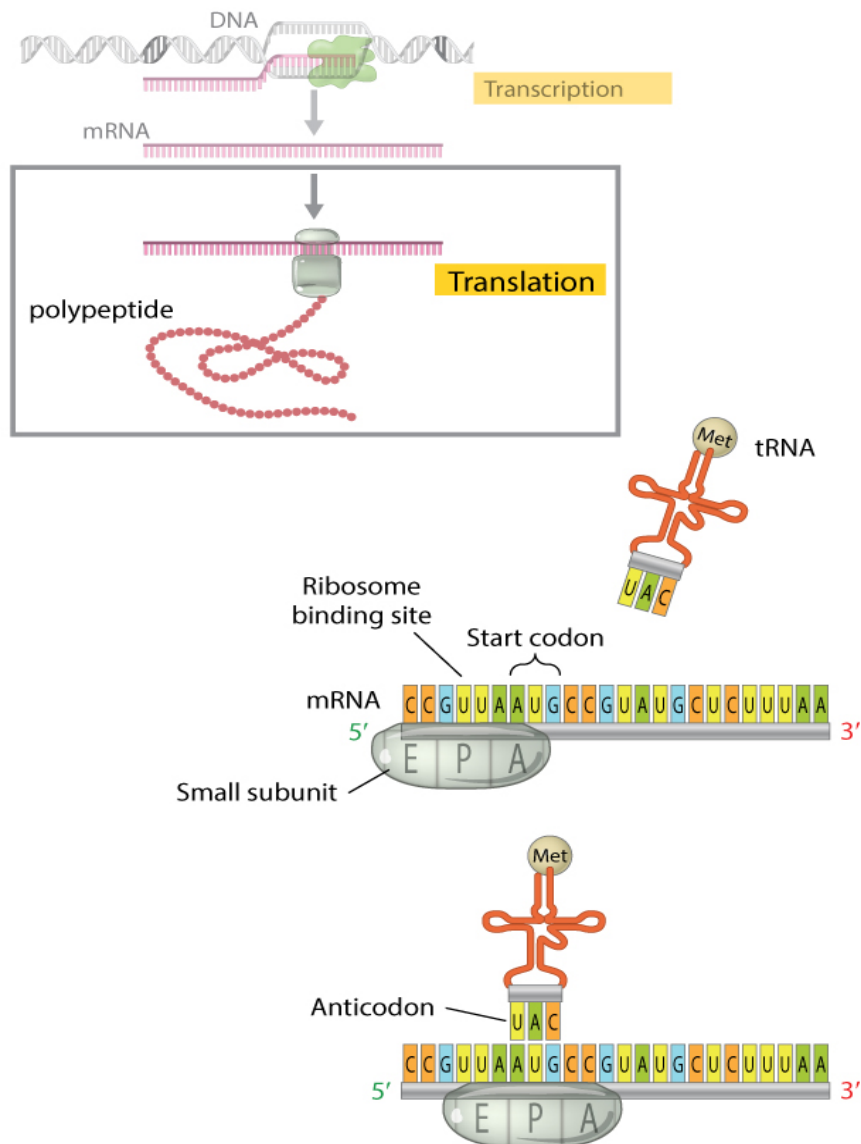


Figura 20. Complejo de iniciación en la traducción del ADN. Tomado de Nature Education 2013. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/translation-dna-to-mrna-to-protein-393#>

El segundo es la **traducción** o el paso de la información del ADN transportada por ARNm a un polipéptido (bien una proteína entera o bien una de las cadenas del complejo

proteico). La molécula de ARNm se traduce a razón de tres nucleótidos (un codón) por vez. La complementariedad entre el codón de ARNm y el anti-codón del ARN de transferencia (ARNt, que lleva el aminoácido correspondiente al ribosoma), garantiza que el polipéptido recién formado contenga la secuencia específica de los aminoácidos necesarios (**Figura 20**).

La proporción del genoma que codifica a proteínas representa sólo el 1,5%, pero se ha calculado que alrededor del 5% del genoma es funcionalmente importante (152). Esto sugiere que el 3,5% del genoma está integrado por elementos no codificantes, muchos de los cuales pueden intervenir en la regulación de la expresión génica (153).

Un polimorfismo genético es una variación en un lugar determinado de la secuencia de ADN. La mayoría de polimorfismos no tienen impacto funcional, sólo algunos tienen impacto y normalmente viene determinado por la evolución. Existen distintos tipos de polimorfismos, entre los que destacan:

- Inserciones y deleciones: ganancia o pérdida de un fragmento de ADN de un cromosoma.
- Variación en el número de copias: segmento de ADN cuyo número de copias es variable si se compara con un genoma de referencia.
- Translocaciones: un segmento de DNA se desplaza a un nuevo lugar en el genoma.
- Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), del inglés “single nucleotide polymorphism”: es el tipo más frecuente pues aproximadamente constituyen el 90% de las variantes genéticas encontradas en el genoma humano.

4.9.1 Polimorfismos de un solo nucleótido.

El Proyecto Genoma Humano, iniciado en 1990, consiguió determinar la secuencia que determina el ADN, identificando aproximadamente 20.000-25.000 genes del genoma humano, y 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 fenotipos y desarrollar investigaciones sobre genes y variaciones genéticas que se asocian a la salud y a la enfermedad. Algunos estudios han centrado su atención en evaluar el rendimiento de los SNPs derivados del HapMap (154, 155).

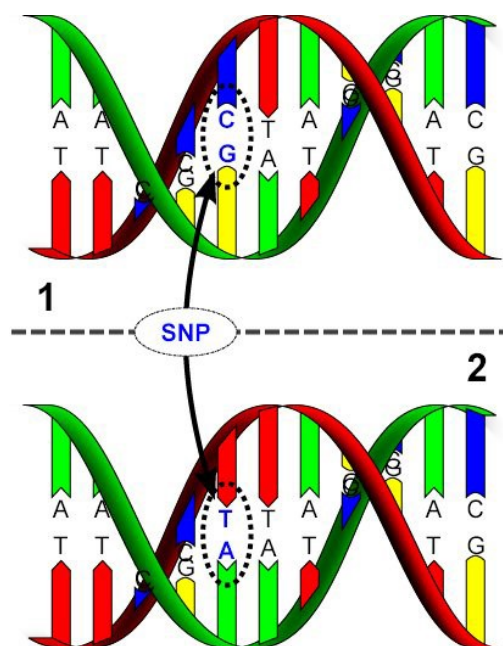


Figura 21. Representación gráfica de SNP. Autor: David Hall. Tomado de Nature Education. <https://www.nature.com/scitable/content/snp-4815>

Un SNP consiste en el cambio de un sólo nucleótido en una posición concreta del genoma que afecta a una sola base (Adenina(A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)) (**Figura 21**). Los SNPs tienen una distribución de aproximadamente uno por cada 200 pares de bases (pb) de los 3000 millones de pb que configuran el genoma humano (156). Representan los marcadores genéticos más ampliamente distribuidos en el genoma humano. Hasta el momento se han identificado más de 10 millones de SNPs, aunque se ha estimado que existen aproximadamente 20 millones de ellos. Se distinguen de las mutaciones por su frecuencia, pues afectan a >1% de la población (157). Las diferentes formas o variantes que un polimorfismo puede tomar se denominan alelos. La mayoría de los SNPs tienen dos posibles alelos, los cuales están representados por la sustitución de una base por otra (por ejemplo, el cambio de T por C representado como T>C). Si el SNPs se localiza en un cromosoma autosómico (del 1 al 22), cada individuo es portador de dos alelos, uno en cada copia del cromosoma que se heredan del padre y madre de manera independiente. La pareja de alelos observada en un individuo es el genotipo, y para el locus T>C del ejemplo, las tres posibilidades de parejas de alelos son TT, TC, y CC. Se denominan homocigotos los dos alelos iguales y heterocigotos si tienen diferentes alelos. En general, se considera variante al alelo menos frecuente. El sistema de nomenclatura más común usa un número con el prefijo “rs”.

La variabilidad genética se ha relacionado principalmente con los SNPs, y éstos con la susceptibilidad a padecer diversas enfermedades. Algunos SNPs desempeñan un papel biológico importante en el desarrollo de enfermedades comunes. (158).

En cuanto a la localización, algunos SNPs se encuentran en partes del gen que se traducen, es decir, que codifican para una proteína. Entre ellos, los SNPs no sinónimos conducen a un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína resultante, mientras que los SNPs sinónimos no dan como resultado un cambio de aminoácidos (159). Otros SNPs se encuentran en áreas del cromosoma que no codifican proteínas pero que pueden influir en la función celular a través de otros mecanismos como controlar la cantidad de proteína que la célula genera. De hecho, recientemente se ha observado que la mayoría de SNPs que se asocian con enfermedades complejas se encuentran, de forma inesperada, fuera de la secuencia codificante (exones) de los genes (160), lo que indica que muchos SNPs de riesgo podrían no ser codificantes, y sin embargo afectar al fenotipo del individuo (161).

Aquellos SNPs, independientemente de su localización, que presentan implicaciones funcionales sobre los niveles de expresión génica se llaman SNPs reguladores (rSNPs). Los rSNPs tienen un papel muy importante en el mecanismo molecular de enfermedades complejas y otros procesos biológicos. Los rSNPs pueden influir en la regulación de la transcripción de diversas maneras como por ejemplo alterando el sitio de unión de factores de transcripción y microARNs (miARNs), regiones de *splicing* o bien modificando elementos reguladores que intervienen en la apertura de la cromatina (162), entre otros.

4.9.2 Conceptos de genética sobre SNPs

Para el estudio de SNPs, se deben tener en cuenta las siguientes nociones:

4.9.2.1 Equilibrio de Hardy- Weinberg (HWE)

La mayoría de las distribuciones de alelos se ajustan al equilibrio de *Hardy-Weinberg* (HWE). La ley de *Hardy-Weinberg* establece que, si hay dos alelos en un locus particular, llamados A y a, con frecuencias p y q respectivamente, después de generaciones de apareamiento aleatorio, las frecuencias de los genotipos AA, Aa y aa en la población

serán p^2 , $2pq$ y q^2 , respectivamente. Dado que solo hay dos posibles alelos presentes en un individuo, A o a, entonces $p + q = 1$, y $p^2 + 2pq + q^2 = 1$.

En estudios de asociación genética, se debe comprobar si los polimorfismos de estudio se encuentran en HWE. Para ello, se suele utilizar una prueba Chi cuadrado, donde la obtención de un valor de $p > 0.05$ indicaría que las frecuencias genotípicas cumplen con el HWE.

Las desviaciones del HWE en la población podrían deberse a deriva genética, migraciones, nuevas mutaciones, selección o endogamia. Además, las desviaciones se podrían también producir por problemas metodológicos como error de genotipado o estratificación de la población (163).

4.9.2.2 Desequilibrio de ligamiento

Es la asociación no aleatoria de alelos en una población dada. Esto es debido a una recombinación disminuida durante la meiosis y conduce a que determinadas regiones del genoma tiendan a heredarse juntas como una unidad. El desequilibrio de ligamiento es expresado con los valores D' y r^2 . Valores elevados de D' entre dos SNPs (cerca de 1) indican un alto desequilibrio de ligamiento entre dichos SNPs y valores elevados de r^2 indican que esos SNPs suministran información similar y por tanto, podrían ser sustituidos uno por el otro en el análisis.

En la práctica, la asociación de un SNP con el fenotipo puede ser no causal, debido a que otros SNPs en desequilibrio de ligamiento con él, sean la variable causal verdadera. Aunque esto es importante si el objetivo es entender los mecanismos fisiopatológicos, no es crítico si el objetivo es usar el SNP simplemente como un marcador de riesgo (163).

4.9.2.3 Haplotipos

Un haplotipo es una combinación de alelos a lo largo de un cromosoma que son heredados como una unidad.

4.9.3 Estudios de asociación genética.

La información genética puede arrojar luz sobre las rutas biológicas implicadas en la enfermedad e identificar nuevas dianas para intervenciones terapéuticas, avances que son de interés en investigación básica y aplicada. En este sentido, los estudios de

asociación genética permiten identificar polimorfismos relacionados con un fenotipo determinado (riesgo de enfermedad o respuesta a un determinado tratamiento, entre otros).

Podemos distinguir dos modalidades de estudios de asociación genética:

- **Estudios de asociación del genoma completo (GWAS o técnicas de genotipado masivo):** se utiliza para la realización de un cribado del genoma completo en el que se intenta determinar qué SNPs se asocian con la enfermedad, sin establecer ninguna hipótesis a priori, lo que permite encontrar nuevos genes de susceptibilidad para enfermedades comunes. Los GWAS genotipan miles o millones de SNPs marcadores para estudiar las bases genéticas en las enfermedades complejas, validan los SNPs más significativos por genotipado en nuevas cohortes y realizan un mapeo fino de los SNPs adyacentes a los validados. Tienen como inconvenientes un número muy elevado de falsos positivos haciendo necesario adoptar correcciones estadísticas o realizar estudios suplementarios para replicar los resultados obtenidos.
- **Estudios de asociación de genes candidatos:** se seleccionan genes de estudio en base a resultados previos o a una hipótesis plausible.

Los estudios de asociación genética, tanto de genes candidatos como de genoma completo, se pueden llevar a cabo entre miembros de familias afectados por una enfermedad rara, llamándose **análisis de ligamiento**. En estos estudios, se necesita una familia grande con varios miembros afectados (al menos en dos generaciones). Se genotipan todos los miembros de la familia para distintos SNPs y se determina qué marcadores son heredados más frecuentemente con la enfermedad, de manera que su análisis permite identificar zonas del genoma de interés.

En los estudios de asociación genética se deberían estudiar diferentes modelos de herencia para evaluar cual se ajusta mejor a los datos. Entre ellos:

- **Modelo dominante:** basta con tener un alelo variante para conferir el riesgo o protección.
- **Modelo recesivo:** es necesario tener las dos copias del alelo variante para conferir el riesgo o protección.

- **Modelo codominante:** cada genotipo proporciona un riesgo de enfermedad diferente y no aditivo. Se comparan heterocigotos y homocigotos por separado respecto al homocigoto del alelo más frecuente.
- **Modelo aditivo:** cada copia del alelo variante confiere un riesgo en una cantidad aditiva. Por tanto, los homocigotos variantes tienen el doble de riesgo que los heterocigotos.
- **Modelo sobredominante (“overdominant”) ó de heterocigosidad:** se compara el genotipo heterocigoto con los dos genotipos homocigotos, suministrando mayor riesgo o protección el genotipo heterocigoto que los homocigotos.

4.9.4 Aplicaciones de SNPs en relación con infección por hepatitis C

Los factores genéticos heredables pueden influir en el riesgo de desarrollar una enfermedad, en su curso clínico, o en la respuesta al tratamiento, entre otros. Sin embargo, la utilidad clínica más probable a corto plazo de la información genética es suministrar información sobre el pronóstico de pacientes y su estratificación de riesgo.

En el caso de la hepatitis C, las líneas de investigación se han centrado en los SNPs que pueden influir en la evolución de la infección por VHC (aclaramiento vs cronificación de la enfermedad, progresión de fibrosis y evolución a hepatocarcinoma) así como en la respuesta a la terapia antiviral (164).

En la hepatitis crónica C, la progresión de la fibrosis hepática a cirrosis y hepatocarcinoma es el principal determinante pronóstico. Según la historia natural de la enfermedad, se pueden clasificar los pacientes en tres grupos: fibrosadores rápidos, fibrosadores intermedios y fibrosadores lentos. Se ha estudiado ampliamente la influencia de factores ambientales, epidemiológicos y clínicos (89). Sin embargo, la progresión de la enfermedad es diferente en pacientes con factores de riesgo similares. Existe una evidencia creciente de que los factores genéticos pueden desempeñar un papel importante en la progresión de la fibrosis. Hasta la fecha, se han realizado numerosos estudios para examinar una amplia variedad de genes candidatos en la progresión de la enfermedad hepática, y aunque se han identificado algunas asociaciones importantes, los resultados son difíciles de interpretar por la ausencia de significado biológico en algunos casos (165). Debido a que tras la infección del VHC se

produce una importante respuesta inmune e inflamatoria, la búsqueda de los posibles SNPs implicados ha ido muy orientada al estudio de genes implicados en el sistema inmune y en mediadores de la inflamación (166). Por tanto, es altamente probable que variaciones genéticas en rutas relacionadas con el sistema inmune puedan modular la intensidad de la inflamación hepática y la progresión de la fibrosis.

Entre los genes candidatos estudiados en los últimos años, destacan los genes de interleucinas (p.e. *TNF- α* , *IL-10*, *IL-12*, *IL-18*, *IL28B*) y quimiocinas (p.e. *RANTES*, *CCR-5*, *MCP-1*, *MCP-2L*), genes relacionados con la activación de las células estrelladas hepáticas (p.e. *TGF β 1*, *EGF*, *TLR4*, *Factor V Leiden*, *PAR-1*, *MPO*, *Mx-1*, *PKR*, *PNPLA3*), genes implicados en el metabolismo del hierro (p.e. *SLC11A1*) y genes que participan en la ruta del IFN (p.e. *IRF7*). La reciente aparición de GWAS, ha permitido realizar análisis de asociación masivos, revelando otros genes implicados, tales como *DDX5*, *STXBP5L*, *B008027*, *AZIN1*, *TRPM5*, *AP3S2*. Sin embargo, algunos de estos estudios en los que se demostraba la asociación de los SNPs con la progresión rápida o lenta de fibrosis, no se confirmaron posteriormente (166).

En los últimos años, se han estudiado en profundidad los polimorfismos genéticos del gen *IL28B* (IFN λ). Se pudo comprobar la mayor potencia inmunológica de los pacientes infectados por VHC portadores del genotipo rs12878680 CC de *IL28B*, dado que se observó que tenían una tasa de aclaramiento espontáneo superior, así como un mayor grado de inflamación hepática y progresión de la fibrosis (167). También se describió la asociación de dicho polimorfismo con la tasa de RVS en pacientes tratados con peg-IFN α y RBV, constituyendo un factor predictivo independiente de respuesta favorable al tratamiento, lo cual fue un gran avance, pues permitió individualizar el tratamiento en los pacientes con hepatitis crónica C antes de la era de los AAD (168, 169).

Durante la preparación del proyecto de investigación para la tesis, realizamos una búsqueda de los trabajos más relevantes en Medline (PubMed), los cuales se relacionan a continuación en la **Tabla 5**:

Tabla 5. Genes y SNPs relacionados con fibrosis hepática en pacientes con infección VHC.

Genes	SNPs	Ref. Anexo.
Adaptor-related protein complex 3, sigma 2 subunit (AP3S2)	rs2290351	(163)
Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase (AlkB) homologue (ALKBH3)	rs6485480	(6)
Antizyme inhibitor 1 (AZIN1)	rs62522600 rs2679757	(102)
Apolipoprotein C-1 (APOC1)	rs4420638	(66)
Apolipoprotein E (APO-E)	rs7412 rs429358	(66, 166, 170)
Aquaporin-2 (AQP2)	rs2878771	(6, 117)
ATP-binding cassette, subfamily B, member II (ABCB1)	rs121434360	(1)
Carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A)	rs17610395	(6, 132)
C-C chemokine receptor type 2 (CCR2)	rs1799864	(133)
CD14 Monocyte differentiation antigen	rs2569190	(134, 135)
CD209 antigen	rs4804803	(136)
Complement factor 5 (C5)	rs17611 rs2300929	(63)
Connective tissue growth factor (CTGF)	rs9402373	(163)
Cyclooxygenase-2 (COX2)	rs689466	(64, 171)
Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6)	rs3892097	(65)
Cytotoxic T-lymphocyte protein 4 (CTLA4 or CD152)	rs5742909 rs231775	(67, 70)
DEAD box polypeptide 5 (DDX5)	rs3179861	(1)
Duffy antigen receptor for chemokines (DARC)	rs12075	(69)
Epidermal growth factor (EGF)	rs4444903	(68, 172)
Glycosyltransferase 8 domain-containing protein 2 (GLT8D2)	rs2629751	(6)
Growth-regulated alpha protein (CXCL1)	rs4074	(173)
Chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9)	rs10336	(64)
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10)	rs3921	(64)
Chemokine (C-X-C motif) ligand 11 (CXCL11)	rs4619915	(64)
Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM 1 or CD54)	rs281437	(174)
Interferon gamma (IFN-gamma)	rs2069707	(175-177)
Interferon gamma receptor 2 (IFNGR2)	rs9976971	(6, 178)
Interferon regulatory factor 7 (IRF7)	rs1061502 rs1131665	(166, 179)
α -chain of the IL-7 receptor (IL7RA)	rs6897932, rs987106, rs3194051	(180)
Interleukin 12 (IL12)	rs1805132	(166, 181)
Interleukin-10 (IL10)	rs9610	(166)

Interleukin-18 (IL18)	rs1946518 rs187238	(166, 178, 182)
Interleukin-28B (IL28B or IFNL3)	rs12979860	(6, 166, 183)
Ligand Factor V Leiden (F5)	rs6025	(166, 184)
Mayor histocompatibility complex (MHC)	rs910049 rs3135363	(185)
Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)	rs1801133	(186)
Myeloperoxidase gene (MPO)	<u>rs2333227</u>	(166, 187)
Oligoadenylate synthetase 1 (OAS-1)	rs3741981	(166, 188, 189)
Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3)	rs738409	(6, 117, 132, 190)
Polycystic kidney disease protein 1-like 1 (PKD1L1)	rs7800244	(6)
Receptor tyrosine kinase (MERTK)	rs4374383	(6)
Regulated and normal T-cell expressed and secreted (RANTES)	rs2107538	(166, 191)
Sensitive to apoptosis gene (SAG or RNF7)	rs16851720	(6)
Syntaxin binding protein 5-like (STXBP5L)	rs17740066	(163)
Toll-like receptor 4 (TLR4)	rs4986791	(117, 189)
Toll-like receptor 7 (TLR7)	rs179008	(192, 193)
Transient receptor potential cation channel subfamily M member 5 (TRPM5)	rs886277	(102, 117, 194)
Translocase of outer membrane 40 kDa subunit homolog (TOMM40)	rs10524523	(66)
Tubby-related protein 1 (TULP1)	rs9380516	(6)
Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alfa)	rs1800629	(195, 196)

Sin lugar a duda, el pronóstico de la infección por VHC está modulado por el “background” genético, así como por las interacciones gen-gen y gen-ambiente. Sin embargo, son necesarios más estudios que ayuden a esclarecer profundamente el papel de los genes en la interacción virus-huésped.

Hipótesis y objetivos

5 Hipótesis y objetivos

5.1 Hipótesis

La infección crónica por VHC se manifiesta de forma variable en el parénquima hepático evolucionando desde cambios mínimos histológicos hasta fibrosis avanzada y cirrosis inicialmente compensada seguida de la fase de descompensación. La progresión de la fibrosis hepática es diferente entre individuos, pudiendo encontrar distintos patrones de pacientes fibrosadores (rápidos, intermedios y lentos) ante similares factores ambientales, epidemiológicos y clínicos.

Planteamos la hipótesis de que los valores de elasticidad hepática (FibroScan®) y los SNPs relacionados con el sistema inmune podrían estar asociados con la aparición de eventos hepáticos y con la progresión de la fibrosis hepática a cirrosis, respectivamente, en pacientes con infección crónica por VHC.

5.2 Objetivos

Se plantearon tres objetivos concretos:

- 1) Determinar si la medida de rigidez hepática, evaluada por FibroScan®, se asocia al riesgo de desarrollar eventos hepáticos en pacientes con hepatitis crónica C.
- 2) Determinar si los SNPs de *CXCL9-11* están relacionados con la presencia de fibrosis hepática y cirrosis en pacientes infectados por VHC.
- 3) Evaluar si los SNPs de *IL7RA* están asociados con la progresión de la fibrosis hepática a fibrosis avanzada y cirrosis en pacientes infectados por VHC.

Material y métodos. Publicaciones

6 Material y métodos. Publicaciones

6.1 La medición de la rigidez hepática predice el desarrollo de eventos hepáticos en pacientes con hepatitis crónica por VHC: un estudio retrospectivo.

Gomez-Moreno AZ, Pineda-Tenor D, Jimenez-Sousa MA, Sanchez-Ruano JJ, Artaza-Varasa T, Saura-Montalban J, Ryan P, Resino S. Liver stiffness measurement predicts liver-related events in patients with chronic hepatitis C: a retrospective study. **PLoS One**. 2017, 12(9):e0184404.

RESUMEN

Objetivos: Determinar si la rigidez hepática medida mediante elastografía de transición (FibroScan®) se asocia con el riesgo de desarrollar eventos hepáticos en pacientes cirróticos.

Métodos: Estudio retrospectivo realizado en 343 pacientes infectados por VHC a los que se determinó la rigidez hepática (LSM, *liver stiffness measurement*). La variable desenlace fue el desarrollo de un evento hepático, definido como descompensación de la cirrosis hepática (ascitis, hemorragia por varices, peritonitis bacteriana espontánea, encefalopatía hepática y síndrome hepatorenal), hepatocarcinoma o muerte por causa hepática. La evaluación de la fibrosis hepática fue realizada mediante FibroScan®. Utilizamos los puntos de corte establecidos: <7,1 kPa (F0-F1), 7,1–9,4 kPa (F2), ≥9,5–12,4 kPa (F3 (fibrosis en puentes)), ≥12,5 kPa (F4 (cirrhosis); y ≥25 kPa (predictivo del desarrollo de varices esofágicas). Los pacientes fueron estratificados de la siguiente forma: <12,5 kPa (F0-F3) y ≥12,5 kPa (F4), dividiendo el último grupo en <25 kPa y ≥25 kPa.

Resultados: De los 343 pacientes, 60 fueron cirróticos (≥12,5 kPa), el 57,4% varones, la mediana de edad fue de 49 años, y el 18% reconocieron ingesta elevada de alcohol. El 85% fueron infectados con VHC genotipo 1 y el 22,7% fueron no respondedores al tratamiento antiviral (peg-IFNα/RBV). En todos los pacientes estudiados, cada incremento en una unidad del logaritmo natural (Ln) del valor de LSM se asoció con 14,76 veces más riesgo de desarrollar un evento hepático (p<0.001). Cuando analizamos sólo los pacientes cirróticos, cada unidad incrementada en el Ln de LSM se asoció con 10,56 veces más riesgo de desarrollar evento hepático (p=0.010). Los pacientes con ≥25 kPa tuvieron 3,65 más riesgo de desarrollar eventos hepáticos comparado con los que tuvieron <25 kPa (p=0.045). El AUROC del LSM para predecir el desarrollo de eventos hepáticos fue de 0,87 en todos los pacientes y de 0,73 en los pacientes cirróticos.

Conclusiones: Valores elevados de rigidez hepática se asociaron con un incremento del riesgo de desarrollar eventos hepáticos en pacientes con hepatitis C, sobre todo dentro del grupo de pacientes cirróticos.

RESEARCH ARTICLE

Liver stiffness measurement predicts liver-related events in patients with chronic hepatitis C: A retrospective study

Ana Zaida Gomez-Moreno¹, Daniel Pineda-Tenor², Maria Angeles Jimenez-Sousa³, Juan Jose Sánchez-Ruano¹, Tomas Artaza-Varasa¹, Jose Saura-Montalban⁴, Pablo Ryan⁵, Salvador Resino^{3*}

1 Servicio de Digestivo, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain, **2** Servicio de Laboratorio Clínico, Hospital Universitario de Fuenlabrada, Madrid, Spain, **3** Unidad de Infección Viral e Inmunidad, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Spain, **4** Servicio de Laboratorio Clínico, Complejo Hospitalario de Toledo, Toledo, Spain, **5** Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario Infanta Leonor, Madrid, Spain

* sresino@isciii.es



OPEN ACCESS

Citation: Gomez-Moreno AZ, Pineda-Tenor D, Jimenez-Sousa MA, Sánchez-Ruano JJ, Artaza-Varasa T, Saura-Montalban J, et al. (2017) Liver stiffness measurement predicts liver-related events in patients with chronic hepatitis C: A retrospective study. *PLoS ONE* 12(9): e0184404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184404>

Editor: Seung Up Kim, Yonsei University College of Medicine, REPUBLIC OF KOREA

Received: May 3, 2017

Accepted: August 23, 2017

Published: September 7, 2017

Copyright: © 2017 Gomez-Moreno et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work has been supported by grants given by Instituto de Salud Carlos III [grant numbers PI14CIII/00011 and CD13/00013].

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

The management of patients with chronic hepatitis C (CHC) depends on their clinical stage. Thus, noninvasive early recognition of patients with CHC at high risk for developing liver-related events (LREs) is important because it ensures optimal preventative management strategies may be employed that can affect the course of CHC disease. Our aim was to determine whether liver stiffness measurement (LSM) in hepatitis C virus (HCV)-infected patients is associated with a risk of LREs, particularly in cirrhotic patients. We carried out a retrospective study on 343 HCV-infected patients stratified according to cirrhosis (LSM < 12.5 kPa vs. LSM ≥ 12.5 kPa), and the cirrhotic patient group (LSM ≥ 12.5 kPa) was divided according to risk of esophageal varices (LSM < 25 kPa vs. LSM ≥ 25 kPa). For all patients, each incremental unit in the natural logarithm (Ln) of LSM was associated with 14.76 times higher risk of developing LREs (p < 0.001). Patients with cirrhosis (LSM ≥ 12.5 kPa) had a higher risk of LREs than patients without cirrhosis (LSM < 12.5 kPa) [adjusted hazard ratio (aHR) = 30.97; p < 0.001]. When only cirrhotic patients were analyzed (n = 60), each incremental unit in the Ln of LSM was associated with 10.56 times higher risk of developing LREs (p = 0.010). Patients with LSM ≥ 25 kPa had a greater risk for LRE development compared to those with LSM < 25 kPa (aHR = 3.65; p = 0.045). The AUROC for predicting the onset of LREs was 0.876 in all patients and 0.729 in cirrhotic patients. In conclusion, LSM was associated with an increased risk of developing LREs in HCV-infected patients, even within the group of cirrhotic patients.

Introduction

Nearly 200 million people worldwide are chronically infected with hepatitis C virus (HCV), which leads to the development of chronic liver disease or liver-related death [1,2]. However,

the long-term impact of HCV infection is highly variable, ranging from minimal histological changes to extensive fibrosis and cirrhosis [3]. Liver cirrhosis is characterized by a compensated stage (stage 4 fibrosis with or without esophageal varices) followed by a decompensated stage, which can involve complications (variceal bleeding, hepatic encephalopathy, ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and/or hepatorenal syndrome), hepatocellular carcinoma, liver transplantation, and liver-related death [4,5]. The management of patients with chronic hepatitis C (CHC) depends on their clinical stage [5], since patients with compensated cirrhosis have a much longer median survival time than those with decompensated cirrhosis [6]. Thus, noninvasive early recognition of patients with CHC at high risk for developing liver-related events (LREs) is important because it ensures optimal preventative management strategies may be employed that can affect the course of CHC disease [7]. Additionally, sustained virological response (SVR) with antiviral therapy may reduce the clinical consequences of CHC, but patients with cirrhosis, despite HCV eradication, remain at risk of disease progression [8].

Decompensated cirrhosis appears as a consequence of portal hypertension, which is defined as a pathologic increase in the pressure gradient between the portal vein and the inferior vena cava measured by hepatic venous pressure gradient (HVPG) [9]. Portal hypertension is a prognostic measure for developing liver decompensation and hepatocellular carcinoma [10,11]. However, measuring the HVPG involves an invasive test that is not widely available. Therefore, noninvasive tests for estimating risk of LREs are needed.

Liver stiffness measurement (LSM) using transient elastography is a noninvasive method based on liver elasticity observations. LSM may accurately predict the presence of advanced fibrosis/cirrhosis and portal hypertension in patients with CHC via the detection of esophageal varices [12–17]. Furthermore, LSM may also predict the future development of LREs in patients with compensated cirrhosis of varying etiologies [18,19]. However, there are few results with a certain degree of discrepancy found in samples from CHC patients, possibly due to the characteristics of the studies carried out. Perez-Latorre et al. found that LSM accurately predicts LREs in HIV-infected patients with CHC [20,21]. Sultanik et al. found that LSM is not a valid surrogate of disease progression of HCV cirrhotic patients in a larger and heterogeneous sample including HIV/HCV-coinfected patients and patients with SVR [22]. Lee et al. found LSM at SVR is useful for predicting LRE development in CHC patients who achieve SVR after treatment with pegylated-interferon-alpha (peg-IFN) plus ribavirin [23]. Fernández-Montero et al. found LSM reliably predicts LREs in HIV/HCV-coinfected patients on antiretroviral therapy [24].

The aim of our study was to determine whether LSM in HCV-infected patients is associated with the risk of developing LREs, particularly in cirrhotic patients.

Patients and methods

Patients

We carried out a retrospective study on 343 HCV-infected patients who had liver stiffness assessed by transient elastometry in Hospital Virgen de la Salud (Toledo, Spain) between 2008 and 2014. The study ran from the day of the LSM (baseline) until the last follow-up visit or death, or the initiation of antiviral treatment for HCV. The administrative censoring date was December 31, 2015. This work was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The Institutional Review Board and the Research Ethic Committee (“Comité de Ética de la Investigación”) of the Instituto de Salud Carlos III approved the study. Each participating patient signed an informed consent form.

The selection criteria were: 1) detectable HCV RNA by polymerase chain reaction (PCR) during the follow-up; 2) availability of a valid baseline LSM; and 3) a follow-up period of at least 12 months after baseline LSM. The exclusion criteria were: 1) co-infection with hepatitis B virus or human immunodeficiency virus; 2) clinical evidence of hepatic decompensation at enrollment or a prior history of hepatic decompensation; and 3) hepatocellular carcinoma at enrollment or a previous history of hepatocellular carcinoma.

Clinical and laboratory data

Clinical and epidemiological data were obtained from medical records. High alcohol intake was considered to be >20 grams/day in women and ≥ 60 grams/day in men [25]. Patients received conventional CHC management during follow-up. Thus, patients could have been treated before or after entering the study with HCV therapy according to clinical guidelines [26,27]. The follow-up was truncated, when the HCV therapy was initiated, only whether HCV was cleared, because HCV clearance may lead to regression of liver fibrosis and cirrhosis [28]. When a patient did not achieve SVR, the follow-up was continued.

Analyzed LREs included ascites, hepatic encephalopathy, variceal bleeding, hepatocellular carcinoma, spontaneous bacterial peritonitis and hepatorenal syndrome. Ascites and spontaneous bacterial peritonitis were confirmed or excluded by paracentesis and/or ultrasound. Hepatic encephalopathy and hepatorenal syndrome were established based on clinical findings and laboratory parameters. The source of gastroesophageal variceal bleeding was confirmed by endoscopy. Diagnosis of hepatocellular carcinoma was based on noninvasive imaging tests or histopathology findings [29]. Surveillance or screening for hepatocarcinoma in cirrhotic patients was performed semiannually by abdominal ultrasonography with experienced personnel (hepatologists), as well as the determination of tumor biomarkers (alpha-fetoprotein) [29]. There was no clinical or analytical suspicion of existence of hepatocarcinoma at the time of inclusion in the study.

All the information related to death was reviewed by AZG, who classified death as either: i) CHC-related death, when the series of events that ended in death was caused by a CHC-related complication; or ii) non-CHC-related death.

HCV assays

HCV infection was documented in all patients by enzyme-linked immunosorbent assay and PCR test. HCV genotype was determined by hybridization of biotin-labeled PCR products to oligonucleotide probes bound to nitrocellulose membrane strips (INNO-LiPA HCV II, Innogenetics, Ghent, Belgium). Plasma HCV RNA viral load was measured by real-time PCR (COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV test), and results were reported in terms of international units per milliliter (IU/mL). The limit of detection was 15 IU/mL.

Liver stiffness measurement

LSM was assessed by transient elastography (FibroScan[®], Echosens, Paris, France) using a single machine. Results were expressed in kilopascals (kPa) with a range of 2.5 to 75 kPa [30]. Transient elastography was performed in our unit by a trained hepatologist, and measurements were considered reliable when the interquartile-range-to-median ratio for at least 10 successful measurements was lower than 0.30 [31].

Outcome and predictor variables

The primary outcome variable was the occurrence of a LRE, defined as the development of a hepatic decompensation (ascites, variceal bleeding, spontaneous bacterial peritonitis, hepatic encephalopathy, and hepatorenal syndrome), hepatocellular carcinoma or liver-related death. For patients who had more than one liver-related event, only the first was included in the analysis of LRE occurrence.

The primary predictor variable was the LSM examined as a continuous variable and a categorical variable. We used established cut-offs of LSM such as <7.1 kPa (F0-F1), 7.1–9.4 kPa (F2), 9.5–12.4 kPa (F3 (bridging fibrosis)), and ≥ 12.5 kPa (F4 (cirrhosis)) [12]; and ≥ 25 kPa (predictive of the development of esophageal varices) [32]. In our study, patients were stratified as follows: LSM <12.5 kPa (F0-F3) and LSM ≥ 12.5 kPa (F4), with the last group divided into LSM <25 kPa and LSM ≥ 25 kPa.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed with the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 21.0 (SPSS INC, Chicago, IL, USA). Statistical significance was defined as $p < 0.05$. All p -values were two-tailed.

Values were expressed as absolute number (percentage) and median (25th; 75th percentile). Categorical data and proportions were analyzed using the chi-squared test or Fisher's exact test. Mann-Whitney U test was used to compare data among independent groups.

For survival analyses, the baseline timepoint was defined as the date of transient elastometry examination. The study ran from the day of the LSM (baseline) until the development of LREs, death, initiation of HCV antiviral therapy, or the censoring date. The Kaplan-Meier analysis was used to estimate the cumulative probability of LREs according to LSM strata, and the log-rank test was used for univariate comparisons among groups. We used the Cox regression analysis to test the association between baseline LSM and LREs. Natural logarithmic (Ln) transformation of LSM was used because of a skewed distribution. Each Cox regression test was adjusted by the most significant covariables for each outcome variable, avoiding overfitting of the regression model. We included the LSM (Enter algorithm (forced entry for the LSM)) and the most relevant characteristics by Forward Stepwise algorithm (at each step, factors are considered for removal or entry: a p -value for entry and exit of 0.15 and 0.20, respectively). The covariables used were age, gender, time since HCV diagnosis, HCV genotype, injection drug use, high alcohol intake, HCV antiviral therapy prior to baseline (patients who failed therapy), and HCV antiviral therapy after baseline (patients who started therapy during follow-up).

We also evaluated the diagnostic performance of LSM for predicting the onset of LREs using the receiver operating characteristic (ROC) curve. We calculated the sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) for each cut-off point.

Results

Baseline characteristics of the study population

[Table 1](#) shows the baseline characteristics of 343 HCV-infected patients, 60 of whom were cirrhotic patients (LSM ≥ 12.5 kPa). In brief, 57.4% were male, the median age was 49.7 years, 18.7% reported a high intake of alcohol, 14.9% were prior injection drug users, 85.5% were infected by HCV genotype 1. Regarding HCV therapy, 78 (22.7%) patients had failed HCV antiviral therapy (peg-IFN- α /ribavirin) before inclusion in the study, 137 (39.9%) started HCV

Table 1. Epidemiological and clinical characteristics of HCV-infected patients at baseline.

Baseline characteristics	All patients	F0-F3 (<12.5 kPa)	F4 (≥12.5 kPa)	p-values
No.	343	283	60	-
Male sex	197 (57.4%)	159 (56.2%)	38 (63.3%)	0.309
Age (years)	49.7 (43.5; 57.9)	48.7 (42.7; 57.4)	52.5 (46.7; 63.1)	0.008
Time of HCV infection (years)	9.1 (2.5; 14.1)	8.4 (2.4; 13.7)	12.1 (2.9; 16.1)	0.021
High alcohol intake	64 (18.7%)	47 (16.6%)	17 (28.3%)	0.034
Prior injection drug use	51 (14.9%)	38 (13.4%)	13 (21.7%)	0.103
HCV genotype (n = 337)				
1	288 (85.5%)	241 (86.4%)	47 (81.0%)	0.293
2	2 (0.6%)	2 (0.7%)	0 (0.0%)	0.999
3	25 (7.4%)	19 (6.8%)	6 (10.3%)	0.406
4	21 (6.2%)	16 (5.7%)	5 (8.6%)	0.379
5	1 (0.3%)	1 (0.4%)	0 (0.0%)	0.999
Prior antiviral therapy (peg-IFN-α/RBV) failed	78 (22.7%)	61 (21.6%)	17 (28.3%)	0.308
Antiviral therapy during follow-up	137 (39.9%)	98 (34.6%)	39 (65.0%)	<0.001
Antiviral therapy with SVR and follow-up truncated	71 (21.1%)	55 (19.8%)	16 (27.6%)	0.186
Liver stiffness (kPa)	6.8 (5.3; 10.2)	6.3 (5.2; 8.1)	20.0 (14.4; 26.9)	<0.001
F0-F1 (<7.1 kPa)	187 (54.5%)	187 (66.1%)	-	-
F2 (7.1–9.4 kPa)	58 (16.9%)	58 (20.5%)	-	-
F3 (9.5–12.4 kPa)	38 (11.1%)	28 (13.4%)	-	-
F4.1 (12.5–24.9 kPa)	40 (11.7%)	-	40 (66.7%)	-
F4.2 (≥25 kPa)	20 (5.8%)	-	20 (33.3%)	-

Values are expressed as median (p25th; p75th) and absolute count (percentage).

Abbreviations: HCV, hepatitis C virus; kPa, kilopascal.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184404.t001>

therapy during follow-up, and of them, 71 (21.1%) patients achieved SVR and their follow-up was truncated. The median LSM baseline was 6.8 kPa and the median time since HCV diagnosis was 9.1 years. When the study population was stratified according to the presence of cirrhosis (LSM >12.5 kPa), cirrhotic patients were older (p = 0.008), had higher time since HCV diagnosis (p = 0.021), and higher percentage of high alcohol intake (p = 0.034) and antiviral therapy during follow-up (p < 0.001) than patients without cirrhosis (LSM ≤ 12.5 kPa).

Follow-up characteristics of the study population

LREs during follow-up are shown in Table 2. The median follow-up was lower in cirrhotic patients (p = 0.001). Twelve patients experienced one or more LREs; the first LREs were: 8 hepatic decompensations (ascites (n = 6) and variceal bleeding (n = 2)) and 4 hepatocellular carcinomas. Overall, 22 LREs were counted during follow-up: 10 hepatic decompensations [Med = 2.7 years (Min = 0.3; Max = 7.4)], 6 hepatocellular carcinomas [Med = 4.9 years (Min = 2.0; Max = 7.5)], and 6 deaths [Med = 3.4 years (Min = 1.9; Max = 7.6)]. Additionally, throughout the study period, only one patient, who was addicted to drugs, died of septic shock (a cause unrelated to CHC) and this event was not included in the analysis.

Liver stiffness measurement and liver-related events

The incidence of LREs during follow-up is shown in Fig 1. Out of 343 patients included in our study, 283 (81.5%) had LSM < 12.5 kPa, of which only two developed a LRE (0.6%), whereas 60

Table 2. Clinical characteristics of the HCV-infected patients during follow-up.

Follow-up characteristics	All patients	F0-F3 (<12.5 kPa)	F4 (≥12.5 kPa)	p-values
No.	343	283	60	-
Follow-up (years)	5.1 (2.9; 6.9)	5.5 (3.1; 7.0)	3.7 (2.1; 5.5)	0.001
Liver-related events (first LRE to appear)	12 (3.5%)	2 (0.7%)	10 (16.7%)	<0.001
Hepatic decompensation	8 (2.3%)	0 (0.0%)	8 (13.3%)	<0.001
Hepatocellular carcinoma	4 (1.2%)	2 (0.7%)	2 (3.3%)	0.285
Death	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	-
Liver-related events (All)	22 (6.4%)	4 (1.4%)	18 (30.0%)	<0.001
Hepatic decompensation	10 (2.9%)	1 (0.4%)	9 (15.0%)	<0.001
Hepatocellular carcinoma	6 (1.7%)	2 (0.7%)	4 (6.7%)	0.010
Death	6 (1.7%)	1 (0.4%)	5 (8.3%)	0.001

Values are expressed as median (p25th; p75th) and absolute count (percentage).

Abbreviations: HCV, hepatitis C virus; kPa, kilopascal; LRE, liver-related events.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184404.t002>

(17.5%) patients had $LSM \geq 12.5$ kPa and 10 of them had a LRE (16.6%). Kaplan-Meier estimates showed that the probability of LREs was significantly higher in patients with cirrhosis ($LSM \geq 12.5$ kPa) in comparison with patients without cirrhosis ($LSM < 12.5$ kPa) (Fig 1A; $p < 0.001$). Moreover, out of 60 patients with cirrhosis ($LSM \geq 12.5$ kPa), 40 (66.6%) patients had $LSM < 25$ kPa and four of these had a LRE (10%); whereas 20 (33.3%) patients had $LSM \geq 25$ kPa, six of whom had a LRE (30%). The probability of developing LREs was higher in patients with $LSM \geq 25$ kPa than patients with $LSM < 25$ kPa (Fig 1B; $p = 0.036$).

Fig 2 shows the risk for the onset of LREs by proportional hazard models, both the unadjusted (A) and the adjusted (B) analysis. For adjusted analysis with all patients (Fig 2B), each incremental unit in the Ln of LSM was associated with 14.74 times higher risk of developing LREs during follow-up [adjusted hazard ratio (aHR) = 14.76; $p < 0.001$]. Furthermore, patients with cirrhosis ($LSM \geq 12.5$ kPa) had a higher risk of developing LREs than patients without cirrhosis ($LSM < 12.5$ kPa) (aHR = 30.97; $p < 0.001$). When only cirrhotic patients were analyzed, each incremental unit in the Ln of LSM was associated with 10.56 times higher risk of developing LREs during follow-up (aHR = 10.56; $p = 0.010$), and patients with $LSM \geq 25$ kPa had higher risk of LREs than patients with $LSM < 25$ kPa (aHR = 3.65; $p = 0.045$). The details of the multivariate analysis are shown in the Supporting Information files (S1, S2, S3 and S4 Tables).

Diagnostic value of liver stiffness measurement for predicting the onset of liver-related events

The area under ROC curve (AUROC) of LSM for predicting the onset of LREs was 0.876 (Fig 3A). Using the cut-off of 12.5 kPa, 10 patients were correctly identified (true positives) as individuals at risk of developing a LRE and only two were misclassified (false negatives) (Table 3A). The NPV were 99.3%, but PPV was under 20%, possibly due to the low prevalence of LREs in our cohort. When the analysis was performed in cirrhotic patients, the AUROC was 0.729 (Fig 3B). Using the cut-off 25 kPa, six patients were correctly identified (true positives) and four were misclassified (false negatives) (Table 3B). The NPV was 90%, but PPV was 30%.

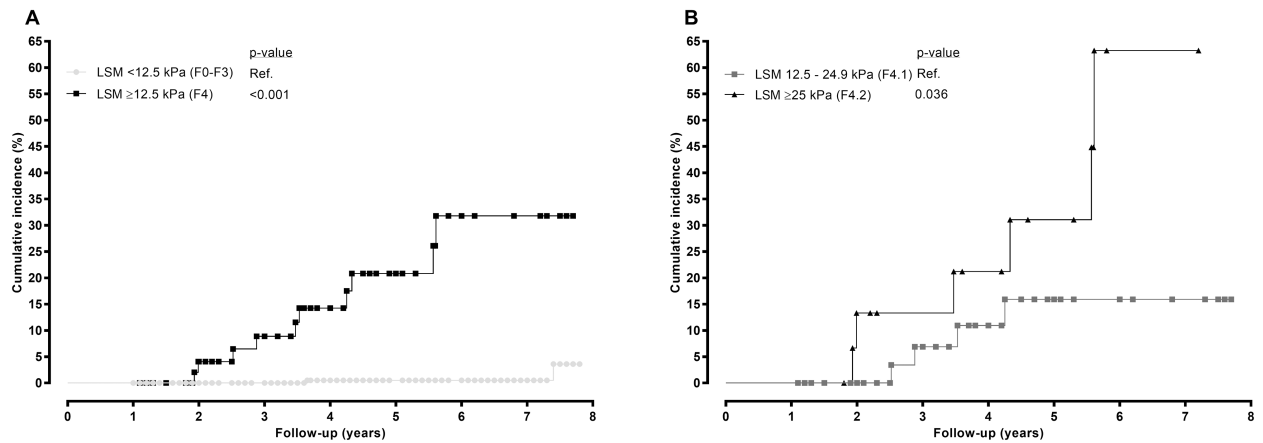


Fig 1. Kaplan-Meier plots showing cumulative incidence of liver-related events according to strata of baseline liver stiffness in HCV-infected patients. P-values were calculated by log-rank test. Abbreviations: kPa, kilopascal; LSM, liver stiffness measurement. (A), All patients stratified by 12.5 kPa. (B), Cirrhotic patients stratified by 25 kPa.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184404.g001>

Discussion

Staging of liver fibrosis is an essential element of the care of patients with CHC, as it provides useful prognostic data and facilitates treatment decisions [4,5]. Given the importance of assessing the risk of LREs in the management of CHC patients, we evaluated whether LSM may predict the occurrence of LREs in CHC patients, finding that patients with higher LSM had a higher risk of developing LREs. Moreover, this association was maintained in cirrhotic patients (LSM ≥12.5 kPa), where patients with LSM ≥25 kPa had a higher risk of developing LREs than patients with LSM <25 kPa. These findings may be clinically relevant, particularly since the use of transient elastography in the clinical management of this population is increasing. Moreover, since there have been recently reported that the incidence of hepatocellular carcinoma has increased even after treatment of chronic hepatitis C [33–36], the results of this study also highlight the importance of monitoring the liver stiffness in CHC patients in the future.

The association found between higher LSM and higher risk of developing LREs is consistent with other reports [19,21,37]. In our study, we observed that a high LSM, independently of other epidemiological and clinical factors related to liver disease severity, was able to predict

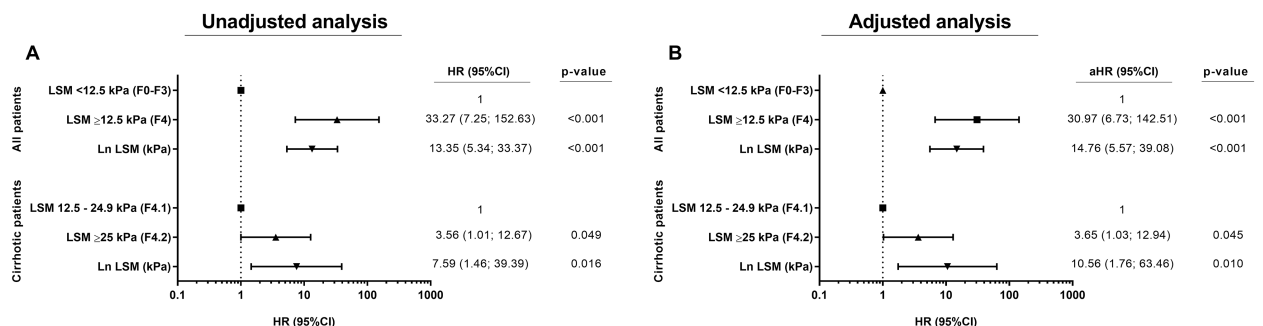


Fig 2. Hazard of liver-related events in HCV-infected patients (Cox proportional hazard regression analysis). Abbreviations: kPa, kilopascal; HR, hazard ratio; aHR, adjusted hazard ratio; 95%CI, 95% of confidence interval; Ln, natural logarithm; LSM, liver stiffness measurement. (A), All patients stratified by 12.5 kPa. (B), Cirrhotic patients stratified by 25 kPa.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184404.g002>

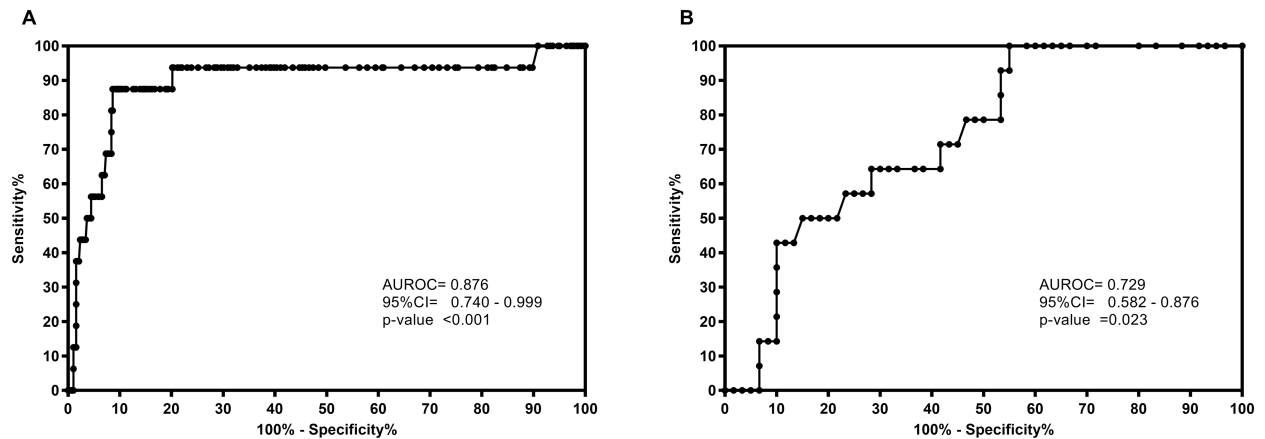


Fig 3. Area under the receiver operating characteristic (AUC-ROCs) curves of liver stiffness for predicting liver-related events in HCV-infected patients. Abbreviations: AUC-ROCs, area under the receiver operating characteristic; 95%CI, 95% of confidence interval. (A), All patients. (B), Cirrhotic patients (LSM \geq 25 kPa).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184404.g003>

future risk of LREs (liver decompensation or hepatocellular carcinoma) in a direct relationship manner. Each incremental Ln unit of LSM was associated with 14.76 times higher risk of LREs in all patients and 10.56 times higher in cirrhotic patients. Furthermore, patients with liver cirrhosis (\geq 12.5 kPa) had a higher risk of developing LREs; and within that group, patients with decompensated cirrhosis (LSM \geq 25 kPa) had an increased risk of LREs compared to patients with compensated cirrhosis (LSM 12.5–24.9 kPa). Thus, patients with LSM \geq 12.5 kPa, and particularly those with LSM $>$ 25 kPa, would benefit from a greater degree of monitoring for hepatic complications. Conversely, patients with LSM $<$ 12.5 kPa might be safely reassured of a low risk of hepatic complications during the following several years. The cut-off 12.5 kPa could be used to defer close surveillance in patients with low liver stiffness values, providing reassurance and minimizing healthcare expenditure.

The increased risk of LREs according to liver stiffness categories suggests that LSM offers prognostic information beyond that provided by liver biopsy. Whereas the cirrhosis stage is defined by histological evidence with one or two qualitative categories (e.g. METAVIR stage 4 or Ishak stages 5 and 6), the dynamic range of LSM is much greater (from 12.5 to 75 kPa in cirrhosis) and it has shown that LSM has greater diagnostic performance than liver biopsy for predicting hepatic complications [38,39]. In our study, LSM values were accurate for the prediction of the development of a first LRE, since the AUROC value was above 0.85 for all patients and somewhat lower for cirrhotic patients (AUROC = 0.729), which supports its

Table 3. Diagnostic accuracy of liver stiffness (kPa) measurement for predicting liver-related events in our cohort.

Cut-off	TP	FP	TN	FN	Se	95%CI	Sp	95%CI	PPV	95%CI	NPV	95%CI
A) All patients												
12.5 kPa	10	50	281	2	83.3%	55.2% - 95.3%	84.9%	80.6% - 88.4%	16.7%	9.3% - 28.0%	99.3%	97.5% - 99.8%
B) Cirrhotic patients												
25 kPa	6	14	36	4	60.0%	31.3% - 83.2%	72.0%	58.3% - 82.5%	30.0%	14.5% - 51.9%	90.0%	76.9% - 96.0%

Abbreviations: kPa, kilopascal; 95%CI, 95% of confidence interval; TP, true positive cases (correct diagnosis); FP, false positive cases (over-diagnosis); TN, true negative cases (correct diagnosis); FN, false negative cases (missed cases); Se, sensitivity; Sp, specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184404.t003>

excellent discriminatory ability. Our AUROC data were similar or better than those previously published [21,38,39]. Furthermore, our Se, Sp, PPV and NPV values were also similar to those previously reported [21,37–39]. The cut-offs evaluated in our study showed NPV values higher than 90%, which could be acceptable for excluding the onset of LREs; whereas the PPV values were around 30%, which could be unacceptable for predicting the first LREs. Therefore, the practical value of these cut-offs for assessing the onset of LREs might be important, as they will give very few false negatives, whereas these cut-offs could also result in a lot of false positives, which would undergo a more thorough follow-up due to a high LSM.

This study has other limitations that must be taken into account to ensure correct interpretation of the data. Firstly, this is a retrospective study and, therefore, patients are selected beforehand from among subjects surviving long enough to yield sufficient follow-up. However, the assessment of the longitudinal association between baseline LSM and LREs is the strength of this analysis. Secondly, our study is limited by its sample size and the small number of events recorded, which may have impaired the ability to detect robust associations and the accuracy of the risk estimates. Thirdly, about 23% of patients were previously treated against HCV infection, before baseline, but they did not remove HCV infection. The first studies already showed beneficial effects in virological nonresponders shortly after cessation of treatment, but not during long-term follow-up [40–42]. Later, other studies been reported that antiviral treatment failure does not appear to affect the natural course of CHC during long-term follow-up [43,44].

Conclusions

In conclusion, our findings indicate that LSM was associated with an increased hazard of developing the first episode of LREs in HCV-infected patients and, then, LSM may be a valid noninvasive test for stratifying the risk for developing LREs in patients with CHC.

Supporting information

S1 Table. Supporting information. Hazard of liver-related events in HCV-infected patients according to the liver stiffness measurement (LSM). Data were analyzed by multivariate Cox regression analysis using Forward Stepwise algorithm.
(XLSX)

S2 Table. Supporting information. Hazard of liver-related events in HCV-infected patients according to the cut-off of liver stiffness measurement (LSM) 12.5 kPa. Data were analyzed by multivariate Cox regression analysis using Forward Stepwise algorithm.
(XLSX)

S3 Table. Supporting information. Hazard of liver-related events in cirrhotic HCV-infected patients according to the liver stiffness measurement (LSM). Data were analyzed by multivariate Cox regression analysis using Forward Stepwise algorithm.
(XLSX)

S4 Table. Supporting information. Hazard of liver-related events in cirrhotic HCV-infected patients according to the cut-off of liver stiffness measurement (LSM) 12.5 kPa. Data were analyzed by multivariate Cox regression analysis using Forward Stepwise algorithm.
(XLSX)

Acknowledgments

The authors want to thank the patients of this study for their participation.

Author Contributions

Conceptualization: Salvador Resino.

Data curation: Juan Jose Sánchez-Ruano, Tomas Artaza-Varasa, Jose Saura-Montalban.

Formal analysis: Salvador Resino.

Investigation: Ana Zaida Gomez-Moreno, Daniel Pineda-Tenor, Maria Angeles Jimenez-Sousa.

Methodology: Ana Zaida Gomez-Moreno, Maria Angeles Jimenez-Sousa, Juan Jose Sánchez-Ruano, Tomas Artaza-Varasa, Jose Saura-Montalban.

Supervision: Salvador Resino.

Visualization: Salvador Resino.

Writing – original draft: Ana Zaida Gomez-Moreno, Salvador Resino.

Writing – review & editing: Daniel Pineda-Tenor, Maria Angeles Jimenez-Sousa, Pablo Ryan.

References

1. Asrani SK, Larson JJ, Yawn B, Therneau TM, Kim WR (2013) Underestimation of liver-related mortality in the United States. *Gastroenterology* 145: 375–382. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.04.005> PMID: 23583430
2. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ (2005) Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 5: 558–567. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70216-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70216-4) PMID: 16122679
3. Westbrook RH, Dusheiko G (2014) Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* 61: S58–68. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.07.012> PMID: 25443346
4. Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, Castera L, Le Bail B, Adhoute X, et al. (2006) Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut* 55: 403–408. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.069153> PMID: 16020491
5. (2015) EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. *J Hepatol* 63: 199–236. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.03.025> PMID: 25911336
6. Zipprich A, Garcia-Tsao G, Rogowski S, Fleig WE, Seufferlein T, Dollinger MM (2012) Prognostic indicators of survival in patients with compensated and decompensated cirrhosis. *Liver Int* 32: 1407–1414. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2012.02830.x> PMID: 22679906
7. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK (2014) Liver cirrhosis. *Lancet* 383: 1749–1761. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60121-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60121-5) PMID: 24480518
8. Serfaty L (2016) Follow-up of patients with chronic hepatitis C and a sustained viral response. *Liver Int* 36 Suppl 1: 67–71.
9. Sanyal AJ, Bosch J, Blei A, Arroyo V (2008) Portal hypertension and its complications. *Gastroenterology* 134: 1715–1728. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.007> PMID: 18471549
10. Ripoll C, Groszmann R, Garcia-Tsao G, Grace N, Burroughs A, Planas R, et al. (2007) Hepatic venous pressure gradient predicts clinical decompensation in patients with compensated cirrhosis. *Gastroenterology* 133: 481–488. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.05.024> PMID: 17681169
11. Ripoll C, Groszmann RJ, Garcia-Tsao G, Bosch J, Grace N, Burroughs A, et al. (2009) Hepatic venous pressure gradient predicts development of hepatocellular carcinoma independently of severity of cirrhosis. *J Hepatol* 50: 923–928. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.01.014> PMID: 19303163
12. Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, et al. (2005) Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 128: 343–350. PMID: 15685546
13. Castera L (2015) Noninvasive Assessment of Liver Fibrosis. *Dig Dis* 33: 498–503. <https://doi.org/10.1159/000374097> PMID: 26159265
14. Castera L, Pinzani M, Bosch J (2012) Non invasive evaluation of portal hypertension using transient elastography. *J Hepatol* 56: 696–703. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.07.005> PMID: 21767510
15. Shi KQ, Fan YC, Pan ZZ, Lin XF, Liu WY, Chen YP, et al. (2013) Transient elastography: a meta-analysis of diagnostic accuracy in evaluation of portal hypertension in chronic liver disease. *Liver Int* 33: 62–71. <https://doi.org/10.1111/liv.12003> PMID: 22973991

16. Pritchett S, Cardenas A, Manning D, Curry M, Afdhal NH (2011) The optimal cut-off for predicting large oesophageal varices using transient elastography is disease specific. *J Viral Hepat* 18: e75–80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2010.01375.x> PMID: 21040236
17. Castera L, Le Bail B, Roudot-Thoraval F, Bernard PH, Foucher J, Merrerouche W, et al. (2009) Early detection in routine clinical practice of cirrhosis and oesophageal varices in chronic hepatitis C: comparison of transient elastography (FibroScan) with standard laboratory tests and non-invasive scores. *J Hepatol* 50: 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.08.018> PMID: 19013661
18. Kim JH, Kim MN, Han KH, Kim SU (2015) Clinical application of transient elastography in patients with chronic viral hepatitis receiving antiviral treatment. *Liver Int* 35: 1103–1115. <https://doi.org/10.1111/liv.12628> PMID: 24976523
19. Singh S, Fujii LL, Murad MH, Wang Z, Asrani SK, Ehman RL, et al. (2013) Liver stiffness is associated with risk of decompensation, liver cancer, and death in patients with chronic liver diseases: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 11: 1573–1584e1571-1572; quiz e1588-1579. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.07.034> PMID: 23954643
20. Perez-Latorre L, Rivero-Juarez A, Hontanon V, Diez C, Cuenca F, Martin-Carbonero ML, et al. (2016) Prognostic Value of Transient Elastography in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients With Chronic Hepatitis C. *Open Forum Infect Dis* 3: ofw212. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw212> PMID: 27833930
21. Perez-Latorre L, Sanchez-Conde M, Rincon D, Miralles P, Aldamiz-Echevarria T, Carrero A, et al. (2014) Prediction of liver complications in patients with hepatitis C virus-related cirrhosis with and without HIV coinfection: comparison of hepatic venous pressure gradient and transient elastography. *Clin Infect Dis* 58: 713–718. <https://doi.org/10.1093/cid/cit768> PMID: 24265358
22. Sultanik P, Kramer L, Soudan D, Bouam S, Meritet JF, Vallet-Pichard A, et al. (2016) The relationship between liver stiffness measurement and outcome in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis: a retrospective longitudinal hospital study. *Aliment Pharmacol Ther*.
23. Lee HW, Chon YE, Kim SU, Kim BK, Park JY, Kim do Y, et al. (2016) Predicting Liver-Related Events Using Transient Elastography in Chronic Hepatitis C Patients with Sustained Virological Response. *Gut Liver* 10: 429–436. <https://doi.org/10.5009/gnl15021> PMID: 26347515
24. Fernandez-Montero JV, Barreiro P, Vispo E, Labarga P, Sanchez-Parra C, Soriano V (2013) Liver stiffness predicts liver-related complications and mortality in HIV patients with chronic hepatitis C on antiretroviral therapy. *AIDS* 27: 1129–1134. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32835e063f> PMID: 23276803
25. O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ (2010) Alcoholic liver disease. *Hepatology* 51: 307–328. <https://doi.org/10.1002/hep.23258> PMID: 20034030
26. (2012) 2011 European Association of the Study of the Liver hepatitis C virus clinical practice guidelines. *Liver Int* 32 Suppl 1: 2–8.
27. (2014) EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 60: 392–420. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.11.003> PMID: 24331294
28. Mallet V, Gilgenkrantz H, Serpaggi J, Verkarre V, Vallet-Pichard A, Fontaine H, et al. (2008) Brief communication: the relationship of regression of cirrhosis to outcome in chronic hepatitis C. *Ann Intern Med* 149: 399–403. PMID: 18794559
29. European Association For The Study Of The L, European Organisation For R, Treatment Of C (2012) EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 56: 908–943. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.12.001> PMID: 22424438
30. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, et al. (2003) Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 29: 1705–1713. PMID: 14698338
31. Castera L, Forns X, Alberti A (2008) Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol* 48: 835–847. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.02.008> PMID: 18334275
32. Garcia-Tsao G, Abraldes JG, Berzigotti A, Bosch J (2017) Portal hypertensive bleeding in cirrhosis: Risk stratification, diagnosis, and management: 2016 practice guidance by the American Association for the study of liver diseases. *Hepatology* 65: 310–335. <https://doi.org/10.1002/hep.28906> PMID: 27786365
33. Conti F, Buonfiglioli F, Scuteri A, Crespi C, Bolondi L, Caraceni P, et al. (2016) Early occurrence and recurrence of hepatocellular carcinoma in HCV-related cirrhosis treated with direct-acting antivirals. *J Hepatol* 65: 727–733. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.06.015> PMID: 27349488
34. van der Meer AJ, Feld JJ, Hofer H, Almasio PL, Calvaruso V, Fernandez-Rodriguez CM, et al. (2017) Risk of cirrhosis-related complications in patients with advanced fibrosis following hepatitis C virus eradication. *J Hepatol* 66: 485–493. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.10.017> PMID: 27780714

35. Janjua NZ, Chong M, Kuo M, Woods R, Wong J, Yoshida EM, et al. (2017) Long-term effect of sustained virological response on hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C in Canada. *J Hepatol* 66: 504–513. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.10.028> PMID: [27818234](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27818234/)
36. Reig M, Marino Z, Perello C, Inarrairaegui M, Ribeiro A, Lens S, et al. (2016) Unexpected high rate of early tumor recurrence in patients with HCV-related HCC undergoing interferon-free therapy. *J Hepatol* 65: 719–726. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.04.008> PMID: [27084592](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27084592/)
37. Pang JX, Zimmer S, Niu S, Crotty P, Tracey J, Pradhan F, et al. (2014) Liver stiffness by transient elastography predicts liver-related complications and mortality in patients with chronic liver disease. *PLoS One* 9: e95776. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095776> PMID: [24755824](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24755824/)
38. Vergniol J, Foucher J, Terrebbonne E, Bernard PH, le Bail B, Merrouche W, et al. (2011) Noninvasive tests for fibrosis and liver stiffness predict 5-year outcomes of patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 140: 1970–1979, 1979e1971–1973. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.058> PMID: [21376047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21376047/)
39. Klibansky DA, Mehta SH, Curry M, Nasser I, Challies T, Afdhal NH (2012) Transient elastography for predicting clinical outcomes in patients with chronic liver disease. *J Viral Hepat* 19: e184–193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2011.01493.x> PMID: [22239518](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22239518/)
40. Poynard T, McHutchison J, Manns M, Trepo C, Lindsay K, Goodman Z, et al. (2002) Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 122: 1303–1313. PMID: [11984517](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11984517/)
41. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. (2001) Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358: 958–965. PMID: [11583749](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11583749/)
42. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, et al. (1998) Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 339: 1485–1492. <https://doi.org/10.1056/NEJM199811193392101> PMID: [9819446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9819446/)
43. Shiffman ML, Sterling RK, Contos M, Hubbard S, Long A, Luketic VA, et al. (2014) Long term changes in liver histology following treatment of chronic hepatitis C virus. *Ann Hepatol* 13: 340–349. PMID: [24927604](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24927604/)
44. Poynard T, Moussalli J, Munteanu M, Thabut D, Lebray P, Rudler M, et al. (2013) Slow regression of liver fibrosis presumed by repeated biomarkers after virological cure in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 59: 675–683. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.05.015> PMID: [23712051](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23712051/)

6.2 Los polimorfismos de *CXCL9-11* se asocian con fibrosis hepática en pacientes con hepatitis crónica por VHC: un estudio transversal.

Jiménez-Sousa MA ^(‡), Gomez-Moreno AZ ^(‡), Pineda-Tenor D, Medrano LM, Sanchez-Ruano JJ, Fernandez-Rodriguez A, Artaza-Varasa T, Saura-Montalban J, Vazquez-Moron S, Ryan P, Resino S. *CXCL9-11* polymorphisms are associated with liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a cross-sectional study. **Clin Transl Med.** 2017, 6(1):26. (‡), Contributed equally to this work.

RESUMEN

Objetivos: Determinar la asociación de los polimorfismos genéticos de un solo nucleótido en los genes de las quimiocinas *CXCL9-11* y la fibrosis hepática en pacientes infectados por el VHC.

Método: Estudio transversal realizado en 389 pacientes infectados por VHC con una muestra de ADN disponible y con valores de rigidez hepática (LSM). Los polimorfismos *CXCL9-11* (*CXCL9* rs10336, *CXCL10* rs3921, and *CXCL11* rs4619915) se determinaron empleando la plataforma MassARRAY de Agena Bioscience y la tecnología iPLEX® Gold assay (CEGEN). La variable desenlace fue la rigidez hepática (LSM). Los pacientes fueron clasificados de acuerdo a los valores de LSM; $\geq 7,1$ kPa (F ≥ 2 – fibrosis significativa), $\geq 9,5$ kPa (F ≥ 3 – fibrosis avanzada), y $\geq 12,5$ kPa (F4 - cirrosis).

Resultados: Los modelos de herencia recesivo, sobredominante y codominante mostraron valores significativos, pero el modelo sobredominante fue el que mejor se ajustó a nuestros datos. En este caso, observamos que los genotipos *CXCL9* rs10336 AG, *CXCL10* rs3921 CG y *CXCL11* rs4619915 AG se asociaron con valores más bajos de LSM [(ratio de media geométrica ajustada (aRMG)=0,85 (p=0.005), aRMG=0,84 (p=0.003), y aRMG=0,84 (p=0.003), respectivamente]. Además, los pacientes con genotipo *CXCL9* rs10336 AG tuvieron menor probabilidad de tener fibrosis significativa ($\geq 7,1$ kPa) [Odds ratio ajustada (aOR)=0,59 (p=0.016)], fibrosis avanzada ($\geq 9,5$ kPa) [aOR=0,54 (p=0.010)], y cirrosis ($\geq 12,5$ kPa) [aOR=0.56 (p=0.043)]. Asimismo, los pacientes que presentaron los genotipos *CXCL10* rs3921 CG o *CXCL11* rs4619915 AG tuvieron menor probabilidad de tener fibrosis significativa ($\geq 7,1$ kPa) [(aOR)=0,56 (p=0.008)], fibrosis avanzada ($\geq 9,5$ kPa) [aOR=0,55 (p=0.013)], y cirrosis ($\geq 12,5$ kPa) [aOR=0,57 (p=0.051)].


Conclusiones: Los pacientes infectados por VHC que fueron heterocigotos para *CXCL9* rs10336, *CXCL10* rs3921 y *CXCL11* rs4619915 presentaron menor riesgo de desarrollar fibrosis hepática.

RESEARCH

Open Access



CXCL9-11 polymorphisms are associated with liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a cross-sectional study

María Ángeles Jiménez-Sousa^{1†}, Ana Zaida Gómez-Moreno^{2†}, Daniel Pineda-Tenor³, Luz Maria Medrano¹, Juan José Sánchez-Ruano², Amanda Fernández-Rodríguez¹, Tomas Artaza-Varasa², José Saura-Montalban⁴, Sonia Vázquez-Morón¹, Pablo Ryan⁵ and Salvador Resino^{1*} 

Abstract

Background and aims: *CXCL9-11* polymorphisms are related to various infectious diseases, including hepatitis C virus (HCV) infection. In this study, we analyzed the association between *CXCL9-11* polymorphisms and liver fibrosis in HCV-infected patients.

Methods: We performed a cross-sectional study in 389 patients who were genotyped for *CXCL9-11* polymorphisms (*CXCL9* rs10336, *CXCL10* rs3921, and *CXCL11* rs4619915) using the Sequenom's MassARRAY platform. The primary outcome variable was the liver stiffness measurement (LSM). We established three cut-offs of LSM: LSM \geq 7.1 kPa (F \geq 2—significant fibrosis), LSM \geq 9.5 kPa (F \geq 3—advanced fibrosis), and LSM \geq 12.5 kPa (F4—cirrhosis).

Results: Recessive, overdominant and codominant models of inheritance showed significant values, but the overdominant model was the best fitting our data. In this case, *CXCL9* rs10336 AG, *CXCL10* rs3921 CG and *CXCL11* rs4619915 AG were mainly associated with lower values of LSM [(adjusted GMR (aGMR) = 0.85 (p = 0.005), aGMR = 0.84 (p = 0.003), and aGMR = 0.84 (p = 0.003), respectively]. Patients with *CXCL9* rs10336 AG genotype had lower odds of significant fibrosis (LSM \geq 7.1 kPa) [adjusted OR (aOR) = 0.59 (p = 0.016)], advanced fibrosis (LSM \geq 9.5 kPa) [aOR = 0.54 (p = 0.010)], and cirrhosis (LSM \geq 12.5 kPa) [aOR = 0.56 (p = 0.043)]. Patients with *CXCL10* rs3921 CG or *CXCL11* rs4619915 AG genotypes had lower odds of significant fibrosis (LSM \geq 7.1 kPa) [adjusted OR (aOR) = 0.56 (p = 0.008)], advanced fibrosis (LSM \geq 9.5 kPa) [aOR = 0.55 (p = 0.013)], and cirrhosis (LSM \geq 12.5 kPa) [aOR = 0.57 (p = 0.051)]. Additionally, *CXCL9-11* polymorphisms were related to lower liver stiffness under a codominant model of inheritance, being the heterozygous genotypes also protective against hepatic fibrosis. In the recessive inheritance model, the *CXCL9* rs10336 AA, *CXCL10* rs3921 CC and *CXCL11* rs4619915 AA were associated with higher LSM values [(adjusted GMR (aGMR) = 1.19 (p = 0.030), aGMR = 1.21 (p = 0.023), and aGMR = 1.21 (p = 0.023), respectively]. Moreover, patients with *CXCL9* rs10336 AA genotype had higher odds of significant fibrosis (LSM \geq 7.1 kPa) [adjusted OR (aOR) = 1.83 (p = 0.044)] and advanced fibrosis (LSM \geq 9.5 kPa) [aOR = 1.85 (p = 0.045)]. Furthermore, patients with *CXCL10* rs3921 CC or *CXCL11* rs4619915 AA genotypes had higher odds of advanced fibrosis (LSM \geq 9.5 kPa) [aOR = 1.89 (p = 0.038)].

*Correspondence: sresino@isciii.es

[†]María Ángeles Jiménez-Sousa and Ana Zaida Gómez-Moreno contributed equally to this work

¹ Unidad de Infección Viral e Inmunidad, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Carretera Majadahonda-Pozuelo, Km 2.2, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

Conclusions: *CXCL9-11* polymorphisms were related to likelihood of having liver fibrosis in HCV-infected patients. Our data suggest that *CXCL9-11* polymorphisms may play a significant role against the progression of CHC and could help prioritize antiviral therapy.

Keywords: Liver stiffness, Chronic hepatitis C, Cirrhosis, *CXCL9-11*, SNPs, Liver fibrosis

Background

Hepatitis C virus (HCV) leads to the development of chronic liver disease or liver-related death worldwide [1, 2]. Around 80% of the subjects exposed to the HCV usually develop chronic hepatitis C (CHC), which may result in significant liver fibrosis, cirrhosis and end stage liver disease [3]. Moreover, CHC constitutes a major indication for liver transplantation in the United States [4] and Europe [5]. However, the impact of HCV infection is highly variable, ranging from minimal rates of fibrosis progression to extensive fibrosis and cirrhosis in a few years [6]. Additionally, HCV antiviral therapy may reduce the clinical consequences of CHC, but patients with cirrhosis, despite HCV eradication, remain at risk of disease progression [7–9].

The management of patients with CHC depends on their clinical stage [10], since patients without cirrhosis have a much longer median survival time than those with cirrhosis [6]. Thus, early recognition of patients with CHC at high risk for developing liver fibrosis and cirrhosis is important, because it ensures optimal preventive management strategies that can modify the course of CHC disease [11]. The hepatic biopsy is the gold standard test to diagnose and quantify liver fibrosis, but this procedure is associated with several drawbacks [12, 13]. Liver stiffness measurement (LSM) using transient elastography is a noninvasive method based on liver elasticity observations, which may accurately predict the presence of fibrosis/cirrhosis in patients with CHC [12, 13].

The pathogenic mechanisms of the accelerated progression of liver injury are incompletely understood; but single nucleotide polymorphisms (SNPs), liver inflammatory profile and the impaired immune response are thought to be important determinants of the evolution of liver disease [14]. In this context, the lymphocyte migration from the periphery to liver parenchyma mediated by chemokines constitutes a major event for development of liver fibrosis in response to HCV infection [15]. *CXCL* chemokine ligand (*CXCL*) 9 [monokine induced by interferon γ (Mig)], *CXCL*10 [interferon- γ —inducible protein-10 (IP-10)], and *CXCL*11 (interferon-inducible T cell α chemoattractant; I-TAC) are produced in the liver by infected hepatocytes during CHC. This response induces migration of activated T cells (T-helper/T-cytotoxic type-1 cell (Th1/Tc1) response) from the periphery to the infected liver parenchyma via chemokine (C-X-C

motif) receptor 3 [16]. It has been reported an increase of *CXCL*9 expression in hepatocytes of HCV-infected patients, and a correlation between *CXCL*9 levels and liver fibrosis [17, 18]. However, an anti-fibrotic role of *CXCL*9 has also been described [19–21]. Besides, increased *CXCL*10 levels have been associated with liver injury in HCV-infected patients [17, 21–26], and *CXCL*11 expression levels have been related to both portal and lobular inflammation; a clear relationship with liver disease in CHC has not been found [17, 22, 27]. Additionally, *CXCL*9-11 chemokines have been significantly correlated with the level of hepatoprotective cytokines such as IL6 and IL10, suggesting their involvement in a counter-regulatory response during the progression of liver disease [17].

CXCL9-11 polymorphisms have been related to severity in various infectious diseases such as those caused by enterovirus-71 [28], hepatitis B infection [29, 30], malaria [31], Chagas disease [32], and tuberculosis [33]. Besides, we have found an association between *CXCL9-11* polymorphisms and liver disease in human immunodeficiency virus (HIV)/HCV-coinfected patients [34]. These patients have a damaged immune system due to HIV infection, causing hepatitis C virus to evolve more aggressively [35, 36]. However, to our knowledge, there is no information regarding the relationship between *CXCL9-11* polymorphisms and liver disease in HCV-monoinfected patients.

In the present study, we analysed the association between *CXCL9-11* polymorphisms and liver fibrosis, considering LSM values, in HCV-infected patients.

Patients and methods

Patients

We carried out a cross-sectional study on 389 HCV-infected patients who had liver stiffness assessed by transient elastometry in Virgen de la Salud Hospital (Toledo, Spain) between 2005 and 2015. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, all patients gave their written consent for the study, and the Research Ethic Committee (“Comité de Ética de la Investigación”) approved the study.

The selection criteria were: (1) detectable HCV RNA by polymerase chain reaction; (2) availability of a valid LSM; (3) availability of DNA sample. The exclusion criteria were: (1) co-infection with hepatitis B virus or

human immunodeficiency virus; (2) clinical evidence of hepatic decompensation at enrollment or a prior history of hepatic decompensation; and (3) hepatocellular carcinoma at enrollment or a previous history of hepatocellular carcinoma.

Clinical and laboratory data

Clinical and epidemiological data were obtained from medical records. The time since HCV diagnosis was calculated starting from the diagnosis date to the date of last visit in our study. High alcohol intake was considered to be ≥ 20 grams/day in women and ≥ 60 grams/day in men [37]. Patients could have been treated with HCV therapy [peg-Interferon (IFN)- α /ribavirin] according to clinical guidelines [38, 39]. However, we only included non-responder patients with detectable serum HCV-RNA.

Liver stiffness measurement

Liver stiffness measurement was assessed by transient elastography (FibroScan[®], Echosens, Paris, France). Results were expressed in kilopascals (kPa) with a range of 2.5–75 kPa. Transient elastography was performed by a trained operator (medical doctor), and measurements were considered reliable when the interquartile-range-to-median ratio was < 0.30 [40]. For at least ten successful measurements.

Outcome variable

The primary outcome variable was the LSM examined as continuous and categorical variable. Three different cut-offs of LSM [41], were established to stratify all patients: LSM ≥ 7.1 kPa ($F \geq 2$ —significant fibrosis), LSM ≥ 9.5 kPa ($F \geq 3$ —advanced fibrosis), and LSM ≥ 12.5 kPa ($F4$ —cirrhosis).

Genotyping of CXCL9-11 polymorphisms

We analyzed three SNPs within the *CXCL9-11* family (*CXCL9* rs10336, *CXCL10* rs3921 and *CXCL11* rs4619915) [34, 42]. DNA samples were genotyped at the Spanish National Genotyping Center (CeGen-PRB2; <http://www.usc.es/cegen/>) by using the iPLEX[®] Gold technology and Agena Bioscience's MassARRAY platform (San Diego, CA, USA). The quality control was performed according to the CeGen criteria, which includes a genotyping call-rate over 95% for all the SNPs; duplicated samples on each plate to check for technical replicates; a negative control; and three positive Coriell controls from Human Genetic Cell Repository (NA10860, NA10861 and NA11984). These controls were included on each batch to exclude DNA contamination and ensure a technically correct laboratory process, respectively.

A control healthy population was obtained at the 1000 Genomes Project's website (<http://www.1000genomes.org/home>): This database provides a broad representation of common human genetic variation detected by next generation sequencing in multiple populations [43]. Our control population was the Iberian population in Spain (IBS), which includes 107 individuals.

Statistical analysis

To analyze the differences among groups according to *CXCL9-11* genotypes, Mann–Whitney U test and Kruskal–Wallis were used for continuous variables and Chi square test or Fisher's exact test for categorical variables.

For the genetic association study, generalized linear model (GLM) was used to analyze the outcome variables with *CXCL9-11* polymorphisms. This analysis was carried out according to dominant, codominant, overdominant, recessive and additive models. These analyses were tested according to the goodness of fit evaluated by Akaike information criterion (AIC) value and Bayesian information criterion (BIC). On the one hand, GLM with a gamma distribution was used to investigate the association between *CXCL9-11* polymorphisms and the LSM (continuous variable). Besides, natural logarithmic transformation (Ln) of LSM was used due to a skewed distribution. The GLM gives the differences between groups and the geometric mean ratio (GMR), or the ratio by which the geometric mean of the original outcome is multiplied. On the other hand, GLM with binomial distribution (logit-link) was used to investigate the association of *CXCL9-11* polymorphisms with categorical outcome variables ($F \geq 2$, $F \geq 3$, and $F4$). This test gives the differences between groups and the odds ratio (OR) for categorical outcome variables. For univariate model, we included each SNP separately. For multivariate model, each SNP together with all available relevant covariates (multivariate model) were included using the Enter algorithm (Forced Entry). The covariates that we have had available for inclusion in our study were age, gender, time since HCV diagnosis, HCV genotype, injection drug use, high alcohol intake, and non-responder patients to HCV antiviral therapy prior to baseline (patients who failed therapy). All statistical tests were performed with the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 21.0 software (IBM Corp., Chicago, USA). All p values were two-tailed and statistical significance was defined as p value < 0.05 .

In addition, Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) and pairwise linkage disequilibrium (LD) were analyzed by Haploview 4.2 software. Haplotype-based association test was performed with Plink software (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>).

Results

Patient characteristics

Table 1 shows the characteristics of 389 chronic HCV-infected patients, 71 were cirrhotic (LSM \geq 12.5 kPa). In

Table 1 Clinical and epidemiological characteristics of HCV-infected patients

Characteristics	Data
No.	389
Male sex	228 (58.6%)
Age (years)	49.6 (43.2; 57.7)
Time of HCV diagnosis (years)	8.6 (2.1; 14.1)
High alcohol intake	75 (19.3%)
Prior injection drug use	66 (17%)
HCV genotype (n = 383)	
1	311 (81.2%)
2	5 (1.3%)
3	42 (11%)
4	23 (6%)
5	2 (0.5%)
Non-responder (peg-IFN- α /RBV)	81 (20.8%)
Liver stiffness (kPa)	6.9 (5.5; 10.5)
F0–F1 (<7.1)	205 (52.7%)
F2 (7.1–9.4)	65 (16.7%)
F3 (9.5–12.4)	48 (12.3%)
F4.1 (12.5–21.4)	41 (10.5%)
F4.2 (\geq 21.5)	30 (7.7%)

Values expressed as absolute numbers (%) and median (percentile 25; percentile 75)

HCV hepatitis C virus, LSM liver stiffness measure, kPa kilopascal, IFN interferon, peg-IFN- α /RBV pegylated-interferon-alpha/ribavirin

brief, 58.6% were male, the median age was 49.6 years, 19.3% reported a high intake of alcohol, 17% were prior injection drug users, 81.2% were infected by HCV genotype 1, and 20.8% were patients treated with antiviral therapy (peg-IFN- α /ribavirin) who did not achieved sustained virological response (non-responders). The median LSM was 6.9 kPa and the median time since HCV diagnosis was 8.6 years.

CXCL9-11 polymorphisms

Table 2 shows allelic and genotypic frequencies of CXCL9-11 polymorphisms. All SNPs had a minimum allele frequency >5%, displayed less than 5% of missing values, and were in HWE ($p > 0.05$). No significant differences were found between studied patients and IBS population. In addition, the allelic and genotypic frequencies in our dataset were in accordance with data listed on the NCBI SNP database for European population (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>).

A strong LD among CXCL9-11 SNPs was found (Fig. 1; $D' \geq 0.97$), meaning that there is no evidence of recombination between these SNPs. Furthermore, the R-squared among CXCL9-11 SNPs was also high (Fig. 1; R-squared ≥ 0.92), indicating that these polymorphisms could substitute each other.

CXCL9-11 polymorphisms and liver stiffness

The values of LSM and fibrosis stages according to CXCL9-11 polymorphisms are shown in Table 3. The CXCL9 rs10336 AG, CXCL10 rs3921 CG and CXCL11 rs4619915 AG were linked to lower values of LSM ($p \leq 0.002$) and frequencies of F ≥ 2 (LSM ≥ 7.1 kPa;

Table 2 Summary of Hardy–Weinberg Equilibrium test and allelic and genotypic frequencies genotypes for CXCL9-11 polymorphisms in HCV-infected patients compared to Iberian population (data from HapMap) (<http://browser.1000genomes.org/index.html>)

SNPs	HCV cohort (n = 389)				IBS group (n = 107)				χ^2 test ^a p value	χ^2 test ^b p value		
	HWE	Alleles	Genotype		HWE	Alleles	Genotype					
CXCL9 rs10336	0.738	A	41%	AA	16%	0.677	A	45%	AA	22%	0.568	0.556
		G	59%	AG	50%		G	55%	AG	46%		
				GG	34%				GG	32%		
CXCL10 rs3921	0.841	C	41%	CC	16%	0.884	C	45%	CC	21%	0.568	0.653
		G	59%	CG	49%		G	55%	CG	47%		
				GG	35%				GG	32%		
CXCL11 rs4619915	0.841	A	41%	AA	16%	0.884	A	44%	AA	21%	0.668	0.650
		G	59%	AG	49%		G	56%	AG	45%		
				GG	35%				GG	34%		

Statistical: p values were calculated by Chi squared test

HWE Hardy–Weinberg Equilibrium, HCV hepatitis C virus, IBS Iberian populations in Spain, CXCL chemokine (C-X-C motif) ligand

^a Differences between allele frequencies

^b Differences between genotype frequencies

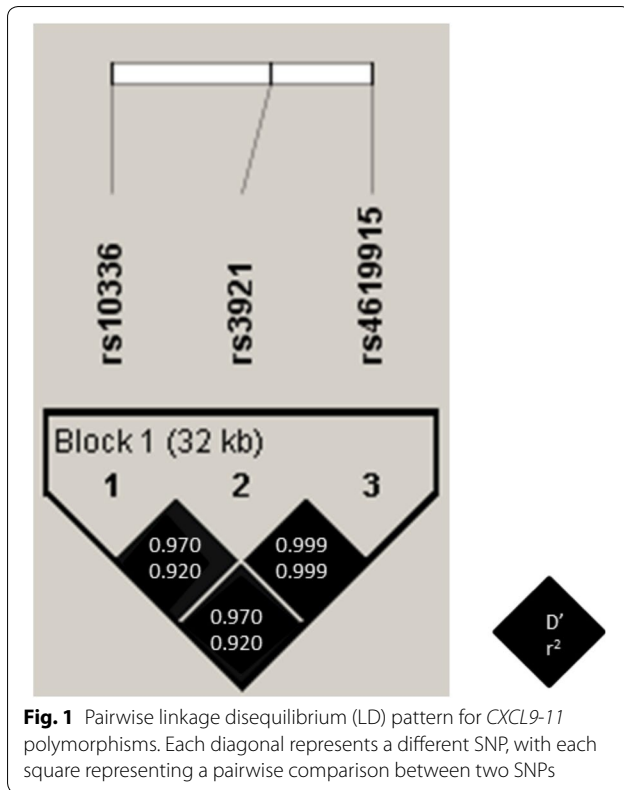


Fig. 1 Pairwise linkage disequilibrium (LD) pattern for *CXCL9-11* polymorphisms. Each diagonal represents a different SNP, with each square representing a pairwise comparison between two SNPs

$p \leq 0.004$), $F \geq 3$ ($LSM \geq 9.5$ kPa; $p \leq 0.003$) and $F4$ ($LSM \geq 12.5$ kPa; $p \leq 0.038$) than patients with homozygote genotypes.

The association analysis was tested under five different genetic models of inheritance. Recessive, overdominant and codominant models showed significant values, but the overdominant model was the best fitting our data according to AIC and BIC.

The overdominant inheritance model was the model that best fitted to our data, and the association values are shown in Table 4. In this case, we also found that *CXCL9* rs10336 AG, *CXCL10* rs3921 CG and *CXCL11* rs4619915 AG were mainly associated with lower values of LSM [(adjusted GMR (aGMR) = 0.85 ($p = 0.005$), aGMR = 0.84 ($p = 0.003$), and aGMR = 0.84 ($p = 0.003$), respectively]. Moreover, patients with *CXCL9* rs10336 AG genotype had lower odds of significant fibrosis ($LSM \geq 7.1$ kPa) [adjusted OR (aOR) = 0.59 ($p = 0.016$)], advanced fibrosis ($LSM \geq 9.5$ kPa) [aOR = 0.54 ($p = 0.010$)], and cirrhosis ($LSM \geq 12.5$ kPa) [aOR = 0.56 ($p = 0.043$)]. Furthermore, patients with *CXCL10* rs3921 CG or *CXCL11* rs4619915 AG genotypes had lower odds of significant fibrosis ($LSM \geq 7.1$ kPa) [adjusted OR (aOR) = 0.56 ($p = 0.008$)], advanced fibrosis ($LSM \geq 9.5$ kPa) [aOR = 0.55 ($p = 0.013$)], and cirrhosis

Table 3 Summary of LSM and fibrosis stages according to *CXCL9-11* polymorphisms (*CXCL9* rs10336, *CXCL10* rs3921, and *CXCL11* rs4619915) in HCV-infected patients

rs10336	AA	AG	GG	p ^a
No.	64	193	132	
LSM (kPa)	8.6 (6.1; 12.9)	6.7 (5.3; 8.9)	7.5 (5.6; 11.7)	<i>0.002</i>
$F \geq 2$ (≥ 7.1)	40 (62.5%)	77 (39.9%)	67 (50.8%)	<i>0.004</i>
$F \geq 3$ (≥ 9.5)	28 (43.8%)	44 (22.8%)	47 (35.6%)	<i>0.002</i>
$F4$ (≥ 12.5)	17 (26.6%)	26 (13.5%)	28 (21.2%)	<i>0.035</i>
rs3921	CC	CG	GG	p ^a
No.	63	191	135	
LSM (kPa)	8.6 (6.1; 12.9)	6.7 (5.3; 9.1)	7.6 (5.6; 11.6)	<i>0.001</i>
$F \geq 2$ (≥ 7.1 kPa)	39 (61.9%)	75 (39.3%)	70 (51.9%)	<i>0.003</i>
$F \geq 3$ (≥ 9.5 kPa)	28 (44.4%)	44 (23%)	47 (34.8%)	<i>0.003</i>
$F4$ (≥ 12.5 kPa)	17 (27%)	26 (13.6%)	28 (20.7%)	<i>0.038</i>
rs4619915	AA	AG	GG	p ^a
No.	63	191	135	
LSM (kPa)	8.6 (6.1; 12.9)	6.7 (5.3; 9.1)	7.6 (5.6; 11.6)	<i>0.001</i>
$F \geq 2$ (≥ 7.1)	39 (61.9%)	75 (39.3%)	70 (51.9%)	<i>0.003</i>
$F \geq 3$ (≥ 9.5)	28 (44.4%)	44 (23.0%)	47 (34.8%)	<i>0.003</i>
$F4$ (≥ 12.5)	17 (27%)	26 (13.6%)	28 (20.7%)	<i>0.038</i>

p value level of significance LSM liver stiffness measure, kPa kilopascal, $F \geq 2$ significant fibrosis, $F \geq 3$ advance fibrosis, $F4$ cirrhosis, CXCL chemokine (C-X-C motif) ligand

Statistical: ^a p values were calculated by KW (continuous variable) or Chi squared test (dichotomous variable). Statistically significant differences are shown in italic

Table 4 Relationship between CXCL9-11 polymorphisms (CXCL9 rs10336, CXCL10 rs3921, and CXCL11 rs4619915) and liver fibrosis in HCV-infected patients

	Unadjusted		Adjusted	
	Exp(B) (95% CI)	p ^a	Exp(B) (95% CI)	p ^b
rs10336 AG				
LSM (kPa)	0.82 (0.73; 0.92)	<i>0.001</i>	0.85 (0.76; 0.95)	<i>0.005</i>
F ≥ 2 (≥7.1)	0.55 (0.37; 0.83)	<i>0.004</i>	0.59 (0.38; 0.91)	<i>0.016</i>
F ≥ 3 (≥9.5)	0.48 (0.31; 0.74)	<i>0.001</i>	0.54 (0.34; 0.86)	<i>0.010</i>
F4 (≥12.5)	0.52 (0.31; 0.89)	<i>0.016</i>	0.56 (0.32; 0.98)	<i>0.043</i>
rs3921 CG				
LSM (kPa)	0.82 (0.73; 0.91)	<i><0.001</i>	0.84 (0.76; 0.94)	<i>0.003</i>
F ≥ 2 (≥7.1)	0.53 (0.35; 0.79)	<i>0.002</i>	0.56 (0.36; 0.86)	<i>0.008</i>
F ≥ 3 (≥9.5)	0.49 (0.32; 0.76)	<i>0.002</i>	0.55 (0.34; 0.88)	<i>0.013</i>
F4 (≥12.5)	0.54 (0.31; 0.91)	<i>0.021</i>	0.57 (0.33; 1.00)	<i>0.051</i>
rs4619915 AG				
LSM (kPa)	0.82 (0.73; 0.91)	<i><0.001</i>	0.84 (0.76; 0.94)	<i>0.003</i>
F ≥ 2 (≥7.1)	0.53 (0.35; 0.79)	<i>0.002</i>	0.56 (0.36; 0.86)	<i>0.008</i>
F ≥ 3 (≥9.5)	0.49 (0.32; 0.76)	<i>0.002</i>	0.55 (0.34; 0.88)	<i>0.013</i>
F4 (≥12.5)	0.54 (0.31; 0.91)	<i>0.021</i>	0.57 (0.33; 1.00)	<i>0.051</i>

Exp(B) geometric mean ratio (GMR) continuous variable or odds ratio (OR) for categorical variables, 95% CI 95% of confidence interval, p value level of significance, LSM liver stiffness measure, kPa kilopascal, F ≥ 2 significant fibrosis, F ≥ 3 advance fibrosis, F4 cirrhosis, HCV-GT hepatitis C virus genotype, CXCL chemokine (C-X-C motif) ligand

Statistical: ^a p values were calculated by univariate regression

^b p values were calculated by multivariate regression adjusted by the most important clinical and epidemiological characteristics (see "statistical analysis" section). Statistically significant differences are shown in italic

(LSM ≥ 12.5 kPa) [aOR = 0.57 (p = 0.051)]. Additionally, we also found that CXCL9-11 polymorphisms were related to lower liver stiffness under a codominant model of inheritance (data not shown), being the heterozygous genotypes also protective against hepatic fibrosis.

Table 5 shows the relationship between CXCL9-11 polymorphisms and liver stiffness under a recessive inheritance model. The CXCL9 rs10336 AA, CXCL10 rs3921 CC and CXCL11 rs4619915 AA were associated with higher LSM values [aGMR = 1.19 (p = 0.030), aGMR = 1.21 (p = 0.023), and aGMR = 1.21 (p = 0.023), respectively]. Moreover, patients with CXCL9 rs10336 AA genotype had higher odds of significant fibrosis (LSM ≥ 7.1 kPa) [adjusted OR (aOR) = 1.83 (p = 0.044)] and advanced fibrosis (LSM ≥ 9.5 kPa) [aOR = 1.85 (p = 0.045)]. Furthermore, patients with CXCL10 rs3921 CC or CXCL11 rs4619915 AA genotypes had higher odds of advanced fibrosis (LSM ≥ 9.5 kPa) [aOR = 1.89 (p = 0.038)].

CXCL9-11 haplotypes and liver fibrosis

Only three major haplotypes were found (Table 6), which included over 99.3% of patients: GGG, ACA, and AGG. However, we did not found any significant association.

Table 5 Relationship between CXCL9-11 polymorphisms (CXCL9 rs10336, CXCL10 rs3921, and CXCL11 rs4619915) and liver fibrosis in HCV-infected patients (recessive inheritance model)

	Unadjusted		Adjusted	
	Exp(B) (95% CI)	p ^a	Exp(B) (95% CI)	p ^b
rs10336 AA				
LSM (kPa)	1.21 (1.03; 1.49)	<i>0.022</i>	1.19 (1.02; 1.41)	<i>0.030</i>
F2 (≥7.1)	2.09 (1.21; 3.63)	<i>0.009</i>	1.83 (1.02; 3.32)	<i>0.044</i>
F3 (≥9.5)	2.01 (1.15; 3.47)	<i>0.014</i>	1.85 (1.02; 3.37)	<i>0.045</i>
F4 (≥12.5)	1.81 (0.97; 3.98)	<i>0.062</i>	1.83 (0.94; 3.54)	<i>0.073</i>
rs3921 CC				
LSM (kPa)	1.21 (1.03; 1.44)	<i>0.019</i>	1.21 (1.03; 1.42)	<i>0.023</i>
F2 (≥7.1)	2.03 (1.16; 3.52)	<i>0.012</i>	1.76 (0.97; 3.20)	<i>0.061</i>
F3 (≥9.5)	2.07 (1.18; 3.59)	<i>0.010</i>	1.89 (1.04; 3.47)	<i>0.038</i>
F4 (≥12.5)	1.86 (0.99; 3.48)	<i>0.053</i>	1.89 (0.97; 3.66)	<i>0.061</i>
rs4619915 AA				
LSM (kPa)	1.22 (1.03; 1.44)	<i>0.019</i>	1.21 (1.03; 1.42)	<i>0.023</i>
F2 (≥7.1)	2.03 (1.16; 3.53)	<i>0.012</i>	1.76 (0.97; 3.20)	<i>0.061</i>
F3 (≥9.5)	2.07 (1.19; 3.59)	<i>0.010</i>	1.89 (1.04; 3.47)	<i>0.038</i>
F4 (≥12.5)	1.86 (0.99; 3.49)	<i>0.053</i>	1.89 (0.97; 3.66)	<i>0.061</i>

Exp(B) geometric mean ratio (GMR) for continuous variable or odds ratio (OR) for categorical variables, 95% CI 95% of confidence interval, p value level of significance, LSM liver stiffness measure, kPa kilopascal, F ≥ 2 significant fibrosis, F ≥ 3 advance fibrosis, F4 cirrhosis, HCV-GT hepatitis C virus genotype, CXCL chemokine (C-X-C motif) ligand

Statistical: ^a p values were calculated by univariate regression

^b p values were calculated by multivariate regression adjusted by the most important clinical and epidemiological characteristics (see "statistical analysis" section). Statistically significant differences are shown in italic

Discussion

In our study, we found that CXCL9-11 polymorphisms, under an overdominant inheritance model, were associated with lower LSM values and fibrosis stage. This association was particularly important with significant fibrosis (F ≥ 2, LSM ≥ 7.5 kPa) and advanced liver fibrosis (F ≥ 3, LSM ≥ 9.5 kPa). To our knowledge, this is the first study that reports a relationship between CXCL9-11 polymorphisms and liver fibrosis in HCV-infected patients. Additionally, this work confirms the previous findings of our group in HIV/HCV-coinfected patients [34]; suggesting that CXCL9-11 polymorphisms may play a key role in the development of liver fibrosis during CHC.

Hepatitis C virus infection is characterized by an increased production of cytokines and chemokines, including the C-X-C motif chemokine receptor 3-associated chemokines [16, 23, 26, 44], which seems to be an important determinant of histological progression in HCV-infected patients [27, 45]. In this context, CXCL9-11 chemokines are expressed on many cell types, and play a crucial role in CHC through the recruitment to the

Table 6 Association between CXCL9-11 haplotypes and liver fibrosis stage in HCV-infected patients

	CXCL9-11 Haplotypes			Association		p
	rs10336	rs3921	rs4619915	Freq.	aOR (95% CI)	
F ≥ 2 (≥7.1 kPa)	G	G	G	0.581	0.95 (0.70; 1.30)	0.760
	A	C	A	0.401	1.01 (0.74; 1.39)	0.929
	A	G	G	0.011	2.50 (0.59; 10.5)	0.198
F ≥ 3 (≥9.5 kPa)	G	G	G	0.581	0.97 (0.70; 1.36)	0.868
	A	C	A	0.401	1.10 (0.78; 1.54)	0.597
	A	G	G	0.011	0.32 (0.04; 2.64)	0.226
F4 (≥12.5 kPa)	G	G	G	0.581	0.91 (0.62; 1.34)	0.629
	A	C	A	0.401	1.12 (0.76; 1.66)	0.557
	A	G	G	0.011	0.58 (0.07; 4.85)	0.591

Statistical: p values were calculated by multivariate logistic regression adjusted by the most important clinical and epidemiological characteristics

95% CI 95% of confidence interval, aOR adjusted odds ratio, p value level of significance, F ≥ 2 significant fibrosis, F ≥ 3 advance fibrosis, F4 cirrhosis, HCV-GT hepatitis C virus genotype, CXCL chemokine (C-X-C motif) ligand

liver parenchyma of inflammatory cells (monocytes/macrophages, activated T lymphocytes, natural killers and dendritic cells). These cells potentially contribute to the host immune response against the HCV, as well as to the hepatic inflammation and the cascade of events that may lead to fibrogenesis and liver disease progression [15, 22, 27, 45].

There is not much available information of the relationship between CXCL9-11 polymorphisms and liver fibrosis in CHC. CXCL9 variants have been related to liver fibrosis in mice and humans [21]. CXCL10 rs1439490 (G-201A) polymorphism has been associated with liver disease in patients infected with hepatitis B virus [29]. In a recent article published by our group, we found that CXCL9 rs10336 AA, CXCL10 rs3921 CC and CXCL11 rs4619915 AA genotypes were related to higher likelihood of severity of liver fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients under a recessive model [34]. Here, the homozygous genotypes for the minor alleles showed susceptibility to the liver disease. In the current study, we also showed that CXCL9-11 polymorphisms were also related to higher LSM values and higher odds of severity of liver fibrosis under a recessive model of inheritance. However, the overdominant model was the one that fitted best to our data, since it had lower values of AIC and BIC. In the overdominant model, the presence of heterozygous genotypes were linked to protection of severity of the liver disease. Thus, heterozygous individuals have a higher fitness than homozygous subjects (heterozygote advantage), such as in the sickle cell anemia, in which homozygote subjects do not have malaria protection or have dramatic propensity to sickle cell anemia; while heterozygote subjects have fewer physiological effects and partial resistance to malaria [46]. However, we do not have data to explain the mechanism by which this occurs.

The three CXCL9-11 SNPs analyzed in this study are located at the 3' untranslated region (UTR) of their respective genes. 3'UTR is a putative regulatory region, which could be targeted by microRNAs (miRNAs). These molecules are small non-coding RNAs that regulates expression by binding to its mRNA target site. Thus, polymorphisms in 3'UTR region could create, destroy or modify the efficiency of miRNA binding to the 3'UTR of a gene, resulting in gene dysregulation at posttranscriptional level. In order to investigate whether CXCL9-11 polymorphisms could affect mRNA target sites for miRNAs, we performed an in silico analysis by using PolymiRTS Database 3.0 [47]. We found that rs10336 A and rs4619915 A allele generates two miRNA binding sites for hsa-miR-4519 and hsa-miR-5089-3p respectively, whereas rs10336 G and rs4619915 G allele disrupt these miRNA target sites. The lack of binding of these miRNAs to the region surrounding these variants could lead to higher CXCL9-11 levels and, consequently, could modulate the fibrotic effect of these proteins since serum levels of CXCL9 were positively associated with the severity of liver fibrosis [17]. Additionally, the three CXCL9-11 polymorphisms seem to be implicated in changes in the chromatin state in several immune-related cell lines. Genetic variation in regulatory elements might coordinate changes in chromatin states and gene expression at both local and distal sites [48]. By using rVarBase [49], we detected that rs10336 has been associated with a 'enhancer' chromatin state in monocytes, rs3921 to a weak transcription in primary B cells and monocytes, and rs4619915 to weak transcription in monocytes among others. All these findings support the idea that CXCL9-11 polymorphisms could affect the production of the CXCL9-11 chemokine levels. In fact, both CXCL9 rs10336 TT and CXCL10 rs3921 GG genotypes

have also been related to higher cellular expression of *CXCL9* and *CXCL10* in other infectious disease, such as Chagas infection, where they were also related to a higher severity of chronic Chagas cardiomyopathy [32]. In this regard, our data are in line with data of Nogueira et al. [32], because patients with *CXCL9* rs10336 TT and *CXCL10* rs3921 GG genotypes (recessive inheritance model) had higher LSM values and fibrosis stages, possibly due to increased production of these chemokines that could allow the development and maintenance of the infiltration of Th1 cells in liver parenchyma. However, it is necessary to take into account that *CXCL9*, *CXCL10*, and *CXCL11* genes are clustered at chromosome 4q21.2, within a range of 32 kb [50, 51], where there is a high number of additional SNPs, which may be tightly linked to *CXCL9* rs10336, *CXCL10* rs3921, and *CXCL11* rs4619915 polymorphisms [50, 51]. Thereby, rs10336, rs3921, and rs4619915 polymorphisms could be functionally responsible for the observed effect or could just be polymorphisms in high LD with the causal mutation. Therefore, this association that we observed might be due to the proximity to other SNPs that may modulate *CXCL9-11* expression, or a direct effect of *CXCL9-11* polymorphisms on *CXCL9-11* expression. In this regard, *CXCL9-11* levels or *CXCL9-11* expression could be very helpful and convincing to reinforce the hypothesis that the observed effect of *CXCL9-11* SNPs have a biological effect, but such information were not available in this study.

In this study, we analyzed the association between haplotypes and liver fibrosis stages, but we did not find any significant association. The explanation for this lack of association is possibly due to the association of each individual SNP with liver fibrosis under an overdominant model of inheritance, which assumes that both alleles in heterozygous have the strongest impact over the trait. Furthermore, we also compared allelic and genotypic frequencies of *CXCL9* rs10336, *CXCL10* rs3921 and *CXCL11* rs4619915 polymorphism between HCV-infected patients and healthy people (IBS), and no significant differences were found, indicating that our cohort did not have any significant bias regarding the distribution of *CXCL9-11* polymorphisms.

Moreover, in terms of translational research, the discriminating power was low for finding patients with liver fibrosis (data not shown). Complex human diseases are under the control of many genes that contribute each one of them with modest individual effects, and only big effects would be detected in small populations. However, the combination of *CXCL9-11* polymorphisms together with other biomarkers (plasmatic, genetic, etc.) could add value to the prediction of the development of advanced fibrosis.

This study has several limitations that must be considered to ensure a correct interpretation of the data. Firstly, this is a cross-sectional study, which entails lack of uniformity. Even with this drawback, the association between *CXCL9-11* polymorphisms and liver stiffness detected is strong. Secondly, *CXCL9-11* chemokines levels in plasma could not be analyzed because we did not have access to plasma samples. Thirdly, since allele frequencies vary among ethnicities, and our study has been carried out entirely in HCV-infected white Europeans, it would be necessary to perform an independent replication of this study for different ethnic groups. Fourthly, in our study, about 20% of the patients were non-responders to IFN-alpha therapy during the follow-up. However, we did not find any significant effect on liver fibrosis progression in the multivariate analysis. Besides, when we excluded non-responder patients, significant associations between *CXCL9-11* were also found (data not shown). Fifthly, time since HCV infection is one of the most important factors determining fibrosis in HCV infected patients, but it is difficult to determine because it involves lead-time bias. In this regard, we did not have access to the date of HCV infection in most patients. Instead, we used the time since HCV diagnosis, which may also accumulate bias due to the variability in time from the HCV infection to the HCV diagnosis. Thus, some patients may have HCV infection a long time before HCV diagnosis, when they show symptoms of chronic liver disease, while some may be diagnosed with HCV infection not long after the onset of infection, especially those who had a regular check-up.

Conclusion

In conclusion, *CXCL9-11* polymorphisms were related to likelihood of having liver fibrosis in HCV-infected patients. Our data suggest that *CXCL9-11* polymorphisms may play a significant role against the progression of CHC and could help prioritize antiviral therapy.

Abbreviations

HCV: hepatitis c virus; CHC: chronic hepatitis c; LSM: liver stiffness measurement; SNPs: single nucleotide polymorphisms; CXCL: CXCL chemokine ligand; HIV: human immunodeficiency virus; IFN: interferon; kPa: kilopascals; F \geq 2—significant fibrosis; LSM \geq 7.1 kPa; F \geq 3—advanced fibrosis; LSM \geq 9.5 kPa; F4—cirrhosis; LSM \geq 12.5 kPa; UTR: 3' untranslated region; IBS: Iberian population in Spain; GLM: generalized linear model; GMR: geometric mean ratio; OR: odds ratio; HWE: Hardy-Weinberg equilibrium; LD: linkage disequilibrium; miRNAs: microRNAs.

Authors' contributions

Conceptualization: MAJS, AZG, DPT, and SR. Resources and data curation: AZG, DPT, MAJS, LMM, AFR, SV, JJSR, TAV, and JSM. Formal analysis: MAJS and SR. Investigation: MAJS, AZG, and DPT. Writing—original draft preparation: MAJS, AZG, and SR. Writing—Review & Editing: LMM, AFR, DPT, and PR. Visualization, supervision and funding acquisition: SR. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Unidad de Infección Viral e Inmunidad, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Carretera Majadahonda- Pozuelo, Km 2,2, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain. ² Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain. ³ Servicio de Laboratorio Clínico, Hospital Universitario de Fuenlabrada, Madrid, Spain. ⁴ Servicio de Laboratorio Clínico, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain. ⁵ Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario Infanta Leonor, Madrid, Spain.

Acknowledgements

The authors thank the Spanish National Genotyping Center (CEGEN-PRB2-ISCI) for providing SNP genotyping services (<http://www.cegen.org>). It is supported by grant PT13/0001, ISCIII-SGEFI/FEDER.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

The datasets analyzed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the Research Ethic Committee of the Instituto de Salud Carlos III and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All patients gave their written informed consent.

Funding

This work has been supported by grants given by Fondo de Investigación de Sanidad en España (FIS) [Spanish Health Funds for Research] [Grant Numbers PI14CIII/00011]. MAJS, LMM and AFR are supported by "Instituto de Salud Carlos III" [Grant Numbers CD13/00013, CD14/00002, and CP14CIII/00010, respectively].

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 4 April 2017 Accepted: 23 July 2017

Published online: 28 July 2017

References

- Asrani SK, Larson JJ, Yawn B, Therneau TM, Kim WR (2013) Underestimation of liver-related mortality in the United States. *Gastroenterology* 145(375–382):e371–e372
- Shepard CW, Finelli L, Alter MJ (2005) Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 5:558–567
- Ghany MG, Kleiner DE, Alter H, Doo E, Khokar F, Promrat K, Herion D, Park Y, Liang TJ, Hoofnagle JH (2003) Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 124:97–104
- Razavi H, Elkhoury AC, Elbasha E, Estes C, Pasini K, Poyndar T, Kumar R (2013) Chronic hepatitis C virus (HCV) disease burden and cost in the United States. *Hepatology* 57:2164–2170
- Adam R, Karam V, Delvart V, O'Grady J, Mirza D, Klempnauer J, Castaing D, Neuhaus P, Jamieson N, Salizzoni M et al (2012) Evolution of indications and results of liver transplantation in Europe. A report from the European Liver Transplant Registry (ELTR). *J Hepatol* 57:675–688
- Westbrook RH, Dusheiko G (2014) Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* 61:S58–S68
- Terrault NA, Hassanein TI (2016) Management of the patient with SVR. *J Hepatol* 65:S120–S129
- Serfaty L (2016) Follow-up of patients with chronic hepatitis C and a sustained viral response. *Liver Int* 36(Suppl 1):67–71
- van der Meer AJ, Feld JJ, Hofer H, Almasio PL, Calvaruso V, Fernandez-Rodriguez CM, Aleman S, Ganne-Carrie N, D'Ambrosio R, Pol S et al (2017) Risk of cirrhosis-related complications in patients with advanced fibrosis following hepatitis C virus eradication. *J Hepatol* 66:485–493
- EASL (2015) EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2015. *J Hepatol* 63:199–236
- Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK (2014) Liver cirrhosis. *Lancet* 383:1749–1761
- Resino S, Sanchez-Conde M, Berenguer J (2012) Coinfection by human immunodeficiency virus and hepatitis C virus: noninvasive assessment and staging of fibrosis. *Curr Opin Infect Dis* 25:564–569
- Castera L (2015) Noninvasive assessment of liver fibrosis. *Dig Dis* 33:498–503
- Heim MH, Bochud PY, George J (2016) Host—hepatitis C viral interactions: the role of genetics. *J Hepatol* 65:S22–S32
- Heydtmann M, Adams DH (2009) Chemokines in the immunopathogenesis of hepatitis C infection. *Hepatology* 49:676–688
- Zeremski M, Petrovic LM, Talal AH (2007) The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 14:675–687
- Tacke F, Zimmermann HW, Berres ML, Trautwein C, Wasmuth HE (2011) Serum chemokine receptor CXCR3 ligands are associated with progression, organ dysfunction and complications of chronic liver diseases. *Liver Int* 31:840–849
- Zeremski M, Dimova R, Brown Q, Jacobson IM, Markatou M, Talal AH (2009) Peripheral CXCR3-associated chemokines as biomarkers of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 200:1774–1780
- Liang YJ, Luo J, Lu Q, Zhou Y, Wu HW, Zheng D, Ren YY, Sun KY, Wang Y, Zhang ZS (2012) Gene profile of chemokines on hepatic stellate cells of schistosomium-infected mice and antifibrotic roles of CXCL9/10 on liver non-parenchymal cells. *PLoS ONE* 7:e42490
- Sahin H, Borkham-Kamphorst E, Kuppe C, Zaldivar MM, Grouls C, Al-samman M, Nellen A, Schmitz P, Heinrichs D, Berres ML et al (2012) Chemokine Cxcl9 attenuates liver fibrosis-associated angiogenesis in mice. *Hepatology* 55:1610–1619
- Wasmuth HE, Lammert F, Zaldivar MM, Weiskirchen R, Hellerbrand C, Scholten D, Berres ML, Zimmermann H, Streetz KL, Tacke F et al (2009) Antifibrotic effects of CXCL9 and its receptor CXCR3 in livers of mice and humans. *Gastroenterology* 137:309–319
- Patel K, Remlinger KS, Walker TG, Leitner P, Lucas JE, Gardner SD, McHutchison JG, Irving W, Guha IN (2014) Multiplex protein analysis to determine fibrosis stage and progression in patients with chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* 12(2113–2120):e2111–e2113
- Harvey CE, Post JJ, Palladinetti P, Freeman AJ, Ffrench RA, Kumar RK, Marinos G, Lloyd AR (2003) Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *J Leukoc Biol* 74:360–369
- Romero AI, Lagging M, Westin J, Dhillon AP, Dustin LB, Pawlotsky JM, Neumann AU, Ferrari C, Missale G, Haagmans BL et al (2006) Interferon (IFN)-gamma-inducible protein-10: association with histological results, viral kinetics, and outcome during treatment with pegylated IFN-alpha 2a and ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 194:895–903
- Roe B, Coughlan S, Hassan J, Grogan A, Farrell G, Norris S, Bergin C, Hall WW (2007) Elevated serum levels of interferon- gamma -inducible protein-10 in patients coinfecting with hepatitis C virus and HIV. *J Infect Dis* 196:1053–1057
- Berenguer J, Fernandez-Rodriguez A, Jimenez-Sousa MA, Cosin J, Zarate P, Micheloud D, Lopez JC, Miralles P, Catalan P, Resino S (2012) High plasma CXCL10 levels are associated with HCV-genotype 1, and higher insulin resistance, fibrosis, and HIV viral load in HIV/HCV coinfecting patients. *Cytokine* 57:25–29
- Marra F, Tacke F (2014) Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology* 147(577–594):e571
- Li JA, Chen ZB, Lv TG, Han ZL (2014) Genetic polymorphism of CCL2-2518, CXCL10-201, IL8+ 781 and susceptibility to severity of Enterovirus-71 infection in a Chinese population. *Inflamm Res* 63:549–556
- Xu Z, Liu Y, Liu L, Li X, Bai S, Rong Y, Wang H, Mao Y, Xin S, Xu D (2013) Association of interferon-gamma induced protein 10 promoter polymorphisms with the disease progression of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. *PLoS ONE* 8:e72799
- Deng G, Zhou G, Zhang R, Zhai Y, Zhao W, Yan Z, Deng C, Yuan X, Xu B, Dong X et al (2008) Regulatory polymorphisms in the promoter of

- CXCL10 gene and disease progression in male hepatitis B virus carriers. *Gastroenterology* 134:716–726
31. Wilson N, Driss A, Solomon W, Dickinson-Copeland C, Salifu H, Jain V, Singh N, Stiles J (2013) CXCL10 gene promoter polymorphism-1447A> G correlates with plasma CXCL10 levels and is associated with male susceptibility to cerebral malaria. *PLoS ONE* 8:e81329
 32. Nogueira LG, Santos RH, Ianni BM, Fiorelli AI, Mairena EC, Benvenuti LA, Frade A, Donadi E, Dias F, Saba B et al (2012) Myocardial chemokine expression and intensity of myocarditis in Chagas cardiomyopathy are controlled by polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1867
 33. Tang NL, Fan HP, Chang KC, Ching JK, Kong KP, Yew WW, Kam KM, Leung CC, Tam CM, Blackwell J, Chan CY (2009) Genetic association between a chemokine gene CXCL-10 (IP-10, interferon gamma inducible protein 10) and susceptibility to tuberculosis. *Clin Chim Acta* 406:98–102
 34. Pineda-Tenor D, Berenguer J, Garcia-Alvarez M, Guzman-Fulgencio M, Carrero A, Aldamiz-Echevarria T, Tejerina F, Diez C, Jimenez-Sousa MA, Fernandez-Rodriguez A et al (2015) Single nucleotide polymorphisms of CXCL9-11 chemokines are associated with liver fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 68:386–395
 35. Re VL III, Kallan MJ, Tate JP, Localio AR, Lim JK, Goetz MB, Klein MB, Rimland D, Rodriguez-Barradas MC, Butt AA et al (2014) Hepatic decompensation in antiretroviral-treated patients co-infected with HIV and hepatitis C virus compared with hepatitis C virus-monoinfected patients: a cohort study. *Ann Intern Med* 160:369–379
 36. Macias J, Berenguer J, Japon MA, Giron JA, Rivero A, Lopez-Cortes LF, Moreno A, Gonzalez-Serrano M, Iribarren JA, Ortega E et al (2009) Fast fibrosis progression between repeated liver biopsies in patients coinfected with human immunodeficiency virus/hepatitis C virus. *Hepatology* 50:1056–1063
 37. O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ (2010) Alcoholic liver disease. *Hepatology* 51:307–328
 38. Pham B, Stern A, Chen W, Sander B, John-Baptiste A, Thein HH, Gomes T, Wodchis WP, Bayoumi A, Machado M et al (2011) Preventing pressure ulcers in long-term care: a cost-effectiveness analysis. *Arch Intern Med* 171:1839–1847
 39. Soto-Rifo R, Limousin T, Rubilar PS, Ricci EP, Decimo D, Moncorge O, Traub MA, Andre P, Cimarelli A, Ohlmann T (2012) Different effects of the TAR structure on HIV-1 and HIV-2 genomic RNA translation. *Nucleic Acids Res* 40:2653–2667
 40. Castera L, Forns X, Alberti A (2008) Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol* 48:835–847
 41. Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, Darriet M, Couzigou P, De Ledinghen V (2005) Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 128:343–350
 42. Pineda-Tenor D, Berenguer J, Jimenez-Sousa MA, Guzman-Fulgencio M, Aldamiz-Echevarria T, Carrero A, Garcia-Alvarez M, Diez C, Tejerina F, Briz V, Resino S (2014) CXCL9, CXCL10 and CXCL11 polymorphisms are associated with sustained virologic response in HIV/HCV-coinfected patients. *J Clin Virol* 61:423–429
 43. Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR, Consortium GP (2015) A global reference for human genetic variation. *Nature* 526:68–74
 44. Hu S, Ghabril M, Amet T, Hu N, Byrd D, Yang K, Vuppalaanchi R, Saxena R, Desai M, Lan J et al (2014) HIV-1 coinfection profoundly alters intrahepatic chemokine but not inflammatory cytokine profiles in HCV-infected subjects. *PLoS ONE* 9:e86964
 45. Zeremski M, Petrovic LM, Chiriboga L, Brown QB, Yee HT, Kinkhabwala M, Jacobson IM, Dimova R, Markatou M, Talal AH (2008) Intrahepatic levels of CXCR3-associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 48:1440–1450
 46. Aidoo M, Terlouw DJ, Kolczak MS, McElroy PD, ter Kuile FO, Kariuki S, Nahlen BL, Lal AA, Udhayakumar V (2002) Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet* 359:1311–1312
 47. Bhattacharya A, Ziebarth JD, Cui Y (2014) PolymiRTS Database 3.0: linking polymorphisms in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways. *Nucleic Acids Res* 42:D86–D91
 48. Grubert F, Zaugg JB, Kasowski M, Ursu O, Spacek DV, Martin AR, Greenside P, Srivas R, Phanstiel DH, Pekowska A et al (2015) Genetic control of chromatin states in humans involves local and distal chromosomal interactions. *Cell* 162:1051–1065
 49. Guo L, Du Y, Qu S, Wang J (2016) rVarBase: an updated database for regulatory features of human variants. *Nucleic Acids Res* 44:D888–D893
 50. Zlotnik A, Yoshie O (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12:121–127
 51. Erdel M, Theurl M, Meyer M, Duba HC, Utermann G, Werner-Felmayer G (2001) High-resolution mapping of the human 4q21 and the mouse 5E3 SCYB chemokine cluster by fiber-fluorescence in situ hybridization. *Immunogenetics* 53:611–615

Submit your manuscript to a SpringerOpen® journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► springeropen.com

6.3 El polimorfismo *IL7RA* rs6897932 se asocia con la progresión de la fibrosis hepática en pacientes con hepatitis C crónica: diseño de medidas repetidas.

Jiménez-Sousa MA (‡), Gomez-Moreno AZ (‡), Pineda-Tenor D, Medrano LM, Sanchez-Ruano JJ, Fernández Rodríguez A, Artaza-Varasa T, Saura-Motalban J, Vazquez-Morón S, Ryan P, Resino S (*). The *IL7RA* rs6897932 polymorphism is associated with progression of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: repeated measurements design. **PLoS One**. 2018, En prensa. (‡), Contributed equally to this work.

RESUMEN

Objetivos: Determinar la influencia de polimorfismos genéticos de un solo nucleótido en el gen de la cadena α del receptor de la interleucina 7 (*IL7RA*) sobre la progresión de la fibrosis hepática en pacientes infectados por el VHC.

Métodos: Realizamos el estudio retrospectivo en 187 pacientes infectados por el VHC con una muestra de ADN disponible y con valores de rigidez hepática (LSM). Se genotiparon los polimorfismos de *IL7RA* rs6897932, rs987106 y rs3194051 utilizando la plataforma MassARRAY de Agena Bioscience y la tecnología iPLEX® Gold assay (CEGEN). La variable desenlace fue la rigidez hepática (LSM). Los puntos de corte utilizados fueron: <7,1 kPa (F0-F1), 7,1-9,4 kPa (F2, fibrosis significativa), 9,5-12,4 kPa (F3, fibrosis avanzada) y $\geq 12,5$ kPa (F4; cirrosis).

Resultados: La mediana del tiempo de seguimiento fue 47,9 meses. Los valores basales de LSM no mostraron diferencias significativas para los distintos genotipos de *IL7RA* ($p > 0.05$). En el análisis univariante, el alelo rs6897932 T tuvo una relación positiva con el aumento de LSM (ratio de la media aritmética (RMA)=1,21; $p=0.001$), progresión a fibrosis avanzada (F ≥ 3) (OR=2,51; $p=0.006$) y progresión a cirrosis (F4) (OR=2,71; $p=0.069$). En el análisis multivariante, el alelo rs6897932 T también se relacionó con un mayor aumento de LSM durante el seguimiento (RMA ajustada (aRMA)=1,27; $p < 0.001$) y mayor probabilidad de tener progresión a fibrosis avanzada (aOR=4,46; $p=0.001$), y a cirrosis (aOR=3,92; $p=0.015$). Respecto a los polimorfismos rs987106 and rs3194051, no obtuvimos resultados significativos excepto para la asociación entre rs987106 y el incremento de los valores de LSM (aOR=1,12; $p=0.015$).

Conclusiones: El polimorfismo *IL7RA* rs6897932 parece estar relacionado con un mayor riesgo de progresión de fibrosis hepática en pacientes infectados por el VHC. Por lo tanto, el polimorfismo rs6897932 podría estar relacionado con la fisiopatología de hepatitis crónica C y podría usarse para estratificar el riesgo de progresión de la fibrosis hepática.

RESEARCH ARTICLE

The *IL7RA* rs6897932 polymorphism is associated with progression of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: Repeated measurements design

María Ángeles Jiménez-Sousa¹*, Ana Zaida Gómez-Moreno²*, Daniel Pineda-Tenor³, Luz María Medrano¹, Juan José Sánchez-Ruano², Amanda Fernández-Rodríguez¹, Tomas Artaza-Varasa², José Saura-Montalbán⁴, Sonia Vázquez-Morón¹, Pablo Ryan^{5,6,7}, Salvador Resino¹*



1 Unidad de Infección Viral e Inmunidad, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Spain, **2** Servicio de Digestivo, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain, **3** Servicio de Laboratorio Clínico, Hospital Universitario de Fuenlabrada, Madrid, Spain, **4** Servicio de Laboratorio Clínico, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain, **5** Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario Infanta Leonor, Madrid, Spain, **6** Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid, Spain, **7** Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM), Madrid, Spain

* These authors contributed equally to this work.

* sresino@isciii.es

OPEN ACCESS

Citation: Jiménez-Sousa MÁ, Gómez-Moreno AZ, Pineda-Tenor D, Medrano LM, Sánchez-Ruano JJ, Fernández-Rodríguez A, et al. (2018) The *IL7RA* rs6897932 polymorphism is associated with progression of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: Repeated measurements design. PLoS ONE 13(5): e0197115. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197115>

Editor: Pavel Strnad, Medizinische Fakultät der RWTH Aachen, GERMANY

Received: February 1, 2018

Accepted: April 26, 2018

Published: May 9, 2018

Copyright: © 2018 Jiménez-Sousa et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work has been supported by grants given by Fondo de Investigación de Sanidad en España (FIS) [Spanish Health Funds for Research] [grant numbers PI14CIII/00011, PI15CIII/00024 and PT13/0001]. MAJS, LMM, and AFR are supported by “Instituto de Salud Carlos III” [grant

Abstract

The polymorphisms at the α -chain of the IL-7 receptor (*IL7RA*) have been related to T-cell homeostasis and development and may contribute to immune system deregulation. In the present study, we analyzed the association between *IL7RA* polymorphisms and the progression of liver fibrosis in patients infected with HCV. We carried out a retrospective study with a design consisting of repeated measurements in 187 HCV-infected patients, to study the risk prediction of liver fibrosis progression using genetic factors. We genotyped the rs6897932, rs987106 and rs3194051 *IL7RA* polymorphisms using the Agena Bioscience’s MassARRAY. Transient elastography was used to measure liver stiffness. The used cut-offs were: <7.1 kPa (F0-F1), 7.1–9.4 kPa (F2; significant fibrosis), 9.5–12.4 kPa (F3; advanced fibrosis), and ≥ 12.5 kPa (F4; cirrhosis). All HCV genotypes were analyzed. The median of follow-up time was 47.9 months. Baseline liver stiffness measurement (LSM) values did not show significant statistical differences for *IL7RA* genotypes ($p > 0.05$). In univariate analysis, the rs6897932 T allele had a positive relationship with an increase in LSM (arithmetic mean ratio (AMR) = 1.21 (95%CI = 1.08; 1.36); $p = 0.001$), progression to advanced fibrosis ($F \geq 3$) (odds ratio (OR) = 2.51 (95%CI = 1.29; 4.88); $p = 0.006$) and progression to cirrhosis (F4) (OR = 2.71 (95%CI = 0.94; 5.03); $p = 0.069$). In multivariable analysis, the rs6897932 T allele was related to a higher increase of LSM values during follow-up (adjusted AMR = 1.27 (95%CI = 1.13; 1.42); $p < 0.001$) and higher odds of progression to advanced fibrosis [adjusted OR = 4.46 (95%CI = 1.87; 10.62); $p = 0.001$], and progression to cirrhosis [adjusted OR = 3.92 (95%CI = 1.30; 11.77); $p = 0.015$]. Regarding *IL7RA* rs987106 and rs3194051 polymorphisms, we did not find significant results except for the relationship between *IL7RA* rs987106 and the increase in LSM values [adjusted OR = 1.12

numbers CD13/00013, CD14/00002 and CP14/0010].

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

(95%CI = 1.02; 1.23); $p = 0.015$]. The *IL7RA* rs6897932 polymorphism seems to be related to increased risk of liver fibrosis progression in HCV-infected patients. Thus, the rs6897932 polymorphism could be related to the physiopathology of CHC and might be used to successfully stratify the risk of CHC progression.

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection results in chronic hepatitis C (CHC) in about 80% of the subjects exposed. HCV infection is related to the development of liver fibrosis, cirrhosis and end-stage liver disease [1–3], and is a major cause for liver transplantation [4,5]. However, CHC progression presents a great deal of variability, from reduced rates of liver fibrosis progression to massive fibrosis and cirrhosis in a short time [6]. The clinical management of CHC patients depends on the disease stage [7], since patients with cirrhosis have a shorter median survival time than those without cirrhosis [6]. Thus, the appropriate identification of patients at risk of liver fibrosis progression and cirrhosis is essential to take preventive measures that may affect the course of CHC [8]. In this regard, transient elastography may accurately predict the presence of fibrosis/cirrhosis in patients with CHC [9]. However, the recent introduction of direct-acting antivirals (DAAs) has revolutionized HCV treatment with sustained virological response rates greater than 90% [10]. HCV eradication has been associated with a reduction in the risk of liver-related events such as hepatic decompensation, hepatocellular carcinoma and death due to liver disease [11]. However, patients with fibrosis bridges (F3) or cirrhosis (F4), despite the eradication of HCV, remain at risk of progression of the disease and of hepatocellular carcinoma at least 8–10 years after the virological cure [12,13].

Interleukin-7 (IL-7) plays a role in homeostasis and development of T cells [14]. IL-7 is also a critical factor in T-cell-mediated antiviral response [15]. The IL-7 receptor is made up of a heterodimer consisting of the α -chain of the IL-7 receptor (IL7RA or CD127) and the gamma chain of the common cytokine receptor (CD132) [14]. In this way, HCV clearance is related to the early expression of IL7RA on HCV-specific T cells during the acute phase of HCV infection [16]. Additionally, IL-7 released by hepatocytes during HCV infection eventually leads to viral clearance [17]. Moreover, IL-7 and IL7RA levels decrease during CHC, which leads to impaired reactivity of HCV-specific cytotoxic T cells [18,19].

IL7RA polymorphisms have been related to the homeostasis and development of T-cells, so they may contribute to the deregulation of the immune system [20,21]. Furthermore, *IL7RA* polymorphisms are related to autoimmune diseases [22,23] and CD4+ T cell recovery in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients on antiretroviral therapy [24–26]. Among HCV-infected patients, *IL7RA* polymorphisms have been associated with the response to peg-interferon (IFN)- α /ribavirin therapy against HCV and severe liver fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients [27,28].

We aimed to analyze the relationship between *IL7RA* polymorphisms and the progression of liver fibrosis in patients infected with HCV in a study with repeated measurements.

Materials and methods

Study population

We performed a retrospective cohort study (repeated measurements design) in 187 HCV-infected patients in the Hospital Virgen de la Salud (Toledo, Spain) between 2008 and 2015.

This study was developed according to the ethical principles of the 1975 Declaration of Helsinki. The study was approved by the Institutional Review Board of the Instituto de Salud Carlos III (“Comités de Ética de la Investigación y Bienestar Animal”– 04/04/2013). Patients included in this study signed a written informed consent. This study has been reported in accordance with the FibroSTARD guidelines.

We considered as inclusion criteria: 1) detectable HCV RNA in plasma during follow-up; 2) data availability of liver stiffness measurement (LSM) for a range of at least 12 months; 3) availability of a DNA sample. The exclusion criteria were: 1) advanced fibrosis or cirrhosis at baseline (F3 or F4; $LSM \geq 9.5$); 2) co-infection with hepatitis B virus or HIV; 3) autoimmune liver disease such as primary biliary cholangitis and autoimmune hepatitis.

From around 1500 HCV-infected patients attended to at the Hospital Virgen de la Salud (Toledo, Spain), we had 608 blood samples available from May 2013 to May 2015. Of them, 92 patients were discarded due to incomplete clinical data, leaving 516 patient samples that were sent for DNA genotyping. These 516 patients constitute our study cohort for this and future studies. Of them, 77 patients were discarded due to unavailable LSM data, 178 patients due to unavailable LSM2 data at least 12 months after baseline LSM, 37 patients for being responders to HCV treatment before the last LSM, and 37 patients because the baseline LSM was ≥ 9.5 (Fig 1).

Clinical data

Medical records were used to obtain clinical and epidemiological data. We considered a high alcohol intake to be levels above 60 grams/day for men and above 20 grams/day for women, which has been described as a risk factor for the development of cirrhosis [29]. Time since HCV diagnosis was defined as the time between HCV diagnosis and the first LSM (LSM1, the baseline of study).

The management of the patients during follow-up was conventional. For this reason, HCV therapy could be used before or after the inclusion into the study, following the recommendations of clinical guidelines [30,31]. However, we only included those patients who were non-responders from patients undergoing HCV treatment. In the case of patients who achieved a sustained virological response (SVR), their follow-ups were truncated at the time of HCV therapy initiation, because elimination of HCV may cause the regression of liver fibrosis and cirrhosis [32]. The time of follow-up was the time between the first LSM (LSM1) and the last LSM (LSM2, the end of study). The administrative censoring date was March 31, 2016.

Genotyping of *IL7RA* polymorphisms

Three single nucleotide polymorphisms (SNPs) located at the *IL7RA* gene [rs987106 (intronic region), rs6897932 (exon 6) and rs3194051 (exon 8)] were evaluated in all patients who met the inclusion criteria regardless of LSM value. Our group has previously analyzed these polymorphisms in HIV-coinfected patients in two recent papers [27,28]. These *IL7RA* polymorphisms are located at a putative regulatory region, but their effects still are unclear. Their minor allelic frequencies were greater than 20% in white Europeans.

QIASymphony DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used to extract DNA from 200 μ l of peripheral blood. The Spanish National Genotyping Center (CeGen; <http://www.cegen.org/>) genotyped the samples by Agena Bioscience’s MassARRAY platform (San Diego, CA, USA) using the iPLEX® Gold assay design system.

The 1000 Genomes Project website (<http://www.1000genomes.org/home>) were used to obtain the frequencies of alleles and genotypes represented in the general population. This database contains a broad representation of common human genetic variation from multiple

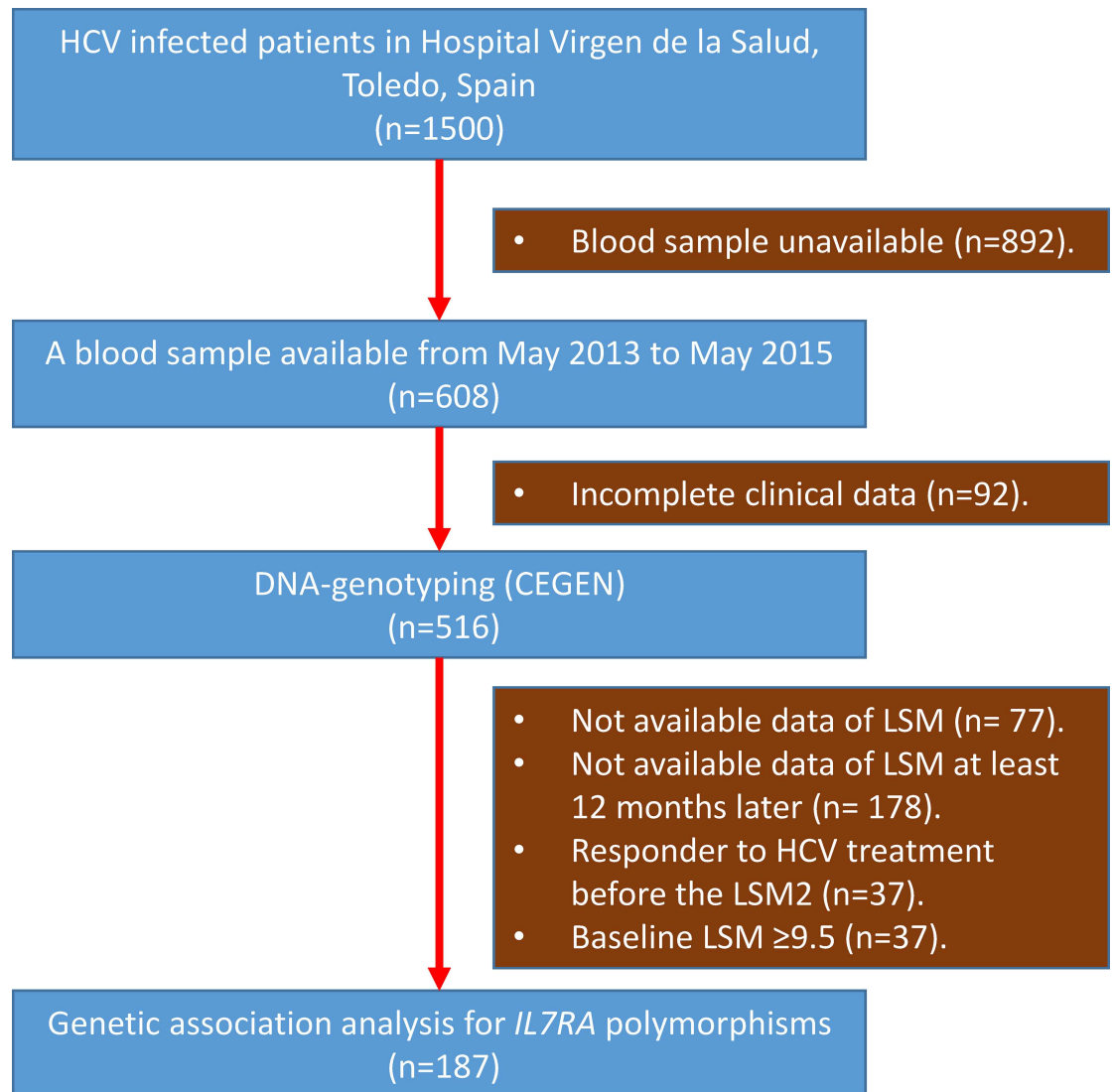


Fig 1. Flow chart of patients included in the genetic association analysis for *IL7RA* polymorphisms. Abbreviations: HCV, hepatitis C virus; *IL7RA*, gene of α -chain of the IL-7 receptor; LSM, liver stiffness measurement (LSM).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197115.g001>

populations [33], including the Iberian population in Spain (IBS) and Utah residents with Northern and Western European ancestry (CEU), which were included in the study as a comparative control.

Liver stiffness measurement

One trained hepatologist evaluated liver stiffness using a single machine of transient elastography (FibroScan®, Echosens, Paris, France). The results were expressed in kilopascals (kPa), with a range of 2.5 to 75 kPa [34]. We considered the measurements appropriate when the interquartile-range-to-median ratio for at least ten successful measurements was lower than 0.30. All LSM measurements were performed with at least four hours of fasting. Advanced obese patients were not included in this study because we did not have access to an XL probe, and the M probe was used in all cases. The cut-offs used were: <7.1 kPa (F0-F1), 7.1–9.4 kPa

(F2; significant fibrosis), 9.5–12.4 kPa (F3; advanced fibrosis), and ≥ 12.5 kPa (F4; cirrhosis) [35]. In this regard, many LSM cut-offs have been reported recently for stratifying patients according to liver fibrosis. However, we used the LSM cut-offs described by Castera et al (2005) [35], because these have been validated by a large number of scientific articles and have been recently endorsed by the American Gastroenterological Association [36].

Outcome variable

The primary outcome variable was the change in LSM values during follow-up (continuous variable). We calculated the LSM variation between the last LSM (LSM2) and the first LSM (LSM1) during follow-up (ratio LSM2/LSM1). Furthermore, we evaluated the progression to advanced fibrosis, which is a dichotomous variable that may have values of +1 [if $F \leq 2$ (F0, F1 or F2) changes to $F \geq 3$ (F3 or F4)] or 0 [if $F \leq 2$ (F0, F1 or F2) remains]. The progression to cirrhosis may also have values of +1 [if $F \leq 2$ (F0, F1, or F2) changes to F4] or 0 (if $F \leq 2$ (F0, F1 or F2) remains).

Statistical analysis

We evaluated the genetic association according to dominant, recessive and additive models of inheritance. The best model was chosen according to the goodness of fit evaluated by Akaike information criterion (AIC) value and Bayesian information criterion (BIC).

The Chi-square test or Fisher's exact test (categorical variables) and Mann-Whitney U test (continuous variables) were used to evaluate the differences between *IL7RA* genotypes. The genetic association of *IL7RA* polymorphisms with the outcome variables was evaluated using a Generalized Linear Model (GLM). When we analyzed continuous variables, a GLM with a gamma distribution (log-link) was employed. This test provides the differences between groups and the arithmetic mean ratio (AMR) that indicates the ratio by which the arithmetic mean of the original outcome should be multiplied. In this way, a GLM with a binomial distribution (logit-link) was employed to investigate dichotomous outcome variables (progression to $F \geq 3$ and progression to F4). This test provides the odds ratio (OR) for dichotomous outcome variables. Each multivariable analysis was adjusted by the most significant co-variables associated with each one of the outcome variables, avoiding the over-fitting of the model. At each step, covariables were considered for removal with a p-value for exit greater than 0.50. The factors used were age, gender, diabetes, time since HCV diagnosis, HCV genotype, injection drug use (IDU), high alcohol intake, HCV antiviral therapy before baseline and during follow-up (patients who failed therapy), the baseline of LSM, and the time of follow-up. Although IDU does not have a direct association with liver fibrosis progression, we included IDU as a covariable because these subjects generally have a worse lifestyle, which can negatively affect the progression of liver disease [36].

The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 21.0 software (IBM Corp., Chicago, USA) was used to perform the statistical tests. Haploview 4.2 software was used to evaluate the pairwise linkage disequilibrium (LD). The frequencies of haplotypes were estimated considering the Expectation-Maximization algorithm. PLINK software (<http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>) was used to analyze the association between haplotypes and fibrosis progression. All p-values were two-tailed and statistical significance was defined as $p < 0.05$.

Results

Study population

The baseline characteristics of 187 HCV-infected patients are summarized in [Table 1](#).

Table 1. Clinical and epidemiological characteristics of HCV-infected patients.

Characteristic	All Patients
No.	187
Male sex	102 (54.5%)
Age (years)	46.4 (40.9; 55.8)
Time of HCV infection (years)	7.5 (2.9; 12.9)
High alcohol intake	25 (13.4%)
Prior injection drug use	20 (10.7%)
HCV genotype (n = 184)	
1	154 (83.7%)
3	14 (7.6%)
4	15 (8.2%)
5	1 (0.5%)
Prior peg-IFN- α /RBV therapy failed	42 (22.5%)
Baseline LSM (kPa)	6.1 (5.3; 8.4)
F0-F1 (<7.1 kPa)	149 (79.7%)
F2 (7.1–9.4 kPa)	38 (20.3%)
Follow-up time (months)	47.9 (29.2; 62.7)
Final LSM (kPa)	6.7 (5.3; 8.6)
F0-F1 (<7.1 kPa)	108 (57.8%)
F2 (7.1–9.4 kPa)	47 (25.1%)
F3 (9.5–12.4 kPa)	15 (8.0%)
F4 (\geq 12.5 kPa)	17 (9.1%)

Values expressed as absolute numbers (%) and median (percentile 25; percentile 75). High alcohol intake was considered as levels above 60 grams/day for men and above 20 grams/day for women.

Abbreviations: Abbreviations: HCV, hepatitis C virus; LSM, liver stiffness measurement; kPa, kilopascal; IFN, interferon; peg-IFN- α /RBV, peg-interferon-alpha/ribavirin.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197115.t001>

We observed that 38 patients presented significant fibrosis (LSM \geq 7.1 kPa). Male patients made up 54.5% of the total, and the median age was 46.4 years, with a high intake of alcohol rate of 13.4%. Nearly eleven percent of patients were prior injection drug users, 83.7% were infected with HCV genotype 1, and 22.5% had previously failed antiviral therapy (peg-IFN- α /ribavirin). The median LSM in the baseline was 6.1 kPa and the follow-up time was 47.9 months.

Characteristics of IL7RA polymorphisms

The IL7RA polymorphisms showed a strong linkage disequilibrium (LD) (non-random association of alleles at different loci) ($D' = 1.0$). Nevertheless, the r-square among SNPs was low (r-square < 0.40) (Fig 2).

The allelic and genotypic frequencies of the IL7RA polymorphisms are shown in Table 2. These frequencies were compared to those for healthy subjects extracted from the 1000 genomes database, and no significant differences between groups were found. All SNPs had a minimum allele frequency > 5% and were in Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$). We did not obtain any missing value for any IL7RA polymorphisms.

IL7RA polymorphisms and liver fibrosis progression

Baseline LSM values did not show significant differences among IL7RA genotypes ($p > 0.05$). We only obtained significant results for the IL7RA rs6897932 polymorphism. Additionally, the additive model was the one that best fit our data.

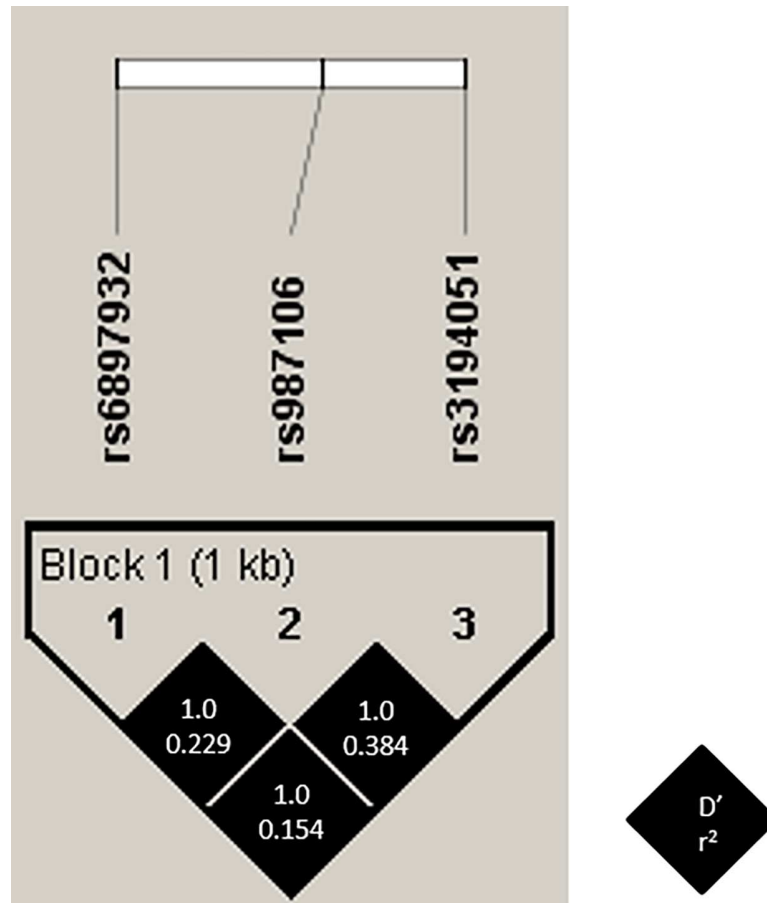


Fig 2. Pairwise linkage disequilibrium (LD) pattern for *IL7RA* polymorphisms. Each diagonal represents a different SNP, with each square representing a pairwise comparison between two SNPs.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197115.g002>

Table 2. Summary of Hardy Weinberg Equilibrium and frequencies of alleles and genotypes for *IL7RA* polymorphisms in HCV-infected patients compared to Iberian populations in Spain (IBS) and Utah residents with Northern and Western European ancestry (CEU) from 1000 genomes project data (<http://browser.1000genomes.org/index.html>).

SNPs	HCV group (n = 187)					IBS group (n = 107)					χ^2 test(a)	χ^2 test (b)	CEU group (n = 99)					χ^2 test(a)	χ^2 test (b)
	HWE	Alleles		Genotypes		HWE	Alleles		Genotypes		p-value	p-value	HWE	Alleles		Genotypes		p-value	p-value
rs6897932	0.216	C	76.7%	CC	56.7%	0.551	C	74.8%	CC	57.0%	0.714	0.225	0.507	C	75.8%	CC	58.6%	0.865	0.255
		T	23.3%	CT	40.1%		T	25.2%	CT	35.5%				T	24.2%	CT	34.3%		
				TT	3.2%				TT	7.5%						TT	7.1%		
rs987106	0.605	A	43.0%	AA	19.8%	0.308	A	49.5%	AA	27.1%	0.283	0.308	0.456	A	42.4%	AA	16.2%	0.922	0.592
		T	57.0%	AT	46.5%		T	50.5%	AT	44.9%				T	57.6%	AT	52.5%		
				TT	33.7%				TT	28.0%						TT	31.3%		
rs3194051	0.255	A	66.3%	AA	46.5%	0.937	A	74.8%	AA	56.1%	0.130	0.100	0.646	A	66.7%	AA	43.4%	0.946	0.446
		G	33.7%	AG	39.6%		G	25.2%	AG	37.4%				G	33.3%	AG	46.5%		
				GG	13.9%				GG	6.5%						GG	10.1%		

Statistical: p-values were calculated by Chi-squared test; (a), differences between allele frequencies; (b), differences between genotype frequencies.

Abbreviations: HWE, Hardy Weinberg Equilibrium; HCV, hepatitis C virus; IL7RA, α -chain of the interleukin 7 receptor.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197115.t002>

In univariate analysis, the rs6897932 T allele had a significant positive relationship with an increase in LSM values (AMR = 1.21 (95%CI = 1.08; 1.36); $p = 0.001$; Fig 3A1), progression to advanced fibrosis (OR = 2.51 (95%CI = 1.29; 4.88); $p = 0.006$; Fig 3B1) and progression to cirrhosis (OR = 2.71 (95%CI = 0.94; 5.03); $p = 0.069$; Fig 3C1). These trends are maintained in the multivariable analysis adjusted by the main clinical and epidemiological covariates (Fig 3D1). The rs6897932 T allele was related to a higher increase in LSM values during follow-up (adjusted AMR = 1.27 (95%CI = 1.13; 1.42); $p < 0.001$), and higher odds of progression to advanced fibrosis [adjusted OR = 4.46 (95%CI = 1.87; 10.62); $p = 0.001$], and progression to cirrhosis [adjusted OR = 3.92 (95%CI = 1.30; 11.77); $p = 0.015$] (Fig 3D1).

In analysis of the IL7RA rs987106 and rs3194051 polymorphisms, we did not find significant results except for the relationship between IL7RA rs987106 and the increase in LSM values [adjusted OR = 1.12 (95%CI = 1.02; 1.23); $p = 0.015$] (Fig 3D2). In addition, S1 Fig shows data for all IL7RA polymorphisms according to recessive and dominant models.

Discussion

In this study, we stratified our HCV-infected patients by IL7RA genotypes, and we evaluated the progression of liver fibrosis, which constitutes a critical element of the management of

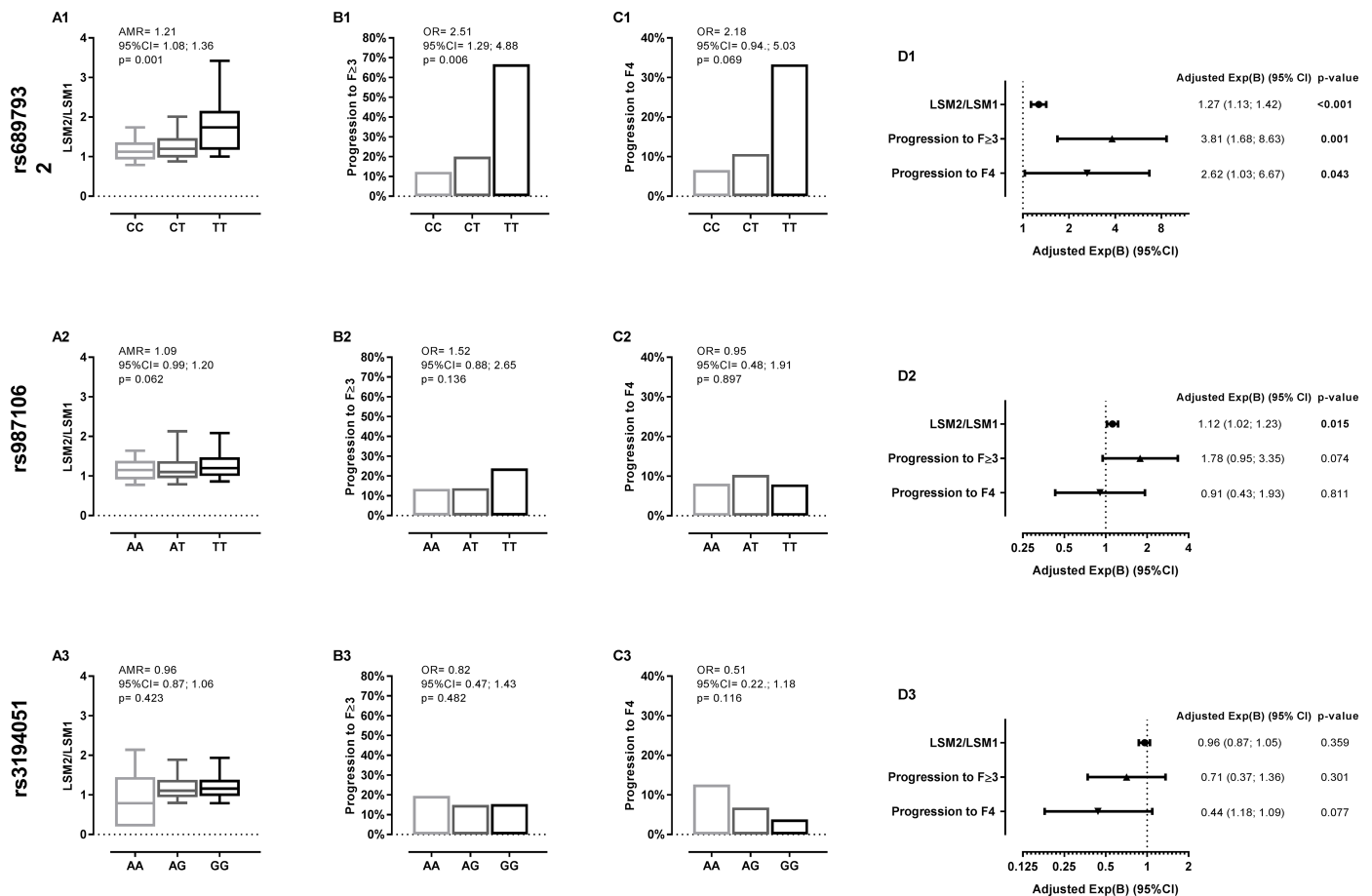


Fig 3. Summary of the relationship between IL7RA polymorphisms and variation of liver stiffness measurements (LSM) and fibrosis stages in HCV-infected patients with an additive inheritance model. Statistical: p-values were calculated by univariate and multivariable regression adjusted by the most important clinical and epidemiological characteristics (see statistical analysis section). Significant differences are shown in bold. **Abbreviations:** LSM, liver stiffness measure; kPa, kilopascal; LSM1, baseline LSM; LSM2, final LSM; Exp(B), arithmetic mean ratio (AMR) for continuous variable and odds ratio (OR) for categorical variables; 95%CI, 95% of confidence interval; p-value, level of significance; F_{≥3}, advanced fibrosis; F₄, cirrhosis; IL7RA, α -chain of the interleukin 7 receptor.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197115.g003>

patients with CHC by providing a useful prognostic tool and helping in treatment decisions [7,37]. The major finding of our study was that the rs6897932 T allele was associated with a higher risk of liver fibrosis progression in HCV-infected patients. However, in our study rs987106 showed a weaker association with liver disease progression and rs3194051 showed none. We must emphasize that in addition to the additive model we also found a significant association with liver fibrosis progression when we used the recessive and dominant models, but with a slightly lower statistical significance. To our knowledge, this is the first article that relates *IL7RA* polymorphisms with liver fibrosis progression in HCV-monoinfected patients. Additionally, our study has a longitudinal design of repeated measurements with a follow-up over a prolonged period of time. This dynamic design is more valid for detecting changes at the individual level, which is a novel aspect of our results in comparison with previous findings.

The *IL7RA* rs6897932 polymorphism constitutes a replacement of a threonine by an isoleucine in the *IL7RA* (also called CD127) transmembrane domain. This fact could affect the levels of the soluble *IL7RA* isoform (s*IL7RA*) and membrane-bound *IL7RA* isoform by putatively disrupting an exonic splicing motif [22]. The rs6897932 T allele, in contrast to the rs6897932 C allele, has been associated with lower plasma levels of s*IL7RA* [22,38–40], without limiting the effect of circulating IL-7 [39,41]. By contrast, the rs6897932 C allele has been related to elevated plasma concentrations of s*IL7RA* [22,38–40], which is able to bind to circulating IL-7 and reduce the bioavailability of IL-7, limiting its effects [39,41]. Moreover, it has been described that the “TT” genotype has increased signal transduction and proliferation in response to IL-7 among HIV-infected individuals [42]. This fact may explain the positive effect of the rs6897932 T allele on CD4+ T cell recovery in HIV-infected patients on antiretroviral therapy [24,25,40]. In our study, patients with the rs6897932 T allele had a higher risk of liver fibrosis progression during follow-up. Therefore, it would be plausible that the rs6897932 T allele, versus C allele, may confer lower levels of s*IL7RA*, higher IL-7 bioavailability [41] and higher immune response against HCV infection [17]. Thus, it may lead to a greater destruction of hepatocytes and liver injury, which favors the progression of liver fibrosis during CHC [43].

Moreover, in a previous cross-sectional study, we observed that both rs987106 and rs3194051 polymorphisms were associated with advanced fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients [28]. However, in the current study, we found a weak association between rs987106 and liver disease progression and none for rs3194051 polymorphism. The discrepancy observed for these two SNPs may be due to multiple reasons, among which we should highlight the study design (cross-sectional vs. longitudinal) and the type of patients included (HIV/HCV-coinfected vs. HCV-monoinfected). Moreover, in our study, a high LD was observed, but the r-square among SNPs was low (r-square<0.40), meaning that the *IL7RA* polymorphisms provide different information and cannot be substituted one for the other, supporting the differential association observed among SNPs in this study.

From now going forward with the new DAAs to treat HCV infection, all HCV-infected patients will be treated in the short or medium term, resulting in a virological cure for 90–95% of them. However, it has recently been reported that disease progression and the incidence of hepatocellular carcinoma have both increased in patients who achieved SVR [44–47]. Under this new context, further studies will be needed to investigate whether the association between the rs6897932 T allele and fibrosis progression is maintained after SVR, which could shed light on the importance of the *IL7RA* polymorphism on the clinical evolution of patients with HCV clearance.

This study has several limitations that must be considered. Firstly, we used a retrospective design that included patients who came to the hospital and had a sufficient follow-up. However, the repeated measurements design provides robustness to this study. Secondly, the

number of samples was small and the reduced number of patients with some *IL7RA* genotypes may have made the detection of associations more difficult, as well as, the accuracy of the risk estimation. Therefore, independent replication studies with a larger sample size, including different ethnic groups, may be necessary. Thirdly, we did not have access to plasma specimens, so the concentration in plasma was missing for both IL-7 and sIL7RA. Fourthly, we performed the analysis on European patients only, and studies would benefit if they were performed on different ethnic groups. Fifthly, around 23% of patients were previously treated with IFN therapy, but they maintained the HCV infection. This treatment failure does not affect the natural course of CHC during long-term follow up [48,49], so these non-responders were not excluded. Moreover, we did not find any significant effect of IFN-failed therapy on the statistical analysis of liver fibrosis progression. Sixthly, we could not study the association between *IL7RA* polymorphisms and hepatocellular carcinoma because only a few patients developed hepatocellular carcinoma in our cohort. Additionally, we did not have enough data of some relevant clinical variables (e.g., HCV viral load, ALT levels), which were therefore not considered in the multivariable analysis. Finally, regarding multiple testing, there is a considerable controversy about adjusting the “p-value” in clinical-orientated studies^{24,25}. In our case, we were not literally doing a random search for a meaningful result because we have a hypothesis supported by theory and previous articles that have shown relationships of *IL7RA* polymorphisms to viral infection outcomes [24–26], including HCV infection [27,28]. Thus, our results should not be affected by carrying out a high number of statistical tests.

Conclusions

In conclusion, the *IL7RA* rs6897932 polymorphism seems to be related to increased risk of liver fibrosis progression in HCV-infected patients. Thus, the rs6897932 polymorphism could play a crucial role in the physiopathology of CHC and could be used to stratify the risk of CHC progression.

Supporting information

S1 Fig. Summary of the relationship between *IL7RA* polymorphisms and variation of liver stiffness measurements (LSM) and fibrosis stages in HCV-infected patients with recessive and dominant inheritance model. Statistical: p-values were calculated by multivariable regression adjusted by the most important clinical and epidemiological characteristics (see statistical analysis section). Significant differences are shown in bold.

Abbreviations: LSM, liver stiffness measure; LSM1, baseline LSM; LSM2, final LSM; Exp(B), arithmetic mean ratio (AMR) for continuous variable and odds ratio (OR) for categorical variables; 95%CI, 95% of confidence interval; p-value, level of significance; $F \geq 3$, advanced fibrosis; F4, cirrhosis; *IL7RA*, α -chain of the interleukin 7 receptor. (TIF)

Acknowledgments

The authors thank the Spanish National Genotyping Center (CEGEN-PRB2-ISCIII) for providing SNP genotyping services (<http://www.cegen.org>).

Author Contributions

Conceptualization: María Ángeles Jiménez-Sousa, Ana Zaida Gómez-Moreno.

Data curation: Ana Zaida Gómez-Moreno, Daniel Pineda-Tenor, Luz Maria Medrano, Juan José Sánchez-Ruano, Tomas Artaza-Varasa, José Saura-Montalbán, Sonia Vázquez-Morón.

Formal analysis: María Ángeles Jiménez-Sousa, Daniel Pineda-Tenor, Luz Maria Medrano, Salvador Resino.

Investigation: María Ángeles Jiménez-Sousa, Ana Zaida Gómez-Moreno, Daniel Pineda-Tenor, Juan José Sánchez-Ruano, Amanda Fernández-Rodríguez.

Resources: María Ángeles Jiménez-Sousa.

Supervision: Salvador Resino.

Writing – original draft: María Ángeles Jiménez-Sousa, Ana Zaida Gómez-Moreno, Salvador Resino.

Writing – review & editing: Daniel Pineda-Tenor, Luz Maria Medrano, Amanda Fernández-Rodríguez, Tomas Artaza-Varasa, Pablo Ryan.

References

1. Ghany MG, Kleiner DE, Alter H, Doo E, Khokar F, Promrat K, et al. (2003) Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 124: 97–104. <https://doi.org/10.1053/gast.2003.50018> PMID: [12512034](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12512034/)
2. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ (2005) Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 5: 558–567. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70216-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70216-4) PMID: [16122679](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16122679/)
3. Asrani SK, Larson JJ, Yawn B, Therneau TM, Kim WR (2013) Underestimation of liver-related mortality in the United States. *Gastroenterology* 145: 375–382 e371–372. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.04.005> PMID: [23583430](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23583430/)
4. Razavi H, ElKhoury AC, Elbasha E, Estes C, Pasini K, Poynard T, et al. (2013) Chronic Hepatitis C Virus (HCV) Disease Burden and Cost in the United States. *Hepatology (Baltimore, Md)* 57: 2164–2170.
5. Adam R, Karam V, Delvart V, O'Grady J, Mirza D, Klempnauer J, et al. (2012) Evolution of indications and results of liver transplantation in Europe. A report from the European Liver Transplant Registry (ELTR). *J Hepatol* 57: 675–688. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.04.015> PMID: [22609307](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22609307/)
6. Westbrook RH, Dusheiko G (2014) Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* 61: S58–68. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.07.012> PMID: [25443346](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25443346/)
7. (2015) EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. *J Hepatol* 63: 199–236. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.03.025> PMID: [25911336](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25911336/)
8. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK (2014) Liver cirrhosis. *Lancet* 383: 1749–1761. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60121-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60121-5) PMID: [24480518](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24480518/)
9. Castera L (2015) Noninvasive Assessment of Liver Fibrosis. *Dig Dis* 33: 498–503. <https://doi.org/10.1159/000374097> PMID: [26159265](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26159265/)
10. Liang TJ, Ghany MG (2014) Therapy of hepatitis C—back to the future. *N Engl J Med* 370: 2043–2047. <https://doi.org/10.1056/NEJMe1403619> PMID: [24795199](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24795199/)
11. Veldt BJ, Heathcote EJ, Wedemeyer H, Reichen J, Hofmann WP, Zeuzem S, et al. (2007) Sustained virologic response and clinical outcomes in patients with chronic hepatitis C and advanced fibrosis. *Ann Intern Med* 147: 677–684. PMID: [18025443](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18025443/)
12. Aleman S, Rahbin N, Weiland O, Davidsdottir L, Hedenstierna M, Rose N, et al. (2013) A risk for hepatocellular carcinoma persists long-term after sustained virologic response in patients with hepatitis C-associated liver cirrhosis. *Clin Infect Dis* 57: 230–236. <https://doi.org/10.1093/cid/cit234> PMID: [23616492](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23616492/)
13. Forner A, Reig M, Bruix J (2018) Hepatocellular carcinoma. *Lancet*.
14. Capitini CM, Chisti AA, Mackall CL (2009) Modulating T cell Homeostasis with IL-7: Preclinical and Clinical Studies. *Journal of internal medicine* 266: 141–153. PMID: [19623690](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19623690/)
15. Pellegrini M, Calzascia T, Toe JG, Preston SP, Lin AE, Elford AR, et al. (2011) IL-7 engages multiple mechanisms to overcome chronic viral infection and limit organ pathology. *Cell* 144: 601–613. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.011> PMID: [21295337](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21295337/)

16. Shin EC, Park SH, Nascimbeni M, Major M, Caggiari L, de Re V, et al. (2013) The frequency of CD127 (+) hepatitis C virus (HCV)-specific T cells but not the expression of exhaustion markers predicts the outcome of acute HCV infection. *J Virol* 87: 4772–4777. <https://doi.org/10.1128/JVI.03122-12> PMID: [23388706](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23388706/)
17. Hou L, Jie Z, Desai M, Liang Y, Soong L, Wang T, et al. (2013) Early IL-17 production by intrahepatic T cells is important for adaptive immune responses in viral hepatitis. *J Immunol* 190: 621–629. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201970> PMID: [23233727](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23233727/)
18. Larrubia JR, Lokhande MU, Garcia-Garzon S, Miquel J, Gonzalez-Praetorius A, Parra-Cid T, et al. (2013) Persistent hepatitis C virus (HCV) infection impairs HCV-specific cytotoxic T cell reactivity through Mcl-1/Bim imbalance due to CD127 down-regulation. *J Viral Hepat* 20: 85–94. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2012.01618.x> PMID: [23301543](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23301543/)
19. Larrea E, Riezu-Boj JI, Aldabe R, Guembe L, Echeverria I, Balasiddaiah A, et al. (2014) Dysregulation of interferon regulatory factors impairs the expression of immunostimulatory molecules in hepatitis C virus genotype 1-infected hepatocytes. *Gut* 63: 665–673. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-304377> PMID: [23787026](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23787026/)
20. Broux B, Hellings N, Venken K, Rummens JL, Hensen K, Van Wijmeersch B, et al. (2010) Haplotype 4 of the multiple sclerosis-associated interleukin-7 receptor alpha gene influences the frequency of recent thymic emigrants. *Genes Immun* 11: 326–333. <https://doi.org/10.1038/gene.2009.106> PMID: [20072142](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20072142/)
21. Jager J, Schulze C, Rosner S, Martin R (2013) IL7RA haplotype-associated alterations in cellular immune function and gene expression patterns in multiple sclerosis. *Genes Immun* 14: 453–461. <https://doi.org/10.1038/gene.2013.40> PMID: [23985573](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23985573/)
22. Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A, et al. (2007) Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat Genet* 39: 1083–1091. <https://doi.org/10.1038/ng2103> PMID: [17660817](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17660817/)
23. Santiago JL, Alizadeh BZ, Martinez A, Espino L, de la Calle H, Fernandez-Arquero M, et al. (2008) Study of the association between the CAPSL-IL7R locus and type 1 diabetes. *Diabetologia* 51: 1653–1658. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-1070-4> PMID: [18563381](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18563381/)
24. Guzman-Fulgencio M, Berenguer J, Jimenez-Sousa MA, Micheloud D, Garcia-Alvarez M, Bellon JM, et al. (2015) IL7RA polymorphisms predict the CD4+ recovery in HIV patients on cART. *Eur J Clin Invest* 45: 1192–1199. <https://doi.org/10.1111/eci.12539> PMID: [26402121](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26402121/)
25. Hartling HJ, Thorne LW, Erikstrup C, Harritshoj LH, Kronborg G, Pedersen C, et al. (2014) Polymorphism in interleukin-7 receptor alpha gene is associated with faster CD4(+) T-cell recovery after initiation of combination antiretroviral therapy. *AIDS* 28: 1739–1748. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000354> PMID: [24911352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24911352/)
26. Rajasuriar R, Booth D, Solomon A, Chua K, Spelman T, Gouillou M, et al. (2010) Biological determinants of immune reconstitution in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy: the role of interleukin 7 and interleukin 7 receptor alpha and microbial translocation. *J Infect Dis* 202: 1254–1264. <https://doi.org/10.1086/656369> PMID: [20812848](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20812848/)
27. Guzman-Fulgencio M, Berenguer J, Pineda-Tenor D, Jimenez-Sousa MA, Garcia-Alvarez M, Aldamiz-Echevarria T, et al. (2015) Association between IL7RA polymorphisms and the successful therapy against HCV in HIV/HCV-coinfected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34: 385–393. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2245-1> PMID: [25236396](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25236396/)
28. Guzman-Fulgencio M, Berenguer J, Jimenez-Sousa MA, Pineda-Tenor D, Aldamiz-Echevarria T, Garcia-Broncano P, et al. (2015) Association between IL7R polymorphisms and severe liver disease in HIV/HCV coinfecting patients: a cross-sectional study. *J Transl Med* 13: 206. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0577-y> PMID: [26123260](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26123260/)
29. O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ (2010) Alcoholic liver disease. *Hepatology* 51: 307–328. <https://doi.org/10.1002/hep.23258> PMID: [20034030](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20034030/)
30. Calvaruso V, Craxi A (2012) 2011 European Association of the Study of the Liver hepatitis C virus clinical practice guidelines. *Liver International* 32: 2–8.
31. (2014) EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 60: 392–420. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.11.003> PMID: [24331294](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24331294/)
32. Mallet V, Gilgenkrantz H, Serpaggi J, Verkarre V, Vallet-Pichard A, Fontaine H, et al. (2008) Brief communication: the relationship of regression of cirrhosis to outcome in chronic hepatitis C. *Ann Intern Med* 149: 399–403. PMID: [18794559](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18794559/)
33. Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, et al. (2015) A global reference for human genetic variation. *Nature* 526: 68–74. <https://doi.org/10.1038/nature15393> PMID: [26432245](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26432245/)

34. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, et al. (2003) Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 29: 1705–1713. PMID: [14698338](#)
35. Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, et al. (2005) Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 128: 343–350. PMID: [15685546](#)
36. Smith DJ, Combellick J, Jordan AE, Hagan H (2015) Hepatitis C virus (HCV) disease progression in people who inject drugs (PWID): A systematic review and meta-analysis. *Int J Drug Policy* 26: 911–921. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2015.07.004> PMID: [26298331](#)
37. Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, Castera L, Le Bail B, Adhoute X, et al. (2006) Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut* 55: 403–408. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.069153> PMID: [16020491](#)
38. Kreft KL, Verbraak E, Wierenga-Wolf AF, van Meurs M, Oostra BA, Laman JD, et al. (2012) Decreased systemic IL-7 and soluble IL-7Ralpha in multiple sclerosis patients. *Genes Immun* 13: 587–592. <https://doi.org/10.1038/gene.2012.34> PMID: [22914435](#)
39. Lundstrom W, Highfill S, Walsh ST, Beq S, Morse E, Kockum I, et al. (2013) Soluble IL7Ralpha potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E1761–1770. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222303110> PMID: [23610432](#)
40. Rajasuriar R, Booth DR, Gouillou M, Spelman T, James I, Solomon A, et al. (2012) The role of SNPs in the alpha-chain of the IL-7R gene in CD4+ T-cell recovery in HIV-infected African patients receiving suppressive cART. *Genes Immun* 13: 83–93. <https://doi.org/10.1038/gene.2011.65> PMID: [21938017](#)
41. Crawley AM, Faucher S, Angel JB (2010) Soluble IL-7R alpha (sCD127) inhibits IL-7 activity and is increased in HIV infection. *J Immunol* 184: 4679–4687. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903758> PMID: [20304824](#)
42. Hartling HJ, Ryder LP, Ullum H, Odum N, Nielsen SD (2017) Gene variation in IL-7 receptor (IL-7R) alpha affects IL-7R response in CD4+ T cells in HIV-infected individuals. *Sci Rep* 7: 42036. <https://doi.org/10.1038/srep42036> PMID: [28181541](#)
43. Shin EC, Sung PS, Park SH (2016) Immune responses and immunopathology in acute and chronic viral hepatitis. *Nat Rev Immunol* 16: 509–523. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.69> PMID: [27374637](#)
44. Conti F, Buonfiglioli F, Scuteri A, Crespi C, Bolondi L, Caraceni P, et al. (2016) Early occurrence and recurrence of hepatocellular carcinoma in HCV-related cirrhosis treated with direct-acting antivirals. *J Hepatol* 65: 727–733. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.06.015> PMID: [27349488](#)
45. van der Meer AJ, Feld JJ, Hofer H, Almasio PL, Calvaruso V, Fernandez-Rodriguez CM, et al. (2017) Risk of cirrhosis-related complications in patients with advanced fibrosis following hepatitis C virus eradication. *J Hepatol* 66: 485–493. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.10.017> PMID: [27780714](#)
46. Janjua NZ, Chong M, Kuo M, Woods R, Wong J, Yoshida EM, et al. (2017) Long-term effect of sustained virological response on hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C in Canada. *J Hepatol* 66: 504–513. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.10.028> PMID: [27818234](#)
47. Reig M, Marino Z, Perello C, Inarrairaegui M, Ribeiro A, Lens S, et al. (2016) Unexpected high rate of early tumor recurrence in patients with HCV-related HCC undergoing interferon-free therapy. *J Hepatol* 65: 719–726. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.04.008> PMID: [27084592](#)
48. Shiffman ML, Sterling RK, Contos M, Hubbard S, Long A, Luketic VA, et al. (2014) Long term changes in liver histology following treatment of chronic hepatitis C virus. *Ann Hepatol* 13: 340–349. PMID: [24927604](#)
49. Poynard T, Moussalli J, Munteanu M, Thabut D, Lebray P, Rudler M, et al. (2013) Slow regression of liver fibrosis presumed by repeated biomarkers after virological cure in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 59: 675–683. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.05.015> PMID: [23712051](#)

Discusión

7 Discusión

El manejo de los pacientes con hepatitis C depende de su etapa clínica, pues el tratamiento en estadios iniciales de fibrosis hepática difiere del manejo de pacientes con cirrosis compensada y descompensada (197). Por tanto, la estadificación de la fibrosis hepática es un elemento esencial en la atención de los pacientes con hepatitis crónica C, ya que proporciona datos de pronóstico útiles y facilita las decisiones de tratamiento (197, 198). La biopsia hepática es la prueba de referencia para diagnosticar y cuantificar la fibrosis hepática, pero este procedimiento está asociado a varios inconvenientes (90, 91). La medición de la rigidez hepática (LSM) mediante elastografía transitoria es un método no invasivo basado en observaciones de la elasticidad hepática, que puede predecir con precisión la presencia de fibrosis / cirrosis en pacientes con hepatitis crónica C (90, 91) .

Además, el impacto a largo plazo de la infección por el VHC es muy variable, desde cambios histológicos mínimos hasta fibrosis avanzada y cirrosis (2). De ahí la importancia del reconocimiento temprano, por un lado, de pacientes con alto riesgo de desarrollar descompensaciones hepáticas mediante técnicas no invasivas y por otro, de pacientes “fibrosadores rápidos”, es decir aquellos que evolucionarán en poco tiempo a fibrosis avanzada y cirrosis (78). En este sentido, aunque se han descrito una serie de factores epidemiológicos y clínicos que influyen en la progresión de la fibrosis hepática, aún no se conocen con detalle los diversos factores del huésped que influyen en la evolución de la enfermedad hepática. Existe una creciente evidencia de que los factores genéticos del huésped pueden desempeñar un papel importante en la progresión de la fibrosis hepática en los pacientes infectados por el VHC (26). La reciente aparición de técnicas de genotipado masivo ha permitido realizar estudios de asociación del genoma completo (GWAS), revelando varios genes implicados (26).

Realizamos un primer estudio que evaluó la asociación entre la rigidez hepática evaluada por elastografía de transición (FibroScan®) y el desarrollo de eventos hepáticos en pacientes con hepatitis crónica C. Posteriormente centramos nuestra investigación en la determinación de distintos SNPs relacionados con la respuesta inmune del huésped y los cuales podrían influir en la evolución de fibrosis hepática.

7.1 La medición de la elasticidad hepática predice el desarrollo de eventos hepáticos en pacientes con hepatitis crónica por VHC: un estudio retrospectivo.

La cirrosis hepática se caracteriza por una etapa compensada (fibrosis en estadio 4 con o sin várices esofágicas) seguida de una etapa descompensada, que puede implicar complicaciones (hemorragia varicosa, encefalopatía hepática, ascitis, peritonitis bacteriana espontánea y/o síndrome hepatorenal), carcinoma hepatocelular, trasplante de hígado y muerte relacionada con el hígado (197, 198). El manejo de los pacientes con hepatitis C depende de su estadio clínico (197), ya que los pacientes con cirrosis compensada tienen una mediana de supervivencia mucho más larga que aquellos con cirrosis descompensada (199). Por lo tanto, el reconocimiento precoz no invasivo de pacientes con hepatitis crónica C con alto riesgo de desarrollar eventos relacionados con el hígado es importante porque asegura que se puedan emplear estrategias óptimas de manejo preventivo que puedan afectar al curso de la hepatitis crónica C (78). Además, la RVS con terapia antiviral puede reducir las consecuencias clínicas de la hepatitis crónica C, pero los pacientes con cirrosis, a pesar de la erradicación del VHC, siguen en riesgo de progresión de la enfermedad (200).

Dada la importancia de determinar el riesgo de tener eventos hepáticos en el manejo de pacientes con hepatitis C, evaluamos si los valores de LSM podían predecir la ocurrencia de eventos hepáticos en pacientes con hepatitis C. En este primer artículo de esta Memoria, encontramos que los pacientes con valores más elevados de LSM tuvieron más riesgo de desarrollar eventos hepáticos. Esta asociación se mantuvo en pacientes cirróticos ($\geq 12,5$ kPa), donde los pacientes con ≥ 25 kPa tuvieron un mayor riesgo de desarrollar eventos hepáticos que los pacientes con < 25 kPa. Estos hallazgos pueden ser clínicamente relevantes, particularmente debido a que el uso de elastografía de transición en el manejo clínico de esta población está aumentando. Además, dado que recientemente se ha descrito que la progresión de la enfermedad y el riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular pueden continuar en pacientes que lograron RVS, principalmente en los subgrupos de fibrosis avanzada y cirrosis (129, 201-203), los resultados de esta Memoria también resaltan la importancia de monitorizar la rigidez

hepática en pacientes con hepatitis crónica C tras la RVS, principalmente en aquellos con fibrosis avanzada y cirrosis.

La asociación encontrada entre valores elevados de LSM y un mayor riesgo de desarrollar eventos hepáticos es consistente con otros estudios (204-206). En esta Memoria, observamos que tener valores altos de LSM, independientemente de otros factores epidemiológicos y clínicos relacionados con la gravedad de la enfermedad hepática, fue capaz de predecir el riesgo de desarrollar eventos hepáticos (descompensación hepática o carcinoma hepatocelular), de forma directamente proporcional. Cada incremento en una unidad de Ln de LSM se asoció con 14,76 veces más riesgo de tener eventos hepáticos en todos los pacientes y de 10,56 veces más en los pacientes cirróticos. Así, los pacientes con cirrosis ($\geq 12,5$ kPa) tuvieron un riesgo mayor de desarrollar eventos hepáticos, y dentro de este grupo, los pacientes con ≥ 25 kPa presentaron mayor riesgo comparado con los pacientes cirróticos con valores entre 12,5 - 24,9 kPa. Por tanto, los pacientes con $\geq 12,5$ kPa, y particularmente aquellos con > 25 kPa, se podrían beneficiar de un control más estrecho de las posibles complicaciones hepáticas. Por el contrario, los pacientes con $< 12,5$ kPa requerirían un seguimiento inferior debido al menor riesgo de complicaciones hepáticas durante los siguientes años.

El mayor riesgo de desarrollar eventos hepáticos según las categorías de rigidez hepática sugiere que la elastografía de transición ofrece más información que la proporcionada por la biopsia hepática para el manejo clínico de estos pacientes. Mientras que la cirrosis hepática está definida por una evidencia histológica estratificada en categorías cualitativas (ej.: METAVIR o Ishak), el rango dinámico de los valores de la elastografía de transición es mucho mayor (de 12,5 hasta 75 kPa en cirrosis), proporcionando un mayor rendimiento que la biopsia hepática para predecir complicaciones hepáticas (207, 208). En esta Memoria, los valores de elastografía de transición fueron bastante precisos para predecir el desarrollo de un primer evento hepático, ya que el valor del área bajo la curva (AUROC) fue superior a 0,85 para todos los pacientes y algo menor para pacientes cirróticos (AUROC=0,729), lo que respalda su excelente capacidad discriminadora. Nuestros datos de AUROC fueron similares o mejores que los publicados previamente por otros investigadores (205, 207, 208). Además, nuestros valores de sensibilidad (Se), especificidad (Es), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN)

fueron también similares a los reportados anteriormente por otros investigadores (205-208).

Los puntos de corte evaluados en esta Memoria mostraron valores de VPN superiores al 90%, por lo que constituyen una herramienta útil para excluir la aparición de eventos hepáticos. Sin embargo, los valores de VPP fueron de alrededor del 30%, inaceptable para descartar la aparición de eventos hepáticos. Por tanto, el valor práctico de los puntos de corte de elastografía de transición analizados en esta Memoria podría ser clínicamente relevante para evaluar la aparición de eventos hepáticos, ya que tendría muy pocos falsos negativos, pero también podría dar lugar a muchos falsos positivos que deberían ser sometidos a una evaluación más exhaustiva.

7.2 Los polimorfismos de CXCL9-11 se asocian con fibrosis hepática en pacientes con hepatitis crónica por VHC: un estudio transversal.

Los mecanismos patogénicos de la progresión acelerada de la lesión hepática no se conocen por completo; pero los SNPs, el perfil inflamatorio del hígado y la respuesta inmune deteriorada se consideran determinantes importantes de la evolución de la enfermedad hepática (26). En este contexto, la migración de células inflamatorias (monocitos/macrófagos, linfocitos T activados, NKs y células dendríticas) desde la periferia al parénquima hepático mediado por las quimioquinas constituye un evento importante para el desarrollo de la fibrosis hepática en respuesta a la infección por el VHC (209-211). Estas células pueden contribuir a la respuesta inmune del huésped contra el VHC, así como a la inflamación hepática y a la cascada de eventos que pueden conducir a la fibrogénesis y la consiguiente progresión de la enfermedad hepática (209-212).

Los ligandos de quimioquinas CXC (CXCL) 9 [monocina inducida por interferón γ (Mig)], CXCL10 [proteína-10 inducible por interferón- γ (IP-10)], y CXCL11 (quimiotáctico de células T inducible por interferón γ ; I-TAC) se producen en el hígado de pacientes infectados por hepatitis C. Esta respuesta induce la migración de células T activadas (respuesta T-helper/T-citotóxicas tipo 1 (Th1/Tc1)) desde la periferia al parénquima hepático infectado a través del receptor de quimioquinas CXCR3 (213). Se ha detectado un aumento de la expresión de CXCL9 en hepatocitos de pacientes infectados por el VHC, y una correlación entre los niveles de CXCL9 y la fibrosis hepática (214, 215). Sin

embargo, también se ha descrito un papel antifibrótico de CXCL9 (216-218). Además, el aumento de los niveles de CXCL10 se ha asociado con daño hepático en pacientes infectados con VHC (212, 214, 218-222). Los niveles de expresión de CXCL11 se han relacionado con inflamación portal y lobulillar, pero no se ha encontrado una relación clara con la enfermedad hepática en pacientes con hepatitis crónica C (209, 212, 214). Además, las quimioquinas CXCL9-11 se han correlacionado significativamente con el nivel de citocinas hepatoprotectoras, como IL6 e IL10, lo que sugiere su participación en una respuesta contrarreguladora durante la progresión de la enfermedad hepática (214).

Los polimorfismos *CXCL9-11* se han relacionado con la gravedad de diversas enfermedades infecciosas como las causadas por enterovirus-71 (223), hepatitis B (224, 225), malaria (226), enfermedad de Chagas (227), y tuberculosis (228).

No hay mucha información disponible sobre la relación entre los polimorfismos de *CXCL9-11* y la fibrosis hepática en hepatitis crónica C. Las variantes de *CXCL9* se han relacionado con la fibrosis hepática en ratones y humanos (218). El polimorfismo *CXCL10* rs1439490 (G-201A) se ha asociado con enfermedad hepática en pacientes infectados por el VHB (224). Nuestro grupo ha publicado una asociación entre los polimorfismos *CXCL9-11* y la enfermedad hepática en pacientes coinfectados por VIH/VHC (229). Estos pacientes tienen un sistema inmune dañado debido a la infección por VIH, lo que hace que la hepatitis C evolucione más agresivamente (230, 231). Sin embargo, hasta donde sabemos, no hay información con respecto a la relación entre los polimorfismos *CXCL9-11* y la enfermedad hepática en pacientes mono infectados por VHC.

En esta Memoria, se encontró que los polimorfismos de *CXCL9-11* se asociaron con los valores de la elastografía de transición y el estadio de fibrosis. La asociación más importante se encontró con el modelo de herencia sobredominante, en la cual los pacientes heterocigotos (*CXCL9* rs10336 AG, *CXCL10* rs3921 CG y *CXCL11* rs4619915 AG) tuvieron más probabilidad de tener valores bajos de LSM y menor estadio de fibrosis, especialmente para fibrosis significativa ($F \geq 2$, $LSM \geq 7,5$ kPa) y fibrosis hepática avanzada ($F \geq 3$, $LSM \geq 9,5$ kPa). Además, se encontró que el modelo de herencia recesivo también fue significativo porque los pacientes con genotipo *CXCL9* rs10336 AA, *CXCL10* rs3921 CC y *CXCL11* rs4619915 AA tuvieron más probabilidad de tener valores más elevados de LSM y un mayor estadio de fibrosis. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que

establece una relación entre polimorfismos de *CXCL9-11* y fibrosis hepática en pacientes mono infectados por VHC. Además, este trabajo confirma los hallazgos previos de nuestro grupo en pacientes coinfectados por VIH/VHC (229) lo que sugiere que los polimorfismos *CXCL9-11* pueden desempeñar un papel clave en el desarrollo de la fibrosis hepática durante la hepatitis crónica C.

En un artículo reciente publicado por nuestro grupo, los genotipos *CXCL9* rs10336 AA, *CXCL10* rs3921 CC y *CXCL11* rs4619915 AA se relacionaron con una mayor probabilidad de severidad de la fibrosis hepática en pacientes coinfectados por VIH/VHC bajo un modelo recesivo (229). En esta Memoria, los genotipos homocigotos para el alelo minoritario también mostraron un aumento de susceptibilidad a la enfermedad hepática bajo un modelo recesivo de herencia. Sin embargo, el modelo sobredominante fue el que mejor se ajustó a nuestros datos, ya que presentó valores más bajos de criterio de información de Akaike (AIC) y criterio de información Bayesiano (CIB). En el modelo sobredominante, la presencia de genotipos heterocigotos se relacionó con la protección de la gravedad de la enfermedad hepática (ventaja de heterocigotos), de forma similar a como sucede en la anemia de células falciformes en la que los sujetos homocigotos no tienen protección contra la malaria o tienen una gran propensión a la anemia; mientras que los sujetos heterocigotos tienen menos efectos fisiológicos y resistencia parcial a la malaria (232). Sin embargo, no tenemos datos para explicar el mecanismo por el cual ocurre esto.

Los tres SNPs de *CXCL9-11* analizados en esta Memoria se encuentran en la región 3'UTR de sus respectivos genes. 3'UTR es una región reguladora putativa, que podría ser el objetivo de miARNs. Estas moléculas son pequeños ARN no codificantes que regulan la expresión uniéndose a su sitio diana de ARNm. Por lo tanto, los polimorfismos en la región 3'UTR podrían crear, destruir o modificar la eficacia de la unión de miARNs a la región 3'UTR de un gen, lo que da como resultado la desregulación génica a nivel postranscripcional. Con el fin de investigar si los polimorfismos *CXCL9-11* podrían afectar los sitios diana de ARNm para miARNs, realizamos un análisis *in silico* utilizando el programa PolymiRTS Database 3.0 (233). Encontramos que el alelo *CXCL9* rs10336 A y *CXCL11* rs4619915 A generan dos sitios de unión de miARN para hsa-miR-4519 y hsa-miR-5089-3p, respectivamente, mientras que el alelo *CXCL9* rs10336 G y *CXCL11* rs4619915 G interrumpen estos sitios diana de miARNs. La falta de unión de estos

miARNs podría conducir a niveles más altos de CXCL9-11 y, en consecuencia, podría modular el efecto fibrótico de estas proteínas ya que los niveles séricos de CXCL9 se han relacionado con mayor gravedad de la fibrosis hepática (214). Además, los tres polimorfismos *CXCL9-11* parecen estar implicados en cambios en el estado de la cromatina en varias líneas celulares relacionadas con el sistema inmune, como pudo ser observado cuando se realizó un análisis in silico con rVarBase (234). La variación genética en los elementos reguladores podría coordinar los cambios en los estados cromáticos y en la expresión génica (235). Todos estos hallazgos apoyan la idea de que los polimorfismos *CXCL9-11* podrían afectar a la producción de los niveles de quimioquinas CXCL9-11. De hecho, los genotipos *CXCL9* rs10336 TT y *CXCL10* rs3921 GG también se han relacionado con una mayor expresión celular de CXCL9 y CXCL10 en otras enfermedades infecciosas, como la infección de Chagas, donde también se relacionaron con una mayor gravedad de la miocardiopatía chagásica crónica (227). En este sentido, nuestros datos están en línea con los datos de Nogueira y cols. (227) porque nuestros pacientes infectados por VHC con genotipos *CXCL9* rs10336 TT y *CXCL10* rs3921 GG (modelo de herencia recesivo) tuvieron valores más altos de LSM y estadios mayores de fibrosis, posiblemente debido a una producción mayor de estas quimioquinas que podría permitir el desarrollo y mantenimiento de la infiltración de células Th1 en el parénquima hepático. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que los genes *CXCL9*, *CXCL10* y *CXCL11* están agrupados en el cromosoma 4q21.2, dentro de un rango de 32 kb (236, 237), donde hay una gran cantidad de SNPs adicionales, que pueden estar estrechamente relacionados con los polimorfismos *CXCL9* rs10336, *CXCL10* rs3921 y *CXCL11* rs4619915 (236, 237). Por tanto, los polimorfismos rs10336, rs3921 y rs4619915 podrían ser funcionalmente responsables del efecto observado o podrían estar simplemente en alto desequilibrio de ligamiento con la mutación causal. Es decir, esta asociación que observamos podría deberse a la proximidad a otros SNPs que pueden modular la expresión de *CXCL9-11* o a un efecto directo de los polimorfismos *CXCL9-11* en la expresión de *CXCL9-11*. A este respecto, la determinación de los niveles o expresión de CXCL9-11 podrían ser muy útiles y convincentes para reforzar la hipótesis de que el efecto observado de los SNPs *CXCL9-11* tiene un efecto biológico, pero dicha información no estuvo disponible en esta Memoria.

También se analizó la asociación entre los haplotipos *CXCL9-11* y los estadios de fibrosis hepática, pero no se encontró ninguna asociación significativa. Esto puede ser debido a que la asociación de cada SNP con la fibrosis hepática es más fuerte bajo un modelo de herencia sobredominante, que supone que ambos alelos en heterocigosis tienen el mayor impacto sobre el fenotipo. Además, también se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos *CXCL9* rs10336, *CXCL10* rs3921 y *CXCL11* rs4619915 entre pacientes infectados por VHC y personas sanas de la población española, y no se encontraron diferencias significativas, lo que indica que nuestra cohorte no tenía ningún sesgo significativo con respecto a la distribución de polimorfismos *CXCL9-11*.

7.3 El polimorfismo *IL7RA* rs6897932 se asocia con la progresión de la fibrosis hepática en pacientes con hepatitis C crónica: diseño de medidas repetidas.

La interleucina 7 (IL-7) juega un papel en la homeostasis y el desarrollo de las células T (238), y es también un factor crítico en la respuesta antiviral mediada por células T (239). El receptor de IL-7 está formado por un heterodímero que consiste en la cadena α del receptor de IL-7 (*IL7RA* o CD127) y la cadena gamma del receptor común de citocina (CD132) (238). En la hepatitis C, la eliminación del VHC está relacionada con la expresión temprana de *IL7RA* en células T VHC-específicas durante la fase aguda de la infección (240). Además, la IL-7 liberada por los hepatocitos durante la infección por VHC conduce eventualmente a la eliminación del virus (241). Asimismo, los niveles de IL-7 e *IL7RA* disminuyen durante la fase crónica de la hepatitis C, lo que conduce a una reactividad alterada de las células T citotóxicas VHC-específicas (242, 243).

Los polimorfismos *IL7RA* se han relacionado con la homeostasis y el desarrollo de las células T, por lo que pueden contribuir a la desregulación del sistema inmune (244, 245). Además, los polimorfismos *IL7RA* están relacionados con enfermedades autoinmunes (246, 247) y la recuperación de células T CD4⁺ en pacientes infectados por el VIH con terapia antirretroviral (248-250). Entre los pacientes infectados por el VHC, los polimorfismos *IL7RA* se han asociado con la respuesta al tratamiento con peg-IFN α /RBV y con la fibrosis hepática severa en pacientes coinfectados con VIH/VHC (180, 251).

En esta Memoria, clasificamos a nuestros pacientes infectados por VHC por genotipos de *IL7RA*, y evaluamos la progresión de la fibrosis hepática. El principal hallazgo de nuestro estudio fue que el alelo rs6897932 T se asoció con un mayor riesgo de progresión de la fibrosis hepática en pacientes infectados por el VHC. Por otro lado, en nuestro análisis, rs987106 mostró una asociación más débil con la progresión de la enfermedad hepática y rs3194051 ninguna. Debemos enfatizar que, además del modelo aditivo, también encontramos una asociación significativa con la progresión de la fibrosis hepática cuando utilizamos los modelos recesivos y dominantes, pero con una significación estadística levemente menor. Hasta donde sabemos, este es el primer hallazgo que relaciona la asociación de polimorfismos de *IL7RA* con la progresión de la fibrosis hepática en pacientes mono infectados con VHC. Además, este estudio tiene un diseño longitudinal de medidas repetidas con un seguimiento durante un período de tiempo prolongado. Este diseño dinámico es más válido para detectar cambios a nivel individual, lo que supone una novedad de nuestros resultados en comparación con estudios previos.

El polimorfismo *IL7RA* rs6897932 promueve el reemplazo de una treonina por una isoleucina en el dominio transmembrana *IL7RA* (también llamado CD127). Este hecho podría afectar a los niveles de la isoforma de *IL7RA* soluble (s*IL7RA*) y la isoforma unida a la membrana (*IL7RA*) al alterar putativamente un punto de corte y empalme exónico (246). El alelo rs6897932 T se ha asociado con niveles plasmáticos más bajos de s*IL7RA* en comparación con el alelo rs6897932 C (246, 252-254), sin limitar el efecto de la IL-7 circulante (253, 255). Por el contrario, el alelo rs6897932 C se ha relacionado con concentraciones plasmáticas elevadas de s*IL7RA* (246, 252-254), pudiendo unirse a la IL-7 circulante y reduciendo la biodisponibilidad de IL-7, lo que limita sus efectos (253, 255). Además, se ha descrito que el genotipo TT en individuos infectados por VIH eleva la transducción de señales y la proliferación en respuesta a IL-7 (256). Este hecho puede explicar el efecto positivo del alelo rs6897932 T en la recuperación de células T CD4+ en pacientes infectados por VIH con terapia antirretroviral (248, 249, 254). En esta Memoria, los pacientes con el alelo rs6897932 T tuvieron un mayor riesgo de progresión de la fibrosis hepática durante el seguimiento. Por tanto, sería plausible que el alelo T, frente al alelo C, pueda conferir niveles más bajos de s*IL7RA*, una mayor

biodisponibilidad de IL-7 (255) y una mayor respuesta inmune contra la infección por VHC (241), la cual podría causar lesiones más severas en el hígado, favoreciendo la progresión de la fibrosis hepática durante la hepatitis crónica C (241).

En un estudio transversal realizado previamente, se observó que los polimorfismos rs987106 y rs3194051 se asociaron con fibrosis avanzada en pacientes coinfectados con VIH/VHC (180). Sin embargo, en esta Memoria, se encontró únicamente una asociación débil para rs987106 y ninguna para el polimorfismo rs3194051. La discrepancia observada en estos dos SNPs (rs987106 y rs3194051) puede deberse a múltiples razones, entre las cuales debemos destacar el diseño del estudio (transversal vs. longitudinal) y el tipo de pacientes incluidos (coinfectados VIH/VHC vs. mono infectados VHC). Además, en esta Memoria, se observó un alto desequilibrio de ligamiento, pero los valores de r^2 entre los SNPs fueron bajos ($r^2 < 0,40$), lo que significa que los polimorfismos de *IL7RA* proporcionan información diferente, de manera que la información proporcionada por un polimorfismo no puede ser sustituida por la información aportada por los otros, apoyando así la asociación diferencial observada entre los SNPs de *IL7RA* en esta Memoria.

En el escenario actual con los nuevos AAD para tratar la infección por VHC, todos los pacientes infectados con VHC serán tratados a corto/mediano plazo, lo que resulta en una curación virológica del 90-95%. Sin embargo, recientemente se ha descrito que la progresión de la enfermedad y el riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular pueden continuar en pacientes que lograron RVS, principalmente en los subgrupos de fibrosis avanzada y cirrosis (129, 201-203). En este nuevo contexto, se necesitarían más estudios para investigar si la asociación entre el alelo rs6897932 T y la progresión de la fibrosis se mantiene después de la RVS, lo que podría arrojar luz sobre la importancia del polimorfismo *IL7RA* en la evolución clínica de los pacientes que eliminan el VHC.

7.4 Limitaciones del estudio

Esta Memoria tiene una serie de limitaciones que deben tenerse en cuenta para la correcta interpretación de los datos y las conclusiones.

- 1) Se trata de estudios con un diseño retrospectivo, lo cual implica falta de uniformidad. Además, los pacientes se seleccionan de antemano entre los sujetos

que viven lo suficiente como para tener un seguimiento largo (posible sesgo de supervivencia).

- 2) El tamaño muestral es relativamente bajo y el número de eventos hepáticos registrados fue pequeño, lo que puede haber perjudicado la capacidad de detectar asociaciones menos robustas y la precisión de las estimaciones. Por tanto, serían necesarios estudios de replicación independientes con un tamaño de muestra más grande.
- 3) Alrededor del 20-25% de los pacientes se trataron previamente contra el VHC (antes del inicio del estudio) pero no eliminaron la infección por el VHC (no respondedores). El fracaso del tratamiento no afecta el curso natural de hepatitis crónica C durante el seguimiento a largo plazo (257, 258), por lo que estos no respondedores no fueron excluidos. Además, no encontramos ningún efecto significativo de la terapia fallida con IFN en el análisis estadístico de la progresión de la fibrosis hepática y el desarrollo de eventos hepáticos.
- 4) No se dispuso de suficientes datos de algunas variables clínicas relevantes (carga viral del VHC, niveles de ALT, entre otros), y no se consideraron para el análisis multivariable.
- 5) Dado que las frecuencias de los alelos varían entre las etnias, y este estudio se ha llevado a cabo completamente en europeos blancos infectados por el VHC, sería necesario realizar una replicación independiente de este trabajo para diferentes grupos étnicos.
- 6) El tiempo de infección por el VHC es uno de los factores más importantes que determina la evolución de la hepatitis crónica C, pero es difícil de determinar porque en muchos casos es desconocido por el propio paciente. En este sentido no tuvimos acceso a la fecha de infección por VHC en la mayoría de los pacientes y utilizamos el tiempo desde el diagnóstico de VHC, lo cual puede acumular un sesgo debido a la variabilidad en el tiempo desde el momento de la infección hasta el diagnóstico de la misma.
- 7) Con respecto a las pruebas múltiples, existe una considerable controversia sobre el ajuste del "valor p" en estudios clínicos orientados (248, 249). En esta Memoria, no se ha realizado una búsqueda aleatoria de un resultado significativo porque tenemos una hipótesis respaldada por la teoría y artículos previos que han relacionado los

polimorfismos de *IL7RA* y *CXCL9-11* con el resultado de infecciones virales, incluida la infección por VHC. Por lo tanto, nuestros resultados no deberían verse afectados por el hecho de llevar a cabo un alto número de pruebas estadísticas.

Conclusiones

8 Conclusiones

- 1) Los valores elevados en la determinación de fibrosis hepática por elastografía de transición se asocian con un incremento del riesgo de desarrollar eventos hepáticos en pacientes con hepatitis crónica C, particularmente entre los pacientes cirróticos ($\geq 12,5$ kPa), donde aquellos con ≥ 25 kPa presentaron mayor riesgo comparado con los pacientes cirróticos con valores entre 12,5 - 24,9 kPa.
- 2) Los puntos de corte de LSM evaluados podrían ser una herramienta útil para excluir la aparición de eventos hepáticos (VPN >90%), pero tienen baja utilidad clínica para predecir la aparición de eventos hepáticos (VPP \leq 30%). Así, se tendrían muy pocos falsos negativos, pero también podría dar lugar a muchos falsos positivos que deberían ser sometidos a una evaluación más exhaustiva.
- 3) Los polimorfismos de *CXCL9-11* se asociaron con los valores de la elastografía de transición y el estadio de fibrosis. Por un lado, la heterocigosis (*CXCL9* rs10336 AG, *CXCL10* rs3921 CG y *CXCL11* rs4619915 AG) se mostró como un factor protector (ventaja de heterocigotos); mientras que la homocigosis para el alelo minoritario (*CXCL9* rs10336 AA, *CXCL10* rs3921 CC y *CXCL11* rs4619915 AA) fue un factor de riesgo de tener fibrosis hepática.
- 4) Los polimorfismos de *IL7RA* también se relacionaron con cambios en los valores de la elastografía de transición y progresión en los estadios de fibrosis en pacientes infectados por el VHC, especialmente el alelo *IL7RA* rs6897932 T que se asoció con un mayor riesgo de progresión de la fibrosis hepática y de cirrosis. Por otro lado, *IL7RA* rs987106 mostró una asociación más débil con la progresión de la enfermedad hepática y *IL7RA* rs3194051 ninguna.
- 5) Esta Memoria confirma los hallazgos previos encontrados en pacientes coinfectados por VIH/VHC, lo que sugiere que los polimorfismos en *CXCL9-11* e *IL7RA* pueden desempeñar un papel clave en la fisiopatología de la fibrosis hepática en pacientes infectados por el VHC.

Bibliografía

9 Bibliografía

1. 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.
2. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *Journal of hepatology*. 2014;61(1 Suppl):S58-68.
3. Allison KM, Faddy HM, Margaritis A, Ismay S, Marks DC. The impact on blood donor screening for human immunodeficiency virus, hepatitis C virus, and hepatitis B virus using plasma from frozen-thawed plasma preparation tubes. *Transfusion*. 2016;56(2):449-56.
4. Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, et al. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nature medicine*. 1995;1(6):564-9.
5. Simons JN, Pilot-Matias TJ, Leary TP, Dawson GJ, Desai SM, Schlauder GG, et al. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(8):3401-5.
6. Llanes MS, Palacios NS, Piccione M, Ruiz MG, Layana C. [Molecular aspects of the antiviral response against hepatitis C virus implicated in vaccines development]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2015;33(4):273-80.
7. Moradpour D, Penin F, Rice C. Replication of Hepatitis C Virus 2007. 453-63 p.
8. Li YP, Gottwein JM, Scheel TK, Jensen TB, Bukh J. MicroRNA-122 antagonism against hepatitis C virus genotypes 1-6 and reduced efficacy by host RNA insertion or mutations in the HCV 5' UTR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(12):4991-6.
9. Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science*. 2010;327(5962):198-201.

10. Friebe P, Bartenschlager R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *Journal of virology*. 2002;76(11):5326-38.
11. Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS letters*. 2003;535(1-3):34-8.
12. Cook GA, Opella SJ. NMR studies of p7 protein from hepatitis C virus. *European biophysics journal : EBJ*. 2010;39(7):1097-104.
13. Jirasko V, Montserret R, Appel N, Janvier A, Eustachi L, Brohm C, et al. Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(42):28546-62.
14. Jirasko V, Montserret R, Lee JY, Gouttenoire J, Moradpour D, Penin F, et al. Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS pathogens*. 2010;6(12):e1001233.
15. Popescu CI, Callens N, Trinel D, Roingeard P, Moradpour D, Descamps V, et al. NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS pathogens*. 2011;7(2):e1001278.
16. Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *Journal of virology*. 2002;76(12):5974-84.
17. Lohmann V, Roos A, Korner F, Koch JO, Bartenschlager R. Biochemical and structural analysis of the NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. *Journal of viral hepatitis*. 2000;7(3):167-74.
18. Dahari H, Feliu A, Garcia-Retortillo M, Fornis X, Neumann AU. Second hepatitis C replication compartment indicated by viral dynamics during liver transplantation. *Journal of hepatology*. 2005;42(4):491-8.

19. Ramirez S, Perez-Del-Pulgar S, Carrion JA, Costa J, Gonzalez P, Massague A, et al. Hepatitis C virus compartmentalization and infection recurrence after liver transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2009;9(7):1591-601.
20. Goutagny N, Fatmi A, De Ledinghen V, Penin F, Couzigou P, Inchauspe G, et al. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *The Journal of infectious diseases*. 2003;187(12):1951-8.
21. Forton DM, Karayiannis P, Mahmud N, Taylor-Robinson SD, Thomas HC. Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants. *Journal of virology*. 2004;78(10):5170-83.
22. Koutsoudakis G, Fornis X, Perez-Del-Pulgar S. [The molecular biology of hepatitis C virus]. *Gastroenterologia y hepatologia*. 2013;36(4):280-93.
23. Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*. 2007;446(7137):801-5.
24. Diedrich G. How does hepatitis C virus enter cells? *The FEBS journal*. 2006;273(17):3871-85.
25. Horner SM. Activation and evasion of antiviral innate immunity by hepatitis C virus. *J Mol Biol*. 2014;426(6):1198-209.
26. Heim MH, Bochud PY, George J. Host - hepatitis C viral interactions: The role of genetics. *Journal of hepatology*. 2016;65(1 Suppl):S22-32.
27. Xu Y, Zhong J. Innate immunity against hepatitis C virus. *Curr Opin Immunol*. 2016;42:98-104.
28. Oo YH, Adams DH. The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *Journal of autoimmunity*. 2010;34(1):45-54.

29. Hartling HJ, Ballegaard VC, Nielsen NS, Gaardbo JC, Nielsen SD. Immune regulation in chronic hepatitis C virus infection. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2016;51(11):1387-97.
30. Ward S, Lauer G, Isba R, Walker B, Klenerman P. Cellular immune responses against hepatitis C virus: the evidence base 2002. *Clinical and experimental immunology*. 2002;128(2):195-203.
31. Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han JH, Hanson HL, Ghayeb J, et al. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science*. 2003;302(5645):659-62.
32. Heim MH, Thimme R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *Journal of hepatology*. 2014;61(1 Suppl):S14-25.
33. Crispe IN. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(1):51-62.
34. Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *The New England journal of medicine*. 1993;328(25):1828-35.
35. Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2011;17(2):107-15.
36. Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, McQuillan GM, Kuhnert WL, Alter MJ. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Annals of internal medicine*. 2006;144(10):705-14.
37. Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2009;29 Suppl 1:74-81.
38. Hofstraat SHI, Falla AM, Duffell EF, HahnÉ SJM, Amato-Gauci AJ, Veldhuijzen IK, et al. Current prevalence of chronic hepatitis B and C virus infection in the general

population, blood donors and pregnant women in the EU/EEA: a systematic review. *Epidemiology and infection*. 2017;145(14):2873-85.

39. Bruggmann P, Berg T, Ovrehus AL, Moreno C, Brandao Mello CE, Roudot-Thoraval F, et al. Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in selected countries. *Journal of viral hepatitis*. 2014;21 Suppl 1:5-33.

40. Kim WR. The burden of hepatitis C in the United States. *Hepatology*. 2002;36(5 Suppl 1):S30-4.

41. Esteban JI, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *Journal of hepatology*. 2008;48(1):148-62.

42. Manns MP, Buti M, Gane E, Pawlotsky JM, Razavi H, Terrault N, et al. Hepatitis C virus infection. *Nature reviews Disease primers*. 2017;3:17006.

43. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine*. 2001;345(1):41-52.

44. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *The Lancet Infectious diseases*. 2005;5(9):558-67.

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

46. Ferri C, Ramos-Casals M, Zignego AL, Arcaini L, Roccatello D, Antonelli A, et al. International diagnostic guidelines for patients with HCV-related extrahepatic manifestations. A multidisciplinary expert statement. *Autoimmunity reviews*. 2016;15(12):1145-60.

47. Younossi Z, Park H, Henry L, Adeyemi A, Stepanova M. Extrahepatic Manifestations of Hepatitis C: A Meta-analysis of Prevalence, Quality of Life, and Economic Burden. *Gastroenterology*. 2016;150(7):1599-608.

48. Ponziani FR, Mangiola F, Binda C, Zocco MA, Siciliano M, Grieco A, et al. Future of liver disease in the era of direct acting antivirals for the treatment of hepatitis C. *World journal of hepatology*. 2017;9(7):352-67.
49. Chigurupati P, Murthy KS. Automated nucleic acid amplification testing in blood banks: An additional layer of blood safety. *Asian journal of transfusion science*. 2015;9(1):9-11.
50. Fornis X, Martinez-Bauer E, Feliu A, Garcia-Retortillo M, Martin M, Gay E, et al. Nosocomial transmission of HCV in the liver unit of a tertiary care center. *Hepatology*. 2005;41(1):115-22.
51. Bronowicki JP, Venard V, Botte C, Monhoven N, Gastin I, Chone L, et al. Patient-to-patient transmission of hepatitis C virus during colonoscopy. *The New England journal of medicine*. 1997;337(4):237-40.
52. Katsoulidou A, Paraskevis D, Kalapothaki V, Arvanitis D, Karayiannis P, Hadjiconstantiou V, et al. Molecular epidemiology of a hepatitis C virus outbreak in a haemodialysis unit. *Multicentre Haemodialysis Cohort Study on Viral Hepatitis. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 1999;14(5):1188-94.
53. Ross RS, Viazov S, Khudyakov YE, Xia GL, Lin Y, Holzmann H, et al. Transmission of hepatitis C virus in an orthopedic hospital ward. *Journal of medical virology*. 2009;81(2):249-57.
54. Thurston RS. Acute hepatitis C virus and cardiac surgeons. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2009;137(3):519-20.
55. Salazar-Vizcaya L, Kouyos RD, Zahnd C, Wandeler G, Battegay M, Darling KE, et al. Hepatitis C virus transmission among human immunodeficiency virus-infected men who have sex with men: Modeling the effect of behavioral and treatment interventions. *Hepatology*. 2016;64(6):1856-69.

56. Solis Sanchez G, Suarez Gonzalez A, Otero Guerra L, Viejo de la Guerra G, de la Iglesia Martinez P, Menendez Garcia MT. [Transmission of hepatitis C virus in pregnant women]. *Medicina clinica*. 2003;120(1):10-3.
57. Papaevangelou V, Pollack H, Rochford G, Kokka R, Hou Z, Chernoff D, et al. Increased transmission of vertical hepatitis C virus (HCV) infection to human immunodeficiency virus (HIV)-infected infants of HIV- and HCV-coinfected women. *The Journal of infectious diseases*. 1998;178(4):1047-52.
58. Dusheiko G, Simmonds P. Sequence variability of hepatitis C virus and its clinical relevance. *Journal of viral hepatitis*. 1994;1(1):3-15.
59. Colina R, Casane D, Vasquez S, Garcia-Aguirre L, Chunga A, Romero H, et al. Evidence of intratypic recombination in natural populations of hepatitis C virus. *The Journal of general virology*. 2004;85(Pt 1):31-7.
60. Garcia-Retortillo M, Fornis X. [Genomic variability and natural history of hepatitis C virus infection]. *Gastroenterologia y hepatologia*. 2002;25(8):514-20.
61. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *The Journal of general virology*. 2004;85(Pt 11):3173-88.
62. Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2013;10(9):553-62.
63. Panel AIHCVG. Hepatitis C guidance: AASLD-IDS recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus. *Hepatology*. 2015;62(3):932-54.
64. Chevaliez S, Pawlotsky J-M. Diagnosis and management of chronic viral hepatitis: Antigens, antibodies and viral genomes. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2008;22(6):1031-48.
65. Ticehurst JR, Hamzeh FM, Thomas DL. Factors affecting serum concentrations of hepatitis C virus (HCV) RNA in HCV genotype 1-infected patients with chronic hepatitis. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(8):2426-33.

66. Pawlotsky J-M, Negro F, Aghemo A, Berenguer M, Dalgard O, Dusheiko G, et al. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. *Journal of hepatology*. 2018.
67. Chevaliez S, Soulier A, Poiteau L, Bouvier-Alias M, Pawlotsky J-M. Clinical utility of hepatitis C virus core antigen quantification in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Clinical Virology*. 2014;61(1):145-8.
68. Bulteel N, Partha Sarathy P, Forrest E, Stanley AJ, Innes H, Mills PR, et al. Factors associated with spontaneous clearance of chronic hepatitis C virus infection. *Journal of hepatology*. 2016;65(2):266-72.
69. Gvinjilia L. National progress toward hepatitis C elimination—Georgia, 2015–2016. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2016;65.
70. Scalioni Lde P, Cruz HM, de Paula VS, Miguel JC, Marques VA, Villela-Nogueira CA, et al. Performance of rapid hepatitis C virus antibody assays among high- and low-risk populations. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2014;60(3):200-5.
71. Vazquez-Moron S, Ryan P, Ardizzone-Jimenez B, Martin D, Troya J, Cuevas G, et al. Evaluation of dried blood spot samples for screening of hepatitis C and human immunodeficiency virus in a real-world setting. *Scientific reports*. 2018;8(1):1858.
72. Jimenez-Sousa MA, Fernandez-Rodriguez A, Guzman-Fulgencio M, Garcia-Alvarez M, Resino S. Meta-analysis: implications of interleukin-28B polymorphisms in spontaneous and treatment-related clearance for patients with hepatitis C. *BMC medicine*. 2013;11:6.
73. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*. 2009;461(7265):798-801.
74. Wang CC, Krantz E, Klarquist J, Krows M, McBride L, Scott EP, et al. Acute hepatitis C in a contemporary US cohort: modes of acquisition and factors influencing viral clearance. *The Journal of infectious diseases*. 2007;196(10):1474-82.

75. Mangia A, Santoro R, Copetti M, Massari M, Piazzolla V, Spada E, et al. Treatment optimization and prediction of HCV clearance in patients with acute HCV infection. *Journal of hepatology*. 2013;59(2):221-8.
76. Tong MJ, el-Farra NS, Reikes AR, Co RL. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *The New England journal of medicine*. 1995;332(22):1463-6.
77. Wiese M, Berr F, Lafrenz M, Porst H, Oesen U. Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C (genotype 1b) single-source outbreak in germany: a 20-year multicenter study. *Hepatology*. 2000;32(1):91-6.
78. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2014;383(9930):1749-61.
79. Koyama Y, Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2017;127(1):55-64.
80. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(2):209-18.
81. Meneghin A, Hogaboam CM. Infectious disease, the innate immune response, and fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(3):530-8.
82. Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(3):539-48.
83. Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *Journal of hepatology*. 2003;38 Suppl 1:S38-53.
84. 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.
85. 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.

86. Ortiz V, Berenguer M, Rayon JM, Carrasco D, Berenguer J. Contribution of obesity to hepatitis C-related fibrosis progression. *The American journal of gastroenterology*. 2002;97(9):2408-14.

87. Westin J, Nordlinder H, Lagging M, Norkrans G, Wejstal R. Steatosis accelerates fibrosis development over time in hepatitis C virus genotype 3 infected patients. *Journal of hepatology*. 2002;37(6):837-42.

88. Poynard T, Mathurin P, Lai CL, Guyader D, Poupon R, Tainturier MH, et al. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *Journal of hepatology*. 2003;38(3):257-65.

89. de Torres M, Poynard T. Risk factors for liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Annals of hepatology*. 2003;2(1):5-11.

90. Resino S, Sanchez-Conde M, Berenguer J. Coinfection by human immunodeficiency virus and hepatitis C virus: noninvasive assessment and staging of fibrosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2012;25(5):564-9.

91. Castera L. Noninvasive Assessment of Liver Fibrosis. *Dig Dis*. 2015;33(4):498-503.

92. Powell EE, Jonsson JR, Clouston AD. Steatosis: co-factor in other liver diseases. *Hepatology*. 2005;42(1):5-13.

93. Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *Journal of hepatology*. 1991;13(3):372-4.

94. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of hepatology*. 1995;22(6):696-9.

95. 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.

96. Fabio Leonel Gil Parada RdPLP. Guías de diagnóstico y tratamiento de hepatitis C. *Rev Col Gastroenterol* 2012;27(4):5.
97. Palacios Perez A, Salmeron Escobar J. [Role of liver biopsy in the diagnosis and management of chronic hepatitis C]. *Gastroenterología y hepatología*. 2007;30(7):402-7.
98. Alados-Arboledas JC, Lopez-Prieto MD, Lopez-Cepero J. [Role of the new Architect HCV Ag(R) assay in the management of hepatitis C naive patients]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2013;31(5):351-2.
99. Castera L, Forns X, Alberti A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *Journal of hepatology*. 2008;48(5):835-47.
100. Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, et al. 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. Garcia-Tsao G, Abraldes JG, Berzigotti A, Bosch J. Portal hypertensive bleeding in cirrhosis: Risk stratification, diagnosis, and management: 2016 practice guidance by the American Association for the study of liver diseases. *Hepatology*. 2017;65(1):310-35.
102. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *Journal of hepatology*. 2015;63(1):237-64.
103. Myers RP, Pomier-Layrargues G, Kirsch R, Pollett A, Duarte-Rojo A, Wong D, et al. Feasibility and diagnostic performance of the FibroScan XL probe for liver stiffness measurement in overweight and obese patients. *Hepatology*. 2012;55(1):199-208.
104. de Ledinghen V, Wong VW, Vergniol J, Wong GL, Foucher J, Chu SH, et al. Diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement: comparison between M and XL probe of FibroScan(R). *Journal of hepatology*. 2012;56(4):833-9.
105. Crespo G, Forns X, Navasa M. [Serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C infection. Prognostic value of noninvasive markers of fibrosis in liver transplantation]. *Gastroenterología y hepatología*. 2012;35 Suppl 2:17-22.

106. Mehta G, Gustot T, Mookerjee RP, Garcia-Pagan JC, Fallon MB, Shah VH, et al. Inflammation and portal hypertension - the undiscovered country. *Journal of hepatology*. 2014;61(1):155-63.
107. Bosch J, Abraldes JG, Albillos A, Aracil C, Banares R, Berzigotti A, et al. [Portal hypertension: recommendations for evaluation and treatment: consensus document sponsored by the Spanish Association for the Study of the Liver (AEEH) and the Biomedical Research Network Center for Liver and Digestive Diseases(CIBERehd)]. *Gastroenterología y hepatología*. 2012;35(6):421-50.
108. Gines P, Quintero E, Arroyo V, Teres J, Bruguera M, Rimola A, et al. Compensated cirrhosis: natural history and prognostic factors. *Hepatology*. 1987;7(1):122-8.
109. Ripoll C, Groszmann R, Garcia-Tsao G, Grace N, Burroughs A, Planas R, et al. Hepatic venous pressure gradient predicts clinical decompensation in patients with compensated cirrhosis. *Gastroenterology*. 2007;133(2):481-8.
110. Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Rodes J. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology*. 1988;8(5):1151-7.
111. Moore CM, Van Thiel DH. Cirrhotic ascites review: Pathophysiology, diagnosis and management. *World journal of hepatology*. 2013;5(5):251-63.
112. Runyon BA. Management of adult patients with ascites due to cirrhosis. *Hepatology*. 2004;39(3):841-56.
113. EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *Journal of hepatology*. 2010;53(3):397-417.
114. Kaplan PW, Rossetti AO. EEG patterns and imaging correlations in encephalopathy: encephalopathy part II. *Journal of clinical neurophysiology : official publication of the American Electroencephalographic Society*. 2011;28(3):233-51.

115. Vilstrup H, Amodio P, Bajaj J, Cordoba J, Ferenci P, Mullen KD, et al. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver. *Hepatology*. 2014;60(2):715-35.
116. Garcia-Tsao G, Sanyal AJ, Grace ND, Carey W. Prevention and management of gastroesophageal varices and variceal hemorrhage in cirrhosis. *Hepatology*. 2007;46(3):922-38.
117. Costaguta A, Alvarez F. [Portal hypertension in pediatrics. I: pathophysiology and clinical aspects]. *Archivos argentinos de pediatría*. 2010;108(3):239-42.
118. Lucey MR, Brown KA, Everson GT, Fung JJ, Gish R, Keeffe EB, et al. Minimal criteria for placement of adults on the liver transplant waiting list: a report of a national conference organized by the American Society of Transplant Physicians and the American Association for the Study of Liver Diseases. *Liver transplantation and surgery : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 1997;3(6):628-37.
119. Christensen E, Schlichting P, Fauerholdt L, Gluud C, Andersen PK, Juhl E, et al. Prognostic value of Child-Turcotte criteria in medically treated cirrhosis. *Hepatology*. 1984;4(3):430-5.
120. Kamath PS, Kim WR. The model for end-stage liver disease (MELD). *Hepatology*. 2007;45(3):797-805.
121. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2012;142(6):1264-73 e1.
122. Torres HA, Vauthey J-N, Economides MP, Mahale P, Kaseb A. Hepatocellular carcinoma recurrence after treatment with direct-acting antivirals: First, do no harm by withdrawing treatment. *Journal of hepatology*. 65(4):862-4.

123. Forner A, Reig M, Varela M, Burrel M, Feliu J, Briceño J, et al. Diagnóstico y tratamiento del carcinoma hepatocelular. Actualización del documento de consenso de la AEEH, SEOM, SERAM, SERVEI y SETH. *Medicina clinica*. 2016;146(11):511.e1-.e22.
124. Arguedas MR, Chen VK, Eloubeidi MA, Fallon MB. Screening for hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C cirrhosis: a cost-utility analysis. *The American journal of gastroenterology*. 2003;98(3):679-90.
125. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: An update. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2011;53(3):1020-2.
126. Forner A, Reig M, Varela M, Burrel M, Feliu J, Briceno J, et al. [Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Update consensus document from the AEEH, SEOM, SERAM, SERVEI and SETH]. *Medicina clinica*. 2016;146(11):511 e1- e22.
127. Conti F, Buonfiglioli F, Scuteri A, Crespi C, Bolondi L, Caraceni P, et al. Early occurrence and recurrence of hepatocellular carcinoma in HCV-related cirrhosis treated with direct-acting antivirals. *Journal of hepatology*. 2016;65(4):727-33.
128. Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2018;391(10127):1301-14.
129. Reig M, Marino Z, Perello C, Inarrairaegui M, Ribeiro A, Lens S, et al. Unexpected high rate of early tumor recurrence in patients with HCV-related HCC undergoing interferon-free therapy. *Journal of hepatology*. 2016;65(4):719-26.
130. Lack of evidence of an effect of direct-acting antivirals on the recurrence of hepatocellular carcinoma: Data from three ANRS cohorts. *Journal of hepatology*. 2016;65(4):734-40.
131. Cacoub P, Comarmond C, Domont F, Savey L, Desbois AC, Saadoun D. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C virus infection. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*. 2016;3(1):3-14.

132. Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB, Rustgi V, Di Bisceglie A, Peters M, et al. Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *The New England journal of medicine*. 1986;315(25):1575-8.
133. Davis GL, Balart LA, Schiff ER, Lindsay K, Bodenheimer HC, Jr., Perrillo RP, et al. Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa. A multicenter randomized, controlled trial. *The New England journal of medicine*. 1989;321(22):1501-6.
134. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, et al. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT)*. *Lancet*. 1998;352(9138):1426-32.
135. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatitis Interventional Therapy Group*. *The New England journal of medicine*. 1998;339(21):1485-92.
136. Glue P, Fang JW, Rouzier-Panis R, Raffanel C, Sabo R, Gupta SK, et al. Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. *Hepatitis C Intervention Therapy Group*. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2000;68(5):556-67.
137. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Jr., et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine*. 2002;347(13):975-82.
138. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *Journal of hepatology*. 2011;55(2):245-64.
139. Coppola N, Pisaturo M, Sagnelli C, Sagnelli E, Angelillo IF. Peg-interferon plus ribavirin with or without boceprevir or telaprevir for HCV genotype 1: a meta-analysis on the role of response predictors. *PloS one*. 2014;9(4):e94542.

140. Muir AJ, Poordad FF, McHutchison JG, Shiffman ML, Berg T, Ferenci P, et al. Retreatment with telaprevir combination therapy in hepatitis C patients with well-characterized prior treatment response. *Hepatology*. 2011;54(5):1538-46.
141. Kumada H, Toyota J, Okanoue T, Chayama K, Tsubouchi H, Hayashi N. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for treatment-naive patients chronically infected with HCV of genotype 1 in Japan. *Journal of hepatology*. 2012;56(1):78-84.
142. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine*. 2011;364(25):2405-16.
143. Asselah T, Marcellin P. New direct-acting antivirals' combination for the treatment of chronic hepatitis C. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2011;31 Suppl 1:68-77.
144. Fontaine H, Pol S. Antiviral activity of telaprevir and boceprevir for the treatment of hepatitis C virus infection in treatment-experienced patients. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. 2011;35 Suppl 2:S59-63.
145. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*. 2009;49(4):1335-74.
146. Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Marcellin P, Vierling JM, Zeuzem S, et al. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *The New England journal of medicine*. 2011;364(13):1207-17.
147. Poordad F, McCone J, Jr., Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *The New England journal of medicine*. 2011;364(13):1195-206.
148. Hezode C, Fontaine H, Dorival C, Zoulim F, Larrey D, Canva V, et al. Effectiveness of telaprevir or boceprevir in treatment-experienced patients with HCV genotype 1 infection and cirrhosis. *Gastroenterology*. 2014;147(1):132-42 e4.

149. Li G, De Clercq E. Current therapy for chronic hepatitis C: The role of direct-acting antivirals. *Antiviral research*. 2017;142:83-122.
150. Pawlotsky JM. New hepatitis C therapies: the toolbox, strategies, and challenges. *Gastroenterology*. 2014;146(5):1176-92.
151. Pineda JA RA, Fornis X, Calleja JL et al. Guías AEEH/SEIMC de manejo de la Hepatitis C. 2017:80.
152. Cooper GM, Sidow A. Genomic regulatory regions: insights from comparative sequence analysis. *Current opinion in genetics & development*. 2003;13(6):604-10.
153. Drake JA, Bird C, Nemesh J, Thomas DJ, Newton-Cheh C, Reymond A, et al. Conserved noncoding sequences are selectively constrained and not mutation cold spots. *Nature genetics*. 2006;38(2):223-7.
154. Peters SP. Reporting and evaluating genetic association studies. *Respiratory Research*. 2009;10(1):109-.
155. Montpetit A, Nelis M, Laflamme P, Magi R, Ke X, Remm M, et al. An Evaluation of the Performance of Tag SNPs Derived from HapMap in a Caucasian Population. *PLoS Genetics*. 2006;2(3):e27.
156. Caratachea MAC. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 2007;20(3):213-21.
157. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999;234(2):177-86.
158. Ramirez-Bello J, Vargas-Alarcon G, Tovilla-Zarate C, Fragoso JM. [Single nucleotide polymorphisms (SNPs): functional implications of regulatory-SNP (rSNP) and structural RNA (srSNPs) in complex diseases]. *Gaceta medica de Mexico*. 2013;149(2):220-8.
159. Hunt R, Sauna ZE, Ambudkar SV, Gottesman MM, Kimchi-Sarfaty C. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods Mol Biol*. 2009;578:23-39.

160. Feero WG, Guttmacher AE, Collins FS. Genomic Medicine — An Updated Primer. *New England Journal of Medicine*. 2010;362(21):2001-11.
161. Guo L, Du Y, Chang S, Zhang K, Wang J. rSNPBase: a database for curated regulatory SNPs. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(Database issue):D1033-D9.
162. Hernández-Romano J, Martínez-Barnetche J, Valverde-Garduño V. Polimorfismos reguladores y su participación en la patogenia de enfermedades complejas en la era posgenómica. *Salud Pública de México*. 2009;51:s455-s62.
163. Attia J, Ioannidis JP, Thakkinstian A, McEvoy M, Scott RJ, Minelli C, et al. How to use an article about genetic association: A: Background concepts. *Jama*. 2009;301(1):74-81.
164. Morgan TR, Lambrecht RW, Bonkovsky HL, Chung RT, Naishadham D, Sterling RK, et al. DNA polymorphisms and response to treatment in patients with chronic hepatitis C: Results from the HALT-C trial. *Journal of hepatology*. 2008;49(4):548-56.
165. Feld JJ, Liang TJ. Hepatitis C -- identifying patients with progressive liver injury. *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S194-206.
166. Romero-Gomez M, Eslam M, Ruiz A, Maraver M. Genes and hepatitis C: susceptibility, fibrosis progression and response to treatment. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2011;31(4):443-60.
167. Sato M, Kondo M, Tateishi R, Fujiwara N, Kato N, Yoshida H, et al. Impact of IL28B genetic variation on HCV-induced liver fibrosis, inflammation, and steatosis: a meta-analysis. *PloS one*. 2014;9(3):e91822.
168. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nature genetics*. 2009;41(10):1105-9.

169. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 2009;461(7262):399-401.
170. Manns MP, Foster GR, Rockstroh JK, Zeuzem S, Zoulim F, Houghton M. The way forward in HCV treatment--finding the right path. *Nature reviews Drug discovery*. 2007;6(12):991-1000.
171. Sakaki M, Makino R, Hiroishi K, Ueda K, Eguchi J, Hiraide A, et al. Cyclooxygenase-2 gene promoter polymorphisms affect susceptibility to hepatitis C virus infection and disease progression. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2010;40(12):1219-26.
172. Carvajal JJ, Restrepo JC, Correa G. Hepatitis C aguda: Acute hepatitis C. *Acta Medica Colombiana*. 2008;33:28-32.
173. Nischalke HD, Berger C, Luda C, Muller T, Berg T, Coenen M, et al. The CXCL1 rs4074 A allele is associated with enhanced CXCL1 responses to TLR2 ligands and predisposes to cirrhosis in HCV genotype 1-infected Caucasian patients. *Journal of hepatology*. 2012;56(4):758-64.
174. Rizk NM, Derbala MF. Genetic polymorphisms of ICAM 1 and IL28 as predictors of liver fibrosis severity and viral clearance in hepatitis C genotype 4. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. 2013;37(3):262-8.
175. Falleti E, Fabris C, Toniutto P, Fontanini E, Cussigh A, Caldato M, et al. Genetic polymorphisms of inflammatory cytokines and liver fibrosis progression due to recurrent hepatitis C. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2007;27(3):239-46.
176. Dai CY, Chuang WL, Hsieh MY, Lee LP, Hou NJ, Chen SC, et al. Polymorphism of interferon-gamma gene at position +874 and clinical characteristics of chronic hepatitis C. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2006;148(3):128-33.

177. Huang Y, Yang H, Borg BB, Su X, Rhodes SL, Yang K, et al. A functional SNP of interferon-gamma gene is important for interferon-alpha-induced and spontaneous recovery from hepatitis C virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(3):985-90.
178. Nalpas B, Laviaille-Meziani R, Plancoulaine S, Jouanguy E, Nalpas A, Munteanu M, et al. Interferon gamma receptor 2 gene variants are associated with liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C infection. *Gut*. 2010;59(8):1120-6.
179. Sermasathanasawadi R, Kato N, Muroyama R, Dharel N, Shao RX, Chang JH, et al. Association of interferon regulatory factor-7 gene polymorphism with liver cirrhosis in chronic hepatitis C patients. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2008;28(6):798-806.
180. Guzman-Fulgencio M, Berenguer J, Jimenez-Sousa MA, Pineda-Tenor D, Aldamiz-Echevarria T, Garcia-Broncano P, et al. Association between IL7R polymorphisms and severe liver disease in HIV/HCV coinfecting patients: a cross-sectional study. *Journal of translational medicine*. 2015;13:206.
181. Mueller T, Mas-Marques A, Sarrazin C, Wiese M, Halangk J, Witt H, et al. Influence of interleukin 12B (IL12B) polymorphisms on spontaneous and treatment-induced recovery from hepatitis C virus infection. *Journal of hepatology*. 2004;41(4):652-8.
182. Haas SL, Weiss C, Bugert P, Gundt J, Witt H, Singer MV, et al. Interleukin 18 promoter variants (-137G>C and -607C>A) in patients with chronic hepatitis C: association with treatment response. *Journal of clinical immunology*. 2009;29(5):620-8.
183. Booth D, George J. Loss of function of the new interferon IFN-lambda4 may confer protection from hepatitis C. *Nature genetics*. 2013;45(2):119-20.
184. Wright M, Goldin R, Hellier S, Knapp S, Frodsham A, Hennig B, et al. Factor V Leiden polymorphism and the rate of fibrosis development in chronic hepatitis C virus infection. *Gut*. 2003;52(8):1206-10.

185. Urabe Y, Ochi H, Kato N, Kumar V, Takahashi A, Muroyama R, et al. A genome-wide association study of HCV-induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at the MHC region. *Journal of hepatology*. 2013;58(5):875-82.
186. Toniutto P, Fabris C, Falleti E, Cussigh A, Fontanini E, Bitetto D, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and liver fibrosis progression in patients with recurrent hepatitis C. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2008;28(2):257-63.
187. Reynolds WF, Patel K, Pianko S, Blatt LM, Nicholas JJ, McHutchison JG. A genotypic association implicates myeloperoxidase in the progression of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Genes and immunity*. 2002;3(6):345-9.
188. El Awady MK, Anany MA, Esmat G, Zayed N, Tabll AA, Helmy A, et al. Single nucleotide polymorphism at exon 7 splice acceptor site of OAS1 gene determines response of hepatitis C virus patients to interferon therapy. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2011;26(5):843-50.
189. Li CZ, Kato N, Chang JH, Muroyama R, Shao RX, Dharel N, et al. Polymorphism of OAS-1 determines liver fibrosis progression in hepatitis C by reduced ability to inhibit viral replication. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2009;29(9):1413-21.
190. Cai T, Dufour JF, Muellhaupt B, Gerlach T, Heim M, Moradpour D, et al. Viral genotype-specific role of PNPLA3, PPARG, MBOAT7, and IL28B in hepatitis C virus-associated steatosis. *Journal of hepatology*. 2011;55(3):529-35.
191. Hellier S, Frodsham AJ, Hennig BJ, Klenerman P, Knapp S, Ramaley P, et al. Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection. *Hepatology*. 2003;38(6):1468-76.
192. Schott E, Witt H, Neumann K, Taube S, Oh DY, Schreier E, et al. A Toll-like receptor 7 single nucleotide polymorphism protects from advanced inflammation and fibrosis in male patients with chronic HCV-infection. *Journal of hepatology*. 2007;47(2):203-11.

193. Askar E, Ramadori G, Mihm S. Toll-like receptor 7 rs179008/Gln11Leu gene variants in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of medical virology*. 2010;82(11):1859-68.
194. Pang PS, Planet PJ, Glenn JS. The evolution of the major hepatitis C genotypes correlates with clinical response to interferon therapy. *PloS one*. 2009;4(8):e6579.
195. Talaat RM, Esmail AA, Elwakil R, Gurgis AA, Nasr MI. Tumor necrosis factor-alpha -308G/A polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus-infected patients. *Chinese journal of cancer*. 2012;31(1):29-35.
196. Goyal A, Kazim SN, Sakhuja P, Malhotra V, Arora N, Sarin SK. Association of TNF-beta polymorphism with disease severity among patients infected with hepatitis C virus. *Journal of medical virology*. 2004;72(1):60-5.
197. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. *Journal of hepatology*. 2015;63(1):199-236.
198. Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, Castera L, Le Bail B, Adhoute X, et al. Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut*. 2006;55(3):403-8.
199. Zipprich A, Garcia-Tsao G, Rogowski S, Fleig WE, Seufferlein T, Dollinger MM. Prognostic indicators of survival in patients with compensated and decompensated cirrhosis. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2012;32(9):1407-14.
200. Serfaty L. Follow-up of patients with chronic hepatitis C and a sustained viral response. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2016;36 Suppl 1:67-71.
201. Conti F, Buonfiglioli F, Scuteri A, Crespi C, Bolondi L, Caraceni P, et al. Early occurrence and recurrence of hepatocellular carcinoma in HCV-related cirrhosis treated with direct-acting antivirals. *Journal of hepatology*. 2016;65(4):727-33.

202. van der Meer AJ, Feld JJ, Hofer H, Almasio PL, Calvaruso V, Fernandez-Rodriguez CM, et al. Risk of cirrhosis-related complications in patients with advanced fibrosis following hepatitis C virus eradication. *Journal of hepatology*. 2017;66(3):485-93.
203. Janjua NZ, Chong M, Kuo M, Woods R, Wong J, Yoshida EM, et al. Long-term effect of sustained virological response on hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C in Canada. *Journal of hepatology*. 2017;66(3):504-13.
204. Singh S, Fujii LL, Murad MH, Wang Z, Asrani SK, Ehman RL, et al. Liver stiffness is associated with risk of decompensation, liver cancer, and death in patients with chronic liver diseases: a systematic review and meta-analysis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2013;11(12):1573-84 e1-2; quiz e88-9.
205. Perez-Latorre L, Sanchez-Conde M, Rincon D, Miralles P, Aldamiz-Echevarria T, Carrero A, et al. Prediction of liver complications in patients with hepatitis C virus-related cirrhosis with and without HIV coinfection: comparison of hepatic venous pressure gradient and transient elastography. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2014;58(5):713-8.
206. Pang JX, Zimmer S, Niu S, Crotty P, Tracey J, Pradhan F, et al. Liver stiffness by transient elastography predicts liver-related complications and mortality in patients with chronic liver disease. *PloS one*. 2014;9(4):e95776.
207. Vergniol J, Foucher J, Terrebonne E, Bernard PH, le Bail B, Merrouche W, et al. Noninvasive tests for fibrosis and liver stiffness predict 5-year outcomes of patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2011;140(7):1970-9, 9 e1-3.
208. Klibansky DA, Mehta SH, Curry M, Nasser I, Challies T, Afdhal NH. Transient elastography for predicting clinical outcomes in patients with chronic liver disease. *Journal of viral hepatitis*. 2012;19(2):e184-93.
209. Marra F, Tacke F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology*. 2014;147(3):577-94 e1.

210. Zeremski M, Petrovic LM, Chiriboga L, Brown QB, Yee HT, Kinkhabwala M, et al. Intrahepatic levels of CXCR3-associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2008;48(5):1440-50.
211. Heydtmann M, Adams DH. Chemokines in the immunopathogenesis of hepatitis C infection. *Hepatology*. 2009;49(2):676-88.
212. Patel K, Remlinger KS, Walker TG, Leitner P, Lucas JE, Gardner SD, et al. Multiplex protein analysis to determine fibrosis stage and progression in patients with chronic hepatitis C. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2014;12(12):2113-20 e1-3.
213. Zeremski M, Petrovic LM, Talal AH. The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of viral hepatitis*. 2007;14(10):675-87.
214. Tacke F, Zimmermann HW, Berres ML, Trautwein C, Wasmuth HE. Serum chemokine receptor CXCR3 ligands are associated with progression, organ dysfunction and complications of chronic liver diseases. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2011;31(6):840-9.
215. Zeremski M, Dimova R, Brown Q, Jacobson IM, Markatou M, Talal AH. Peripheral CXCR3-associated chemokines as biomarkers of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *The Journal of infectious diseases*. 2009;200(11):1774-80.
216. Liang YJ, Luo J, Lu Q, Zhou Y, Wu HW, Zheng D, et al. Gene profile of chemokines on hepatic stellate cells of schistosome-infected mice and antifibrotic roles of CXCL9/10 on liver non-parenchymal cells. *PloS one*. 2012;7(8):e42490.
217. Sahin H, Borkham-Kamphorst E, Kuppe C, Zaldivar MM, Grouls C, Al-samman M, et al. Chemokine Cxcl9 attenuates liver fibrosis-associated angiogenesis in mice. *Hepatology*. 2012;55(5):1610-9.

218. Wasmuth HE, Lammert F, Zaldivar MM, Weiskirchen R, Hellerbrand C, Scholten D, et al. Antifibrotic effects of CXCL9 and its receptor CXCR3 in livers of mice and humans. *Gastroenterology*. 2009;137(1):309-19, 19 e1-3.
219. Harvey CE, Post JJ, Palladinetti P, Freeman AJ, French RA, Kumar RK, et al. Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 2003;74(3):360-9.
220. Romero AI, Lagging M, Westin J, Dhillon AP, Dustin LB, Pawlotsky JM, et al. Interferon (IFN)-gamma-inducible protein-10: association with histological results, viral kinetics, and outcome during treatment with pegylated IFN-alpha 2a and ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *The Journal of infectious diseases*. 2006;194(7):895-903.
221. Roe B, Coughlan S, Hassan J, Grogan A, Farrell G, Norris S, et al. Elevated serum levels of interferon-gamma-inducible protein-10 in patients coinfecting with hepatitis C virus and HIV. *The Journal of infectious diseases*. 2007;196(7):1053-7.
222. Berenguer J, Fernandez-Rodriguez A, Angeles Jimenez-Sousa M, Cosín J, Zarate P, Micheloud D, et al. High plasma CXCL10 levels are associated with HCV-genotype 1, and higher insulin resistance, fibrosis, and HIV viral load in HIV/HCV coinfecting patients. *2012*. 25-9 p.
223. Li JA, Chen ZB, Lv TG, Han ZL. Genetic polymorphism of CCL2-2518, CXCL10-201, IL8+781 and susceptibility to severity of Enterovirus-71 infection in a Chinese population. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2014;63(7):549-56.
224. Xu Z, Liu Y, Liu L, Li X, Bai S, Rong Y, et al. Association of interferon-gamma induced protein 10 promoter polymorphisms with the disease progression of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. *PloS one*. 2013;8(9):e72799.

225. Deng G, Zhou G, Zhang R, Zhai Y, Zhao W, Yan Z, et al. Regulatory polymorphisms in the promoter of CXCL10 gene and disease progression in male hepatitis B virus carriers. *Gastroenterology*. 2008;134(3):716-26.
226. Wilson N, Driss A, Solomon W, Dickinson-Copeland C, Salifu H, Jain V, et al. CXCL10 gene promoter polymorphism -1447A>G correlates with plasma CXCL10 levels and is associated with male susceptibility to cerebral malaria. *PloS one*. 2013;8(12):e81329.
227. Nogueira LG, Santos RH, Ianni BM, Fiorelli AI, Mairena EC, Benvenuti LA, et al. Myocardial chemokine expression and intensity of myocarditis in Chagas cardiomyopathy are controlled by polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(10):e1867.
228. Tang NL, Fan HP, Chang KC, Ching JK, Kong KP, Yew WW, et al. Genetic association between a chemokine gene CXCL-10 (IP-10, interferon gamma inducible protein 10) and susceptibility to tuberculosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2009;406(1-2):98-102.
229. Pineda-Tenor D, Berenguer J, Garcia-Alvarez M, Guzman-Fulgencio M, Carrero A, Aldamiz-Echevarria T, et al. Single nucleotide polymorphisms of CXCL9-11 chemokines are associated with liver fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2015;68(4):386-95.
230. Lo Re V, 3rd, Kallan MJ, Tate JP, Localio AR, Lim JK, Goetz MB, et al. Hepatic decompensation in antiretroviral-treated patients co-infected with HIV and hepatitis C virus compared with hepatitis C virus-monoinfected patients: a cohort study. *Annals of internal medicine*. 2014;160(6):369-79.
231. Macias J, Berenguer J, Japon MA, Giron JA, Rivero A, Lopez-Cortes LF, et al. Fast fibrosis progression between repeated liver biopsies in patients coinfecting with human immunodeficiency virus/hepatitis C virus. *Hepatology*. 2009;50(4):1056-63.

232. Aidoo M, Terlouw DJ, Kolczak MS, McElroy PD, ter Kuile FO, Kariuki S, et al. Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet*. 2002;359(9314):1311-2.
233. Bhattacharya A, Ziebarth JD, Cui Y. PolymiRTS Database 3.0: linking polymorphisms in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D86-91.
234. Guo L, Du Y, Qu S, Wang J. rVarBase: an updated database for regulatory features of human variants. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(Database issue):D888-D93.
235. Grubert F, Zaugg JB, Kasowski M, Ursu O, Spacek DV, Martin AR, et al. Genetic Control of Chromatin States in Humans Involves Local and Distal Chromosomal Interactions. *Cell*. 2015;162(5):1051-65.
236. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000;12(2):121-7.
237. Erdel M, Theurl M, Meyer M, Duba HC, Utermann G, Werner-Felmayer G. High-resolution mapping of the human 4q21 and the mouse 5E3 SCYB chemokine cluster by fiber-fluorescence in situ hybridization. *Immunogenetics*. 2001;53(7):611-5.
238. Capitini CM, Chisti AA, Mackall CL. Modulating T-cell homeostasis with IL-7: preclinical and clinical studies. *Journal of internal medicine*. 2009;266(2):141-53.
239. Pellegrini M, Calzascia T, Toe JG, Preston SP, Lin AE, Elford AR, et al. IL-7 engages multiple mechanisms to overcome chronic viral infection and limit organ pathology. *Cell*. 2011;144(4):601-13.
240. Shin EC, Park SH, Nascimbeni M, Major M, Caggiari L, de Re V, et al. The frequency of CD127(+) hepatitis C virus (HCV)-specific T cells but not the expression of exhaustion markers predicts the outcome of acute HCV infection. *Journal of virology*. 2013;87(8):4772-7.

241. Hou L, Jie Z, Desai M, Liang Y, Soong L, Wang T, et al. Early IL-17 production by intrahepatic T cells is important for adaptive immune responses in viral hepatitis. *J Immunol*. 2013;190(2):621-9.
242. Larrubia JR, Lokhande MU, Garcia-Garzon S, Miquel J, Gonzalez-Praetorius A, Parra-Cid T, et al. Persistent hepatitis C virus (HCV) infection impairs HCV-specific cytotoxic T cell reactivity through Mcl-1/Bim imbalance due to CD127 down-regulation. *Journal of viral hepatitis*. 2013;20(2):85-94.
243. Larrea E, Riezu-Boj JI, Aldabe R, Guembe L, Echeverria I, Balasiddaiah A, et al. Dysregulation of interferon regulatory factors impairs the expression of immunostimulatory molecules in hepatitis C virus genotype 1-infected hepatocytes. *Gut*. 2014;63(4):665-73.
244. Broux B, Hellings N, Venken K, Rummens JL, Hensen K, Van Wijmeersch B, et al. Haplotype 4 of the multiple sclerosis-associated interleukin-7 receptor alpha gene influences the frequency of recent thymic emigrants. *Genes and immunity*. 2010;11(4):326-33.
245. Jager J, Schulze C, Rosner S, Martin R. IL7RA haplotype-associated alterations in cellular immune function and gene expression patterns in multiple sclerosis. *Genes and immunity*. 2013;14(7):453-61.
246. Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A, et al. Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nature genetics*. 2007;39(9):1083-91.
247. Santiago JL, Alizadeh BZ, Martinez A, Espino L, de la Calle H, Fernandez-Arquero M, et al. Study of the association between the CAPSL-IL7R locus and type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(9):1653-8.
248. Guzman-Fulgencio M, Berenguer J, Jimenez-Sousa MA, Micheloud D, Garcia-Alvarez M, Bellon JM, et al. IL7RA polymorphisms predict the CD4+ recovery in HIV patients on cART. *European journal of clinical investigation*. 2015;45(11):1192-9.

249. Hartling HJ, Thorner LW, Erikstrup C, Harritshoj LH, Kronborg G, Pedersen C, et al. Polymorphism in interleukin-7 receptor alpha gene is associated with faster CD4(+) T-cell recovery after initiation of combination antiretroviral therapy. *AIDS*. 2014;28(12):1739-48.
250. Rajasuriar R, Booth D, Solomon A, Chua K, Spelman T, Gouillou M, et al. Biological determinants of immune reconstitution in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy: the role of interleukin 7 and interleukin 7 receptor alpha and microbial translocation. *The Journal of infectious diseases*. 2010;202(8):1254-64.
251. Guzman-Fulgencio M, Berenguer J, Pineda-Tenor D, Jimenez-Sousa MA, Garcia-Alvarez M, Aldamiz-Echevarria T, et al. Association between IL7RA polymorphisms and the successful therapy against HCV in HIV/HCV-coinfected patients. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2015;34(2):385-93.
252. Kreft KL, Verbraak E, Wierenga-Wolf AF, van Meurs M, Oostra BA, Laman JD, et al. Decreased systemic IL-7 and soluble IL-7Ralpha in multiple sclerosis patients. *Genes and immunity*. 2012;13(7):587-92.
253. Lundstrom W, Highfill S, Walsh ST, Beq S, Morse E, Kockum I, et al. Soluble IL7Ralpha potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(19):E1761-70.
254. Rajasuriar R, Booth DR, Gouillou M, Spelman T, James I, Solomon A, et al. The role of SNPs in the alpha-chain of the IL-7R gene in CD4+ T-cell recovery in HIV-infected African patients receiving suppressive cART. *Genes and immunity*. 2012;13(1):83-93.
255. Crawley AM, Faucher S, Angel JB. Soluble IL-7R alpha (sCD127) inhibits IL-7 activity and is increased in HIV infection. *J Immunol*. 2010;184(9):4679-87.
256. Hartling HJ, Ryder LP, Ullum H, Odum N, Nielsen SD. Gene variation in IL-7 receptor (IL-7R)alpha affects IL-7R response in CD4+ T cells in HIV-infected individuals. *Scientific reports*. 2017;7:42036.

257. Shiffman ML, Sterling RK, Contos M, Hubbard S, Long A, Luketic VA, et al. Long term changes in liver histology following treatment of chronic hepatitis C virus. *Annals of hepatology*. 2014;13(4):340-9.
258. Poynard T, Moussalli J, Munteanu M, Thabut D, Lebray P, Rudler M, et al. Slow regression of liver fibrosis presumed by repeated biomarkers after virological cure in patients with chronic hepatitis C. *Journal of hepatology*. 2013;59(4):675-83.