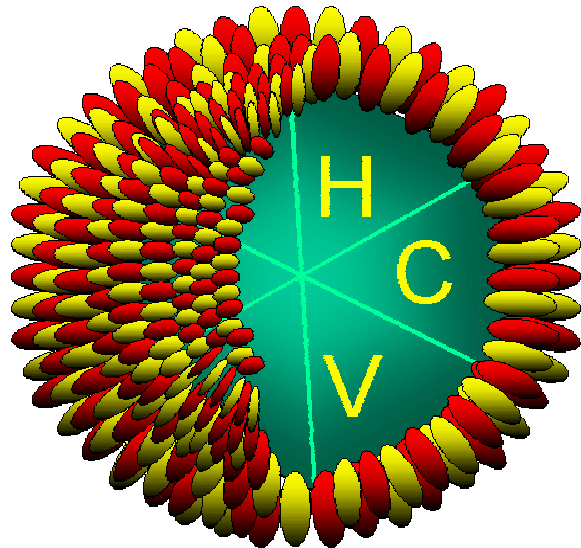


***ESTUDIO DE VARIACIONES GENÉTICAS
EN PACIENTES CON INFECCIÓN POR
VIRUS DE LA HEPATITIS C***



Tesis Doctoral presentada por D. Marco Antonio Montes Cano para
optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla

D. ANTONIO NÚÑEZ ROLDÁN, DOCTOR EN MEDICINA, JEFE DEL SERVICIO DE INMUNOLOGÍA DE LOS HOSPITALES UNIVERSITARIOS VIRGEN DEL ROCÍO Y PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

CERTIFICA:

Que el Licenciado D. MARCO ANTONIO MONTES CANO, ha realizado el trabajo de investigación que lleva por título: "***ESTUDIO DE VARIACIONES GENÉTICAS EN PACIENTES CON INFECCIÓN POR VIRUS DE LA HEPATITIS C***" bajo mi Dirección, reuniendo las condiciones necesarias para ser leída y defendida como tesis para optar al grado de Doctor en Biología.

Para que conste y a los efectos oportunos, expido la presente Comunicación en Sevilla a 28 de Junio de 2007.

Fdo: Dr. Antonio Núñez Roldán

DIRECTOR DE LA TESIS

D^a. M^a FRANCISCA GONZÁLEZ ESCRIBANO, DOCTORA EN BIOLOGÍA Y FACULTATIVO ESPECIALISTA DE ÁREA DEL SERVICIO DE INMUNOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DEL ROCÍO DE SEVILLA

CERTIFICA:

Que el Licenciado D. MARCO ANTONIO MONTES CANO, ha realizado el trabajo de investigación que lleva por título: "***ESTUDIO DE VARIACIONES GENÉTICAS EN PACIENTES CON INFECCIÓN POR VIRUS DE LA HEPATITIS C***" bajo mi Dirección, reuniendo las condiciones necesarias para ser leída y defendida como tesis para optar al grado de Doctor en Biología.

Para que conste y a los efectos oportunos, expido la presente Comunicación en Sevilla a 28 de Junio de 2007

Fdo: Dra. M^a Francisca González Escribano

DIRECTORA DE LA TESIS

D. JOSÉ AGUILAR REINA, DOCTOR EN MEDICINA, JEFE DE SECCIÓN DEL SERVICIO DE DIGESTIVO DE LOS HOSPITALES UNIVERSITARIOS VIRGEN DEL ROCÍO DE SEVILLA Y PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

CERTIFICA:

Que el Licenciado D. MARCO ANTONIO MONTES CANO, ha realizado el trabajo de investigación que lleva por título: "***ESTUDIO DE VARIACIONES GENÉTICAS EN PACIENTES CON INFECCIÓN POR VIRUS DE LA HEPATITIS C***" bajo mi Dirección, reuniendo las condiciones necesarias para ser leída y defendida como tesis para optar al grado de Doctor en Biología.

Para que conste y a los efectos oportunos, expido la presente Comunicación en Sevilla a 28 de Junio de 2007.

Fdo: Dr. José Aguilar Reina

DIRECTOR DE LA TESIS

**DR. FRANCISCO SOBRINO BENEYTO, CATEDRÁTICO DEL
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

CERTIFICA:

Que ha actuado como tutor de la Tesis Doctoral presentada por el Licenciado D. MARCO ANTONIO MONTES CANO, titulada: "***ESTUDIO DE VARIACIONES GENÉTICAS EN PACIENTES CON INFECCIÓN POR VIRUS DE LA HEPATITIS C'***", reuniendo su autor, a mi juicio, las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor en Biología.

Para que conste y a los efectos oportunos, expido la presente Comunicación en Sevilla a 28 de Junio de 2007

Fdo: Dr. Francisco Sobrino Beneyto

TUTOR DE LA TESIS

A mis padres y hermanos. Especialmente a Miguel y Julio por haberme oído y dado consejo en innumerables ocasiones durante la elaboración de este trabajo.

A mi mujer, **Yolanda**, mi mejor amiga en este viaje y otros muchos, por su apoyo incondicional y su paciencia. Sin ella nada hubiera sido igual. A mis dos hijos, **Borja** y **Gonzalo**, ellos se encargaron siempre de recordarme el lado alegre de la vida.

AGRADECIMIENTOS

- A los directores de esta Tesis: **Dr. Antonio Núñez Roldán** que hizo posible la realización del presente trabajo. A la **Dra. María Francisca González Escribano**, por su tenacidad, ayuda y ánimo prestado. Sus consejos, tanto en el desarrollo de la parte experimental como en la redacción de esta tesis han sido fundamentales y en definitiva ha hecho posible que un proyecto culmine en una realidad. Al **Dr. José Aguilar Reina** por su apoyo y participación en la selección de los pacientes estudiados.
- A todos los facultativos, residentes, becarios, enfermeras, técnicos, auxiliares y administrativos, en definitiva compañeros y compañeras del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Virgen del Rocío por la colaboración que me han prestado en la realización de la presente tesis doctoral.
- Al Dr. Francisco Sobrino Beneyto, catedrático del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla, por ser tutor en esta tesis.
- Quiero agradecer igualmente a mis compañeros y compañeras del CIBER de Epidemiología y Salud Pública, y especialmente a su responsable, el Dr. Enrique Calderón Sandubete por sus sabios consejos y por su apoyo incondicional en todo momento.
- Finalmente quiero agradecer a todas aquellas personas de las que me he olvidado, que sin duda ninguna merecen igualmente todo mi agradecimiento.

“La verdadera sabiduría está en reconocer la propia ignorancia”

Sócrates

“Llegar al conocimiento de la verdad solamente no basta. Al contrario, hay que renovarla continuamente con un incesante esfuerzo. De no ser así, la perderemos”

A. Einstein

ÍNDICE

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN 2

1. Justificación del estudio 2
2. Virus de la hepatitis C. Características estructurales y genéticas 2
3. Historia Natural de la Infección por VHC 5
 - 3.1. Fibrosis hepática 7
 - 3.2. Respuesta al tratamiento 11
4. La respuesta inmunitaria frente a la infección por VHC 15
5. Genes candidatos seleccionados en el presente trabajo 18
 - 5.1. Genes KIRs - Killer cell immunoglobulin like receptor 20
 - 5.2. Genes MHC-Clase I 23
 - 5.3. Quimiocinas: CCL2/MCP-1. Receptores de quimiocinas:CCR2 26
 - 5.4. Citocinas: TNF- α y TGF- β 1 29
 - 5.5. Sistema renina-angiotensina: ECA 32
 - 5.6. Metabolismo del hierro: HFE; SLC11A1 34

OBJETIVOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL 38

PACIENTES Y MÉTODOS 40

	40
1. Pacientes	
1.1. Sujetos con aclaramiento viral espontáneo y	40
1.2. Pacientes con infección crónica por VHC	40
1.3. Características clínico-epidemiológicas de los pacientes con Infección crónica por VHC	41
1.4. Terapia antiviral y respuesta	43
2. Métodos	44
2.1. Extracción de DNA	44
2.2. Amplificación de genes para detección en geles de agarosa	45
2.2.1. Discriminación por tamaños	45
2.2.2. Discriminación por PCR-ARMS	49
2.2.3. Discriminación por PCR + RFLP	56
2.3. Electroforesis en gel de agarosa	56
2.4. Amplificación de genes analizados mediante electroforesis capilar	59
2.5. Genes analizados mediante sistema TaqMan	61
2.6. Genes analizados mediante SSOP	63
2.7. Análisis estadístico	65
2.8. Soluciones	66
 RESULTADOS	 72
1. Factores relacionados con la cronificación del virus de hepatitis C	72

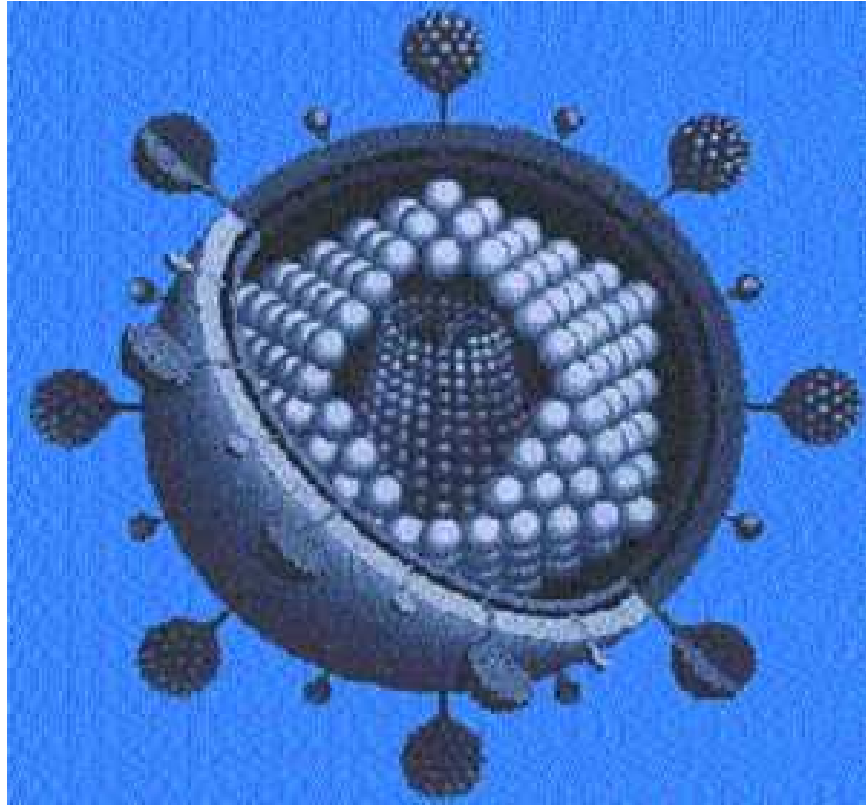
1.1. KIRs 2DL2 y 2DL3	72
1.2. HLA-Cw*	73
1.3. interacción KIRs-HLA-Cw*	74
1.4. CCR2	74
1.4.1. Dimorfismo G>A en la posición +190	74
1.4.2. Dimorfismo G>A situado en el intrón 2	75
1.5. Gen CCL2/MCP-1	76
1.6. Gen TNF-A	78
1.7. TGF- β 1	79
1.8. Modelo multivariante en cronificación	80
2. Factores relacionados con la progresión de la fibrosis hepática	82
2.1. Características clínico-epidemiológicas de los pacientes con infección crónica por VHC.	82
2.2. Gen CCR2	83
2.2.1. Dimorfismo G>A en la posición +190	83
2.2.2. Dimorfismo G>A situado en el intrón 2	83
2.3. Gen CCL2/MCP-1	84
2.4. Gen TNF-A	85
2.5. - TGF- β 1	86
2.6. Gen ECA	87
2.7. Gen HFE	88

2.8. Gen SLC11A1 (<i>Nramp1</i>)	89
2.9. Modelo multivariante en la progresión de la fibrosis	91
3. Factores relacionados con la respuesta al tratamiento en la infección por VHC	92
3.1. Características clínico-epidemiológicas	92
3.2. Gen CCR2	93
3.2.1. Dimorfismo G>A en la posición +190	93
3.2.2. Dimorfismo G>A situado en el intrón 2	93
3.3. Gen CCL2/MCP-1	94
3.4. Gen TNF-A	95
3.5. Gen TGF- β 1	96
3.6. Gen HFE	98
3.7. Gen SLC11A1 (<i>Nramp1</i>)	99
3.8. Modelo multivariante en la respuesta al tratamiento	100
DISCUSIÓN	102
CONCLUSIONES	126
BIBLIOGRAFÍA	129
APÉNDICE	153

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AI	Angiotensina I
Arg	Arginina
Asp	Aspártico
bp	base pair (pares de bases)
cM	Centimorgans
Cys	Cisteína
D	Delección
dNTPs	dexosi Nucleotido Trisfosfato
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
EDTA	ethylenediaminetetra-acetic acid (ácido etilendiaminotetraacético)
FA	Fosfatasa alcalina
GGT	Gamma GT
GOT(AST)	Aspartatoaminotransferasa
GPT(ALT)	Alaninoaminotransferasa
H	Horas
HFE	Gen de la hemocromatosis
HH	Hemocromatosis humana
His	Histidina
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos)
I	Inserción
IC	Intervalo de confianza
IFN	Interferón
Ile	Isoleucina
ISG	Genes estimulados por Interferón
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (Immunoreceptor activador de tirosina)
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (Immunoreceptor inhibidor de tirosina)
JAK-1	Janus-activated Kinase 1
Kd	Kilodaltons
KIR	Killer cell immunoglobulin-like receptor (receptores de "células naturales asesinas")
LCR	Complejo Receptor de los Leucocitos
Lys	Lisina
CCL2/ MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1 (proteína quimioatrayente de quimiocinas 1)
MHC	(Major Histocompatibility complex) Complejo Mayor de Histocompatibilidad
min	minuto
ml	mililitros
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero

NF- κ B	Nuclear Factor kappa-B (Factor Nuclear κ B)
NK	Natural Killer (Células "asesinas" naturales)
ns	No significativa
nt	Nucleótido
OMS	Organización mundial de la salud
OR	Odds Ratio (Razón de ventajas)
PCR	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PCR-ARMS	PCR-amplification refractory mutation system
PME	Proteínas de la matriz extracelular
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
RBV	Ribavirina
RFLP	Restriction fragments length polymorphism. (Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción)
rpm	revoluciones por minuto
SDS	Sodium dodecyl sulfate (dodecilsulfato sódico)
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida
SNP	Single nucleotide polymorphism (mutaciones puntuales)
SSO	Single specific oligonucleotides (oligonucleótidos específicos de secuencia)
STR	Short Tandem Repeats (Repeticiones cortas)
TGF- β 1	Transforming Growth Factor β 1 (Factor de transformación del crecimiento 1)
Th1	T helper 1 (respuesta de células T colaboradoras 1)
Th2	T helper 1 (respuesta de células T colaboradoras 2)
TM	Transmembrana
TNF α	Tumor necrosis factor (factor de necrosis tumoral)
Tyr	Tirosina
UTR	Untranslated (no traducida).
Val	Valina
VHC	Virus de la hepatitis C
Vs	Versus



INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. Justificación del estudio

Las hepatitis víricas son el resultado de la infección del hígado por diferentes tipos de virus con tropismo hepático como son los virus de la hepatitis A, B, C, D y E (VHA; VHB; VHC; VHD; VHE). La infección por virus de la hepatitis C (VHC) constituye un serio problema de salud pública debido a su elevada prevalencia y tendencia a la cronificación, así como por el desarrollo de fibrosis y cirrosis. Además, se sabe que los pacientes infectados por VHC evolucionan de manera muy diferente y presentan respuestas diversas al mismo tratamiento aun en el caso de condiciones homogéneas de infección, como son el mismo genotipo viral, cantidad de inóculo similar, etc. Por tanto, deben existir factores genéticos del hospedador que condicionan estas diferentes respuestas. El análisis de estos factores podría permitir un mejor conocimiento de la historia natural de la infección y un manejo clínico de los pacientes más eficaz. En general, los estudios genéticos realizados en este tipo de pacientes están condicionados por el número de individuos incluidos y la heterogeneidad tanto genética como de clasificación diagnóstica de los mismos. El presente trabajo aporta un número relativamente amplio de pacientes, procedentes de una misma área geográfica y seguidos durante un largo periodo de tiempo por el mismo grupo clínico, por lo que se minimizan tanto los posibles sesgos relacionados con el virus como, las variaciones observadas cuando son diferentes grupos los que diagnostican y realizan el seguimiento de este tipo de pacientes.

2. Virus de la hepatitis C

Desde la década de los años cincuenta los dos tipos fundamentales de virus causantes de hepatitis se denominaban "infecciosos" y "séricos" (Havens WP Jr et al., 1945). Numerosos ensayos experimentales así como la aparición de varios cuadros agudos de hepatitis en un mismo sujeto, generalmente drogadictos por vía parenteral y hemofílicos tratados con hemoderivados,

hicieron sospechar la existencia de un tercer tipo de virus de la hepatitis. En la década de los sesenta se pusieron a punto las técnicas de diagnóstico del virus de la hepatitis B (VHB) y en los años setenta la metodología para la detección del virus de la hepatitis A (VHA). Nuevamente la aplicación de los test diagnósticos para la determinación del virus de la hepatitis A con resultados negativos en pacientes con hepatitis no-B adquirida tras transfusión, hizo que aumentasen las sospechas de la existencia de un nuevo virus de hepatitis no filiado hasta la fecha (Feinstone SM et al., 1975). Finalmente, y tras la introducción sistemática de los test para detectar el virus de la hepatitis B, se volvía a constatar la presencia de un nuevo virus llamado virus no-A, no-B (NANB) cuyo diagnóstico se realizaba por exclusión de otros como VHA, VHB y citomegalovirus (CMV).

A pesar de todos los esfuerzos realizados desde abordajes tanto virológicos como inmunológicos, no fue hasta finales de los ochenta cuando se consiguieron clonar determinadas regiones del genoma de este virus, al que se denominó virus de la hepatitis C (VHC). Fue a partir de entonces cuando se desarrolló un test diagnóstico para detectar anticuerpos específicos frente al VHC (Choo QL et al., 1989). Finalmente, el desarrollo de este método diagnóstico para la determinación de anticuerpos específicos circulantes frente a este virus, demostró que la mayoría de las hepatitis NANB de origen postransfusional eran debidas a la infección por VHC.

En la actualidad, el VHC pertenece al género *Hepacivirus*, encuadrado dentro de la familia *Flaviviridae*. En relación con las características estructurales del VHC, en primer lugar consta de una envuelta lipoproteica que deriva de la membrana celular del hospedador, en la que están incluidas proteínas virales. Esta envuelta recubre la nucleocápside formada por las proteínas del *core*, en cuyo interior se encuentra el genoma viral.

Aunque su forma se desconoce en detalle, algunas imágenes de microscopía electrónica han permitido detectar formas esféricas de entre 60-70 nm de diámetro, que proyectan unas protuberancias hacia fuera, las cuales parecen corresponder con las proteínas E1/E2. A continuación, la figura 1 muestra un esquema simplificado de la estructura del VHC.

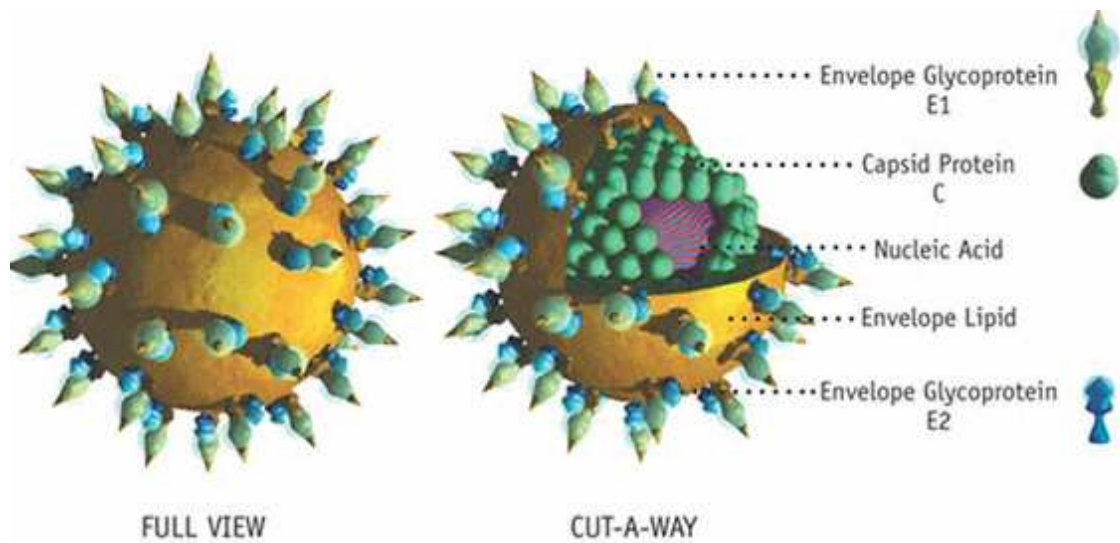


Figura 1. Esquema de los principales componentes estructurales del virus de la hepatitis C.

Respecto del genoma del VHC, este se caracteriza por presentar una única cadena de RNA con polaridad positiva. En ella encontramos una región 5' UTR de 341 nucleótidos con estructura secundaria donde existen las denominadas regiones IRES (Internal Ribosomal Entry Site) que están implicadas en la traducción del RNA viral. Es además una zona con alto grado de conservación por lo que se piensa que pueda jugar un importante papel en la replicación del virus. A continuación existe una zona estructural donde se encuentra en primer lugar la región C, que codifica la proteína básica de la nucleocápsida y posteriormente las regiones E1 y E2/NS1 relacionadas con la síntesis de la glicoproteína de la envuelta, una de cuyas características es la presencia de dominios hipervariables. A continuación en el dominio no estructural se encuentran genes que codifican seis proteínas: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. La proteína NS2 presenta actividad proteasa, el producto del gen NS3 presenta actividad proteasa, helicasa y fosfatasa, las proteínas NS4A y B funcionan como cofactores y los productos génicos de NS5A y B, funcionan como serín-proteasa y RNA-polimerasa respectivamente. Para finalizar, existe

una región 3' UTR, con un pequeño número de nucleótidos (entre 150 y 300) y con tres regiones diferenciadas. Una primera pequeña y conservada, otra con hasta 200 nucleótidos donde se localiza una región poli-U y finalmente una tercera denominada 3' X altamente conservada. En la figura 2 se esquematiza la estructura genética del VHC.

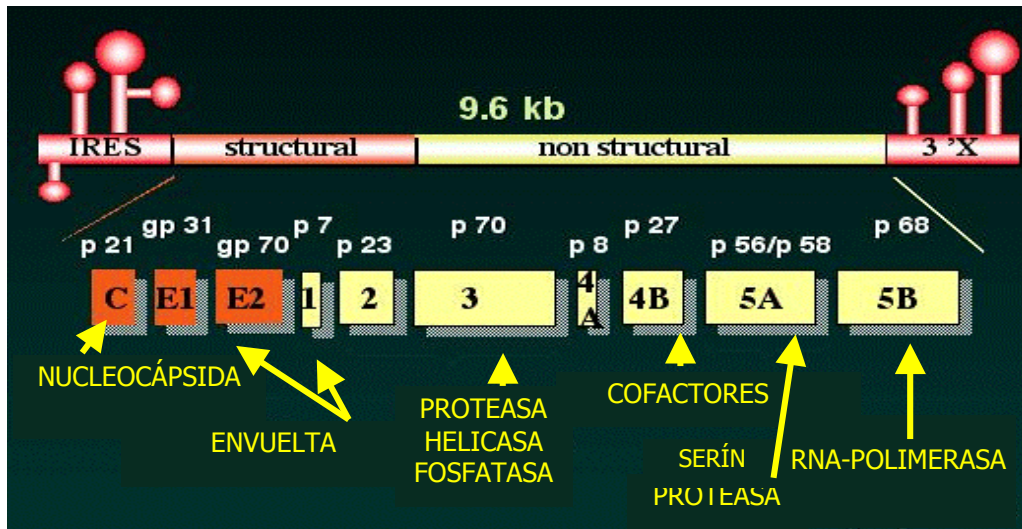


Figura 2. Estructura genética del virus de la hepatitis C.

3. Historia natural de la infección por virus de la hepatitis C

La organización mundial de la salud (OMS) ha declarado la infección por VHC un problema de salud pública (Kenny-Walsh E, 2001). En la actualidad se calcula que la prevalencia mundial de la infección por VHC es de un 2%-3%, lo que se traduce en 180-200 millones de personas infectadas por este virus (Alter MJ, 1995; Polyak SJ, 2003). En torno a un 15-20% de los infectados evoluciona a un proceso de aclaramiento viral espontáneo. Un estudio realizado recientemente en población italiana confirmó que alrededor de un 17% de los sujetos infectados aclaraban espontáneamente el virus (Mazzeo C et al., 2003). Se desconocen los factores que determinan que algunos individuos infectados aclaran espontáneamente el virus, mientras que otros cronifican la infección. En este sentido, diferentes estudios han relacionado factores genéticos del hospedador con el aclaramiento viral espontáneo (Kenny-Walsh E, 1999;

Messick K et al., 2001; Mascheretti S et al., 2004). Así, se ha sugerido que la inmunidad innata, y concretamente las células NK (Natural Killer, o "asesinas naturales") a través de los receptores KIR, puede estar involucrada en este proceso (Kakoo SI et al., 2004). Otro aspecto importante que se produce durante las primeras fases de la infección por VHC es la liberación de diferentes tipos de quimiocinas que intervienen de manera directa en el mantenimiento del infiltrado celular relacionado con el proceso inflamatorio. Estas moléculas, a través de sus receptores específicos, podrían jugar un importante papel en el proceso de aclaramiento viral espontáneo. En este sentido, existen diferentes trabajos que muestran alteraciones en los niveles de quimiocinas en pacientes con infección por VHC (Marra F et al., 1999). Por último, estudios recientes indican que el tipo de respuesta celular frente a la infección viral resulta decisivo para su evolución. Así, se sabe que el control del balance TH1/TH2 de la respuesta inmune adaptativa es fundamental en este tipo de infecciones. Por tanto, alteraciones en la expresión de determinadas citocinas podrían favorecer una respuesta TH1 CD4+ y CD8+ más eficiente en la eliminación del agente viral y por el contrario, una respuesta con predominio TH2 favorecería la cronificación (Lloyd AR et al., 2007).

Los datos de aclaramiento viral espontáneo indican que aproximadamente un 80% de los individuos cronifican la infección, desarrollando un proceso de fibrosis progresiva muy variable, que desemboca en una situación de cirrosis en un 20-30% de los casos, y que en ocasiones requiere la necesidad de un trasplante hepático. En general, la aparición de la fibrosis es un proceso insidioso, que no cursa de forma clara y la mayor morbi-mortalidad en estos pacientes se asocia con situaciones de cirrosis, que puede sobrevenir a partir de los 15 años de evolución. Entre las complicaciones más importantes que pueden aparecer en este tipo de pacientes se incluyen ascitis, encefalopatía hepática, fallo renal y sangrado de varices. Aunque los pacientes cirróticos pueden permanecer durante largos periodos de tiempo exentos de complicaciones graves, en ocasiones aparecen descompensaciones de la cirrosis que se asocian con bajo grado de supervivencia. Otro aspecto relacionado con la morbilidad de la cirrosis es el desarrollo de hepatocarcinoma que está

considerado como un importante factor de riesgo asociado (Davis GL et al., 2003).

3.1. Fibrosis hepática por VHC

La fibrosis hepática es un proceso que se produce como consecuencia de un daño crónico a nivel hepático, junto a un depósito continuado de proteínas de la matriz extracelular (PME). Estas dos características ocurren básicamente en la mayoría de las enfermedades hepáticas crónicas. Actualmente se sabe que la infección por VHC es una de las principales causas en el desarrollo de fibrosis hepática junto con la infección por VHB, consumo excesivo de alcohol y la esteatosis hepática no alcohólica.

Como se ha dicho anteriormente, uno de los acontecimientos que se producen durante el proceso de fibrosis es el depósito de PME que origina la desorganización de la arquitectura del tejido hepático, apareciendo numerosas lesiones fibrosas que posteriormente causan la aparición de nódulos de regeneración hepática, lo que se define como cirrosis. Esta situación produce disfunción hepatocelular, así como un incremento de la resistencia intrahepática al flujo sanguíneo, lo que clínicamente se traduce en insuficiencia hepática e hipertensión portal.

Tradicionalmente la fibrosis hepática se ha considerado como un proceso pasivo e irreversible debido a que se produce un colapso del parénquima hepático, el cual es sustituido por un tejido rico en colágeno. Este concepto ha ido cambiando, y en la actualidad se habla de un modelo dinámico en el que se produce una *lesión* (acción) – *curación* (reacción) como respuesta a un daño hepático crónico.

Durante los años 80 se describieron las células hepáticas estrelladas (CHE) como las principales productoras de colágeno a este nivel, y se determinó su papel en los procesos de fibrosis hepática. A partir de entonces se estandarizaron los métodos de obtención de estas células, así como el cultivo continuo de las mismas que actualmente se acepta como modelo de estudio (Rockey DC et al., 1992). También se desarrollaron modelos animales en ratas y ratones transgénicos en los que se confirmaron los estudios previos realizados

en cultivos celulares, y además se identificaron potenciales mediadores fibrogénicos. Por otro lado, junto a las CHE, se ha demostrado que otros tipos celulares como los miofibroblastos portales y células procedentes de médula ósea, son capaces de desencadenar procesos fibrogénicos.

Por tanto, la fibrosis hepática es el resultado de un proceso de lesión-reparación frente a un daño repetido. Tras una hepatitis viral, en la que se produce daño hepático agudo, las células parenquimales se regeneran y sustituyen a las células que han sufrido necrosis o apoptosis. Es precisamente este proceso el que se relaciona con respuestas de tipo inflamatorio y con el depósito de proteínas de la matriz extracelular.

Como hemos comentado anteriormente, un alto porcentaje de los pacientes que se infectan por VHC cronifican la infección, y es esta situación de agresión permanente la que origina fallos en el proceso de regeneración. Así, tras la destrucción de los hepatocitos, estos son sustituidos por grandes cantidades de PME, entre las que se incluyen colágeno, fibronectina, ácido hialurónico, etc (figura 3). Este proceso es el que origina la aparición de la fibrosis y posterior deterioro de la función hepática.

Por otra parte la distribución de este material fibroso depende del agente causal, así en la hepatitis crónica de origen viral la región de depósito está en torno a la zona portal, y por el contrario en hepatitis inducidas por consumo de alcohol las regiones afectadas se localizan a nivel pericentral y perisinusoidal (Pinzani M, 1999). En cualquier caso, un hecho demostrado en situaciones de fibrosis-cirrosis es la presencia de entre 7 y 10 veces más cantidad de PME en un hígado con una fibrosis avanzada o cirrosis respecto de un hígado sano (Arthur MJ, 2000).

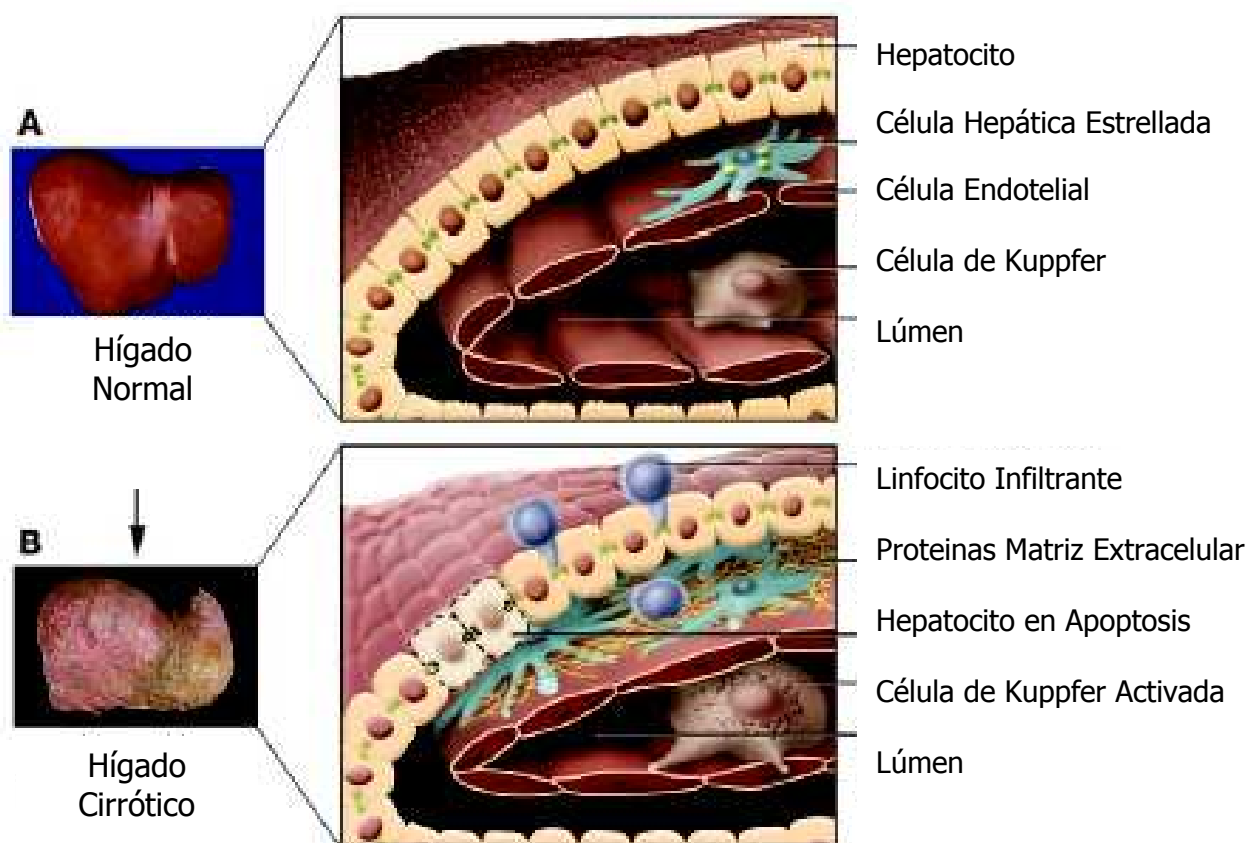


Figura 3. Alteraciones que aparecen en la arquitectura hepática tras la acción crónica del virus de la hepatitis C.

En general podemos decir que el resultado de la fibrosis está condicionado a dos niveles. En primer lugar hay un incremento en la actividad de las CHE que adquieren propiedades contráctiles, proinflamatorias y fibrogénicas; esto último produce directamente un aumento de las PME. En segundo lugar hay un descenso en la actividad de las metaloproteinasas, que se encargan específicamente de degradar las PME, debido a la sobreexpresión de inhibidor tisular de metaloproteinasas.

Por otro lado, existe una gran variabilidad en la respuesta desde el punto de vista de la progresión de la fibrosis en los pacientes con infección por VHC o sea, que no todos los pacientes expuestos al mismo agente causal desarrollan el mismo grado de fibrosis hepática ni lo hacen a igual velocidad. Por tanto, los

factores propios del hospedador parecen desempeñar un importante papel en este proceso (Poynard T et al., 1997).

Diferentes estudios han aportado información relevante sobre la variabilidad existente entre pacientes con un rápido desarrollo de fibrosis y pacientes con evolución lenta. Una propuesta para explicar, al menos parcialmente, estas variaciones son los factores genéticos del hospedador. Así, uno de los mayores avances en el conocimiento de la etiología de la fibrosis hepática ha sido la identificación y estudio de genes candidatos implicados en este proceso. En estos estudios se han utilizado diferentes herramientas como la activación de CHE, fundamentales en el proceso de fibrogénesis hepática (Reeves HL et al., 2002), o el estudio de la expresión génica en modelos de fibrosis hepática en roedores (Jiménez W et al., 1992). Además, la introducción de mutaciones dirigidas ha permitido la detección de genes fundamentales implicados en la modificación de la fibrosis hepática (Rudolph KL et al., 2000). Finalmente la utilización de microarrays ha facilitado el estudio de perfiles de expresión genética, y todo esto ha permitido identificar potenciales genes candidatos implicados en la activación de CHE, así como su relación en el desarrollo del proceso de fibrosis hepática.

3.2. Respuesta al tratamiento de la infección por VHC

Hace más de veinte años que se conoce el beneficio del tratamiento con interferón alfa (IFN- α) en pacientes con hepatitis crónica VHC, incluso antes de la identificación del virus (Hoofnagle J et al., 1986). La monoterapia con IFN- α conduce a un marcado descenso en los niveles séricos de RNA viral y a más largo plazo al sostenimiento de esta situación tanto a nivel sérico como hepático (Lau DT et al., 1998). Desafortunadamente este tratamiento tiene un éxito limitado, con un porcentaje máximo de respuesta de 12% en periodos de 6 meses, llegando hasta un 20% cuando el tratamiento se amplía a 12 meses (Di Bisceglie AM et al., 2002). Posteriormente y con la incorporación de la ribavirina (RBV), un agente antiviral de amplio espectro, se ha elevado el porcentaje de respuesta sostenida hasta un 40% (McHutchison JG et al., 1999). Más recientemente, la utilización de una molécula modificada de IFN- α

mediante la unión covalente con la molécula de polietilenglicol (IFN- α pegilado) ha permitido disponer de un fármaco con mayor vida media y mejor perfil farmacocinético (Glue P et al., 2000). Con la incorporación de este fármaco han mejorado aún más las tasas de respuesta llegando a valores de hasta un 56% (Manns MP, 2001 et al.; Fried MW et al., 2002). En la actualidad las recomendaciones terapéuticas del *National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement* de 2002 en la infección crónica por VHC están basadas en la terapia combinada con IFN- α y RBV.

El IFN- α es una citocina con una importante función en la respuesta inmune innata antiviral, cuyo mecanismo de acción consiste en transmitir señales al interior de la célula a través de receptores situados en la superficie celular (figura 4). En esta ruta intervienen de manera acoplada las proteínas JAK-1 (Janus-activated Kinase-1) y Tyk2 (Tyrosine Kinase-2). La acción de las kinasas fosforiladas resulta en una activación de proteínas STAT-1 y STAT-2 que son traslocadas al núcleo y ejercen su acción incrementando la transcripción de genes estimulados por IFN (ISG) que codifican proteínas con actividad antiviral (adenosín deaminasa, proteín kinasa R y 2'5' oligoadenilato sintasa).

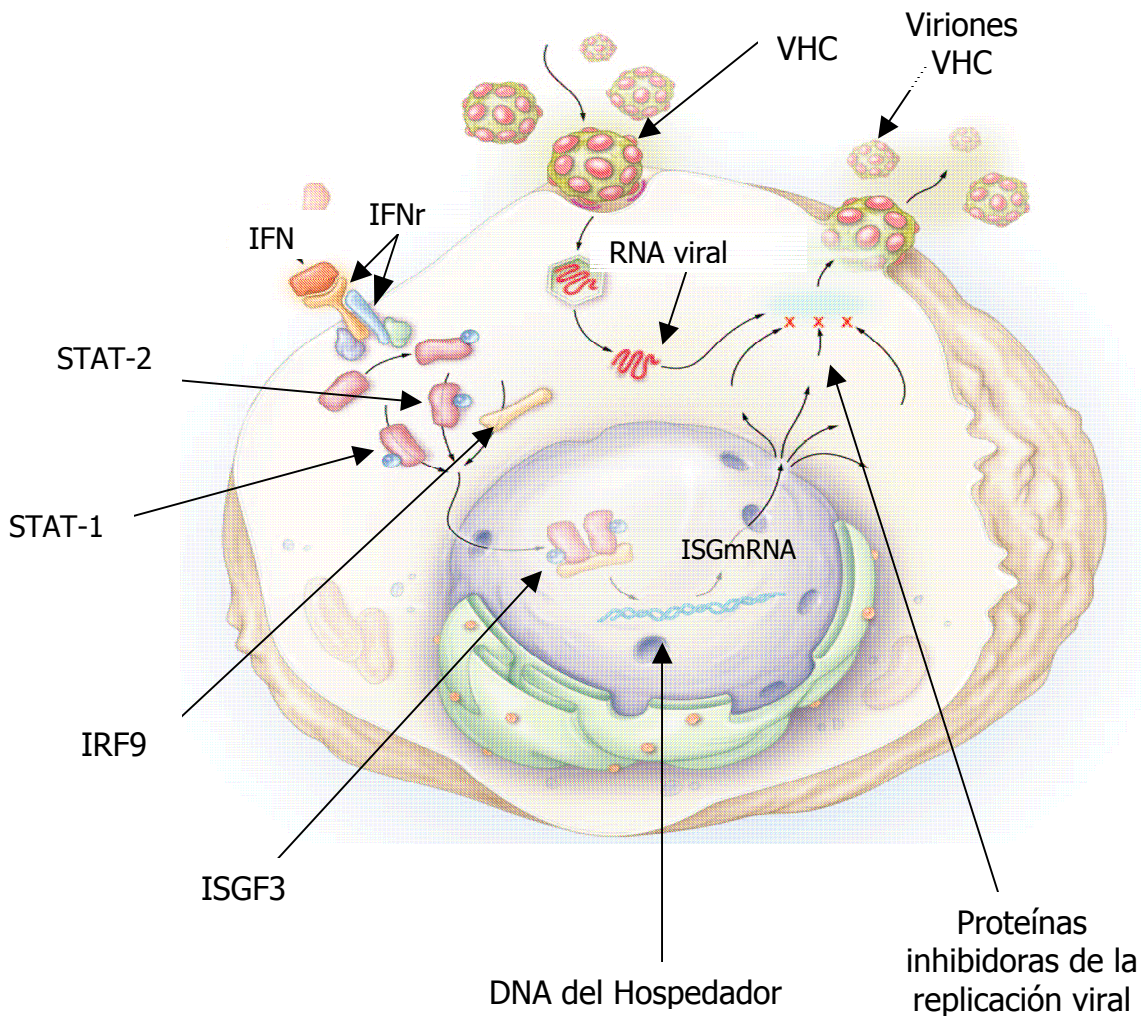


Figura 4. Mecanismo de acción propuesto para el IFN-α en la infección por VHC.

La RBV es un análogo de nucleósido (guanosina) con una gran actividad frente a patógenos virales (Feld JJ et al., 2005). Como comentamos anteriormente su incorporación en la terapia frente a VHC mejoró sustancialmente los porcentajes de respuesta viral sostenida en pacientes infectados por VHC, incrementando por un lado la proporción de casos que aclaraban el virus y disminuyendo por otro el número de recaídas. El mecanismo de acción antiviral propuesto para la RBV se desarrolla a cuatro niveles que se muestran en la figura 5. Un primer nivel a través de inmunomodulación, modificando el balance TH1/TH2. Existen evidencias de que una respuesta TH1 se relaciona con aclaramiento viral mientras que en una situación en la que predomina la respuesta TH2 se tendería a la cronificación. En este sentido, parece ser que la

RBV favorecería el balance hacia la respuesta TH1. Tanto ensayos in vitro (Tam RC et al., 1999), como la existencia de una respuesta celular más intensa en pacientes tratados con terapia combinada en relación a aquellos tratados con monoterapia apoyan esta hipótesis (Cramp ME et al., 2000). El segundo nivel de actuación sería la inhibición directa de la replicación viral, bloqueando la replicación al ser incorporada en la síntesis del material genético viral por la RNA polimerasa, y por su acción directa inhibiendo a la RNA polimerasa. El tercer mecanismo propuesto está basado en el bloqueo de la síntesis de GTP, el cual es imprescindible para la replicación viral. Finalmente, el cuarto mecanismo de acción propuesto para esta molécula es la producción de mutagénesis en el RNA viral (Contreras AM et al., 2002). A continuación, se muestran los diferentes mecanismos de acción propuestos para la RBV (figura 5).

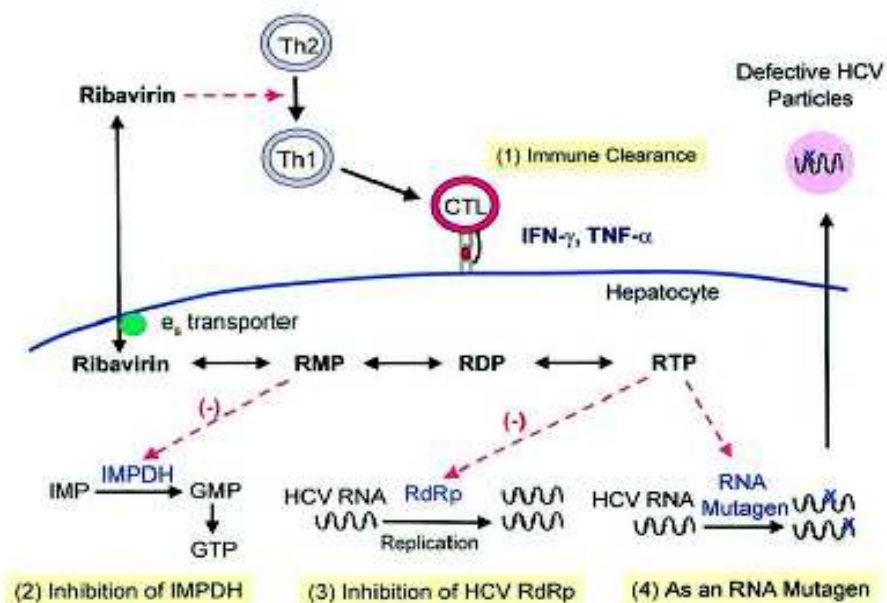


Figura 5. Modelo de acción propuesto para la ribavirina en el tratamiento de pacientes con infección crónica por VHC.

Como se ha dicho anteriormente, la respuesta al tratamiento presenta diferencias entre los pacientes. Así, los patrones de respuesta al tratamiento frente al VHC se agrupan en respuesta sostenida, respuesta al finalizar el tratamiento seguido de recaída y no respuesta. El origen de esta situación

parece ser debida fundamentalmente a factores relacionados con el virus como son fundamentalmente el genotipo del virus y otros como la carga viral. Por otro lado, existen factores relacionados con el hospedador que también tienen importancia en la respuesta al tratamiento. Así por ejemplo, condiciones tales como sexo, grado de fibrosis, edad, niveles basales de hierro, grado de resistencia a la insulina y obesidad han sido relacionados con la respuesta (Heathcote EJ et al., 2005). Además, algunos trabajos se han centrado en las diferencias detectadas en cuanto a la respuesta al tratamiento en relación con la raza (Muir AJ et al., 2004), lo que apoya la importancia del fondo genético con la respuesta al tratamiento. Así, la existencia de polimorfismos situados en genes implicados tanto en la cascada del IFN- α , como en otros genes que pudieran verse afectados por su acción (Abu-Khabar KS et al., 1992), podrían tener un papel en el resultado final de la respuesta al tratamiento.

4. La respuesta inmunitaria frente a la infección por VHC

El sistema de reconocimiento inmunológico innato que induce la expresión de genes con efecto antiviral está basado en los receptores de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que originan la inducción de IFNs de tipo 1 y desencadenan la respuesta antiviral (Sen G, 2001). En el caso de la infección por VHC, diferentes estudios basados en modelos animales han puesto de manifiesto que durante el pico de replicación viral sólo un 10 % de los hepatocitos están infectados, hecho que apoya la hipótesis de una rápida respuesta antiviral, a través de IFN α . El origen de este IFN no está del todo claro, parece que los hepatocitos infectados junto con algunas células del sistema inmune inician esta respuesta que posteriormente es amplificada (Bigger CB et al., 2001). Las células NK son claves en la respuesta inmune innata y, por tanto, juegan un importante papel en la resolución de infección por VHC ya que muchos virus inhiben la expresión de moléculas HLA como mecanismo de escape del sistema inmune adaptativo. Las células NK intervienen en mecanismos de lisis directa de células que no expresan moléculas HLA en superficie. Las moléculas HLA actúan como ligandos de los receptores inhibidores KIRs, de esta forma, al desaparecer las señales de

inhibición predomina la señal activadora por lo que se ponen en marcha los mecanismos de lisis (figura 6). Además, estas células producen $IFN\gamma$ y promueven la acumulación de células linfoides e inflamatorias en la zona de infección (Salazar-Mather TP et al., 2006).

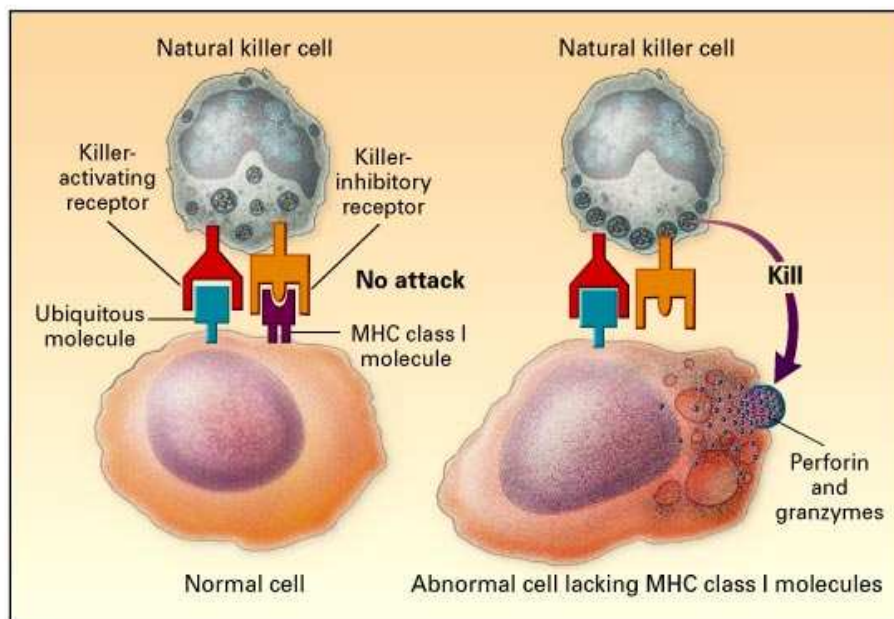


Figura 6. Mecanismo de reconocimiento y acción de las células NK

Otra interesante función de las células NK es su capacidad de estimular la maduración de las células presentadoras de antígeno (células dendríticas, CD) mediante la secreción de $IFN\gamma$ y $TNF-\alpha$, estableciendo un nexo de unión entre la inmunidad innata y adquirida (Munz C et al., 2005). En este sentido, defectos en las células NK de pacientes con infección crónica por VHC provocan alteraciones en la maduración de las CD (Jinushi M et al., 2004). Además, las CD reconocen partículas y material genético virales a través de sus receptores de superficie (receptores tipo Toll, DC-SIGN, etc), este reconocimiento puede promover la maduración de estas células (Lozach PY et al., 2004). La información actual sobre el efecto directo del VHC en la función de las CD no es

concluyente (Pachiadakis I et al., 2005), aunque algunos autores han descrito que las CD de los pacientes VHC tienen dañada la función aloestimuladora, lo que se traduce en un deficiente sistema de presentación antigénica viral (Bain C et al., 2001), y otros autores han descrito un descenso en el nivel de CD, aunque con una completa actividad funcional (Longman RS et al., 2005).

Tanto la respuesta inmune innata celular como la producción de IFN aparecen en las fases precoces de la infección por VHC. Sin embargo, la resolución de la misma depende fundamentalmente de la respuesta adaptativa. El control de la infección aguda depende de una activación vigorosa, directa, amplia y sostenida de las células T específicas para el virus (Racanelli V et al., 2003; Bowen DG et al., 2005) y la protección frente a infecciones recurrentes depende de los linfocitos T memoria CD4+ y CD8+ (Grakoui A et al., 2003; Shoukry NH et al., 2003). Las células T CD4+ son críticas en el establecimiento de una respuesta celular y humoral efectiva (Elliot LN et al., 2006). De esta forma, fallos funcionales en células específicas frente a antígenos virales se relacionan con la cronificación (Shoukry NH et al., 2004) y además, se ha demostrado en modelos animales mediante estudios de depleción celular, que la pérdida de CD4+ se relaciona con la cronificación de la infección por VHC (Grakoui A et al., 2003). En cuanto al patrón de citocinas producido por las células T CD4+ específicas para VHC, una respuesta predominantemente TH1 se asocia con la resolución de la infección (Darling JM et al., 2004; Gramenzi A et al., 2005). Al igual que ocurre con la respuesta de células T CD4+, una respuesta T CD8+ vigorosa y multiespecífica producida durante las primeras fases de la infección se relaciona con el aclaramiento viral (Cooper S et al., 1999). Las células T CD8+ presentan funciones de citotoxicidad frente a células infectadas por VHC y secretan citocinas con actividad antiviral como IFN γ y TNF- α (Neumann-Haefelin C et al., 2005). Además, ha sido descrito que las células CD8+ de sujetos que cronifican la infección pierden la capacidad de reconocimiento de uno o varios epítomos frente a los que si actuaban durante la fase primaria de infección y por tanto, en esta situación, los mecanismos de escape viral conducen a una reducción en la magnitud de la respuesta de hasta

un 85% que no es compensada con el desarrollo de nuevas especificidades frente a nuevos epítomos (Cox AL et al., 2005).

5. Genes candidatos seleccionados en el presente trabajo

Está demostrado que incluso en condiciones homogéneas de infección, pacientes contagiados con el mismo genotipo viral y una cantidad similar de inóculo evolucionan de manera muy diferente (Kenny-Walsh E, 1999). Por tanto, factores genéticos del hospedador deben modificar el resultado de la infección por este virus. Uno de los campos donde se centra la investigación de la infección por VHC en la actualidad es el estudio de estos factores genéticos. La figura 7 muestra algunos de los mediadores y genes implicados en los diferentes estadios de los procesos de cronificación, fibrogénesis hepática y respuesta al tratamiento en el contexto de la infección por VHC.

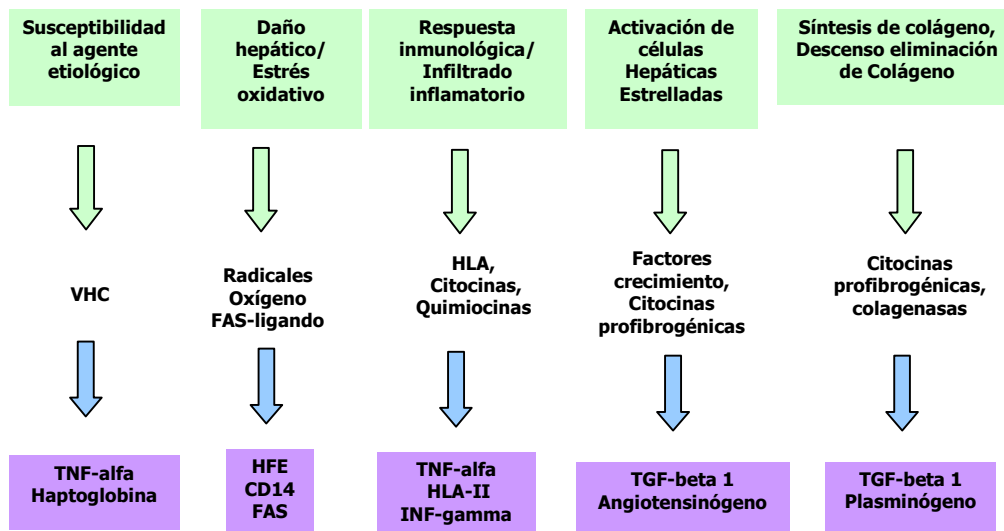


Figura 7. Esquema de la fisiopatología de la infección crónica por VHC.

Con respecto al aclaramiento viral espontáneo, existen diferentes trabajos que ponen de manifiesto el papel que juegan determinados genes del hospedador en este proceso (Khakoo SI et al., 2004; Chang KM, 2003). En relación con el desarrollo de fibrosis hepática, cabe decir que cualquier gen implicado en las diferentes rutas que convergen en la activación de las CHE y aumento de los

depósitos de las PME, es un potencial candidato con capacidad de influir en la progresión de la fibrosis hepática y posterior evolución a cirrosis. En esta línea existen diferentes estudios epidemiológicos cuyo objetivo ha sido identificar y analizar polimorfismos en genes candidatos así como la relación con la progresión de la fibrosis hepática en humanos (Bataller R et al., 2003). En relación con la respuesta al tratamiento, sería importante evaluar el papel que determinados genes del hospedador juegan en el predominio de una respuesta TH1, que favorecería la resolución de la infección por este virus.

A continuación, la tabla 1 muestra los genes candidatos que han sido seleccionados y analizados en el presente trabajo en relación con la cronificación de la infección, progresión de la fibrosis hepática y respuesta al tratamiento en pacientes con infección por VHC.

Cronificación	Fibrosis	Tratamiento
KIR2DL1	CCR2	CCR2
KIR2DL2	CCL2/MCP-1	CCL2/MCP-1
KIR2DL3	TNF- α	TNF- α
HLA-Cw*	TGF- β 1	TGF- β 1
CCR2	ECA	HFE
CCL2/MCP-1	HFE	SLC11A1
TNF- α	SLC11A1	
TGF- β 1		

Tabla 1. Genes candidatos seleccionados en relación con la cronificación, progresión de la fibrosis hepática y respuesta al tratamiento en la infección por VHC

5.1. KIRs (Killer cell immunoglobulin like receptor)

Las células NK están reguladas por una serie de receptores, algunos de los cuales reconocen como ligandos a moléculas MHC de clase I. En el hombre, estos receptores se engloban dentro de la familia KIR. Los genes que codifican los KIR se localizan en el Complejo Receptor de los Leucocitos (LCR), concretamente en el brazo largo del cromosoma 19 (19q13.4). La organización de los genes KIR es bastante compleja, y actualmente se conocen unos 14 genes KIR y 2 pseudogenes, que codifican una serie de receptores activadores e inhibidores que se expresan en la superficie de las células NK y en algunos subtipos de células T. La composición génica de esta región difiere de unos individuos a otros y estas diferentes combinaciones génicas originan básicamente dos haplotipos distintos bien definidos. El haplotipo A es más simple, conservado y está constituido por un número fijo de nueve genes entre los que se incluyen seis genes KIR inhibitorios, un gen KIR activador y dos pseudogenes. El haplotipo B es más extenso, complejo y variable, y se caracteriza por presentar más genes KIR activadores (Uhrberg M et al., 1997). Los haplotipos A y B se diferencian porque el primero presenta el gen 2DL3 y el segundo el gen 2DL2 en la mayoría de los casos. Sus ligandos son moléculas MHC de clase I y en función de las interacciones que se establecen entre ambos las señales resultantes para la función de las células pueden ser tanto activadoras como inhibitoras (Parham P, 2005). A continuación, la figura 8 muestra la distribución del sistema genético KIR en el hombre.

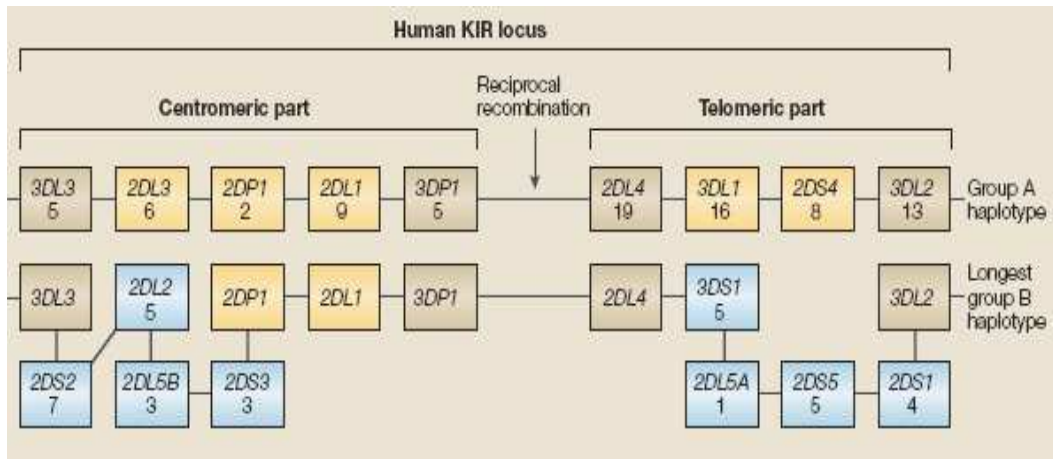


Figura 8. Esquema de la composición génica de los haplotipos KIR más frecuentes.

La estructura de los receptores KIRs que se muestra en la figura 9 contiene dos (KIR2D) o tres (KIR3D) dominios similares a los de las inmunoglobulinas, seguidos de una región transmembrana que puede ser larga (L) con una o dos regiones ITIM que contribuyen a la señalización inhibitoria, o bien una región transmembrana corta (S) con regiones ITAM que requieren la interacción con una molécula adaptadora denominada DAP12, y que determinan una señalización activadora (Rajagopalan S et al., 2005).

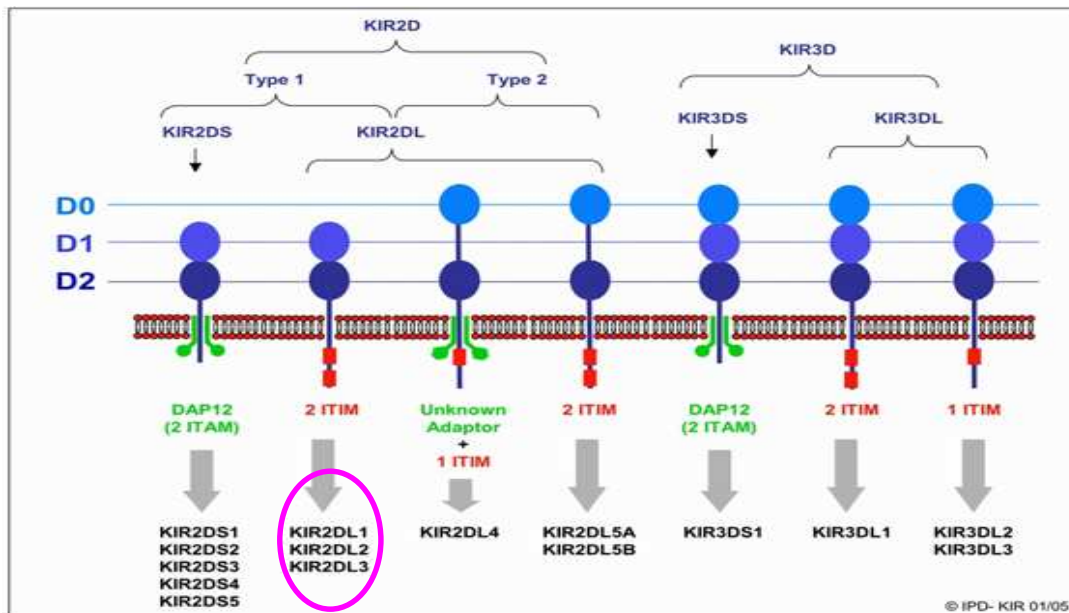


Figura 9. Estructura de los diferentes tipos de receptores KIR

En la actualidad, se desconocen la mayoría de los ligandos de los diferentes receptores KIRs, sin embargo, se sabe que los receptores 2DL1, 2DL2 y 2DL3 que son los mejor caracterizados, establecen uniones con diferentes moléculas HLA-Cw. Además, las diferentes uniones que se establecen pueden ser fuertes (KIR2DL1/HLA-C2 y KIR2DL2/HLA-C1) o débiles (KIR2DL3/HLA-C1) (Winter CC et al., 1998). Por otro lado, su papel en relación con la evolución y resultado de diferentes enfermedades infecciosas y no infecciosas ha sido puesto de manifiesto en diversos estudios. Así, por ejemplo se ha establecido asociación entre el desarrollo de neoplasia cervical inducida por virus del papiloma humano (VPH) y el receptor KIR3DS1 (Carrington M et al., 2005). Además otros trabajos han establecido la existencia de un retraso en la evolución a SIDA de pacientes con infección VIH, en relación a la combinación de determinados genes KIR (3DS1) y HLA (HLA-Bw4) (Martin MP et al., 2002). Finalmente, se ha establecido una relación similar entre genes KIR y HLA en el contexto del aclaramiento del virus de la hepatitis C (Khakoo SI et al., 2004).

5.2. MHC clase I

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano (HLA), se encuentra situado en la región 6p11-22 y comprende aproximadamente 4 centimorgans (cM) de DNA (4×10^6 pares de bases) e incluye más de 200 genes conocidos, aunque es probable que tanto la extensión como el número de genes reales sean mayores (Janeway C Jr et al., 2003). Estos genes codifican diferentes proteínas con funciones clave en la respuesta inmune. Dentro del sistema HLA se diferencian tres grupos de genes que codifican las denominadas moléculas de clase I, clase II y clase III (figura 10).

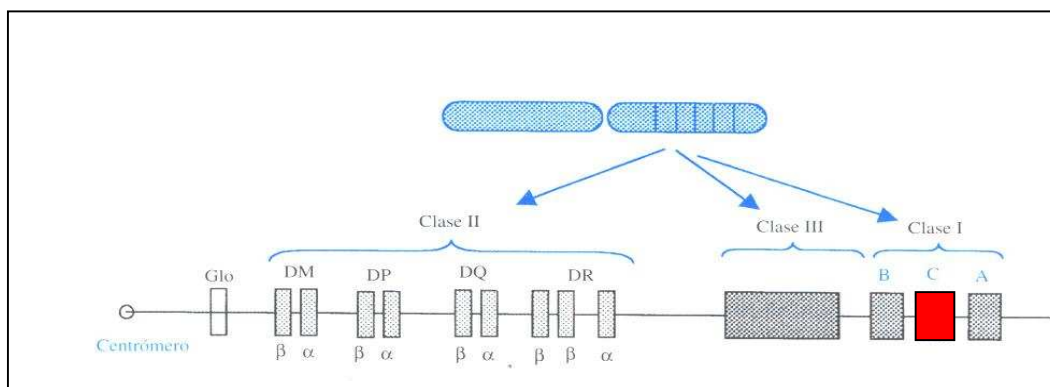


Figura 10. Localización cromosómica y organización general del MHC

Las moléculas de clase I son heterodímeros constituidos por una cadena pesada glicoproteica, de unos 45 Kd de peso molecular, codificada por los genes del MHC, asociada de forma no covalente con una cadena ligera de 12 Kd de peso molecular, denominada β 2-microglobulina codificada por un gen situado fuera de la región MHC. Las moléculas de clase I se expresan en la superficie de todas las células nucleadas del organismo y presentan péptidos a células T CD8. La cadena pesada contiene unos 350 aminoácidos y es una proteína típica de membrana que consta de tres regiones: extracelular, transmembrana y citoplasmática (figura 11). La región extracelular, que comprende 283 aminoácidos, presenta tres dominios diferentes α 1, α 2 y α 3. Los dominios α 1,

$\alpha 2$ constituyen la zona de unión al péptido, y el dominio $\alpha 3$, presenta un puente disulfuro intracatenario y constituye la zona de unión a la $\beta 2$ -microglobulina. La región transmembrana comprende unos 25 aminoácidos hidrofóbicos y se continúa con la porción intracitoplasmática formada por unos 30 aminoácidos.

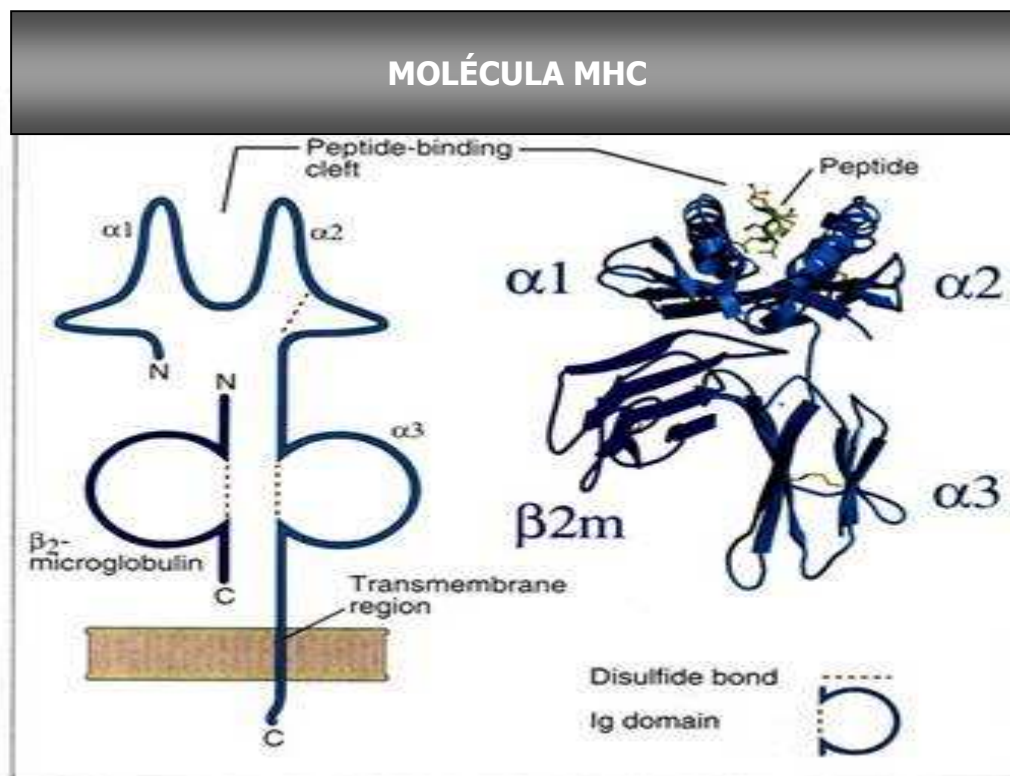


Figura 11. Estructura de las moléculas MHC de clase I

Los genes HLA-clase I presentan 8 exones separados entre sí por 7 intrones. En la figura 12 se muestra la organización intrón-exón de un gen HLA-clase I.

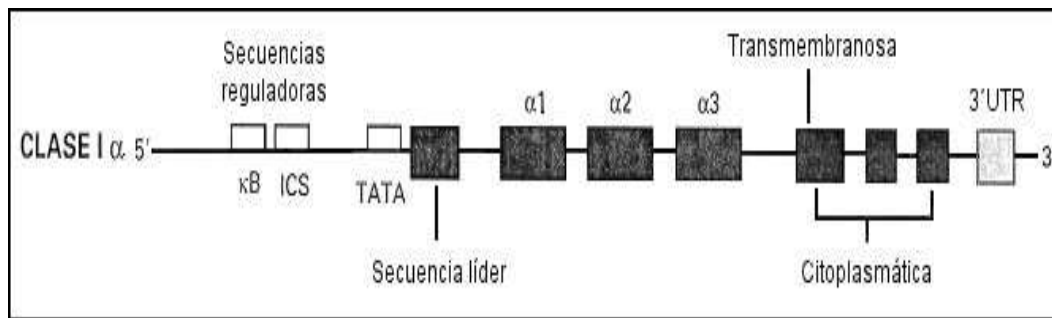


Figura 12. Estructura intrón-exón de un gen HLA de clase I.

El primer exón codifica la secuencia líder de 21-24 aminoácidos, los exones 2, 3 y 4 codifican los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ respectivamente, el exón 5 codifica el péptido que conecta la región extracelular con la porción transmembrana, la propia región transmembrana y parte de la región intracitoplasmática. El resto de la región intracitoplasmática está codificada por los exones 6 y 7, y el exón 8 codifica la región 3' UTR del gen (Marsh S et al., 2000).

Las moléculas de clase I, generalmente unen péptidos derivados de proteínas sintetizadas en el citoplasma de la célula y los presentan a las células T CD8 (restricción MHC), por lo que intervienen en la regulación de la inmunidad adaptativa. Además, estas moléculas son los ligandos de los KIR de las células NK, por lo que intervienen en la regulación de la inmunidad innata ya que, aunque la respuesta de estas células no está restringida por MHC si está condicionada por determinadas moléculas HLA. Hay tres tipos diferentes de moléculas HLA de clase I clásicas: HLA-A, B, Cw. Las moléculas HLA-Cw son ligandos conocidos de los KIRs y se clasifican en dos grupos denominados HLA-C1 y HLA-C2 en función de que presenten en la posición 80 de la secuencia aminoacídica una Asn o Lys respectivamente.

5.3. Quimiocinas y receptores de quimiocinas

Las quimiocinas o citocinas quimioatrayentes constituyen una familia de proteínas de bajo peso molecular (7-12 KDa), con un alto grado de homología entre ellas y que presentan cuatro residuos de Cys a lo largo de su secuencia

aminoacídica. En función de sus propiedades estructurales se agrupan en: CXC o α -quimiocinas y las CC o β -quimiocinas. El primer grupo presenta un residuo aminoacídico cualquiera (X) entre las dos primeras Cys, mientras que en el segundo grupo los dos residuos Cys se encuentran adyacentes. Además, estas diferencias estructurales se acompañan de una diferente localización cromosómica: 4q13 para las CXC y 17q11-12 para las CC. Se sabe que ambos grupos de citocinas actúan sobre distintos tipos celulares dentro y fuera del sistema leucocitario, así, en general, las CXC actúan sobre neutrofilos y CC sobre monocitos y linfocitos T (Rollings BJ, 1997). Existen dos quimiocinas que no cumplen esta regla estructural, la linfotactina, que carece de dos de los cuatro residuos de Cys, cuyo gen se localiza en 1q, y que ejerce su acción sobre los linfocitos T y la fractalquina o neurotactina que se caracteriza por la presencia de tres aminoácidos entre las dos primeras Cys (CX₃C), cuyo gen se localiza en 16q13 y que es quimiotáctica para células NK (Bazan JF et al., 1997).

La proteína quimioatrayente de monocitos (CCL2/MCP-1), fue una de las primeras quimiocinas de la familia CC en ser caracterizadas (Matsushima K et al., 1989). CCL2/MCP-1 es una potente β -quimiocina, que ha sido relacionada con el desarrollo de fibrosis en diferentes órganos. La primera vez que se vinculó esta quimiocina con la fibrosis fue en un modelo animal de rata (Xu Y et al., 1996). A partir de entonces se han publicado diferentes trabajos, algunos de los cuales han puesto de manifiesto la relación entre fibrosis renal y CCL2/MCP-1 (Vielhauer V et al., 2001; Wada T et al., 2004). Por otro lado, esta quimiocina, es producida por macrófagos activados en respuesta a la infección por VHC y en el contexto del proceso inflamatorio parece ser un importante regulador de la homeostasis de citocinas (Marra F et al., 1999). Además, los niveles séricos de CCL2/MCP-1 se han encontrado alterados en sujetos con infección por VHC (Narumi S et al., 1997). Todo ello sugiere que esta citocina pueda desempeñar un papel en el aclaramiento viral espontáneo.

Además, desde que fue descrito el polimorfismo funcional de la posición -2518 del promotor del gen CCL2/MCP-1 (Rovin BH et al., 1999), se han realizado estudios de asociación entre este dimorfismo y el desarrollo de fibrosis

hepática, en el contexto de la infección por VHC. Se ha descrito que este polimorfismo tiene relevancia funcional porque parece existir un aumento en la expresión de esta quimiocina en aquellos individuos portadores del alelo G (GG y/o AG) respecto de aquellos que no lo llevan (AA) y además este aumento se ha relacionado con un mayor grado de fibrosis hepática (Muhlbauer M et al., 2003).

Las quimiocinas ejercen su acción mediante la interacción con receptores específicos que están presentes en la membrana de las células diana. Una característica de estos receptores es la presencia de dominios de tipo serpina o rodopsina, que son dominios hidrofóbicos que atraviesan la membrana siete veces, por lo que se les denomina 7TM. La mayoría de ellos están acoplados a proteína G y presentan tres asas extracelulares y otras tres intracelulares. A continuación la figura 13 muestra un esquema típico de estos receptores (Amatruda TT et al., 1993).

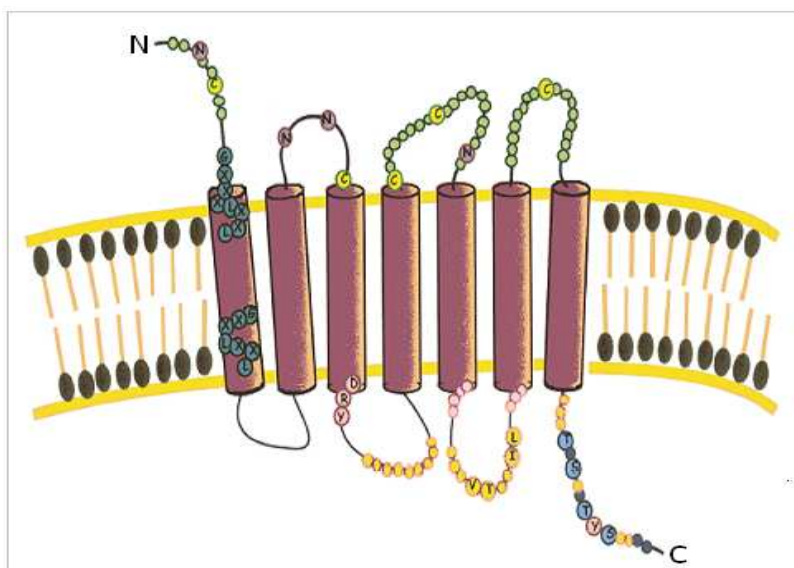


Figura 13. Estructura de un receptor de quimiocinas 7TM. Los círculos verdes representan las zonas de unión con el ligando y los amarillos la zona de acoplamiento con la proteína G.

En la actualidad es bien conocido que el principal receptor de la quimioquina CCL2/MCP-1 es CCR2. Desde la descripción de esta molécula receptora hace más de diez años (Charo IF et al., 1994), diferentes estudios realizados en modelos animales han demostrado la implicación de estos receptores en el desarrollo y progresión de fibrosis en diferentes órganos tales como pulmón y riñón (Moore BB et al., 2005; Kitagawa K et al., 2004). Estudios recientes con técnicas de PCR cuantitativa y análisis de mRNA en pacientes con infección crónica por virus de la hepatitis C han puesto de manifiesto la existencia de diferentes perfiles de expresión génica en relación con la evolución de la enfermedad, siendo CCR2 un candidato claramente implicado en estos procesos (Asselah T et al., 2005; Bieche I et al., 2005). Se sabe que determinados receptores de citocinas actúan como receptores o correceptores virales, por ejemplo, es bien conocido el papel de CCR5 en la infección por VIH. El gen que codifica CCR2 se encuentra en la región 3p21 y se ha descrito un polimorfismo en posición 190 G>A que se traduce en un cambio de Val por Ile en posición 64. Este cambio podría traducirse en alteraciones, tanto de la afinidad por su ligando como de la cascada de eventos profibrogénicos que se producen tras la infección por VHC. También se sabe que los individuos con mutación Ile64Val en CCR2 evolucionan más lentamente a SIDA (Smith MW et al., 1997; Dean M et al., 1996). El papel de esta mutación en la progresión de la infección por VIH no está bien explicado. Se ha propuesto que los niveles de diferentes isoformas de CCR2 sean determinantes en la evolución de esta infección. La molécula CCR2 puede presentar dos isoformas, una de superficie CCR2b y otra que aparece fundamentalmente en el citosol de la célula CCR2a (Nakayama E et al., 2004). La expresión de una u otra isoforma depende de mecanismos de splicing alternativo. CCR2 forma heterodímeros con CCR5 de manera que aquellos individuos que produjeran mayor cantidad de CCR2a podrían tener reducida la expresión de CCR5 en superficie. La existencia de un *SNP* próximo a la región de splicing podría favorecer una isoforma sobre la otra. Además, han sido descritas alteraciones de la carga viral en relación con CCR5 en pacientes infectados por VHC (Woitas RP et al., 2002) y más recientemente se ha

sugerido el posible papel de estos receptores en el aclaramiento viral espontáneo (Mascheretti S et al., 2004).

5.4. Citocinas

Son moléculas estructuralmente diversas que se comportan como mensajeros del sistema inmunológico. Además, respecto del patrón de citocinas liberadas por las células T CD4+ específicas frente al virus VHC, y en relación al balance TH1/TH2, se ha sido descrito que existe un patrón de respuesta de citocinas con capacidad antiviral en sujetos que aclaran la infección (Gramenzi A et al., 2005).

TNF- α es una citocina proinflamatoria con actividad citotóxica y antiviral que promueve desgranulación de neutrófilos, expresión de moléculas HLA-clase II en células T activadas, síntesis de inmunoglobulinas y proliferación de células B (Balkwill FR et al., 1989). El gen TNF- α se encuentra en 6p11-22 dentro de la región HLA de clase III. Se expresa en fagocitos mononucleares activados, células T estimuladas con antígeno, células NK y mastocitos activados.

Se ha descrito que la expresión de TNF- α se encuentra aumentada en pacientes con infección por VHC (Nelson DR et al., 1997). Se han postulado diferentes hipótesis que vinculan el efecto de TNF- α con el daño hepático. En este sentido, una posible vía de actuación estaría situada en la fase inflamatoria en la que los hepatocitos cargados con proteínas virales, liberarían esta citocina y activarían las CHE que dispararían los mecanismos de fibrosis. En la actualidad existen trabajos contradictorios referentes a la relación de esta citocina proinflamatoria con la progresión a fibrosis y posterior desarrollo de cirrosis en pacientes con infección crónica por VHC (Yee LJ et al., 2000; Powell EE et al., 2000). Por otro lado, existen trabajos con diferentes resultados en cuanto al papel que juega TNF- α en el aclaramiento viral espontáneo y en la cronificación de la enfermedad (Hohler T, et al., 1998; Barrett S et al., 2003).

Se han identificado varios polimorfismos en la región promotora del gen TNF-A, entre ellos el situado en posición -307 G>A que parece estar relacionado con un incremento en la transcripción del gen (Wilson AG et al., 1997) y el descrito en la

posición -237 G>A (D'Alfonso S et al., 1994), cuyo posible efecto sobre la expresión de este gen no está aún aclarado.

TGF- β 1, es un prototipo de citocina que se caracteriza por tener un efecto pleiotrópico, actuando sobre diferentes dianas celulares. Esta molécula es capaz de inhibir células de origen mieloide, epitelial y linfoide, además de estimular la proliferación de fibroblastos normales, de células no epiteliales y de ciertas células mesenquimales (Sport MB et al., 1992).

Las alteraciones en los niveles plasmáticos de esta citocina, han sido correlacionadas con el desarrollo de diferentes patologías tales como aterosclerosis (Densem CG et al., 2000) y enfermedades fibróticas (Arkwright PD et al., 2000). Sin embargo, los factores que influyen en las variaciones de los niveles de esta citocina en la circulación no se conocen bien. Se ha propuesto que la producción de TGF- β 1 y por lo tanto su relación con la fibrosis está bajo control genético. Sin embargo, se ha demostrado que el nivel de esta citocina en la circulación es dependiente del grado de insuficiencia hepática, posiblemente debido a un aumento de la producción local, o a una reducción en el nivel de aclaramiento. En este sentido existen diferentes estudios con modelos animales realizados *in vitro* e *in vivo* donde se pone de manifiesto el papel central de esta citocina en el establecimiento y progresión de la fibrosis a través de la activación de CHE (Nakamura T et al., 2000; Arias M et al., 2003). Por otro lado esta citocina es producida por células hepáticas infectadas por VHC y actúa suprimiendo la proliferación y la citotoxicidad de las células NK, que como ya se ha comentado, juegan un importante papel en el aclaramiento viral espontáneo.

El gen TGF- β 1 está situado en la región 19q13 y codifica un precursor pre-pro TGF- β 1 de unos 390 aa, que incluye una secuencia señal de 29 aminoácidos que es liberada para producir pro-TGF- β 1. Posteriormente y por rotura en una zona dibásica en el aa 278 se origina la forma activa constituida por dímeros de 25 kDa. Se ha sugerido que determinados polimorfismos genéticos podrían estar asociados con elevaciones plasmáticas de esta citoquina (Grainger DJ et al., 1999). Así, el polimorfismo CGG>CCG, en el codón 25 (exón-1) de este gen que origina un cambio de Arg por Pro, se ha relacionado por un lado con un

incremento en la velocidad de producción de esta citocina por los leucocitos (Awad MR et al., 1998) y por otro lado con el incremento en el riesgo de infarto de miocardio (Cambien F et al., 1996), el desarrollo de fibrosis pulmonar en sujetos trasplantados (Awad MR et al., 1998) así como con el grado de fibrosis hepática en sujetos con infección crónica por VHC (Powell EE et al., 2000; Gewaltig J et al., 2002).

5.5. El sistema renina-angiotensina

El sistema renina-angiotensina (SRA) ha sido considerado tradicionalmente como un regulador endocrino de la presión arterial (Lavoie JL et al., 2003). En este sistema, cuyos componentes actúan en cascada, la primera molécula que se sintetiza en los hepatocitos es el angiotensinógeno. Este precursor es posteriormente liberado al torrente circulatorio donde se transforma en angiotensina I (AI), por la acción de la renina. A continuación, a partir de la AI, y por acción del enzima convertidora de angiotensina (ECA), se obtiene la angiotensina II (AII), que es la principal molécula efectora del sistema y cuya acción vasoconstrictora se realiza a través de la unión a receptores AT1. Además otras acciones descritas son: crecimiento tisular, profibrogénesis y actividad proinflamatoria (figura 14).

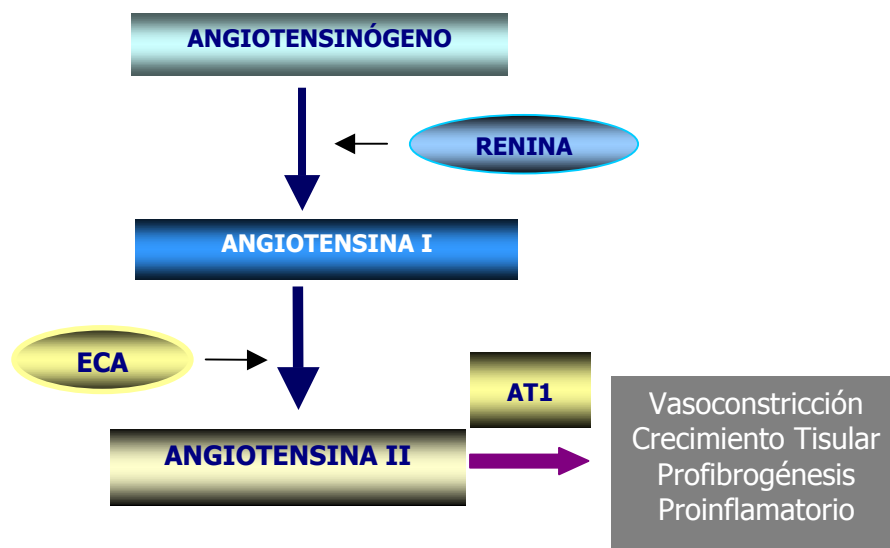


Figura 14. Cascada del sistema renina-angiotensina.

Además de esta acción endocrina tradicionalmente aceptada, se ha puesto de manifiesto en diferentes órganos una acción local de los componentes del SRA que es regulada mediante estímulos originados in situ, y que fundamentalmente obedece a daños agudos o crónicos (Varagic Jet al., 2002). Existen diferentes trabajos desarrollados en modelos animales que apoyan la

relación entre los componentes de este sistema y el desarrollo de fibrosis en diferentes órganos diana, tales como el corazón (Ocaranza MP et al., 2004). Actualmente existen datos en relación con la presencia de receptores específicos de AII en las CHE. Además, AII está relacionada con la expresión de TGF- β 1 que es un factor de crecimiento con un papel central en los mecanismos de fibrogénesis, por lo que la acción de inhibidores específicos como ECA, podrían modular estos procesos (Bataller R et al., 2000). En la misma línea y en relación con el desarrollo de fibrosis hepática existen estudios realizados en un modelo de rata en el que se vincula la inhibición de la ECA con una menor progresión de la fibrosis (Jonsson JR et al., 2001; Paizis G et al., 2002). Además, recientemente se han realizado estudios en el campo de la fibrosis hepática inducida tras infección por VHC en el que se analizan diferentes polimorfismos en genes que participan a distintos niveles en el SRA (Forrest EH et al., 2005).

La estructura del gen ECA humano se muestra en la figura 15. Este gen forma parte del SRA y se encuentra localizado en la región cromosómica 17q23; presenta un polimorfismo consistente en la presencia (inserción, I) o ausencia (delección, D) de un fragmento de 287 pares de bases en el intrón 16 del gen, que explica hasta un 47% de la variabilidad fenotípica de la proteína a nivel plasmático. Concretamente, se ha visto que el alelo D se asocia a unos niveles plasmáticos aumentados de ECA (Rigat B et al., 1990).

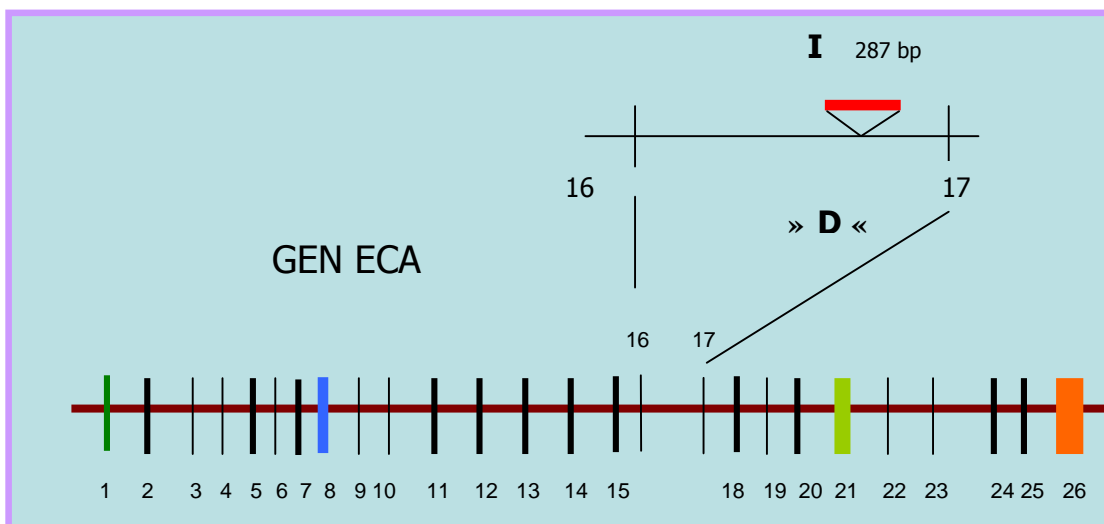


Figura 15. La figura muestra la estructura del gen ACE con la zona de inserción de 287 bp en el intrón 16.

5.6. Genes implicados en el metabolismo del hierro

Desde 1976 se conoce la asociación del gen de la hemocromatosis hereditaria (HH) con el locus HLA-A situado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p). Sin embargo, el gen responsable de la HH (HFE) no fue identificado hasta 1996 mediante técnicas de clonación (Feder JN et al., 1996). El gen HFE es similar a los genes HLA de clase I (Bacon BR et al., 1999). A diferencia de otras proteínas HLA clase-I, HFE no tiene la función presentadora de antígenos, debido a diferencias en los bucles del dominio extracelular (Lebron JA et al., 1998).

Diferentes trabajos han documentado que entre 64-100% de los pacientes con HH son homocigotos para una mutación puntual en el exón-4 del gen HFE, que resulta en una sustitución de Cys por Tyr en el posición 282, que suprime el puente disulfuro del bucle alfa-3 del dominio extracelular de la proteína HFE, lo que impide la unión con la β_2 -microglobulina y por tanto la expresión de la proteína en membrana (Andrews NC et al., 1998). Otros cambios descritos se localizan en el exón-2, a nivel de los codones 63 (His por Asp) y 65 (Cys por Ser) y no tienen un efecto tan claro en la HH (Pietrangelo A et al., 1999).

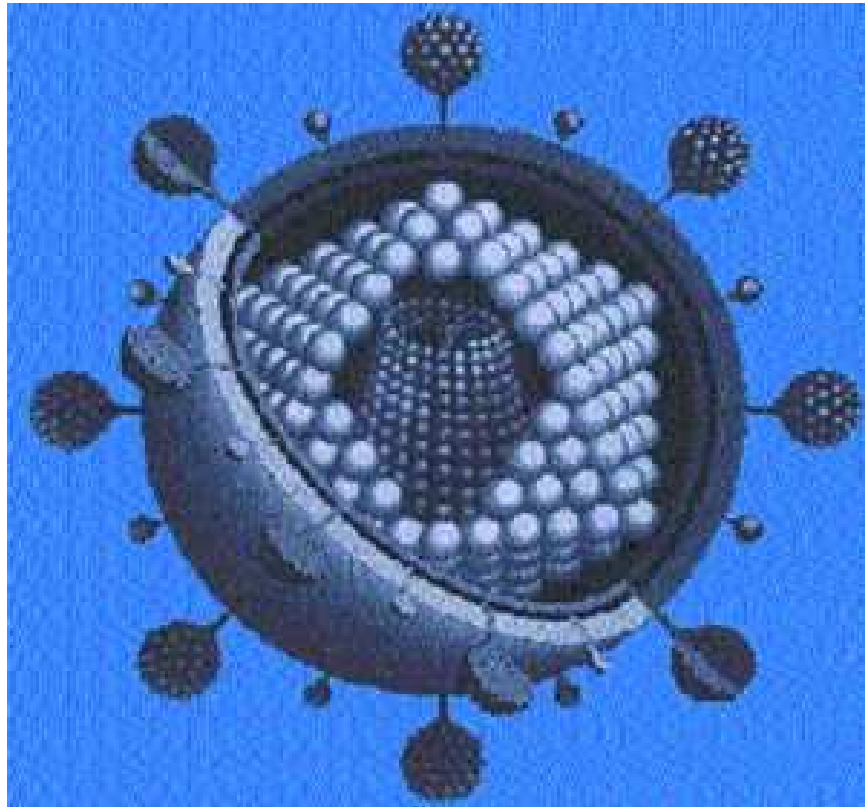
El hígado es uno de los primeros órganos afectados por la sobrecarga férrica. Este órgano sufre un aumento progresivo de tamaño debido al depósito continuado de hierro, conduciendo a un desarrollo progresivo de fibrosis que

desemboca en cirrosis hepática, insuficiencia hepática e incluso hepatocarcinoma. En este contexto, y dado que es frecuente un incremento medio-moderado del hierro hepático en los pacientes con infección por VHC, se han publicado diferentes estudios (Piperno A et al., 1998; Smith BC et al., 1998; Thorburn D et al., 2002; Gehrke SG et al., 2003; Tung BY et al., 2003) en los que se analiza la posible implicación de mutaciones en el gen HFE y la progresión a fibrosis hepática y/o cirrosis en el contexto de la infección crónica por VHC.

SLC11A1, anteriormente denominado *Nramp1* es una proteína transportadora de cationes divalentes localizada a nivel del endosoma tardío de macrófagos en reposo y reclutada al fagosoma mediante mecanismos de fagocitosis (Gruenheid S et al., 1997). Inicialmente se le atribuyó un importante papel en la regulación de la resistencia y susceptibilidad frente a determinadas infecciones (HU J et al., 1997), así como en relación con enfermedades inflamatorias, tales como la artritis reumatoide (Shaw MA et al., 1996). Además, como resultado de diferentes estudios funcionales realizados en modelos murinos se ha demostrado la implicación de esta molécula en diferentes funciones de los macrófagos, entre las que se incluyen el aumento de la expresión de determinados genes como TNF, IL-1 β , TGF- β 1 así como la inducción de la óxido nítrico sintasa (iNOS), todos ellos involucrados en el desarrollo de fibrosis hepática en la infección por VHC (Blackwell JM et al., 2003). Además, otros trabajos han permitido establecer nuevas hipótesis en relación con otras funciones de esta molécula. Así, por ejemplo, se sabe que interviene en el control de la homeostasis del hierro en macrófagos, habiéndose demostrado que la proteína funciona como un transportador de hierro y que se satura cuando la concentración en la circulación es elevada (Levy JE et al., 2000).

El gen SLC11A1 está situado en el cromosoma 2, concretamente en la región 2q35. Tiene un tamaño de 12 Kb, y contiene 15 exones. Entre los diferentes polimorfismos identificados, uno de ellos consiste en un número variable de repeticiones cortas en tándem "GT" (STR) situadas en la región promotora. Los diferentes alelos que se han descrito en varias poblaciones son: Alelo 1, (GT)₅

AC (GT)₁₁ G; alelo 2, (GT)₅ AC (GT)₁₀ G; alelo 3, (GT)₅ AC (GT)₉ G; y alelo 4, (GT)₉ G. Se han descrito diferencias funcionales en estos alelos, así, el alelo 3 presenta un alto grado de expresión en ausencia de estímulos externos mientras que la expresión de los alelos 1, 2 y 4 es menor en estas condiciones (Bellamy R, 2003).



OBJETIVOS Y DISEÑO

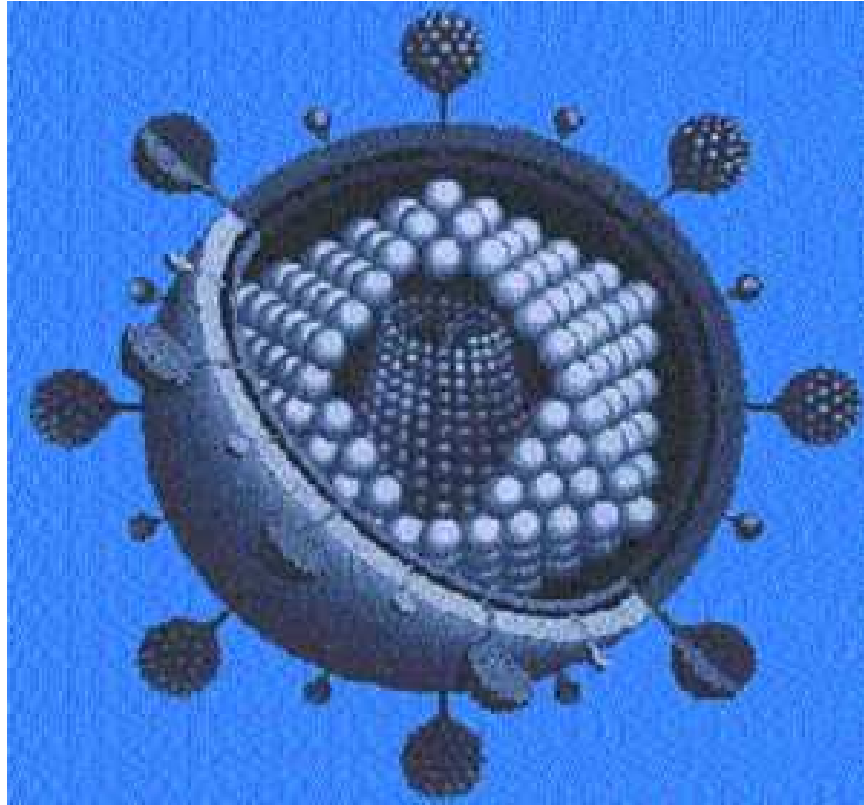
II. OBJETIVOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

El objetivo del presente trabajo ha sido profundizar en el conocimiento de las bases genéticas implicadas en:

- 1) La respuesta inmunológica a la infección por virus de la hepatitis C (VHC) que determina, bien el aclaramiento del virus o por el contrario, la cronificación de la infección.
- 2) El grado de afectación hepática que presentan los pacientes que cronifican la infección, que varía desde fibrosis leve-moderada hasta cirrosis.
- 3) La diferente respuesta frente a la terapia antiviral que se observa en estos pacientes.

El diseño experimental utilizado para el logro de estos objetivos ha sido un estudio de casos-controles utilizando una estrategia basada en proponer una serie de genes candidatos de acuerdo con su función.

Para dar respuesta a nuestro primer objetivo se asignaron como casos los pacientes con infección crónica por VHC y como controles los sujetos con aclaramiento viral espontáneo. Para alcanzar nuestro segundo objetivo se consideraron como casos aquellos sujetos con infección crónica VHC en estadio de fibrosis avanzada o cirrosis, y como controles aquellos pacientes con infección viral que presentaban un grado moderado o no presentaban fibrosis. Por último, para estudiar la relación con la respuesta a la terapia se asignaron como casos aquellos sujetos sin respuesta sostenida y como controles aquellos que respondieron al tratamiento. En todos los casos se realizó un análisis de cada variable por separado, así como un estudio conjunto. La cohorte de pacientes incluida en el presente estudio presentaba características genéticas y criterios de seguimiento homogéneos.



PACIENTES Y MÉTODOS

III. PACIENTES Y MÉTODOS

1. Pacientes

Todos los pacientes fueron diagnosticados en el Servicio de Digestivo de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío y la Sección de Hepatología del Hospital de Valme. Todos los pacientes seleccionados procedían del área de Sevilla y sus alrededores y dieron su consentimiento informado para la inclusión en este trabajo.

1.1. Sujetos con aclaramiento viral espontáneo

Se incluyeron un total de 65 pacientes, 28 (43.1%) hombres y 37 (56.9%) mujeres con aclaramiento viral espontáneo. Este grupo de sujetos presentaba anticuerpos específicos frente VHC detectados mediante técnicas de EIA. No se detectó RNA viral mediante técnicas de RT-PCR específica en tres determinaciones independientes.

1.2. Pacientes con infección crónica

Se incluyeron un total de 284 pacientes, 166 (58.4%) hombres y 118 (41.6%) mujeres con infección crónica por VHC. Estos pacientes presentaban anticuerpos específicos frente al VHC mediante técnicas de EIA y RNA viral confirmado mediante técnicas de RT-PCR. La edad media de los pacientes en el momento de la inclusión en el estudio fue de 42.5 ± 11.3 con un rango de 21-75 años. En 194 (68.3%) pacientes se pudo determinar la ruta de infección. El 58.2% había sido sometido a una intervención quirúrgica o transfusión; el 29.9% era consumidor activo o había consumido drogas por vía parenteral y el 11.8% restante tenía antecedentes de riesgo laboral, sexual o se había realizado algún tatuaje. Las características clínico-epidemiológicas de estos pacientes se muestran en la tabla 2.

Características clínico-epidemiológicas de los pacientes con Infección crónica por VHC		
Sexo (Hombre/ Mujer)	(166/118)	
	Media ± σ	Rango
Edad Infección (156)	24.3±11.4	1-57
Tiempo de evolución * (153)	16.05 ±9.6	0-44
Edad primera biopsia (225)	40.2±11.8	16-70
Carga Viral (10 ⁶) copias /ml (150)	1.29±1.3	0.0015-6.3
GOT (ALT)	67.6±44.3	16-300
GPT (AST)	121.3 ± 100.9	16-660
GGT	53.9± 53.8	10-472
FA	181.35± 65.6	73-637
Genotipo Viral	(%)	
G1	81.0	
Resto	19.0	

Tabla 2. Características clínico-epidemiológicas de los pacientes incluidos en este estudio.

*Tiempo transcurrido en años desde la fecha probable de infección hasta la primera biopsia. El número entre paréntesis indica los pacientes incluidos en el análisis.

A cada paciente se le realizó una biopsia hepática percutánea, siendo clasificados según el grado de fibrosis hepática detectada mediante técnicas histoquímicas y anatomo-patológicas de acuerdo con los criterios Scheuer (Scheuer PJ, 1991). Los pacientes quedaron incluidos en dos categorías. Un primer grupo de 202 pacientes se clasificaron como no fibróticos o fibróticos leves (F0-F2) y un segundo grupo de 82 pacientes como fibróticos avanzados o

cirróticos (F3-F4). La figura 16 muestra la distribución de los pacientes con infección crónica por VHC estratificados según el grado de fibrosis hepática.

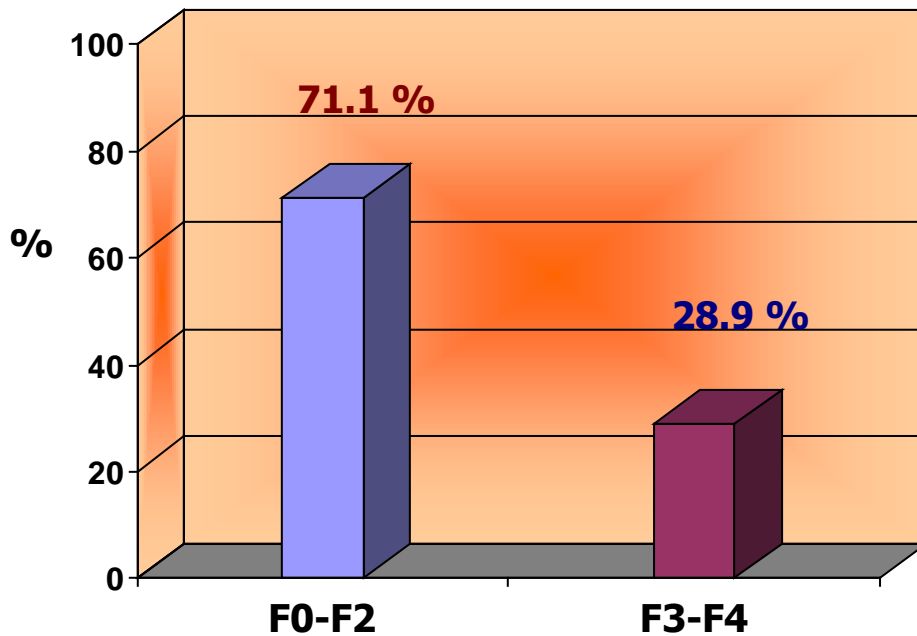


Figura 16. Distribución de pacientes según grado de fibrosis

1.3. Terapia antiviral y respuesta

La monoterapia con IFN- α recombinante fue administrada a un total de 199 pacientes pautaada en tres veces por semana durante un periodo de un año. La terapia combinada IFN- α +ribavirina se administró en 104 pacientes. De estos, 58 eran "naive" y 46 eran pacientes que habían recaído después del tratamiento con IFN- α . Según la respuesta a la terapia los pacientes se clasificaron en dos grupos, el grupo de respuesta sostenida (RS) que incluye 101 pacientes con carga viral indetectable durante los seis meses posteriores al tratamiento y el grupo de no respuesta sostenida (NRS) que incluye 98 pacientes que o no respondieron al tratamiento o recayeron al interrumpir la terapia

2. Métodos

2.1. Extracción de DNA

Como material de partida, se utilizó sangre periférica fresca o conservada a -20 °C, obtenida previamente por venopunción que se recogió directamente en tubos estériles con EDTA o ACD como anticoagulante. El procedimiento para la extracción de DNA a partir de sangre total se describe a continuación:

Dispensar 100 µl de sangre en un tubo Eppendorf de 1.5 ml previamente autoclavado y añadir 1 ml de tampón TE. Mezclar con vórtex y centrifugar 60 s a 13.000 x g.

Descartar el sobrenadante y resuspender el botón celular en 1 ml de tampón TE. Centrifugar durante 60 s a 13.000 x g.

Repetir esta operación, hasta eliminar cualquier resto de hemoglobina ya que el grupo hemo inhibe la reacción en cadena de la polimerasa, normalmente es suficiente con hacerlo 2 veces más. El botón celular obtenido puede ser almacenado a -70 °C hasta su procesamiento final y uso, o bien se puede continuar el proceso resuspendiendo el botón celular en 200 µl de tampón K (proteínasa K) e incubando 45 min en un baño termostático a 56°C para digerir las proteínas.

Finalmente, incubar durante 10 min a 95°C para inactivar la proteínasa K. Dar un pulso de centrifuga a 13.000 x g para eliminar los restos celulares no digeridos.

A partir de aquí, el DNA así obtenido está preparado para su amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y puede conservarse a -20 °C durante varios años, manteniendo su viabilidad.

2.2. Amplificación de genes para detección en geles de agarosa

Las amplificaciones de los distintos fragmentos de DNA para caracterizar los polimorfismos genéticos fueron llevadas a cabo en diferentes termocicladores programables: PTC-100 (MJ Research), PTC-200 (MJ Research) y GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer).

A continuación se describen los diferentes parámetros y condiciones de PCR utilizados en la amplificación y análisis de los genes candidatos que se han incluido en este trabajo, los cuales han sido agrupados basándose en las diferentes técnicas utilizadas para su estudio.

2.2.1. Discriminación por tamaños:

Esta técnica fue utilizada en todos aquellos casos en los que la amplificación por PCR y electroforesis en gel de agarosa permitía detectar y asignar directamente el genotipo basándonos en el tamaño del amplificado.

KIRs

Se analizó la presencia o ausencia de los genes KIR2DL1, KIR2DL2 Y KIR2DL3. Aquellas muestras en las que no se observó amplificación para ninguno de los tres genes se eliminaron del análisis posterior. KIR2DL1 se utilizó como control de amplificación ya que se trata de un gen presente en prácticamente el 100% de los haplotipos KIRs.

Las secuencias de los cebadores utilizados para detectar la presencia/ausencia de estos tres genes fueron tomadas de Uhrberg M et al., 1997 y sintetizados por invitrogen. Los tamaños de los fragmentos amplificados fueron: 1750 bp para KIR2DL1, 1800 bp para KIR2DL2, y 798 bp para KIR2DL3.

KIR_S	Cebadores (5' - 3')
KIR2DL1F	ACTCACTCCCCCTATCAGG
KIR2DL1R	AGGGCCCAGAGGAAAGTCA
KIR2DL2F	CCATGATGGGGTCTCCAA
KIR2DL2R	GCCCTGCAGAGAACCTACA
KIR2DL3F	CCTTCATCGCTGGTGCTG
KIR2DL3R	CAGGAGACAAC TTTGGATCA

Las condiciones y parámetros empleados para la amplificación fueron:

Mezcla PCR

- 1 µl de DNA.
- 5 pmoles de cada cebador
- 200 µM de cada dNTP.
- 1 µL tampón PCR 10x
- 0.5 U de Taq DNA polimerasa
- Volumen final de 10 µl.

Parámetros PCR

- 95 °C, 5 min
 - 97 °C, 20 s
 - 62 °C, 45 s
 - 72 °C, 90 s
 - 95 °C, 20 s
 - 60 °C, 45 s
 - 72 °C, 90s
- } 5 ciclos
- } 25 ciclos

ECA

Estudiamos el polimorfismo rs13447447 que viene determinado por la presencia de inserción/delección (I/D) en el intrón 16.

El método utilizado para la detección de I/D en el gen ECA fue descrito por Rigat B et al., 1990. Los cebadores fueron sintetizados por Pharmacia. Las muestras DD amplificaban un fragmento de 190 bp, las heterocigotas DI un fragmento de 190 bp y otro de 490 bp, y finalmente las muestras homocigotas II un fragmento de 490 bp (figura 17).

Además, y dado que está descrito que el alelo D amplifica preferentemente sobre el alelo I en muestras heterocigotos, todas las muestras asignadas

inicialmente con genotipo DD, fueron sometidas a una segunda PCR independiente utilizando un cebador con una secuencia específica para la I (Shanmugan V et al., 1993). De esta forma sólo se producía amplificación en caso de la presencia del alelo I, y no aparecía ningún producto de amplificación en aquellas muestras realmente homocigotas para D. Esta segunda amplificación se realizó utilizando el mismo cebador directo y un nuevo reverso (R2) diseñado en nuestro laboratorio a partir de la secuencia del gen obtenida en el Genbank (número de acceso: BC036375) y sintetizado por invitrogen. El producto amplificado era un fragmento de unos 108 bp que sólo aparecía en caso de que el DNA llevase incluida la I (figura 18).

ECA	Cebadores (5' - 3')
INTRÓN 16	
F	CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT
R1	GATGTGGCCATCACATTCGTCAGA
R2	CCAGCCTGGGCGACAGAGCGAGA

Las condiciones y parámetros empleados en estas amplificaciones fueron:

Método 1

Mezcla PCR (ECA-1)

- 1 μ l de DNA.
- 2 pmoles de cada cebador.
- 200 μ M de cada dNTP
- 2 μ L tampón PCR 5x
- 0.2 U de Taq DNA polimerasa.
- Glicerol
- DMSO 10%
- Rojo Cresol
- Volumen final de 10 μ l.

Parámetros PCR (ECA-1)

- 95 °C, 5 min
 - 94 °C, 10 s
 - 60 °C, 1 min
 - 72 °C, 1 min
 - 72 °C, 7 min
- } 35 ciclos

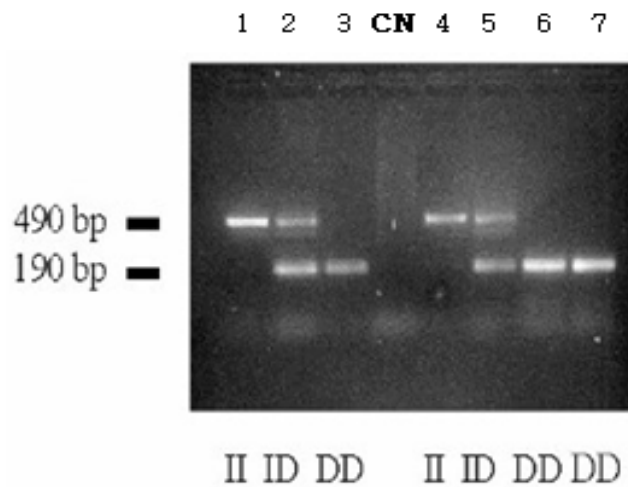


Figura 17. Patrón de bandas de los diferentes genotipos para la inserción/delección del gen ECA con el método 1

Método 2

Mezcla PCR (ECA-2)

- 1 μ l de DNA amplificado en la 1ª PCR.
- 2.5 pmoles de cada cebador.
- 200 μ M de cada dNTP.
- 1 μ L tampón PCR 10x
- 0.2 U de Taq DNA polimerasa.
- Rojo Cresol.
- Volumen final de 10 μ l.

Parámetros PCR (ECA-2)

- 95 °C, 5 min
 - 94 °C, 10 s
 - 64 °C, 1 min
 - 72 °C, 1 min
 - 72 °C, 7 min
- } 35 ciclos

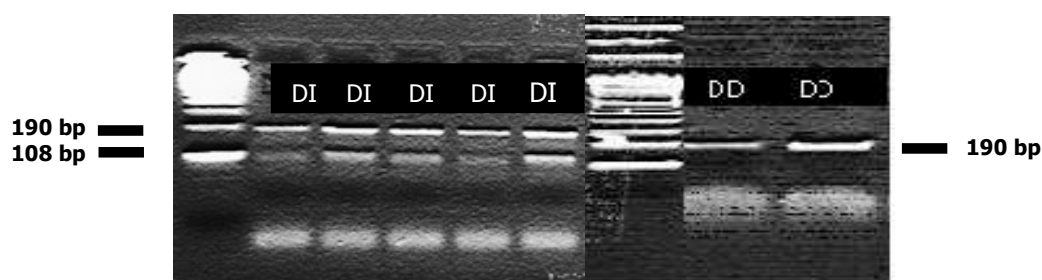


Figura 18. Patrón de bandas para la inserción del gen ECA con el método 2.

2.2.2. Discriminación por PCR-ARMS:

Con el sistema de mutación refractario a la amplificación (ARMS), se utilizan cebadores cuyos extremos 3' son específicos del cambio que queremos estudiar. En todos los casos en los que se aplicó esta técnica los cebadores directos fueron diseñados como específicos. Para el estudio de cada muestra de ADN se realizan dos reacciones de PCR en tubos diferentes en los que se incluyen el cebador directo con la base cambiada y el reverso común.

CCR2 +190

Analizamos el polimorfismo rs1799864 situado en el exón-2, que origina un cambio de A>G en la posición 190.

Los cebadores se diseñaron en nuestro laboratorio de acuerdo con la secuencia publicada en Genbank, y fueron sintetizados por invitrogen. Para la amplificación se usaron dos tubos por muestra, uno contenía la pareja de cebadores F1-R y otro la pareja F2-R. El fragmento amplificado presentaba un tamaño de 183 bp.

CCR2 + 190	Cebadores (5' - 3')
F1	TTGTGGGCAACATGCTGGTCA
F2	TTGTGGGCAACATGCTGGTCG
R	ACTGTGAATAATTTGCACATTGC

Las condiciones y parámetros empleados para la amplificación fueron:

Mezcla PCR

- 1 µl de DNA.
- 2 pmoles de cada cebador.
- 6 µl de Mix Dynal.
- 2.5 mM MgCl₂.
- 0.2 U de Taq DNA polimerasa.
- Volumen final de 10 µl.

Parámetros PCR

- 94° C, 2 min
 - 94 °C, 10 s
 - 67 °C, 1 min
 - 94 °C, 10 s
 - 65 °C, 50 s
 - 72° C, 30 s
- } 10 ciclos
- } 20 ciclos

HFE

En este gen se estudiaron dos polimorfismos: rs17515604 (187 C>G) posición 63 y rs1800562 (845 G>A) posición 282.

Los cebadores para el estudio de estos dos dimorfismos (187C>G para el exón-2 y 845G>A para el exón-4) se diseñaron en nuestro laboratorio según la secuencia publicada del gen HFE y fueron sintetizados por PE Applied Biosystems. Para la amplificación se usaron dos tubos por muestra, uno para la pareja de cebadores F1-R y otro para la pareja F2-R (ver tabla). El tamaño esperado para los fragmentos amplificados era de 274 bp para el polimorfismo del exón-2 y 180 bp para el exón-4.

HFE-187	Cebadores (5' - 3')
F1	GCTGGTCGTGTGCTATGAT <u>C</u>
F2	GCTGGTCGTGTGCTATGAT <u>G</u>
R	TGCTCCCACAAGACCTCAGA
HFE-845	Cebadores (5' - 3')
F1	GAAGAGCAGAGATATACG <u>C</u>
F2	GAAGAGCAGAGATATACG <u>A</u>
R	TAACAAAGAGCAGATCCTCA

Las condiciones y parámetros empleados para la amplificación fueron:

Mezcla de reacción para HFE-187 y HFE-845

- 0.5 μ l de DNA.
- 5 μ l Mix Dynal.
- 5 pm de cada cebador.
- 0.25 U de Taq DNA polimerasa
- Volumen final de 10 μ l.

Parámetros PCR

HFE-187		HFE-845
94 °C, 2 min		94 °C, 2min
94 °C, 10s	} 30 ciclos	94 °C, 10s
60 °C, 1 min		62 °C, 1 min
72 °C, 30s		72 °C, 30s

TNF-A

Analizamos dos posiciones situadas en la región promotora del gen: rs1800629 (-307 G>A) y rs361525 (-237 G>A).

Estos cebadores se diseñaron en nuestro laboratorio según la secuencia publicada del gen TNFA y fueron sintetizados por invitrogen. Se utilizaron dos tubos por muestra y posición, uno contenía la pareja de cebadores F1-R y en otro la pareja F2-R. El tamaño esperado de los fragmentos amplificados era de 171 bp para la posición -307 y 101 bp para la posición -237.

Las condiciones y parámetros empleados para la amplificación fueron:

Mezcla de reacción para TNFA -237 y TNFA -307

- 1 μ l de DNA.
- 2.5 pmoles de cada cebador.
- 200 μ M de cada dNTP.

- 1 μ l de tampón de PCR 10X.
- 0.2 U de Taq DNA polimerasa.
- Volumen final de 10 μ l.

TNFA -307	Cebadores (5' - 3')
F1	ATAGGTTTTGAGGGGCATG G
F2	ATAGGTTTTGACGGGCATG A
R	GGTTTCTTCTCCATCACTGG
TNFA -237	Cebadores (5' - 3')
F1	GAAGACCTCTCTCAGATC G
F2	GAAGACCTCTCTCAGATC A
R	GGTTTCTTCTCCATCACTGG

Parámetros PCR

TNFA -237

95° C, 5 min
 94 °C, 30 s
 50 °C, 30 s
 72° C, 30 s
 72 °C, 7 min

} 30 ciclos

TNFA -307

95° C, 5 min
 94 °C, 10 s
 62 °C, 30 s
 94 °C, 10 s
 52 °C, 30 s
 72° C, 30 s

} 10 ciclos

} 20 ciclos

2.2.3. Discriminación por PCR + RFLP

a) Amplificación

CCL2/ MCP-1

Analizamos el polimorfismo A>G situado en posición -2518 del promotor.

Los cebadores utilizados para la detección de este polimorfismo en MCP-1, fueron descritos por Rovin BH et al., 1999 y sintetizados por PE Applied Biosystems. El tamaño del fragmento amplificado era de 930 bp.

CCL2/MCP-1 -2518	Cebadores (5' - 3')
F	CCGAGATGTTCCCAGCACAG
R	CTGCTTTGCTTGTGCCTCTT

Las condiciones y parámetros empleados para la amplificación fueron:

Mezcla PCR

0.5 µl de DNA.
2.5 pmoles de cada cebador.
200 µM de cada dNTP.
1 µl de tampón de PCR 10X.
0.5 U de Taq DNA polimerasa.
Volumen final de 10 µl.

Parámetros PCR

94°C, 1min
55°C, 1 min
72°C, 1.5 min } 40 ciclos
72°C, 10 min

TGF-β1

Analizamos el polimorfismo rs1800471 (G>C) situado en el exón-1, concretamente en el codón 25 de dicho gen.

Los cebadores se diseñaron en nuestro laboratorio de acuerdo con la secuencia publicada del gen TGF- β 1 (número de acceso en el Genbank: X05839) y fueron sintetizados por invitrogen. El diseño de los cebadores se realizó basándose en la secuencia complementaria con el fin de obtener zonas de corte para el posterior análisis con el enzima de restricción. El fragmento amplificado tenía un tamaño de 241 bp.

TGF-β1 Codón 25 (G>C)	Cebadores (5' - 3')
F	CGGCACCTCCCCCTGGCTCG
R	GCTCTCGGCAGTGCCGGGGG

Las condiciones y parámetros empleados para la amplificación fueron:

Mezcla PCR

- 2 μ l de DNA.
- 5 pmoles de cada cebador
- 200 μ M de cada dNTP.
- 1.5 mM MgCl₂.
- 0.2 U de Taq DNA polimerasa.
- DMSO 10%
- Volumen final de 15 μ l.

Parámetros PCR

- | | |
|--------------|-------------|
| 95 °C, 3 min | } 40 ciclos |
| 94 °C, 10 s | |
| 67 °C, 1 min | |
| 72 °C, 30 s | |
| 72 °C, 7 min | |

b) Restricción

Preparar la reacción de digestión con la enzima correspondiente:

Mezcla de reacción: CCL2/MCP-1

- 3 μ l de DNA amplificado.
- 1 μ l de tampón 10X (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany).
- 5 U de la enzima de restricción *Pvu II* (Boehringer-Mannheim).
- ddH₂O hasta volumen final de 10 μ l.

Incubar toda la noche en baño termostatzado a 37 °C.

A no corta, G corta. Los homocigotos AA presentan una banda de 930 bp, los homocigotos GG dos bandas de 708 y 222 bp, y los heterocigotos las tres bandas.

Mezcla de reacción: TGF-β1

3 µl de DNA amplificado.

1 µl de tampón 10X (New England BioLads Inc., Beverly, MA, USA).

2 U de la enzima de restricción *Fse I* (New England BioLads Inc., Beverly, MA, USA).

0.1 µl de BSA 100X (New England BioLads Inc.).

ddH₂O hasta volumen final de 10 µl.

Incubar toda la noche en baño termostatzado a 37 °C.

C no corta, G corta. Los homocigotos CC presentan una banda de 241 bp, los homocigotos GG dos bandas de 131 y 110 bp y los heterocigotos las tres bandas.

2.3. Electroforesis en gel de agarosa

El tamaño y la cantidad de los productos amplificados se visualizan mediante electroforesis submarina en un gel de agarosa (Bio-Rad, Hércules CA, USA) en tampón TBE 0.5X. La concentración de agarosa en el gel depende del tamaño esperado del fragmento amplificado y se detalla en la tabla 3. Los pasos a seguir son:

Determinar el volumen de gel que se necesita según el tamaño del molde seleccionado y la cantidad de agarosa necesaria para una adecuada concentración dependiendo del tamaño esperado del fragmento amplificado. Por ejemplo, para un volumen de gel de 100 ml y una concentración de agarosa del 1.5%, pesar 1.5 g de agarosa y disolverlos en 100 ml de TBE 0.5X calentando hasta ebullición en un horno microondas (5 min. aproximadamente). Preparar el molde de electroforesis (Bio-Rad) sellando los lados con cinta adhesiva y colocar el peine adecuado según el número de muestras. Comprobar

que la agarosa se ha disuelto totalmente (la solución debe ser transparente). Dejar enfriar hasta que la solución alcance una temperatura aproximada de 60 °C. Agitar el matraz de vez en cuando durante el proceso para que el enfriamiento sea uniforme.

Se añade el volumen necesario de solución madre de bromuro de etidio para que la concentración final sea de 0.5 µg/ml. Por ejemplo, para un gel de 100 ml, añadimos 5 µl de la solución madre. Agitar suavemente el matraz para distribuir el bromuro uniformemente.

Dispensar el gel en el molde de electroforesis preparado anteriormente. Tomar una muestra de 5 µl de cada amplificado y transferir a un tubo Eppendorf previamente rotulado. Añadir 1.25 µl del tampón de carga (solución de blue juice 5X) y mezclar. Para aquellas PCR que en las que se utilizan mezclas que llevan rojo cresol, no es necesario añadir el tampón de carga.

Dispensar cada muestra en un pocillo del gel. Reservar un pocillo para el control de peso molecular. Dispensar 5 µl del control de peso molecular (100 bp *leader*) en el pocillo correspondiente. Someter el gel a electroforesis en tampón TBE 0.5X durante 20 minutos a 15 V/cm. Por ejemplo, para un gel de 100 ml aplicar entre 100-200 V. Examinar el gel con un trans-iluminador de luz ultravioleta y guardar registro gráfico.

Región Amplificación	Tamaño esperado (bp)	% agarosa (p/v)
Polimorfismo +190 A>G del gen CCR2	183	2%
Exón 2 del gen HFE	274	2%
Exón 4 del gen HFE	180	2%
Polimorfismo -307 del gen TNF α	171	2%
Polimorfismo -237 del gen TNF α	101	2%
Inserción/Delección gen ECA	490/190	2%
Inserción gen ECA	108/190	2%
Polimorfismo -2518 del gen CCL2/MCP-1	930	2%
AA	930	2%
AG	930, 708,222	2%
GG	708, 222	2%
Codón 25 G>C del gen TGF- β 1	241	2%
CC	241	2%
CG	241, 131, 110	2%
GG	131, 110	2%
KIR2DL1/KIR2DL2/KIR2DL3	1750/1800/798	0.9%

Tabla 3. Porcentajes de agarosa utilizados y tamaños de fragmentos detectados en cada amplificación. En los casos de -2518 CCL2/MCP-1 y codón 25 G>C TGF- β 1 se muestran también los tamaños de los fragmentos de restricción.

2.4 Amplificación de genes analizados mediante electroforesis capilar

Este método permite detectar diferencias de tamaño muy pequeñas, concretamente los polimorfismos "STR", que no son apreciables en geles de agarosa. De esta forma podemos asignar los alelos en función de los tamaños detectados.

a) Amplificación

SLC11A1 (*Nramp1*)

Analizamos un polimorfismo consistente en repeticiones "GT" localizadas en la región promotora del gen.

El cebador Nramp1 PF había sido descrito por Bellamy R et al., 1998 y el cebador Nramp1 PR fue diseñado en nuestro laboratorio a partir de la secuencia del gen obtenida a partir del Genbank, con número de acceso (D63507). Ambos fueron sintetizados por PE Applied Biosystems. Se utilizó el cebador directo marcado con el fluorocromo HEX en el extremo 5'.

SLC11A1	Cebadores (5' - 3')
F	HEX-ACTCGCATTAGGCCAACGAG
R	TGTGCCCCACAACACATCTG

Las condiciones y parámetros empleados para la amplificación fueron:

Mezcla PCR

- 1 μ l de DNA.
- 2.5 pmoles de cada cebador.
- 200 μ M de cada dNTP.
- 1 μ l de tampón de PCR 10X.
- 0.2 U de Taq DNA polimerasa.
- Volumen final de 10 μ l.

Parámetros PCR

- 95° C, 5 min
 - 94 °C, 1 min
 - 55 °C, 1 min
 - 72° C, 1 min
 - 72 °C, 7 min
- } 30 ciclos

b) Electroforesis capilar

Las repeticiones "GT", situadas en la región promotora del gen SLC11A1 originan diferencias de tamaño muy pequeñas entre los diferentes alelos y que no son detectables en geles de agarosa. Por lo tanto se deben utilizar sistemas que permitan una mayor resolución como geles de acrilamida o como en nuestro caso sistemas de electroforesis capilar.

Diluir las muestras en una proporción 1/4 con ddH₂O autoclavada. Mezclar 1 μ l de la dilución anterior con 0.5 μ l de marcador de peso molecular (TAMRA-500, PE Applied Biosystems) y con 12 μ l de formamida desionizada (PE Applied Biosystems).

Desnaturalizar la muestra calentando durante 2 min. a 95 °C y pasar a hielo. Someter a la muestra a electroforesis capilar (310 Genetic Analyzer, PE Applied Biosystems) en el módulo de análisis de fragmentos (GenScan) con el filtro A. Utilizar el polímero POP-4 (PE Applied Biosystems) con un capilar de 50 μ m de diámetro y 47 cm de largo (PE Applied Biosystems).

Parámetros de electroforesis capilar

Tiempo de inyección de la muestra	5 s
Temperatura	60 °C
Voltaje	15x10 ³ V
Tiempo de electroforesis	20 min

El tamaño de los fragmentos se determinó utilizando el programa informático "GenScan 672 Análisis Software" (PE Applied Biosystems). Este *software* asigna el tamaño de los fragmentos interpolando los datos de cada muestra en función del control de peso molecular. Por ello, en este procedimiento donde cada tubo de muestra es sometido a una electroforesis independiente, cada muestra debe contener el control de peso molecular, ya que, las condiciones pueden variar ligeramente en cada caso. El tamaño de los fragmentos detectados era de 244bp, 242bp, 240bp, 230bp para los alelos 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

2.5 Genes analizados mediante sistema TaqMan

CCR2 intrón 2

Analizamos el polimorfismo rs3138042 G>A situado en el intrón 2 del gen.

La detección de los diferentes genotipos estudiados en esta posición del gen CCR2 se realizó mediante un equipo de PCR tiempo real Applied Biosystems 7500-Fast y utilizando un sistema TaqMan. Para cada alelo se utiliza una sonda marcada con un fluorocromo en el extremo 5'. En concreto en nuestro caso las sondas fueron marcadas con VIC para el alelo A y FAM para el alelo G. Estas sondas se unen o no con nuestra muestra de ADN en función de que contenga uno u otro alelo. A continuación, la figura 19 muestra los diferentes pasos que se producen durante la amplificación.

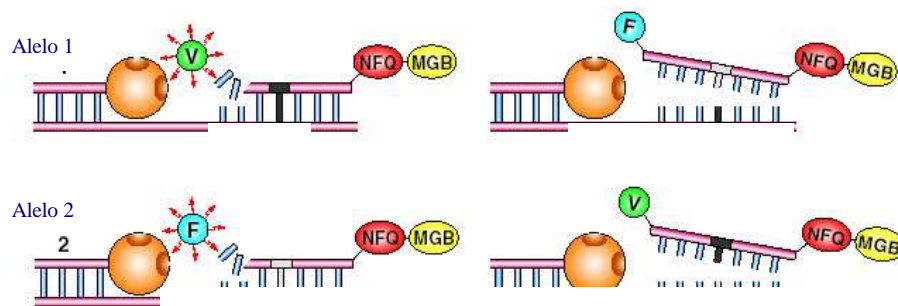


Figura 19. Detección de SNPs mediante sistema TaqMan

Los cebadores y sondas fueron diseñados y sintetizados por Applied Biosystems a partir de la secuencia publicada del gen. Los cebadores, sondas, condiciones y parámetros empleados para la amplificación y discriminación de los alelos fueron las siguientes:

CCR2 rs 3138042	Cebadores (5' - 3')
F	CGTGTGGAACCACTGCAGAA
R	CCTTCCTGGCTCTCTCCAATA

CCR2 rs 3138042	Sondas TaqMan
VIC	CTATTTCCG A AATCAAC
FAM	TTTCCG G AATCAAC

Mezcla de reacción

1 µl de DNA.
 4 µl de mix (2x)
 0.2 µl de primer/sondas (40x)
 Volumen final de 8 µl.

Parámetros PCR

95 °C, 10 min
 92 °C, 15 s
 60 °C, 1 min } 40 ciclos

2.6. Genes analizados mediante SSOP**HLA-Cw***

Se amplificaron los exones 2 y 3 con cebadores marcados con biotina, detectando posteriormente el polimorfismo con sondas específicas de secuencia (SSOP).

a) Amplificación

Se emplearon los cebadores del "kit" comercial "RELY™ SSO HLA-Cw* Typing kit" (Dynal). Las condiciones y parámetros empleados para la amplificación se detallan a continuación:

Mezcla reacción

7.5 µl de DNA.
 7.5 µl de MgCl₂ 6 mM
 15 µl de Master Mix.
 Volumen final 30 µl.

Parámetros PCR

Desnaturalización: 95 °C, 5 min
 Desnaturalización 95 °C, 15 s
 Hibridación 60 °C, 45 s
 Elongación 72 °C, 15 s
 Elongación Final: 72°C, 5 min } 35 ciclos

b) SSOP

Tanto los procesos de hibridación como de detección se realizaron en sistema automático AutoReli II-48 de Dynal.

Sacar las muestras del termociclador, separar 5 µl de cada una para comprobar la amplificación y añadir 30 µl de solución desnaturalizante a cada tubo. Incubar 10 min a temperatura ambiente (RT). Las muestras desnaturalizadas

pueden conservarse a 4 °C durante 1 semana y no deben mantenerse a RT más de 2 h.

Calentar a 50°C en un baño con agua tanto el SDS como el SSPE con el fin de eliminar todos los restos precipitados. A partir de aquí y en función del número de muestras que queremos estudiar se preparan los volúmenes necesarios de las distintas soluciones. Por ejemplo, para analizar 50 muestras, preparar el buffer de hibridación con 275 ml de H₂O desionizada, 71 ml de SSPE concentrado y 9 ml de SDS concentrado. Para el mismo número de muestras preparar la solución de lavado con 1279.5 ml de H₂O desionizada, 67.7 ml de SSPE concentrado y 6.8 ml de SDS concentrado.

Para interpretar el tipaje, colocar el indicador de líneas encima de la tira haciendo coincidir la línea base con la marca de la tira y señalar las bandas positivas para cada muestra. El tipaje se deduce de la combinación de sondas positivas y negativas. Existe un software específico suministrado por el fabricante para la interpretación de los resultados que nos da el tipaje HLA definitivo.

Según el tipaje HLA-Cw* los diferentes alelos detectados se asignaban a los grupos C1 y C2 en función de que presentaran Asn o Lys en posición 80. A continuación, la tabla 4 muestra los alelos HLA-Cw* incluidos en cada grupo.

HLA-C1 (Asn 80)	Cw*01, Cw*03, Cw*07, Cw*08, Cw*12, Cw*13, Cw*14, Cw*1601, 1604
HLA-C2 (Lys 80)	Cw*02, Cw*04, Cw*05, Cw*06, Cw*0707, Cw*1204, Cw*1205, Cw*15, Cw*1602, Cw*17, Cw*18

Tabla 4. Clasificación de los diferentes alelos HLA-Cw*.

2.7. Análisis estadístico de los resultados

Las pruebas estadísticas empleadas fueron la χ^2 de Pearson para tablas de contingencia. El test exacto de Fisher se aplicó cuando alguno de los valores esperados era inferior a 5, en la mayoría de los casos se utilizó el programa estadístico Statcalc (Epi Info 2002, Center for Disease Control and Prevention,

Atlanta, GA). Los valores de p (ó p_{Fischer}) iguales o inferiores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. Los Odds Ratio (OR) con los intervalos de confianza al 95% (95% CI) fueron calculados utilizando Statcalc (Epi Info 2002), cuando es aconsejado por el programa se calcularon los límites exactos de los intervalos de confianza del 95% para los OR. Para la comparación de medias se utilizó el test de ANOVA utilizando el mismo paquete estadístico, salvo cuando el valor de p para el test de Barlett era inferior a 0.05, en cuyo caso se utilizó el test de Kruskal-Wallis para dos grupos.

En el análisis multivariante se incluyeron aquellas variables que en análisis univariante se asociaban con un valor de p igual o inferior a 0.25. Los resultados con valores de p entre 0.25 y 0.05 se refieren como tendencias.

2.8. Soluciones

2.8.1. Soluciones madre

Bromuro de Etidio 10 mg/ml

Disolver 100 mg de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich Co, St Luis, Misoury, USA) en un volumen final de 10 ml de agua bidestilada. Guardar protegido de la luz a temperatura ambiente.

EDTA 0.5 m ph 8.0

Disolver 93 g de EDTA (Sigma-Aldrich) y 10 g de NaOH en aproximadamente 400 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8.0 con NaOH 10 N. Ajustar el volumen a 500 ml con agua destilada. Autoclavar. Almacenar a temperatura ambiente.

KCL 1 M

Disolver 37.28 g de KCl en agua destilada hasta un volumen final de 500 ml. Autoclavar. Almacenar a temperatura ambiente.

MgCL₂ 1 M

Disolver 203.3 g de MgCl₂ hasta un volumen final de 1l con agua destilada. Autoclavar. Almacenar a temperatura ambiente.

NaOH 10N

Disolver 200 g de NaOH en un volumen final de 500 ml de agua destilada autoclavada. Almacenar a temperatura ambiente.

Proteinasa K 33 µG/µL

Disolver 49.5 mg de proteinasa K (Sigma-Aldrich) en 1.5 ml de agua bidestilada estéril. Conservar a -20 °C.

Ficoll al 10%

Se prepara disolviendo 100 g del polímero de sacarosa en un volumen final de 1 l de agua destilada autoclavada. Posteriormente se ajusta a una densidad de 1077 g/ml. Almacenar a 4 °C, protegido de la luz.

Rojo Cresol 10 mg/ml

Disolver 10 mg de sal sódica de rojo cresol (Sigma-Aldrich) en un volumen final de 1 ml de agua destilada autoclavada.

SDS AL 20%

Disolver 100 g de SDS (Sigma-Aldrich) en un volumen final de 500 ml de agua destilada autoclavada. Almacenar a temperatura ambiente.

SSPE 30X

NaCl 4.5 M, NaH₂PO₄·H₂O 0.3 M, EDTA 30 mM a pH 8.0.

Disolver 262.98 g de NaCl y 41,4 g de NaH₂PO₄·H₂O en un volumen aproximado de 800 ml de agua destilada. Añadir 60 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0. Ajustar el pH a 7.4 con NaOH 10 N. Añadir agua destilada hasta un volumen final de 1 l. Autoclavar. Almacenar a temperatura ambiente.

Tampón de carga

Solución de *blue juice* 5X

Azul de bromofenol (Sigma-Aldrich) al 0.25%, xilencianol (Sigma-Aldrich) al 0.25%, y glicerol al 30% (Merck, KgaA, Darmstadt, Alemania) en agua bidestilada. Conservar a 4 °C.

Tampón para PCR 10x

KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8.3, suministrado junto con la Taq polimerasa (Pharmacia). Almacenar a -20 °C.

Tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1 X

Trizma base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0.

Por ejemplo, para 10 l mezclar: 108 g de Trizma base (Merck), 55 g de ácido bórico, 40 ml de una solución de EDTA 0.5 M. Disolver en agua bidestilada ajustando el volumen a 10 l. Almacenar a temperatura ambiente.

2.8.2. Soluciones de trabajo

Conjugado para SSOP reverso

Mezclar 3.3 ml de tampón de lavado a RT con 10 µl del conjugado Streptoavidina-HRP por cada pocillo. Mezclar lentamente con agitación suave. Preparar como mucho 15 min antes de su uso.

Controles de peso molecular:

100 bp leader

Se prepara a una concentración final de 0.1 µg/µl. Mezclar 100 µl del control de peso molecular "100 base pair leader" (Pharmacia) suministrado a una concentración de 1 µg/µl, 200 µl del tampón de carga (*blue juice* 5 X) y 700 µl de agua destilada autoclavada. Almacenar a 4 °C.

TAMRA 500

Es suministrado listo para usar por PE Applied Biosystems.

NaOH 0.4 N/EDTA 25mM

Mezclar 4 ml de NaOH 10 N y 5 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0. Ajustar el volumen a 100 ml con agua destilada autoclavada. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución desnaturalizante

Solución de NaOH al 1.6%, EDTA al 3% y thymol blue. Suministrada en el kit de tipaje HLA-DQB1* "RELY™ SSO HLA-DQB1 Typing kit" (Dynal).

Sustrato para SSOP reverso

Mezclar 2.8 ml por pocillo de solución de sustrato A con 0.7 ml por pocillo de la solución B. Mezclar por agitación suave. No preparar mas de 3 h antes de su uso y mantener protegido de la luz.

Tampón citrato para SSOP reverso

Diluir 30 ml de citrato concentrado en 570 de agua bidestilada. Mezclar bien. Almacenar en una botella rotulada con el nombre del reactivo y la fecha. Almacenar a RT. La solución es estable durante 3 meses.

Tampón de hibridación para SSOP reverso

Mezclar en este orden 55 ml de SSPE 30X, 213 ml de agua bidestilada y 6.9 ml de SDS 20%. Tanto el SSPE como el SDS pueden tener precipitados, si es así introducir en baño a 50°C hasta que se disuelvan. Se puede almacenar durante 3 meses a RT.

Tampón de lavado para SSOP reverso

Mezclar por este orden 65 ml de SSPE 30X, 1228.5 ml de agua bidestilada y 6.5 ml de SDS 20%. Almacenar a temperatura ambiente.

Tampón K

KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 2.5 mM, Tween-20 0.5% y proteinasa K 100 µg/ml.

Mezclar 5 ml de KCl 1 M, 2 ml de Tris-HCl 1 M pH 8.0, 250 µl de MgCl₂ 1 M, 500 µl de Tween-20 y 300 µl de proteinasa K 33 µg/µl. Ajustar a un volumen final de 100 ml con agua destilada autoclavada. Almacenar a -20°C en alícuotas de 2 ml.

Tampón TE

Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM pH 8.0.

Mezclar 10 ml de Tris-HCl 1 M a pH 7.5, 2 ml de EDTA 0.5 M a pH 8.0. Ajustar a 1 l con agua destilada. Autoclavar y almacenar a temperatura ambiente.

KIT de extracción de ADN (QUIAGEN)

Se almacena a temperatura ambiente

KIT Master Mix para PCR Universal. TaqMan

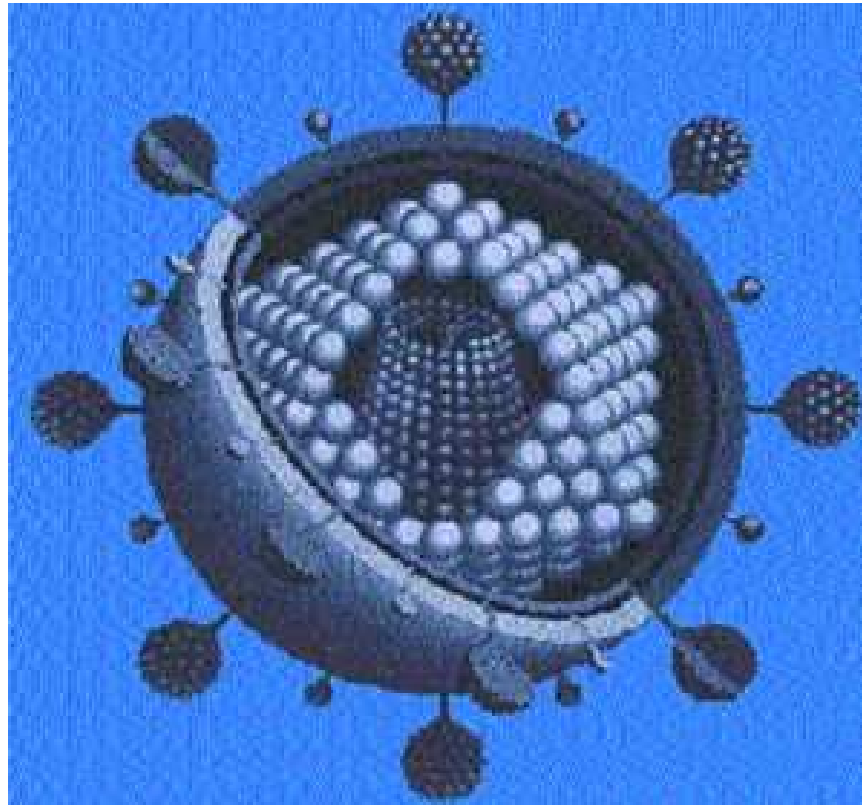
Suministrado por PE Applied Biosystems. Se almacena a 4°C

TBE 0.5X

Diluir a la mitad TBE 1X. Por ejemplo, para un volumen de 1L de disolución, mezclar 500 ml de TBE 1X con 500 ml de agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

Mezcla de PCR (Dyna)

Mezcla suministrada por el fabricante. Almacenar a 4°C



RESULTADOS

IV. RESULTADOS

A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los posibles factores implicados en la cronificación de la infección, en la relación con los diferentes grados de fibrosis hepática y finalmente en la respuesta sostenida al tratamiento. Todos los polimorfismos genéticos incluidos en el presente estudio fueron analizados previamente en un grupo de 194 controles sanos con el mismo acervo genético que los pacientes. Todos estos polimorfismos cumplían la ley de Hardy-Weinberg en este grupo de controles sanos.

1. Factores relacionados con la cronificación del virus de la hepatitis C

A continuación se presentan los datos de los polimorfismos estudiados en genes candidatos en el grupo pacientes con infección crónica por VHC (casos) y de sujetos con aclaramiento viral espontáneo (controles). Ambos grupos mostraron diferencias en la distribución por sexo, siendo la frecuencia de hombres más elevada en el grupo de pacientes con infección crónica (58.4%) que en el grupo de sujetos con aclaramiento viral espontáneo (43.1%, $p= 0.02$, OR= 1.86, 95% CI 1.04-3.32). En las diferentes tablas de resultados se muestran aquellas variables para las que se obtuvieron valores de $p \leq 0.25$, ya que estas han sido las tenidas en cuenta al realizar el análisis multivariante.

1.1. KIRs 2DL2 y 2DL3

Se analizó la presencia de 2DL3 (2DL3+2DL2/2DL3) frente a su ausencia (2DL2) en una tabla de 2x2. La tabla 5 muestra que la frecuencia de KIR2DL3 se encuentra aumentada entre los individuos con infección crónica respecto de aquellos que resuelven la infección.

GENES KIR					
Fenotipos	ACLARAMIENTO VIRAL ESPONTÁNEO N = 65 (%)	INFECCIÓN CRÓNICA VHC N = 130 (%)	OR	IC 95%	p
2DL2	21 (32.3)	21 (16.2)			
2DL2/2DL3	17 (26.2)	42 (32.3)			
2DL3	27 (41.5)	66 (50.8)	2.45	1.15-5.23	0.01

Tabla 5. Frecuencia de fenotipos de los receptores KIRs 2DL2 y 2DL3 entre sujetos con aclaramiento espontáneo y pacientes con infección crónica.

1.2. HLA-Cw*

Los diferentes alelos HLA-C analizados fueron clasificados en función de presentar Asn (HLA-C1) o Lys (HLA-C2) en posición 80 de la molécula. Se comparó la presencia de C1 (C1C1+C1C2) frente su ausencia (C2C2) en una tabla de 2 x 2. Se encontró una tendencia a una mayor presencia de C1 entre pacientes con infección crónica frente a los sujetos con aclaramiento espontáneo. Los resultados se muestran en la tabla 6

HLA-C			
Genotipos	ACLARAMIENTO VIRAL ESPONTÁNEO N = 65 (%)	INFECCIÓN CRÓNICA VHC N = 130 (%)	p
C1C1	18 (27.7)	40 (30.7)	0.08
C1C2	32 (49.2)	73 (56.1)	
C2C2	15 (23.1)	17 (13.1)	

Tabla 6. Frecuencias genotípicas HLA-C1/C2 en aclaramiento viral espontáneo y pacientes con infección crónica por VHC.

1.3. Interacción KIRs-HLA-Cw*

La tabla 7 muestra el resultado obtenido tras analizar las interacciones entre ligando (HLA-Cw*) y receptor (KIR) en relación al tipo de respuesta frente a la infección por VHC. Se consideraron interacciones fuertes o intermedias la presencia simultánea de KIR2DL1-C2 o KIR2DL2-C1 en el mismo individuo e interacciones débiles o no interacciones el resto. Se encontró una tendencia a una mayor presencia de interacciones débiles o no interacción en el grupo de pacientes con infección crónica.

INTERACCIONES			
Interacción Genes KIRs-HLA-C	Aclaramiento Viral Espontáneo N = 65 (%)	Infección Crónica VHC N = 130 (%)	p
Fuerte + intermedia	57 (87.7)	104 (80.8)	0.18
Débil + no interacción	8 (12.3)	26 (20.0)	
Homocigotos KIR2DL3-C1	8 (12.3)	22 (16.9)	

Tabla 7. Distribución de las interacciones entre genes KIRs y HLA-C1/C2 en pacientes con aclaramiento viral espontáneo y con infección crónica por VHC.

1.4. CCR2

1.4.1. Dimorfismo G>A en la posición +190

Los resultados obtenidos para este polimorfismo se muestran en la tabla 8 Se comparó la presencia de A (AA+AG) contra su ausencia (GG). Se encontró una tendencia a una mayor frecuencia de A entre individuos con infección crónica.

CCR2 (+190)			
Genotipos	ACLARAMIENTO VIRAL ESPONTÁNEO N = 65 (%)	INFECCIÓN CRÓNICA VHC N = 284 (%)	p
GG	54 (83.1)	205 (72.2)	0.07
AG	10 (15.4)	73 (25.7)	
AA	1 (1.5)	6 (2.1)	

Tabla 8. Frecuencias genotípicas del polimorfismo G>A +190 del gen CCR2 en sujetos con aclaramiento viral espontáneo y pacientes con hepatitis crónica VHC.

1.4.2. Dimorfismo G>A situado en el intrón 2

Los resultados obtenidos en el análisis de este polimorfismo se muestran en la tabla 9. No se observó ninguna tendencia hacia una diferente distribución de genotipos al comparar ambos grupos.

CCR2 (intrón 2)		
Genotipos	ACLARAMIENTO VIRAL ESPONTÁNEO N = 65 (%)	INFECCIÓN CRÓNICA VHC N= 284 (%)
AA	32 (49.2)	134 (47.2)
AG	24 (36.9)	124 (43.6)
GG	9 (13.8)	26 (9.1)

Tabla 9. Frecuencias genotípica del polimorfismo A>G en el intrón 2 del gen CCR2 en sujetos con aclaramiento viral espontáneo y pacientes con hepatitis crónica VHC.

1.4.3. Estudio de haplotipos entre los dos polimorfismos incluidos en CCR2

Estos polimorfismos se presentaban en dos bloques haplotípicos diferentes. Los resultados obtenidos en el análisis de haplotipos teniendo en cuenta los dos polimorfismos estudiados en el gen CCR2 se muestran en la tabla 10. No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos.

HAPLOTIPOS			
CCR2 190 A/G	CCR2 rs3138042	ACLARAMIENTO VIRAL ESPONTÁNEO 2N=130 (%)	INFECCIÓN CRÓNICA VHC 2N= 260 (%)
G	A	74 (56.9)	146 (56.1)
G	G	38 (29.2)	75 (28.8)
A	A	16 (12.3)	34 (13.1)
A	G	2 (1.5)	5 (1.9)

Tabla 10. Análisis de haplotipos para ambos polimorfismos del gen CCR2 en sujetos con aclaramiento viral espontáneo y pacientes con hepatitis crónica VHC.

1.5. CCL2/MCP-1

Los resultados obtenidos para este polimorfismo se muestran en la tabla 11. Se comparó la presencia de G (GG + AG) contra su ausencia (AA). No se observaron diferencias en la distribución de genotipos entre ambos grupos de pacientes.

CCL2/MCP-1 (-2518)		
Genotipos	ACLARAMIENTO VIRAL ESPONTÁNEO N = 65 (%)	INFECCIÓN CRÓNICA VHC N = 284 (%)
AA	36 (55.3)	168 (59.1)
AG	26 (40.1)	109 (38.4)
GG	3 (4.6)	7 (2.5)

Tabla 11. Frecuencias genotípicas del polimorfismo -2518 del gen CCL2/MCP-1 en sujetos con aclaramiento viral espontáneo y pacientes con infección crónica por VHC.

1.6. Interacción CCR2- CCL2/MCP-1

Para evaluar la posible relación del complejo receptor-ligando (CCR2-CCL2/MCP-1) con la cronificación de la infección, se realizó un análisis univariante teniendo en cuenta las posibles combinaciones en función de la presencia o ausencia de la mutación en ambos genes. Ninguna de las combinaciones mostró asociación con el aclaramiento viral espontáneo, si bien, la combinación CCR2A-CCL2/MCP-1A presentó una tendencia hacia una mayor frecuencia entre los pacientes que cronificaban la infección. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 12.

INTERACCIÓN CCR2- CCL2/MCP-1				
CCR2A	CCL2/ MCP-1G	ACLARAMIENTO VIRAL ESPONTÁNEO N= 65 (%)	INFECCIÓN CRÓNICA VHC N= 284 (%)	p
+	+	6 (9.2)	31 (10.9)	
+	-	5 (7.7)	48 (16.9)	0.06
-	+	23 (35.4)	85 (29.9)	
-	-	31 (47.7)	120 (42.3)	

Tabla 12. Frecuencia de las diferentes combinaciones CCR2-CL2/MCP-1 en sujetos con aclaramiento viral espontáneo y pacientes con infección crónica por VHC.

Los símbolos + y - aluden a la presencia o ausencia del alelo mutado para ambos genes.

1.7. TNF-A

Respecto de la posición -307 se comparó la presencia de A (AA+AG) respecto a su ausencia (GG). Se detectó una tendencia a una mayor frecuencia de A entre el grupo de pacientes con infección crónica respecto del grupo de aclaramiento viral espontáneo. En relación a la posición -237 se comparó la presencia de A (AA+AG) respecto a su ausencia (GG). No se observó ninguna tendencia hacia una diferente distribución de genotipos. La tabla 13 muestra los resultados de la distribución de frecuencias genotípicas de los dos polimorfismos analizados en TNF-A.

TNF-A -307			
Genotipos	ACLARAMIENTO VIRAL ESPONTÁNEO N = 65 (%)	INFECCIÓN CRÓNICA VHC N = 284 (%)	p
GG	56 (86.1)	215 (75.7)	0.07
AG	9 (13.8)	67 (23.6)	
AA	-	2 (0.7)	
TNF-A -237			
GG	60 (92.3)	252 (88.7)	
AG	5 (7.7)	29 (10.2)	
AA	-	3 (1.05)	

Tabla 13. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos -307 y -237 del gen TNF-A en sujetos con aclaramiento viral espontáneo y pacientes con infección crónica por VHC.

1.8. TGF- β 1

A continuación, la tabla 14 muestra los resultados obtenidos para el polimorfismo Arg/Pro del gen TGF- β 1 entre sujetos con aclaramiento viral espontáneo y pacientes con infección crónica por VHC. Se comparó la presencia de Pro (Arg/Pro+Pro/Pro) frente a su ausencia (Arg/Arg). No se observó ninguna diferencia en cuanto a la distribución de genotipos entre ambos grupos.

TGF- β 1 codón 25		
Genotipos	ACLARAMIENTO VIRAL ESPONTÁNEO N = 65 (%)	INFECCIÓN CRÓNICA VHC N = 284 (%)
Arg/Arg	57 (87.7)	239 (84.2)
Arg/Pro	8 (12.3)	44 (15.5)
Pro/Pro	-	1 (0.3)

Tabla 14. Frecuencias genotípicas del polimorfismo del codón 25 (Arg/Pro) del gen TGF- β 1 en sujetos con aclaramiento viral espontáneo y pacientes con infección crónica por VHC.

1.9. Análisis multivariante en cronificación

Se construyó un modelo multivariante incluyendo los factores genéticos con $p \leq 0.25$ en el univariante. Por tanto, se incluyeron las siguientes variables: CCR2A (si/no), TNF-307A (si/no), 2DL3 (si/no) y HLA-C1 (si/no). Los resultados de este modelo se muestran en la tabla 15. Se observó que todas las variables genéticas incluidas en el modelo, excepto HLA-C1, se asociaban de manera independiente con la cronificación. La variable CCR2A-CCL2/MCP-1A (si/no) resultaba asociada también en el modelo univariante pero al ser una variable artificialmente obtenida de otras dos, no puede ser incluida en el mismo modelo que CCR2A. El modelo alternativo construido incluyendo esta variable en lugar de CCR2A no difiere del anterior.

VARIABLES	OR	95% IC	p
CCR2A	2.97	1.38-6.40	0.005
TNF-307A	2.33	1.01-5.37	0.047
2DL3	2.21	1.07-4.56	0.03

Tabla 15. Resultados del análisis multivariante en relación con la cronificación de la infección por VHC. Se incluyeron los factores genéticos que presentaban $p \leq 0.25$.

Además, se construyó un nuevo modelo multivariante en el que se incluyeron las variables genéticas que resultaron independientemente asociadas en el modelo anterior junto con la variable sexo. Los resultados se muestran en la tabla 16. Se observó que la presencia del alelo CCR2A y TNF-307A eran variables asociadas independientemente con el proceso de cronificación por VHC.

VARIABLES	OR	95% IC	p
CCR2A	2.93	1.36-6.28	0.006
TNF-307A	2.43	1.05-5.60	0.04
2DL3	2.06	0.99-4.29	0.05
Sexo (H/M)	1.76	0.93-3.32	0.08

Tabla 16. Resultados del análisis multivariante en relación con la cronificación de la infección por VHC. Se incluyeron los factores genéticos que presentaban $p \leq 0.05$ en el análisis multivariante anterior y el sexo.

2. Factores relacionados con la progresión de la fibrosis hepática

A continuación, la tabla 17 muestra algunas características y parámetros biológicos de los pacientes con infección crónica por VHC, estratificados en base al grado de fibrosis (Scheuer PJ et al., 1991).

Características clínico-epidemiológicas	F0-F2	F3-F4	p
Sexo (H/M)	123/79	43/39	0.2
Edad infección*(156)	21.9±10.37	28.8±12.58	0.0007
Tiempo de evolución** (153)	15.34±9.56	18.02±9.70	0.1
Carga viral x10 ⁶ (150)	1.26±1.26	1.54±1.86	ns
Genotipo viral (G1/resto) (205)	114/31	52/8	0.2
GOT *** (AST) (225)	61.85±40.82	85.13±50.32	0.0001
GPT*** (ALT) (226)	116.89±93.39	134.54±118.55	ns
GGT*** (224)	48.76±52.01	69.45±57.37	0.01
FA*** (224)	171.68±52.78	210.54±89.19	0.001

Tabla 17. Características clínico-epidemiológicas de los pacientes estratificados según el grado de fibrosis.

*Edad en años. **Tiempo de evolución en años desde la fecha probable de infección hasta la primera biopsia. *** Niveles medios de transaminasas y fosfatasa alcalina en el momento del diagnóstico.

Entre paréntesis se indica el número de pacientes analizados.

A continuación se detallan los resultados obtenidos para los diferentes factores analizados en los pacientes con infección crónica por virus de la hepatitis C agrupados en base al grado de fibrosis. Todos los valores de p que resultaron ≤ 0.25 en el análisis univariante fueron tenidos en cuenta al realizar el análisis multivariante.

2.1. CCR2

2.1.1. Dimorfismo G>A en la posición +190

Los resultados obtenidos para este polimorfismo se muestran en la tabla 18. Se comparó la presencia de A (AA+AG) contra su ausencia (GG). No se observó ninguna diferencia en la distribución de genotipos al comparar el grupo de pacientes F0-F2 con el grupo de pacientes F3-F4.

CCR2 (+190)		
Genotipos	F0-F2 N = 202 (%)	F3-F4 N = 82 (%)
GG	146 (72.2)	59 (71.9)
AG	52 (25.7)	21 (25.6)
AA	4 (1.9)	2 (2.4)

Tabla 18. Frecuencias genotípicas del polimorfismo 190 del gen CCR2 en pacientes con infección por VHC estratificando según grado de fibrosis.

2.1.2. Dimorfismo A>G en el intrón 2

Los resultados obtenidos en el análisis de este polimorfismo se muestran en la tabla 19. No se observó ninguna diferencia en la distribución de genotipos al comparar el grupo de pacientes F0-F2 con el grupo F3-F4.

CCR2 (intrón 2)		
Genotipos	F0-F2 N = 202 (%)	F3-F4 N = 82 (%)
AA	93 (46.03)	41 (50.0)
AG	91 (45.04)	33 (40.24)
GG	18 (8.9)	8 (9.7)

Tabla 19. Frecuencias genotípicas del polimorfismo del intrón 2 del gen CCR2 en pacientes con infección crónica por VHC estratificados según el grado de fibrosis.

2.2. CCL2/MCP1

Los resultados obtenidos para este polimorfismo se muestran en la tabla 20. Se comparó la presencia del alelo G (GG+AG) contra su ausencia (AA). No se encontró ninguna tendencia hacia una diferente distribución de genotipos al comparar ambos grupos.

CCL2/ MCP1		
Genotipos	F0-F2 N = 202 (%)	F3-F4 N = 82 (%)
AA	123 (60.9)	45 (54.87)
AG	75 (37.12)	34 (41.46)
GG	4 (1.98)	3 (3.65)

Tabla 20. Frecuencias genotípicas del polimorfismo – 2518 A>G del gen CCL2/MCP-1 en pacientes con infección crónica por VHC según el grado de fibrosis hepática.

2.3. Interacción CCR2- CCL2/MCP-1

Para evaluar la posible relación del complejo receptor-ligando (CCR2-CCL2/MCP-1) en cuanto al desarrollo de fibrosis hepática, se realizó un análisis univariante teniendo en cuenta las posibles combinaciones en función de la presencia o ausencia de la mutación en ambos genes. La tabla 21 muestra los resultados obtenidos en el análisis. No se observaron diferencias en relación con el grado de fibrosis.

INTERACCIÓN CCR2- CCL2/MCP-1			
CCR2A	CCL2/MCP-1G	F0-F2 N = 202 (%)	F3-F4 N = 82 (%)
+	+	22 (10.9)	9 (11.0)
+	-	34 (16.8)	14 (17.1)
-	+	57 (28.2)	28 (34.1)
-	-	89(44.1)	31 (37.8)

Tabla 21. Frecuencias de las diferentes combinaciones CCR2-CCL2/MCP-1 en relación al grado de fibrosis.

* Los símbolos + y - aluden a la presencia o ausencia del alelo mutado para ambos genes.

2.4. TNF-A

Respecto de la posición -307 se comparó la presencia de A (AA+AG) respecto a su ausencia (GG). Se detectó una tendencia a una menor frecuencia de A entre el grupo de pacientes en estadio F3-F4. En relación a la posición -237 se comparó la presencia de A (AA + AG) respecto a su ausencia (GG). No se observó ninguna diferencia en la distribución de genotipos. La tabla 22 muestra los resultados de la distribución de frecuencias genotípicas de los dos polimorfismos analizados en TNF-A.

TNF-A -307			
Genotipos	F0-F2 N = 202 (%)	F3-F4 N = 82 (%)	p
GG	149 (73.7)	66 (80.4)	0.23
AG	53 (26.2)	14 (17.1)	
AA	-	2 (2.4)	

TNF-A -237			
Genotipos	F0-F2 N = 202 (%)	F3-F4 N = 82 (%)	
GG	181 (89.6)	71(86.6)	
AG	19 (9.4)	10 (12.2)	
AA	2 (0.99)	1 (1.2)	

Tabla 22. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos del gen TNF-A en las posiciones -307 (G>A) y -237 (G>A) en pacientes con infección crónica por VHC estratificados en función del grado de fibrosis.

2.5. TGF- β 1

A continuación la tabla 23 muestra los resultados obtenidos para el polimorfismo Arg/Pro del gen TGF β -1 entre los pacientes con infección crónica por VHC estratificados por el grado de fibrosis. Se comparó la presencia de Pro (Arg/Pro+Pro/Pro) frente a su ausencia (Arg/Arg). No se observó ninguna diferencia en cuanto a la distribución de genotipos entre ambos grupos.

TGF- β 1 (codón 25)		
Genotipos	F0-F2 N = 202 (%)	F3-F4 N = 82 (%)
Arg/Arg	167 (82.6)	72 (87.8)
Arg/Pro	34 (16.8)	10 (12.2)
Pro/Pro	1 (0.5)	-

Tabla 23. Frecuencias genotípicas del polimorfismo Arg/Pro en el codón 25 del gen TGF- β 1 en pacientes con infección crónica por VHC estratificados por grado de fibrosis hepática.

2.6. ECA

Se estudió la presencia o ausencia de una inserción de 287 bp en el intrón 16 del gen ECA. Con el uso de la segunda PCR, 14 de los 123 casos inicialmente asignados como DD fueron reasignados como DI. La tabla 24 muestra los resultados del polimorfismo (D/I) analizado. No se observaron diferencias en la distribución de los distintos genotipos entre ambos grupos de pacientes.

Gen ECA (intrón 16)		
Genotipos	F0-F2 N = 202 (%)	F3-F4 N = 82 (%)
DD	78 (38.6)	31 (37.8)
DI	97 (48.0)	44 (53.6)
II	27 (13.4)	7 (8.5)

Tabla 24. Frecuencias genotípicas del polimorfismo D/I en el intrón 16 del gen ECA en pacientes con infección crónica por VHC según el grado de fibrosis.

2.7. HFE

Se estudiaron dos dimorfismos genéticos, el SNP rs17515604 localizado en el exón-2 (His63Asp) y el SNP rs1800562 localizado en el exón-4 (Cys282Tyr) del gen HFE.

Respecto del exón-2 (His63Asp) se analizó la presencia de G (CG+GG) frente a su ausencia, observándose una tendencia a una mayor presencia de G entre los paciente que presentaban un estadio de fibrosis más avanzado F3-F4. En cuanto al exón-4 (Cys282Tyr) se analizó la presencia de A (AG+AA) frente a su ausencia (GG). No se observó ninguna diferencia en la distribución de genotipos entre ambos grupos de pacientes. Los datos recogidos se muestran en la tabla 25.

HFE (His63Asp)			
Genotipos	F0-F2 N = 202 (%)	F3-F4 N = 82 (%)	p
CC	143 (70.8)	52 (63.4)	0.2
CG	53 (26.2)	23 (28.05)	
GG	6 (2.9)	7 (8.5)	
HFE (Cys282Tyr)			
GG	193 (95.5)	77 (93.9)	
AG	9 (4.5)	5 (6.1)	
AA	-	-	

Tabla 25. Frecuencia genotípica de los polimorfismos del exón-2 C/G (His63Asp) y del exón-4 G/A (Cys282Tyr) del gen HFE en pacientes con infección por VHC y clasificados según el grado de fibrosis hepática.

Se ha descrito que la presencia de la mutación del exón-2 en homocigosis así como los dobles heterocigotos exón-2/exón-4 tienen mayor tendencia a

acumular hierro, sobre todo en individuos varones, por lo que se analizaron estas situaciones. En el grupo completo, la presencia del genotipo homocigoto mutado en el exón-2 fue significativamente más frecuente en el grupo de pacientes F3-F4 ($p=0.04$, $OR=3.05$; $0.84-11.32$). Cuando se clasificaron los pacientes no fibróticos y fibróticos en función del sexo se detectó un aumento significativo del número de homocigotos para la mutación en el exón-2 en el grupo de hombres ($p=0.001$; $OR=9.81$; $1.64-101.62$). Respecto de los dobles heterocigotos no se pudo realizar ningún análisis ya que sólo detectamos un individuo en el grupo F0-F2. A continuación la tabla 26 muestra los resultados obtenidos.

HFE (His63Asp)					
Genotipos	Hombres N= 166 (%)		Mujeres N= 118 (%)		p
	F0-F2 N=123	F3-F4 N=43	F0-F2 N=79	F3-F4 N=39	
CC	96 (78.0)	25 (58.1)	47 (61.5)	27 (69.2)	0.001
CG	25 (20.3)	12 (27.9)	28 (35.4)	11 (28.2)	
GG	2 (1.6)	6 (14.0)	4 (5.1)	1 (2.5)	

Tabla 26. Frecuencias genotípicas del polimorfismo del exón-2 del gen HFE en pacientes estratificados por sexo y grado de fibrosis.

2.8. SLC11A1 (*Nramp1*)

Los resultados obtenidos para el polimorfismo del promotor del gen SLC11A1 se muestran en la tabla 27. Se observó un aumento estadísticamente significativo de los pacientes que presentaban el alelo 3 en el grupo F3-F4 respecto del grupo F0-F2.

SLC11A1					
Fenotipos	F0-F2 N = 202 (%)	F3-F4 N = 82 (%)	OR	95% IC	p
No alelo 3	29 (14.3)	4 (4.8)	3.27	1.09-13.19	0.02
Alelo 3	173 (85.6)	78 (95.1)			

Tabla 27. Frecuencias fenotípicas del polimorfismo del promotor del gen SLC11A1 en pacientes con infección crónica por VHC estratificados según grado de fibrosis.

Cuando se clasificaron los pacientes no fibróticos y fibróticos en función del sexo se detectó un aumento significativo del número de portadores del alelo 3 en el grupo de hombres ($p=0.006$; $OR=16.23$; $1.61-274.91$). Los resultados se muestran en la tabla 28.

SLC11A1					
Fenotipos	Hombres N= 166 (%)		Mujeres N= 118 (%)		p
	F0-F2 N=123	F3-F4 N=43	F0-F2 N=79	F3-F4 N=39	
No alelo 3	19 (15.4)	0 (0.0)	10 (12.7)	41 (10.3)	0.006
Alelo 3	104 (84.6)	43 (100)	69 (87.3)	35 (89.7)	

Tabla 28. Frecuencias fenotípicas del polimorfismo del promotor del gen SLC11A1 en pacientes con infección crónica por VHC estratificados según sexo y grado de fibrosis.

2.9. Modelo multivariante en relación con la progresión de la fibrosis hepática

Se construyó un modelo multivariante en el que se incluyeron todas aquellas variables genéticas cuyo valor de p fue inferior o igual a 0.25, por tanto se incluyeron las siguientes variables: TNF-307A (si/no), SLC11A1 alelo 3 (si/no), HFE Ho exón-2 (si/no). Los dos genes relacionados con el metabolismo del hierro que se incluyeron en el estudio, HFE y SLC11A1, resultaron variables independientemente asociadas con el desarrollo de un mayor grado de fibrosis. La tabla 29 muestra los resultados obtenidos.

VARIABLES	OR	95% IC	p
SLC11A1 (presencia alelo 3)	3.26	1.08-9.81	0.035
HFE Ho Exón-2	3.23	1.03-10.21	0.045

Tabla 29. Resultado del modelo multivariante incluyendo factores genéticos en relación con el desarrollo de fibrosis hepática en pacientes con infección por VHC.

Se construyó un nuevo modelo en el que se incluyeron las variables genéticas asociadas con la fibrosis en el modelo anterior (HFE Ho Exón-2 y SLC11A1 presencia del alelo 3) y las variables clínico-epidemiológicas asociadas en el univariante (edad de infección, AST, genotipo viral 1 y tiempo de evolución). La edad de infección fue la única variable que resultó independientemente asociada con el grado de fibrosis en este modelo ($p=0.001$, $OR=1.09$, $95\% CI$ 1.03-1.14).

3. Factores relacionados con la respuesta al tratamiento en la infección por VHC

La tabla 30 muestra algunas características y parámetros biológicos de los pacientes con infección crónica por VHC estratificados según la respuesta al tratamiento. Los pacientes se clasificaron en dos grupos de respuesta: respuesta sostenida (RS) y no respuesta sostenida (NRS).

Características clínico-epidemiológicas	RS N= 101	NRS N= 98	p
Sexo (H/M) (199)	62/39	56/42	ns
Edad infección*(135)	23.94±10.40	22.94± 12.70	ns
Tiempo de evolución**(133)	12.00 ±7.59	18.69 ±10.30	0.0001
Carga viral x10 ⁶ (133)	1.19±1.41	1.40±1.37	ns
Genotipo viral (G1/resto) (158)	38/27	87/6	10 ⁻⁷
Grado de Fibrosis (199):			
(F0-F2/F3-F4)	85/16	74/24	0.13
GOT(AST) *** (188)	74.17±53.43	62.84±36.66	0.06
GPT(ALT) *** (189)	148.67±121.01	108.38±82.61	0.001
GGT ***(189)	41.67±32.89	65.03±69.09	0.02
FA*** (188)	172.16±53.12	185.00±61.61	0.13

Tabla 30. Se muestran las características clínico-epidemiológicas de los pacientes estratificados según la respuesta al tratamiento.

*Edad en años. **Tiempo de evolución en años desde la fecha probable de infección hasta la primera biopsia. *** Niveles medios de transaminasas y fosfatasa alcalina en el momento del diagnóstico.

Entre paréntesis se indica el número de pacientes analizados.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para los polimorfismos estudiados en los genes considerados como candidatos en la respuesta al tratamiento. Todos los casos con valor de $p \leq 0.25$ en el análisis univariante fueron tenidos en cuenta en el posterior análisis multivariante.

3.1. CCR2

3.1.1. Dimorfismo G>A en la posición +190

Los resultados obtenidos para este polimorfismo se muestran en la tabla 31. Se comparó la presencia de A (AA + AG) contra su ausencia (GG). No se

observaron diferencias en cuanto a la distribución de los distintos genotipos entre ambos grupos de pacientes.

CCR2 (+190)		
Genotipos	RS N= 101 (%)	NRS N= 98 (%)
GG	72 (71.28)	74 (75.51)
AG	28 (27.72)	21 (21.42)
AA	1 (0.99)	3 (3.06)

Tabla 31. Frecuencias genotípicas del polimorfismo +190 del gen CCR2 en pacientes con infección por VHC en función de la respuesta al tratamiento.

3.1.2. Dimorfismo G>A situado en el intrón 2

Los resultados obtenidos en el análisis de este polimorfismo se muestran en la tabla 32. No se observaron diferencias en la distribución de genotipos al comparar ambos grupos.

CCR2 (intrón 2)		
Genotipos	RS N= 101 (%)	NRS N= 98 (%)
AA	48 (47.5)	46 (46.9)
AG	42 (41.6)	45(45.9)
GG	11 (10.9)	7 (6.9)

Tabla 32. Frecuencias genotípicas del polimorfismo A>G en el intrón 2 del gen CCR2 en función de la respuesta al tratamiento.

3.2. CCL2/MCP-1

Los resultados obtenidos para este polimorfismo se muestran en la tabla 33. Se comparó la presencia de G (GG + AG) contra su ausencia (AA). No se observaron diferencias en la distribución de genotipos entre ambos grupos de pacientes.

CCL2/MCP-1 (-2518)		
Genotipos	RS N= 101 (%)	NRS N= 98 (%)
AA	64 (63.36)	55 (56.12)
AG	35 (34.65)	40 (40.81)
GG	2 (1.98)	3 (3.06)

Tabla 33. Frecuencias genotípicas respecto de la posición -2518 del gen CCL2/MCP-1 en pacientes con infección crónica por VHC según la respuesta al tratamiento.

3.3. Interacción CCR2-CCL2/MCP-1

Para evaluar la posible relación del complejo receptor-ligando CCR2-CCL2/MCP-1 en cuanto a la respuesta al tratamiento, se realizó un análisis univariante teniendo en cuenta las posibles combinaciones en función de la presencia o ausencia de la mutación en ambos genes. La tabla 34 muestra los resultados obtenidos en el análisis. No se observaron diferencias en la distribución de las diferentes combinaciones en relación con la respuesta al tratamiento.

INTERACCIÓN CCR2-CCL2/MCP-1			
CCR2A	CCL2/MCP-1G	RS N= 101 (%)	NRS N= 98 (%)
+	+	10 (9.9)	11 (11.2)
+	-	19 (18.8)	13 (13.2)
-	+	27 (26.7)	32 (32.6)
-	-	45 (44.5)	42 (42.8)

Tabla 34. Frecuencias de las diferentes combinaciones CCR2-CCL2/MCP-1 en función de la respuesta al tratamiento.

Los símbolos + y - indican la presencia o ausencia del alelo mutado para ambos genes.

3.4. TNF-A

Respecto de las posiciones -307 y -237 se comparó la presencia de A (AA +AG) respecto a su ausencia (GG). No se observaron diferencias en la distribución de genotipos. La tabla 35 muestra los resultados de la distribución de frecuencias genotípicas de los dos polimorfismos analizados en TNF-A.

TNF-A -237		
Genotipos	RS N= 101 (%)	NRS N= 98 (%)
GG	92 (91.08)	91(92.85)
AG	8 (7.92)	7 (7.14)
AA	1(0.99)	-

TNF-A -307		
Genotipos	RS N= 101 (%)	NRS N= 98 (%)
GG	77 (76.23)	70 (71.42)
AG	24 (23.76)	28 (28.57)
AA	-	-

Tabla 35. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos del gen TNF-A en las posiciones -307 (G>A) y -237 (G>A) en pacientes con infección crónica por VHC estratificados en función de la respuesta al tratamiento.

3.5. TGF- β 1

A continuación la tabla 36 muestra los resultados obtenidos para el polimorfismo Arg/Pro del gen TGF- β 1 entre los pacientes con infección crónica por VHC estratificados según la respuesta al tratamiento. Se comparó la presencia de Pro (Arg/Pro+Pro/Pro) frente a su ausencia (Arg/Arg). Se observó una tendencia a una mayor frecuencia de individuos con arginina entre el grupo de pacientes no respondedores.

TGF-β1(codón 25)			
Genotipos	RS N= 101 (%)	NRS N= 98 (%)	p
Arg/Arg	77 (76.2)	84 (85.71)	0.09
Arg/Pro	24 (23.76)	13 (13.26)	
Pro/Pro	-	1 (1.02)	

Tabla 36. Frecuencias genotípicas del polimorfismo Arg/Pro en el codón 25 del gen TGF-β1 en pacientes con infección crónica por VHC estratificados en función de la respuesta al tratamiento.

Cuando se clasificaron los pacientes según el genotipo viral se observó que el aumento de frecuencia del polimorfismo alto productor sólo se encontraba entre los pacientes infectados con genotipo viral 1 que no respondieron al tratamiento ($p= 0.06$). Los resultados se muestran en la tabla 37.

TGF-β1(codón 25)					
Genotipos	G1 N= 125 (%)		No G1 N= 33 (%)		p
	RS N= 38	NRS N= 87	RS N= 27	NRS N= 6	
Arg/Arg	28 (73.7)	76 (87.4)	17 (63.0)	4 (66.7)	0.06
No Arg/Arg	10 (26.3)	11 (12.6)	10 (37.0)	2 (33.3)	

Tabla 37. Frecuencias genotípicas del polimorfismo Arg/Pro en el codón 25 del gen TGF-β1 en pacientes con infección crónica por VHC estratificados en función de la respuesta al tratamiento.

3.6. HFE

Se estudiaron dos dimorfismos genéticos, el SNP rs17515604 localizado en el exón-2 (His63Asp) y el SNP rs1800562 localizado en el exón-4 (Cys282Tyr) del gen HFE.

Respecto del exón-2 (His63Asp) se analizó la presencia de G (CG+GG) frente a su ausencia, y en el exón-4 (Cys282Tyr) se analizó la presencia de A (AG+AA) frente a su ausencia (GG). No se observó ninguna diferencia en la distribución de genotipos entre ambos grupos de pacientes para los polimorfismos analizados en ambos exones. Los datos recogidos se muestran en la tabla 38. Al clasificar el grupo de pacientes varones en base a la respuesta al tratamiento, no se observaron diferencias en la distribución de homocigotos para la mutación His63Asp (2/62, 3.2% RS; 2/56, 3.6% NRS).

HFE (His63Asp)		
Genotipos	RS N= 101 (%)	NRS N= 98 (%)
CC	71(70.29)	69 (70.40)
CG	25(24.75)	27(27.55)
GG	5 (4.95)	2 (2.04)

HFE (Cys282Tyr)		
Genotipos	RS N= 101 (%)	NRS N= 98 (%)
GG	97 (96.03)	93 (94.89)
AG	4 (3.96)	5 (5.10)
AA	-	-

Tabla 38. Frecuencias de los genotipos de los polimorfismos estudiados en el exón-2 C/G (His63Asp) y exón-4 G/A (Cys282Tyr) del gen HFE en pacientes con infección por VHC en relación con la respuesta al tratamiento.

3.7. SLC11A1 (*Nramp1*)

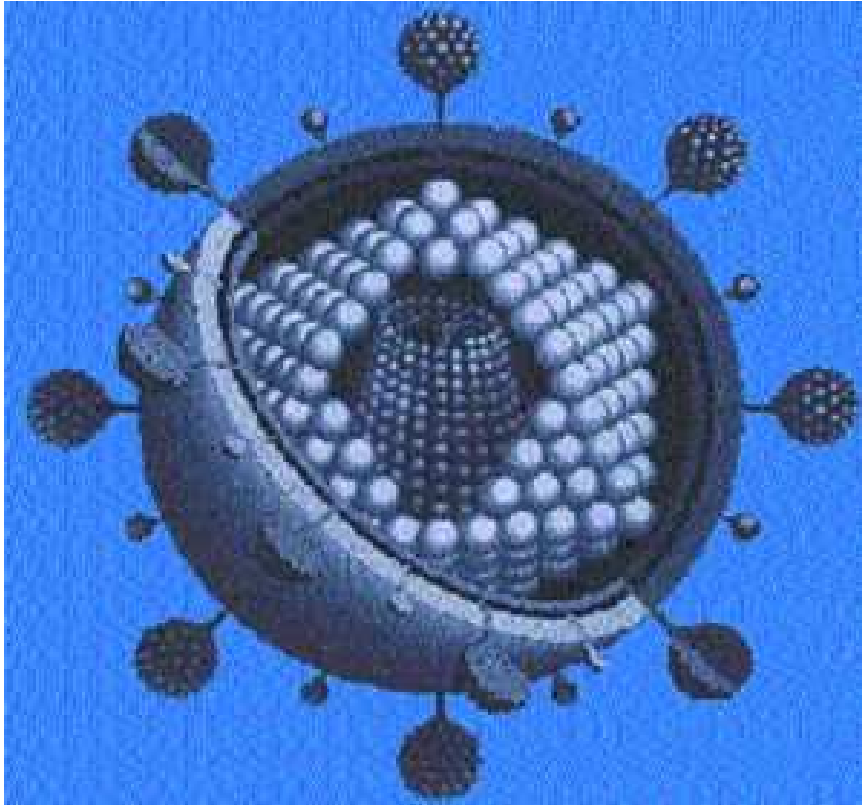
Los resultados obtenidos para los polimorfismos del promotor del gen SLC11A1 se muestran en la tabla 39. No se observó ninguna tendencia a una diferente distribución de genotipos respecto a los polimorfismos analizados. Al clasificar el grupo de pacientes varones en base a la respuesta al tratamiento, no se observaron diferencias en la distribución de individuos portadores del alelo 3 (53/62, 85.5% RS; 49/56, 87.5% NRS).

SLC11A1		
Fenotipos	RS N= 101 (%)	NRS N= 98 (%)
No 3	13 (12.9)	13 (13.3)
3	88 (87.1)	85 (86.7)

Tabla 39. Frecuencias de fenotipos del polimorfismo del promotor del gen SLC11A1 en pacientes con infección crónica por VHC estratificados según respuesta al tratamiento.

3.8. Modelo multivariante en relación con la respuesta total al tratamiento

En este análisis multivariante se incluyeron todas las variables cuyos valores de p resultaron ≤ 0.25 en el análisis univariante. Por tanto, se incluyeron las siguientes variables: grado de fibrosis (F3-F4 si/no), edad de infección, tiempo de evolución, genotipo viral 1(si/no), TGF- β 1 (Arg/Arg si/no), GOT (AST), GPT (ALT), GGT y FA. El genotipo viral fue la única variable asociada de manera independiente con la respuesta al tratamiento (p= 0.001, OR= 10.03, 95% CI 2.53-39.75).



DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación analiza la posible influencia que diferentes factores genéticos del hospedador pueden jugar en la cronificación, en el grado de progresión de la fibrosis-cirrosis hepática, así como en la respuesta al tratamiento tras la infección por el virus de la hepatitis C (VHC). El diseño experimental utilizado consistió en un estudio caso-control con selección de genes candidatos utilizando una estrategia basada en la función biológica de la proteína (hipótesis-testing). De acuerdo con lo anterior, se realizó una selección de genes candidatos relacionados con la cronificación de la infección en la que se incluyeron genes involucrados en la respuesta inmunológica antiviral (KIRs, HLA-Cw*, CCL2-MCP-1, CCR2, TNF- α y TGF- β 1); genes implicados en el desarrollo y progresión de la fibrosis hepática a través de mecanismos de activación de células hepáticas estrelladas (CHE) y síntesis de colágeno (CCL2-MCP-1, CCR2, TNF- α , TGF- β 1, ECA, HFE y SLC11A1); y, por último, genes con un posible papel en la respuesta al tratamiento (CCL2-MCP-1, CCR2, TNF- α , TGF- β 1, HFE y SLC11A1). La selección de los diferentes polimorfismos analizados en cada gen se hizo de acuerdo con su influencia en la expresión de la molécula o en la funcionalidad de la misma.

Los estudios caso-control en los que se investiga la asociación de polimorfismos y susceptibilidad a enfermedades deben ser repetidos en diferentes poblaciones y series para confirmar los resultados obtenidos. En el caso concreto de la infección por VHC, el limitado número de pacientes incluidos en cada serie, la heterogeneidad de las poblaciones analizadas en los diferentes trabajos, así como las diferencias en los criterios de evolución de los pacientes, hace imprescindible la confirmación de los resultados en diferentes cohortes.

En relación con el resultado de la infección por VHC se ha demostrado que determinadas características del hospedador, como el género, influyen en la cronificación de la infección. En este sentido, diferentes estudios concluyen que el sexo femenino es un factor asociado con el aclaramiento viral espontáneo, mientras que el masculino se asocia con la cronificación (Inoue G et al., 2000;

Micallef JM et al., 2006). De hecho, nuestros resultados concuerdan con estos estudios, ya que el grupo de individuos con aclaramiento viral espontáneo y el grupo de pacientes crónicos presentaban una diferente distribución de géneros. Entre los genes candidatos a modificar el curso de las infecciones virales se encuentra el sistema HLA, tanto por la función de estas moléculas en la presentación de antígenos a las células T, como por su papel como ligandos de los receptores inhibidores de las células NK. En este sentido, diferentes trabajos han relacionado estas moléculas con la evolución de distintas infecciones virales crónicas como las producidas por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de la hepatitis B (VHB) (Just JJ et al., 1995; Thio CL et al., 1999). Además, existen estudios donde se evalúa la influencia de diferentes alelos HLA de clase I (Neumann-Haefelin C et al., 2006) y clase II (Barrett S et al., 2005; Thursz M et al., 1999) en el aclaramiento viral de VHC. Estos trabajos ponen de relieve que diferentes especificidades y alelos HLA como B27, DRB1*0101 y DQB1*0301 pueden tener relación con el aclaramiento viral, mientras que otros, como DRB1*0701 y DRB4*0101 se relacionan con la persistencia. Recientemente, se ha descrito asociación de determinados alelos y especificidades del locus HLA-Cw* con la persistencia viral, gracias al desarrollo de las técnicas de biología molecular que son las únicas que permiten un correcto tipaje de este locus (Thio CL et al., 2002). Por otro lado, es bien conocida la existencia de desequilibrio de ligamiento entre diferentes loci HLA, por lo que es plausible plantearse la posibilidad de que asociaciones descritas anteriormente con otras moléculas HLA, fuesen debidas al menos en parte a asociaciones con HLA-Cw*.

Los trabajos anteriormente mencionados, planteaban la relación de las moléculas HLA con la persistencia de la infección desde el punto de vista de su papel como presentadoras de antígenos. Recientemente, se ha replanteado la asociación de estas moléculas con la persistencia de la infección por VHC, en base a su función como ligandos de los receptores de las células NK. Las moléculas HLA-Cw* actúan como ligandos de los receptores KIR de las células NK, las cuales son componentes fundamentales de la respuesta inmune innata antiviral. Aunque existen diferentes genes KIR, los únicos con ligandos HLA-Cw* bien conocidos

son KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3. Como se comentó con anterioridad, los alelos HLA-Cw* se clasifican en dos grupos, C1 y C2, según la presencia de Asn o Lys en posición 80 de la molécula. Las interacciones KIR-HLA-Cw* bien descritas son las que se producen entre HLA-C1 que se une a KIR2DL2 con afinidad intermedia y a KIR2DL3 con afinidad débil y HLA-C2 que se une a KIR2DL1 con afinidad fuerte.

Un estudio previo puso de manifiesto un efecto sinérgico entre determinadas combinaciones KIR-HLA y el resultado de la infección por VHC (Khakoo SI et al., 2004). Este trabajo mostraba que la frecuencia de individuos homocigotos C1C1 era mayor en el grupo de pacientes con aclaramiento viral espontáneo. Dado que KIR2DL3 interactúa con HLA-C1 de forma débil, este grupo estableció la hipótesis de que esta combinación podría ser protectora frente a la infección, al permitir una mayor activación de las células NK que, por tanto, aclararían el virus más fácilmente que en el caso del resto de combinaciones KIR-HLA. Los datos del trabajo anteriormente mencionado mostraban un aumento significativo de la combinación 2DL3/2DL3-C1C1 entre los sujetos con aclaramiento viral, si bien la hipótesis sólo se cumplía en aquellos casos en los que el mecanismo de contagio suponía una baja dosis de inoculación. Hay que resaltar que los sujetos con combinaciones genotípicas óptimas para la activación de las células NK resultaron infectados, lo que indica que el mayor nivel de activación de las células NK que presentan estos individuos no es suficiente para prevenir el establecimiento de esta infección viral.

Nuestros resultados difieren de los esperados según la hipótesis de Kakoo et al., ya que en primer lugar, los individuos con infección crónica presentaban una mayor frecuencia del receptor de baja afinidad 2DL3, mientras que, los individuos que aclaraban la infección presentaban una mayor frecuencia del receptor de afinidad intermedia 2DL2. Además, la frecuencia de HLA-C1 (C1C1+C1C2) se encontraba aumentada entre los individuos que cronificaban la infección. Por último, las interacciones HLA-KIR más fuertes eran más frecuentes en el grupo de pacientes que aclaraban la infección. Las discrepancias detectadas entre ambos trabajos podrían ser explicadas por las diferencias en las frecuencias de los diferentes haplotipos KIR y alelos HLA-C

entre poblaciones. En este sentido y de manera muy general los haplotipos KIRs pueden clasificarse en dos grupos, el grupo A más simple y que contiene el gen 2DL3 y el grupo B, más complejo y que contiene la mayoría de las veces el gen 2DL2. En general, podemos decir que el grupo B contiene más genes KIRs activadores que el grupo A (Parham P, 2005). La alta frecuencia del gen 2DL3, encontrada en el presente trabajo entre los individuos con infección crónica, podría reflejar una mayor frecuencia de haplotipos del grupo A en estos pacientes y por tanto, la existencia de un menor número de genes que codifican receptores activadores. Esta situación podría ser la opuesta para los individuos con aclaramiento viral espontáneo, explicando así la mayor capacidad de aclarar el virus en estos pacientes. Por tanto, nuestros resultados sustentan asociación de los receptores KIR, bien por sí solos, o en combinación con sus ligandos con el proceso de cronificación de la infección por VHC, ya que esta variable se encontraba asociada tanto en el modelo univariante como en el multivariante. No obstante, esta relación no se ajusta al modelo propuesto por Kakoo et al.

Por otro lado, durante la fase aguda-inflamatoria de la infección se sintetizan y actúan componentes fundamentales en la regulación de la respuesta inmunológica tales como la quimiocina CCL2/MCP-1. Una de las funciones de esta molécula es actuar como regulador de la homeostasis de citocinas a nivel hepático contribuyendo a la formación y mantenimiento del infiltrado inflamatorio observado durante la infección por VHC (Bataller R et al., 2005). Se ha descrito que los pacientes con infección por VHC presentan niveles aumentados de CCL2/MCP-1 (Marra F et al., 1999; Narumi S et al., 1997), y recientemente, se ha asociado esta citocina con procesos de aclaramiento en la infección por VHB (Byung Lae Park et al., 2006). Estos antecedentes han permitido establecer una relación entre CCL2/MCP-1 y el resultado de la infección por este virus.

La transmisión de señales vía CCL2/MCP-1 al interior de la célula se realiza a través del receptor de quimiocinas CCR2, y por tanto es plausible que una alteración de la afinidad entre ligando y receptor pudiera afectar el resultado de la respuesta frente al virus. Actualmente sabemos que existe relación entre

determinadas variaciones genéticas de receptores de quimiocinas y la evolución de la infección por diferentes virus tales como VIH (Dean M et al., 1996; Smith MW et al., 1997) y VHC (Woitas RP et al., 2002). De igual forma variaciones descritas en el gen CCR2 se han asociado con retrasos en el desarrollo de la enfermedad en pacientes con infección por VIH (Smith MW et al., 1997). Aunque se dispone de bastante información acerca del papel de CCL2/MCP1 en la fisiopatología de las enfermedades hepáticas crónicas, así como de la influencia que tiene VHC en la inducción de la expresión de esta molécula (Marra F et al., 1998), el conocimiento del papel que juegan tanto CCL2/MCP1 como CCR2 en la resolución de la infección viral es bastante limitado. En el presente trabajo no se detectó asociación del polimorfismo -2518 G>A en el gen CCL2/MCP1 con la cronificación de la infección. Respecto de CCR2, nuestros resultados mostraron una tendencia a una mayor frecuencia de la mutación en la posición 190 en el grupo de pacientes que cronificaban aunque sin alcanzar la significación estadística. Además, en los dos modelos multivariantes construidos, la presencia de CCR2A se comportó como una variable independientemente asociada a la cronificación. Nuestros resultados son similares a los de un estudio univariante realizado recientemente que sugiere un modesto efecto del polimorfismo G190A del gen CCR2 en el aclaramiento viral espontáneo (Mascheretti S et al., 2004). Sin embargo, estos resultados son contradictorios con otros en cuyas series no se encuentra ninguna asociación (Hellier S et al., 2003; Goulding C et al., 2005). Las discrepancias encontradas entre los diferentes estudios podrían deberse a sesgos en la población seleccionada, ya que algunos trabajos que incluyen pacientes de diferentes orígenes (Hellier et al), o bien al tamaño muestral inapropiado de determinadas series de pacientes que presentan un inadecuado poder estadístico insuficiente para detectar asociaciones débiles. Esta situación de inadecuado poder estadístico aparece con facilidad cuando la frecuencia del alelo asociado con la enfermedad es relativamente baja, como ocurre precisamente en el caso de la mutación G190A en CCR2 en población caucásica. Además, aunque se ha descrito asociación entre el polimorfismo G190A de CCR2 y una lenta evolución a SIDA de los pacientes infectados por

VIH (Smith MW et al., 1997), las bases moleculares de esta asociación no están perfectamente establecidas ya que el cambio de Val64Ile es conservativo. Una de las hipótesis planteadas para explicar esta asociación se basa en la existencia de dos isoformas diferentes de CCR2 que se producen mediante splicing alternativo. La isoforma CCR2a, se encuentra predominantemente en el citoplasma, mientras que la CCR2b aparece en la membrana celular (Charo IF et al., 1994). Se ha demostrado que la presencia de la mutación Ile64 origina un incremento de la estabilidad de la isoforma citoplasmática que no afecta a la expresión de la isoforma de superficie (Nakayama E et al., 2004). No obstante, este incremento de la estabilidad de la isoforma citoplasmática, podría provocar alteraciones en la funcionalidad de la isoforma de membrana en diferentes tipos celulares, como NK y linfocitos T, que están fuertemente involucrados en el aclaramiento viral, y por lo tanto en la respuesta frente a la infección por VHC. Hasta la fecha, no existen estudios que analicen otras posibles áreas de asociación del gen CCR2 con la resolución de la infección por VHC. Para explorar esta hipótesis analizamos el *SNP* rs3138042, localizado en el intrón 2 del gen CCR2, próximo a la región de splicing, que presenta un alto grado de heterocigosidad y, que por tanto, podría ser informativo ya que presenta mayor frecuencia del alelo minoritario que G190A por lo que, disminuyen los problemas de poder estadístico. Sin embargo, no encontramos asociación entre este SNP y la cronificación de la infección. Además, con objeto de comprobar el posible efecto combinado de ambos polimorfismos realizamos un análisis de haplotipos en el que tampoco se detectó asociación. Por tanto, en caso de existir realmente una asociación de CCR2 con la cronificación de la infección por VHC, pensamos que la zona asociada estaría más próxima a la posición 190. Finalmente, para evaluar si el ligando y receptor, considerados como un único factor, podrían tener un efecto en la cronificación de la infección se realizó un análisis combinado de las mutaciones -2518 CCL2/MCP-1 y 190 CCR2, en el que se detectó que el grupo que cronificaba la infección presentaba una mayor frecuencia de individuos CCR2A-CCL2/MCP-1A. Además, en el modelo multivariante esta variable se encontraba independientemente asociada con la cronificación, si bien, esta asociación no se podía diferenciar de la que se

encontraba para CCR2A. Por tanto, nuestros resultados no descartan asociación de CCR2 o del par CCR2-CCL2/MCP-1 en la cronificación de la infección por VHC.

El desarrollo de una respuesta intensa por parte de linfocitos T frente a los diferentes antígenos del VHC es un acontecimiento clave durante el proceso de aclaramiento viral espontáneo. Además, se sabe que la regulación del balance TH1/TH2 es fundamental en la respuesta frente al virus. Las células efectoras TH1 promueven la actividad citotóxica mediada por linfocitos T y producen diferentes citocinas con actividad antiviral entre las que se encuentran TNF- α y TGF- β 1. Se ha establecido que una respuesta vigorosa TH1 se relacionaría con el aclaramiento del virus y por el contrario, una respuesta predominantemente TH2, o bien, una respuesta citotóxica ineficaz, condicionaría la cronificación de la infección.

TNF- α es una citocina proinflamatoria con actividad citotóxica y antiviral, que desarrolla su acción a través de mecanismos inmunológicos. La molécula TNF- α se expresa en diferentes tipos celulares tales como fagocitos mononucleares activados, células NK y células T estimuladas con antígeno.

Diferentes trabajos de investigación realizados hasta la fecha ponen de manifiesto el papel de esta molécula en la infección por VHC. Así, se ha descrito que pacientes con infección por VHC presentan niveles elevados de TNF- α (Tilg H et al., 1992), por lo que la inapropiada producción de esta citocina se ha relacionado con la persistencia viral. Por otro lado, se sabe que el virus es capaz de inducir la producción de TNF- α en los hepatocitos humanos (González-Amaro R et al., 1994). La expresión de TNF- α está fuertemente controlada a nivel transcripcional y postranscripcional, y los polimorfismos -307 y -237 se han asociado con el control de la expresión de este gen.

En nuestro estudio, se observó una tendencia hacia una mayor frecuencia de la mutación -307A en el grupo de pacientes crónicos. Además, esta mutación se detectó como variable independientemente asociada con la cronificación en los dos modelos multivariantes construidos, por lo que nuestros resultados no permiten descartar la existencia de asociación entre el polimorfismo de la posición -307 del TNF- α y la cronificación de la infección. En general, los

estudios publicados en población caucasoide comparando pacientes que cronifican con sujetos que aclaran espontáneamente la infección que analizan este polimorfismo no encuentran asociación (Lio D et al., 2003; Constatini PK et al., 2002; Barret S et al., 2003, Mangia A et al., 2004), si bien, algunos muestran una mayor frecuencia de la mutación en posición -307 en el grupo de pacientes que cronifican (Constatini PK et al., 2002; Barret S et al., 2003) y otros, que no la muestran, incluyen una serie muy limitada de pacientes (Lio et al., 2003). Dado el bajo poder estadístico de los estudios individuales debido, por un lado, a la baja frecuencia de la mutación, y por otro al escaso número de sujetos con aclaramiento espontáneo, valoramos la posibilidad de realizar un meta-análisis teniendo en cuenta los datos de todos estos estudios. Sin embargo, descartamos esta posibilidad ya que los resultados no serían concluyentes debido a que existen grandes diferencias en la frecuencia de la mutación dentro de la población caucasoide, y por tanto, no sería correcto tratarla como una cohorte homogénea. Finalmente otros estudios que incluyen como controles individuos sanos no infectados (Hohler T et al., 1998), o poblaciones no caucasoides (Thio CL et al., 2004; Kusumoto K et al., 2006) presentan también resultados discordantes. Respecto de la posición -237 nuestro trabajo y los anteriormente referenciados en población caucasoide que incluyen sujetos con infección crónica y con aclaramiento viral espontáneo, sugieren que no existe relación entre este polimorfismo y la cronificación (Constatini PK et al., 2002; Mangia A et al., 2004).

Como ya se mencionó con anterioridad, las células NK intervienen en la respuesta frente a la infección viral, ya que, constituyen uno de los principales tipos celulares involucrados en la inmunidad innata. Se sabe que, diferentes citocinas tales como TGF- β 1 son supresores de células NK ya que, inhiben la producción de IFN- γ así como de IL-12 y bloquean la proliferación y citotoxicidad de las células NK (Rook AH et al., 1986). Se ha descrito que los niveles de mRNA de TGF- β 1 se encuentran aumentados en pacientes con infección crónica por VHC (Poynard T et al., 1997). Existen diferentes polimorfismos en el gen TGF- β 1 que han sido relacionados con los niveles de expresión de esta citocina y, más concretamente, se ha demostrado que los

sujetos homocigotos Arg/Arg para el polimorfismo del codón 25 presentan niveles incrementados de esta molécula (Awad MR et al., 1998).

Aunque las variaciones genéticas en TGF- β 1 se han estudiado ampliamente en procesos tales como cáncer, fibrosis, etc, existen pocos trabajos en relación con los mecanismos de aclaramiento viral espontáneo tras infección por VHC. Un estudio reciente sugiere que determinados polimorfismos de esta citocina pueden jugar algún papel en el aclaramiento de VHC. Concretamente, este estudio relaciona la presencia del polimorfismo -509C en el promotor del gen TGF- β 1 con una como con una menor actividad transcripcional del gen y con una mayor tasa de aclaramiento del virus (Kimura T et al., 2006). Estos autores sugieren que esta situación podría estar condicionando una menor supresión de la actividad NK, y por lo tanto podría favorecer el aclaramiento. En nuestro trabajo se analizó el polimorfismo Arg25Pro, situado en la región codificante y que se ha relacionado con alteraciones del nivel de expresión de esta molécula (Awad MR et al., 1998). Concretamente, se ha descrito que el genotipo Arg25/Arg25 se relaciona con un mayor nivel de TGF- β 1, por lo que según la hipótesis anterior, constituiría un factor de riesgo para la cronificación. Sin embargo, nuestros resultados no mostraron diferencias en la distribución de genotipos entre los dos grupos analizados. Estos resultados son concordantes con otros publicados en población caucasoide que incluyen grupos de pacientes con infección crónica y grupos control de sujetos con aclaramiento viral espontáneo (Barret S et al., 2003). Además, los datos de un estudio en población asiática en el que el grupo control lo constituían sujetos sanos no infectados, presenta resultados similares a los anteriores (Suzuki S et al., 2003). Por tanto, nuestros resultados, junto con el resto de los publicados, descartan un papel relevante de este polimorfismo en la cronificación de la infección.

Una vez que la infección por VHC cronifica, el curso clínico de la misma es variable y puede ser evaluado de diferentes formas. La comparación entre diferentes estudios resulta en ocasiones difícil debido a la diversidad de marcadores de evolución utilizados. El grado de lesión evaluado mediante el análisis histológico de biopsias hepáticas es uno de los índices utilizado en el

seguimiento de estos pacientes. La diversidad de índices de clasificación utilizados en el análisis de las biopsias así como, la relativa subjetividad de la evaluación de las mismas son factores que añaden heterogeneidad a los estudios. En el presente trabajo se utilizó el índice de Scheuer que permite clasificar las biopsias en función del grado de fibrosis observado. Todas las biopsias fueron obtenidas en el momento del diagnóstico, siendo los criterios de evaluación homogéneos dentro de lo posible.

El desarrollo de diferentes grados de fibrosis en pacientes VHC se ha relacionado con factores tales como edad de infección, sexo, consumo de alcohol, etc. En nuestro estudio, factores como una mayor edad en el momento de la infección y alteraciones en los niveles de las transaminasas GOT (AST) y GGT así como de FA, resultaron características asociadas con un mayor grado de fibrosis. La fibrosis hepática es una consecuencia deletérea de la situación de inflamación crónica que se presenta como resultado de la respuesta inmune frente al virus (Webster JC et al., 2001). El mecanismo de respuesta frente a la infección por VHC desencadena una fase inflamatoria en la que las células hepáticas y linfocitos T activados secretan moléculas tales como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento que juegan un importante papel en la activación de las CHE que, a su vez, producen los componentes de la matriz extracelular y promueven el proceso de fibrosis. Durante la infección crónica por VHC se produce, por tanto, inflamación persistente, daño hepático y fibrosis, y aquellos factores que intervienen en perpetuar este proceso podrían estar relacionados con diferencias en la evolución de la fibrosis. Por tanto, diversos factores genéticos del hospedador relacionados con la cascada inflamatoria y con el proceso fibrogénico podrían explicar, al menos en parte, el amplio abanico de respuestas que se producen frente al mismo agente etiológico en el proceso de cronificación (Bataller R et al., 2003). Por ejemplo, se ha propuesto que determinados polimorfismos genéticos en genes de citocinas y quimiocinas proinflamatorias podrían explicar la heterogeneidad de la respuesta fibrogénica que manifiestan estos pacientes (Poynard T et al., 1997). En este sentido, diferentes estudios han puesto de manifiesto el papel del par CCL2/MCP-1-CCR2 en el reclutamiento y mantenimiento del infiltrado

inflamatorio durante el daño hepático (Marra F et al., 1999) y, en concreto, en el que se produce como consecuencia de la infección por VHC (Narumi S et al., 1997; Nischalke HD et al., 2004). En el presente estudio, no se encontraron diferencias en la distribución de genotipos respecto del polimorfismo -2518 del gen CCL2/MCP-1 al comparar los pacientes con infección VHC clasificados según el grado de fibrosis. Estos resultados son concordantes con algunos descritos anteriormente en una serie corta de pacientes (Glas J et al., 2004) y discrepan de otros que describen asociación entre la presencia del alelo -2518G, descrito como alto productor de esta quimiocina, y el desarrollo de un mayor grado de fibrosis (Muhlbauer et al., 2003). Nuestra serie incluía un número de pacientes superior al de la serie de Muhlbauer et al. y aún así no se encontró asociación.

Por otro lado, CCR2 se ha relacionado con el proceso de fibrosis en diferentes estudios desarrollados en modelos animales. Por ejemplo, en un modelo murino de fibrosis pulmonar se demostró que los ratones deficientes en este receptor no progresaban a fibrosis, lo que sugiere asociación entre CCR2 y la cascada de citocinas profibróticas (Moore BB et al., 2001). En esta misma línea, se ha establecido el papel de este receptor en un modelo murino de fibrosis renal demostrándose que, en aquellos ratones en los que se bloqueaba el receptor el grado de fibrosis era inferior al que presentaban los ratones en los que el receptor no se bloqueaba (Kitagawa K et al., 2004). Además, un trabajo reciente en el que se identificaba el perfil molecular de genes relacionados con los estadios iniciales de fibrosis inducida por VHC, se describía una alteración en la regulación de la expresión de este gen en pacientes en estadio inicial de fibrosis respecto de sujetos normales, lo que parece indicar la existencia de una relación entre este gen y el desarrollo de fibrosis hepática (Bieche I et al., 2005).

En el presente trabajo se estudió el posible papel del polimorfismo 190A del gen CCR2 en el desarrollo de la fibrosis hepática, no observándose asociación con el estadio de fibrosis. Nuestros resultados son concordantes con otros estudios que no encuentran asociación entre este polimorfismo y el desarrollo de fibrosis hepática avanzada (Hellier S et al., 2003; Promrat K et al., 2003; Ruiz-Ferrer M

et al., 2004). Como se comentó en el apartado correspondiente al proceso de cronificación de la infección, el análisis de este *SNP* presenta una serie de problemas relacionados tanto con la baja frecuencia de la mutación, como con la naturaleza del cambio de aminoácido generado. Al igual que en el apartado anterior, se analizó la frecuencia del *SNP* rs3138042 G>A no detectándose ninguna diferencia en la distribución de genotipos entre los dos grupos estudiados. Además, al analizar el posible efecto combinado de las mutaciones en la quimiocina y su receptor no se encontraron diferencias en la distribución entre ambos grupos de pacientes. Por tanto, este estudio sugiere que no existe relación entre los polimorfismos analizados en el par CCR2-CCL2/MCP-1 y el grado de fibrosis hepática en pacientes con infección crónica por VHC.

La infección crónica de las células hepáticas por VHC desencadena la producción de determinadas citocinas tales como TNF- α y TGF- β 1. Estas citocinas intervienen en la activación de las CHE contribuyendo al proceso de fibrosis hepática. Por tanto, la existencia de polimorfismos funcionales en los genes que codifican estas citocinas podrían contribuir al resultado final de la enfermedad. En relación con el gen TNFA, se ha descrito por ejemplo, que los pacientes infectados con VHC receptores de un injerto hepático procedente de un donante con la mutación TNFA -307A, desarrollan un mayor grado de lesión histológica en el órgano trasplantado, lo que puede indicar relación entre este polimorfismo y el grado de fibrosis desarrollado (Rosen HR et al., 1999). Con respecto al análisis realizado en el presente estudio, nuestros resultados mostraron un ligero aumento de la frecuencia del alelo -307A en pacientes con estadio de fibrosis F3-F4. Otros estudios realizados en población caucasoide con este mismo polimorfismo muestran diferentes resultados. Por ejemplo, algunos estudios describen asociación entre el desarrollo de fibrosis avanzada y la mutación -307A (Yee LJ et al., 2000), sin embargo otros no confirman esta asociación (Powell EE et al., 2000; Bahr MJ et al., 2003). Como se comentó en el apartado correspondiente a la cronificación, los trabajos individuales presentan problemas relacionados con el poder estadístico que podrían solucionarse con un meta-análisis que englobara los resultados obtenidos en poblaciones genéticamente homogéneas. Sin embargo, las limitaciones

comentadas anteriormente impedían obtener resultados concluyentes este análisis. Respecto a los estudios en poblaciones no caucásicas se encuentran igualmente resultados contradictorios (Goyal et al., 2004; Abbas Z et al., 2005; Dai CY et al., 2006a). Además, el modelo multivariante realizado en el presente estudio no detectó esta variable como independientemente asociada con el grado de fibrosis. En relación con la posición -237A, nuestros resultados en el estudio univariante son concordantes con los encontrados en población caucasoide y en otras poblaciones que describen no asociación de este polimorfismo con el grado de fibrosis (Yee LJ et al., 2000; Dai CY et al., 2006a). Por tanto, nuestros resultados sugieren que estos dos polimorfismos en el gen TNFA no juegan un papel relevante en el grado de fibrosis hepática desarrollado en estos pacientes.

En relación con la otra citocina incluida en el presente trabajo, diferentes estudios realizados tanto en modelos animales como humanos han establecido el papel de TGF- β 1 en el desarrollo de fibrosis tisular (Border WA et al., 1994; Blobe GC et al., 2000; Gressner AM et al., 2006). TGF- β 1 ejerce su acción activando las CHE que expresan un amplio abanico de PME y, además, inhibe la degradación de estas moléculas. Esta citocina es un potente inductor de apoptosis en hepatocitos, la cual se relaciona con el proceso de fibrogénesis.

Los resultados del estudio del polimorfismo Arg/Pro en el codón 25 del gen TGF-B1 en nuestra serie de pacientes no sugieren asociación de este polimorfismo con el grado de fibrosis. En relación con este polimorfismo se han publicado tres trabajos en población caucásica, en uno de ellos se describe asociación entre el grado de fibrosis hepática y el genotipo alto productor de la citocina (Powell EE et al., 2000), mientras que en los otros dos, la asociación detectada es la contraria (Gewaltig J et al., 2002; Wang H et al., 2005). En cuanto al único trabajo publicado en población no caucásica no se encontró ninguna asociación (Suzuki S et al., 2003). La detección de asociaciones contrarias en la misma posición indicaría que el polimorfismo estudiado no es el causante directo de la asociación encontrada, si bien, pueden existir otras posiciones en desequilibrio de ligamiento causantes de las asociaciones

descritas. El estudio de múltiples *SNPs* en este gen podría ayudar a dilucidar su papel en el desarrollo de este proceso.

Una de las múltiples rutas involucradas en el desarrollo de fibrosis hepática es el sistema renina-angiotensina (SRA). Aunque la información actual sobre el funcionamiento de este sistema a nivel hepático no es concluyente, existen datos que sugieren la presencia de receptores de angiotensina II (AII) en las CHE (Bataller R et al., 2000). El SRA es regulado por estímulos generados en el mismo órgano, especialmente en presencia de daño agudo o crónico. La enzima convertidora de angiotensina (ECA) está implicada en la síntesis de AII, y ésta, a su vez, se ha relacionado con el proceso de fibrosis en diferentes órganos (Noble NA et al., 1997; Ocaranza MP et al., 2004). Modelos animales de fibrogénesis hepática sugieren que el bloqueo de uno de los principales receptores para la AII podría influir en el resultado final de enfermedad, reduciendo la fibrosis (Paizis G et al., 2002). Además, se ha postulado que la actividad ECA podría ser un indicador de la severidad de la enfermedad hepática (Schweisfurth H et al., 1979).

Por otro lado, se ha demostrado que la presencia del polimorfismo D/I localizado en el intrón 16 del gen ECA se relaciona con el nivel de expresión de la enzima y a su vez con el aumento de AII (Rigat B et al., 1990). Al analizar este polimorfismo en nuestra serie de pacientes, no encontramos asociación entre el genotipo alto productor (DD) y un mayor grado de fibrosis. Estos resultados son similares a los obtenidos en estudios previos (Powell EE et al., 2000; Forrest EH et al., 2005). Hay que resaltar, que nuestro estudio aporta un mayor número de casos que los anteriores y además, se realizó una mejora en el método de genotipado con el fin de asignar correctamente aquellos genotipos que presentan problemas de amplificación (Shanmugan V et al., 1993).

En la actualidad se sabe que los pacientes con infección crónica por VHC presentan frecuentemente alteraciones en los indicadores de los niveles de hierro sérico, ferritina e índice de saturación de transferrina, así como incrementos moderados en la concentración de hierro a nivel hepático (Di Bisceglie AM et al., 1992) y que estos cambios pueden influir en el desarrollo de

fibrosis (Chitturi S et al., 2002; Metwally MA et al., 2004). La producción de radicales activos de oxígeno y concretamente el estrés oxidativo se encuentran entre los mecanismos propuestos para explicar la influencia de la sobrecarga de hierro en el desarrollo del proceso de fibrosis a través de la activación de las CHE (Pietrangelo A, 2003).

Existen diferentes estudios que han relacionado mutaciones en genes vinculados con el metabolismo del hierro (HFE, TFR, etc) y la progresión de fibrosis hepática (Smith BC et al., 1998). Además, está bien documentado el papel de la mutación Cys282Tyr del gen HFE en el metabolismo del hierro y en el desarrollo de hemocromatosis hereditaria (Feder JN et al., 1996). También se ha descrito que los sujetos Asp63/Asp63, así como los dobles heterocigotos His63/Asp63 y Cys282/Tyr282, tienen mayor tendencia a acumular hierro, fundamentalmente en el caso de varones que carecen de pérdidas fisiológicas periódicas de hierro (Martinelli AL et al., 2000). En nuestro estudio, en el análisis de mutaciones en el gen HFE, detectamos un aumento de la frecuencia de la mutación Asp63 entre los pacientes que presentaban un estadio de fibrosis más avanzado. Hay que señalar que respecto a la mutación en posición 282, el número de pacientes Tyr282Tyr así como, el de dobles heterocigotos, no permitió ningún tipo de análisis estadístico. Con los resultados anteriormente descritos para la mutación en posición 63 y el argumento previamente expuesto de la mayor influencia de esta mutación en la sobrecarga férrica en varones, analizamos la influencia de la posición 63 en el grupo de pacientes separados por sexo. Nuestros resultados sugieren que la molécula HFE interviene en el desarrollo de estadios avanzados de fibrosis en pacientes varones infectados por VHC. Estos resultados son concordantes con otros obtenidos previamente (Piperno A et al., 1998) y explican, al menos en parte, las discrepancias observadas en diferentes estudios cuyos resultados oscilan desde, la no asociación entre el desarrollo de fibrosis y las mutaciones en el gen HFE (Hezode C et al., 1999; Thorburn D et al., 2002) hasta asociaciones con *ORs* que varían entre 1.8 y 18 (Tung BY et al., 2003; Richardson MM et al., 2005).

SLC11A1 es una proteína transportadora de cationes divalentes y, por tanto, de hierro cuyo gen presenta un polimorfismo situado en la región promotora que

se ha relacionado con diferentes enfermedades autoinmunes e infecciosas (Rodríguez MR et al., 2002; Searle S et al., 1999; Marquet S et al., 1999). Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar la asociación con estas enfermedades, entre ellos se encuentra la posible relación entre este polimorfismo y los niveles de expresión de determinadas citocinas proinflamatorias. Por ejemplo, en individuos con tuberculosis se ha sugerido que los monocitos con genotipo 2/2 expresan mayores niveles de IL-10 (Awomoyi AA et al., 2002). Además, SLC11A1 se ha relacionado con la estabilidad del mRNA de citocinas tales como TNF o TGF- β 1 (Schuppan D et al., 2003). Por otro lado, SLC11A1 se ha relacionado también con un incremento en los niveles de óxido nítrico en macrófagos y hepatocitos, y a su vez, vía peroxinitrito con la producción de radicales oxidantes, lo que puede afectar al desarrollo de fibrosis hepática (Nathan C et al., 1995; Kandemir O et al., 2002). Nuestros resultados sugieren que los varones portadores del alelo 3 desarrollan un mayor grado de fibrosis. Una posible explicación para estos resultados sería que los pacientes que presentan este alelo tuvieran una expresión disminuida de IL-10 (Awomoyi AA et al., 2002), y puesto que esta citocina tiene efectos anti-fibrogénicos y anti-inflamatorios estos individuos estarían más expuestos al desarrollo de fibrosis. Otros mecanismos implicados en el estrés oxidativo y/o en la expresión de otras citocinas podrían estar relacionados con los resultados obtenidos. Este es el primer estudio que investiga el posible papel de este polimorfismo en el desarrollo de fibrosis.

Cabe señalar que los dos genes relacionados con el hierro incluidos en este estudio resultaron independientemente asociados con el grado de fibrosis en el modelo multivariante que incluía los factores genéticos. Sin embargo, cuando se introdujeron variables clínico-epidemiológicas en el modelo, no se encontró relación con estas variables, probablemente por el menor número de casos incluidos.

En la actualidad, la recomendación terapéutica para la hepatitis crónica por VHC se basa en el uso combinado de IFN-pegilado más RBV durante periodos que oscilan entre 24 y 48 semanas (Di Bisceglie AM et al., 2002). Aproximadamente el 50% de los pacientes tratados responden a la terapia, siendo el genotipo

viral un factor determinante en el resultado de la misma (Fried MW et al., 2002). Se sabe que el nivel de respuesta en sujetos infectados con genotipos virales 1 ó 4 es menor que el de aquellos que lo están con genotipos 2 ó 3, que además son sometidos a tratamientos más cortos y con menores dosis de RBV (Manns MP et al., 2001). Otro factor viral que podría influir en la respuesta es la concentración sérica de RNA viral, sobre todo entre los pacientes infectados con genotipo 1 (Feld JJ et al., 2005). En nuestra serie de pacientes, los factores clínico-epidemiológicos asociados con la respuesta en el análisis univariante fueron: mayor tiempo de evolución (tiempo transcurrido desde la infección hasta la primera biopsia), genotipo viral 1 y mayores niveles medios de transaminasas, principalmente GPT (ALT).

Por otro lado, aunque en menor medida, se ha descrito que factores del hospedador tales como la raza pueden estar también implicados en el resultado final de la respuesta, lo que sugiere que factores genéticos del hospedador intervienen en este proceso (Muir AJ et al., 2004). Entre los factores genéticos que pueden influir en la respuesta a la terapia, se ha demostrado que la expresión en hígado CCL2/MCP-1 es dependiente de IFN α / β y que el déficit de esta quimiocina se asocia fuertemente con la reducción del número macrófagos y células NK, así como, con el descenso de la concentración de MIP-1 α e IFN γ en un modelo murino de infección por CMV (Hokeness KL et al., 2005). Por tanto es plausible que el tratamiento con IFN α modifique la expresión de CCL2/MCP-1 y que polimorfismos funcionales localizados en este gen pudieran condicionar la respuesta a la terapia. En este sentido, se ha descrito correlación entre los niveles plasmáticos de quimiocinas y el resultado de la terapia antiviral en pacientes VHC (Wright H et al., 2005; Butera D et al., 2005). En contraposición con los datos publicados previamente (Konishi I et al., 2004), nuestros resultados no sugieren asociación entre el polimorfismo estudiado en el gen CCL2/MCP-1 y la respuesta al tratamiento.

En cuanto a CCR2, los resultados obtenidos respecto de las dos posiciones analizadas no sugieren asociación con la respuesta a la terapia. Estos resultados son concordantes con los obtenidos en estudios previos (Konishi I et al., 2004; Mascheretti S et al., 2004). El análisis combinado de las mutaciones

en el par CCL2-MCP-1/CCR2 tampoco sugiere asociación del par ligando-receptor considerado como un único factor en la respuesta a la terapia.

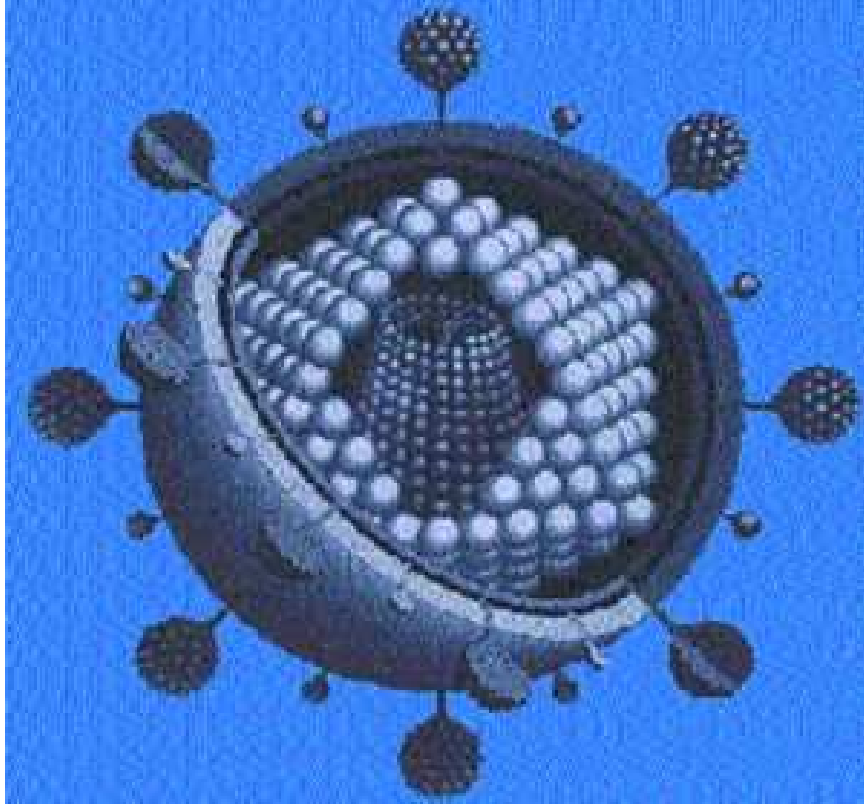
Respecto a las posibles implicaciones de polimorfismos funcionales localizados en TNF- α y TGF- β 1 en la respuesta al tratamiento, actualmente existen diferentes estudios que sugieren un posible papel de determinadas citocinas en relación con la respuesta al tratamiento antiviral VHC. Por ejemplo, un determinado genotipo de IL-10 se ha asociado con una mejor respuesta al tratamiento (Edwards-Smith CJ et al., 1999; Yee LJ et al., 2001). Por otro lado, existen diferentes trabajos que documentan el efecto de la terapia con IFN- α sobre los niveles de TNF- α , habiéndose descrito un efecto supresor tanto de la expresión génica como de la síntesis proteica in vitro e in vivo, lo que sugiere una posible relación entre esta citocina y la respuesta al tratamiento antiviral (Abu-Khabar KS et al., 1992; Larrea E et al., 1996). El análisis de los resultados obtenidos en nuestra serie de pacientes respecto de los dos polimorfismos funcionales de TNF- α incluidos en este estudio, no sugieren relación de estos polimorfismos en la respuesta a la terapia se observaron diferencias entre los grupos de pacientes respondedores y no respondedores. Estos resultados son concordantes con la mayoría de los publicados previamente (Yee LJ et al., 2001; Vidigal PG et al., 2002; Rosen HR et al., 2002; Constantini PK et al., 2002; Yu ML et al., 2003; Schiemann et al., 2003; Airoldi A et al., 2004; Konishi I et al., 2004; Ben-Ari Z et al., 2004; Wright H et al., 2005; Abbas Z et al., 2005).

En el único trabajo donde se sugería asociación entre la presencia del alelo -307A y no respuesta al tratamiento, esta asociación se limitaba a los pacientes infectados con genotipo 1b que representaban menos del 50% de los casos incluidos en esta serie (Dai CY et al., 2006b). Sin embargo, nuestro estudio y la mayoría de los anteriormente mencionados incluyen una población mayoritariamente infectada por genotipo 1 (en nuestro caso más del 80% de los pacientes) no encontrándose asociación. Por tanto, con independencia del genotipo viral, el conjunto de los estudios descarta asociación entre estos polimorfismos y la respuesta al tratamiento.

En relación con TGF- β 1, estudios recientes sugieren que los pacientes con respuesta sostenida al tratamiento combinado presentan niveles séricos reducidos, y así como un descenso en el nivel del ARNm de esta citocina en el hígado. (Marek B et al., 2005; Guido M et al., 2006; Janczewska-Kazek E et al., 2006). Por tanto, niveles más elevados de esta citocina podrían correlacionarse con una peor respuesta al tratamiento. En el presente trabajo detectamos una mayor frecuencia del genotipo alto productor (Arg/Arg) de esta citocina entre el grupo de pacientes no respondedores infectados con genotipo viral 1. En el modelo multivariante no se detectó asociación independiente de este polimorfismo con la respuesta a la terapia, si bien, hay que tener en cuenta la limitación del modelo impuesta por el número de casos analizados. No se han publicado otros trabajos que investiguen la relación entre este polimorfismo y la respuesta al tratamiento. Sin embargo, estudios de otros polimorfismos en este mismo gen, muestran relación con la respuesta al tratamiento (Vidigal PG et al., 2002), o no la descartan completamente (Abbas Z et al., 2005). En resumen, nuestros resultados sugieren que TGF- β 1 puede ser un factor predictivo de falta de respuesta sostenida a la terapia antiviral sobretodo en individuos infectados con genotipo viral 1.

El grado de fibrosis hepática es un factor que se ha relacionado con la respuesta a la terapia combinada en pacientes infectados por VHC (Schalm SW et al., 1999; Heathcote EJ et al., 2000). Está descrito que mutaciones en genes relacionados con el metabolismo del hierro pueden asociarse con un mayor grado de fibrosis en pacientes VHC (Smith BC et al., 1998). De hecho, en este estudio detectamos diferencias en la distribución de genotipos en los genes HFE y SLC11A1 respecto del grado de fibrosis hepática, lo que podría constituir un factor de confusión al evaluar la respuesta al tratamiento. Sin embargo, al analizar la distribución de genotipos del gen HFE, así como de los diferentes alelos del gen SLC11A1, no se detectó ninguna diferencia entre los grupos de respuesta sostenida y no-respuesta. Al clasificar el grupo de pacientes varones en función de la respuesta al tratamiento, no se observaron diferencias en la distribución de sujetos homocigotos para la mutación His63Asp del gen HFE, ni en la distribución de individuos portadores del alelo 3 del gen SLC11A1.

En general, este trabajo analiza una serie de factores que pueden modular el resultado final de la infección por VHC. En relación con la cronificación de la enfermedad, nuestros resultados sugieren la existencia de diferentes rutas involucradas en este proceso. Así, hemos encontrado que tanto la respuesta NK, como las quimiocinas, sus receptores, y las citocinas pueden estar relacionados con los mecanismos de cronificación. Respecto de la progresión a fibrosis, el presente trabajo aporta datos que indican que, las citocinas y sobretodo las moléculas relacionadas con el metabolismo del hierro podrían estar involucradas en este proceso. Para finalizar, en relación con la respuesta al tratamiento con terapia combinada la influencia de los factores genéticos del hospedador incluidos en el presente trabajo parece ser menor. En este sentido, nuestros datos sólo sugieren cierta asociación con determinadas citocinas. Finalmente, este estudio abre nuevas perspectivas sobre posibles rutas en las que profundizar en relación con la evolución de la infección por VHC.



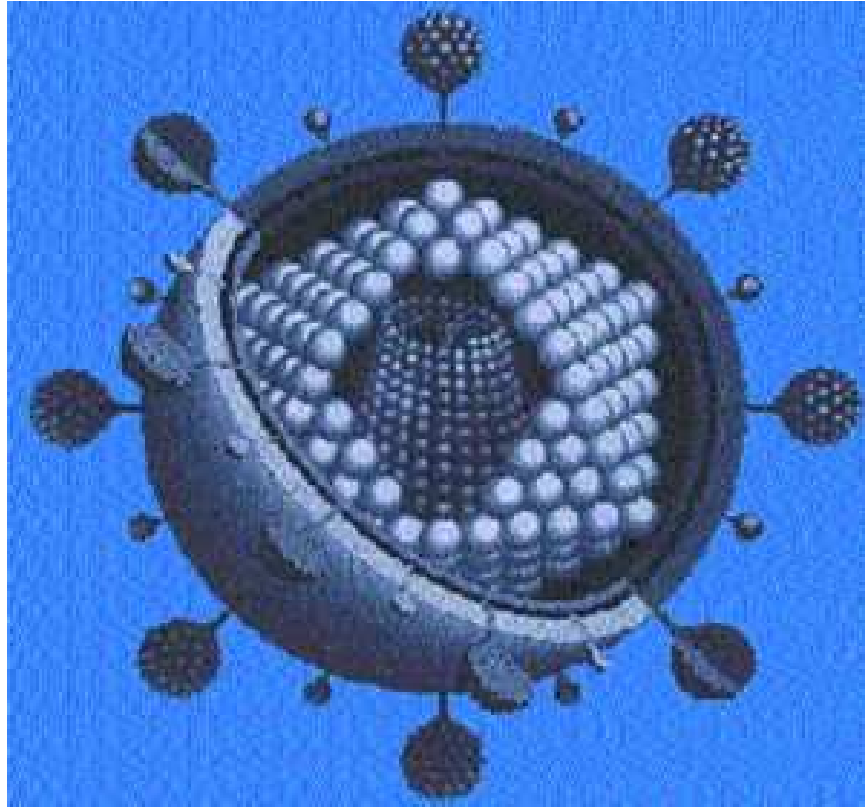
CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

- 1.** El estudio de una serie de genes candidatos seleccionados por la función de sus productos génicos permite establecer la existencia de bases genéticas en la variabilidad del curso clínico de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC).
- 2.** Los genes KIR, bien por sí solos, o en combinación con sus ligandos están asociados con el proceso de cronificación de la infección por VHC. En concreto, la presencia del gen KIR2DL3, se asocia con la cronificación de la infección por este virus.
- 3.** Determinadas moléculas HLA-C que presentan el aminoácido Asn en posición 80 de la secuencia polipeptídica podrían asociarse con la persistencia de la infección viral.
- 4.** Otros factores genéticos del hospedador parecen tener cierta influencia en la cronificación de la infección por este virus. Concretamente, la presencia del alelo 190CCR2A o del par 190CCR2A/-2518CCL2-MCP-1A, así como el alelo -307TNFA podrían estar relacionados con este proceso.
- 5.** Genes involucrados en el metabolismo del hierro influyen en el desarrollo de la fibrosis hepática, sobre todo, en sujetos sin pérdidas fisiológicas periódicas de hierro. En concreto, tanto la mutación His63Asp del gen HFE en homocigosis, como la presencia del alelo 3 del gen SLC11A1, se asocian con un mayor

grado de fibrosis hepática en pacientes varones con infección crónica por VHC.

- 6.** La respuesta al tratamiento depende en gran medida de los factores genéticos del huésped. No hemos podido demostrar relación entre la mayoría de los factores genéticos analizados en el hospedador y la respuesta al tratamiento de los pacientes con infección por VHC. Sin embargo, el genotipo alto productor para el polimorfismo del codón 25 del gen TGF- β 1 podría asociarse con una peor respuesta sostenida, sobre todo en pacientes infectados con genotipo viral 1.



BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abbas Z, Moatter T, Hussainy A, Jafri W. Effect of cytokine gene polymorphism on histological activity index, viral load and response to treatment in patients with chronic hepatitis C genotype 3. **2005**. World J Gastroenterol. 11:6656-61.

Abu-Khabar KS, Armstrong JA, Ho M. Type I interferons (IFN-alpha and beta) suppress cytotoxin (tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin) production by mitogen-stimulated human peripheral blood mononuclear cell. **1992**. J Leukoc Biol. 52: 165-72.

Airoidi A, Zavaglia C, Silini E, Tinelli C, Martinetti M, Asti M, Rossini A, Vangeli M, Salvaneschi L, Pinzello G. Lack of strong association between HLA class II, tumour necrosis factor and transporter associated with antigen processing gene polymorphisms and virological response to alpha-interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. **2004**. Eur J Immunogenet. 31: 259-65.

Alter MJ. The epidemiology of hepatitis C in the west. **1995**. Semin Liver Dis. 15: 5-14.

Amatruda TT, N.P. Gerard, C. Gerard, M.I. Simon. Specific interactions of chemoattractant receptors with G-proteins. **1993**. J Biol. Chem. 268: 10139-10144.

Andrews NC, Levy JE. Iron is hot: an update on the pathophysiology of hemochromatosis. **1998**. Blood. 92: 1845-51.

Arias M, Sauer-Lehnen S, Treptau J, Janoschek N, Theuerkauf I, Buettner R, Gressner AM, Weiskirchen R. Adenoviral expression of a transforming growth factor-beta1 antisense mRNA is effective in preventing liver fibrosis in bile-duct ligated rats. **2003**. BMC Gastroenterol. 3:29.

Arkwright PD, Laurie S, Super M, Pravica V, Schwarz MJ, Webb AK, Hutchinson IV. TGF-beta-1 genotype and accelerated decline in lung function of patients with cystic fibrosis. **2000**. Thorax. 55:459-62.

Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. **2000.** Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.279: G245-G249.

Asselah T, Bieche I, Laurendeau I, Paradis V, Vidaud D, Degott C, Martinot M, Bedossa P, Valla D, Vidaud M, Marcellin P. Liver gene expression signature of mild fibrosis in patients with chronic hepatitis C. **2005.** Gastroenterology. 129: 2064-75.

Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. **1998.** Transplantation. 66:1014-20.

Awomoyi AA, Marchant A, Howson JMM, McAdam KP, Blackwell JM, Newport MJ. Interleukin 10, polymorphism in SLC11A1 (formerly nramp1), and susceptibility to tuberculosis. **2002.** J Infect Dis. 186:1808-14.

Bacon BR, Wolff RK. A novel MHC class I-like gene is mutated in Patients with hereditary haemochromatosis. **1996.** Nat Genet. 13:399-408.

Bacon BR. The discovery of HFE. **1999.** Curr Gastroenterol Rep. 1:7

Bahr MJ, el Menuawy M, Boeker KH, Musholt PB, Manns MP, Lichtinghagen R. Cytokine gene polymorphisms and the susceptibility to liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. **2003** Liver Int. 23:420-5.

Bain C, Fatmi A, Zoulim F, Zarski JP, Trepo C, Inchauspe G. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. **2001.** Gastroenterology. 120:512-24.

Balkwill FR, Griffin DB, Lee AE. Interferons alpha and gamma differ in their ability to cause tumour stasis and regression in vivo. **1989.** Eur J Cancer Clin Oncol. 25:1481-6.

Barret S, Sweeney M, Crowe J. Host immune response in hepatitis C virus clearance. **2005.** Eur J gastroenterol hepatol. 17: 1089-97.

Barrett S, Collins M, Kenny C, Ryan E, Keane CO, Crowe J. Polymorphisms in tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma, and outcome of hepatitis C virus infection. **2003.** J Med Virol. 71: 212-8.

Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. **2005.** J Clin Invest. 115:209-18.

Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbis MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodes J. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. **2000**. *Gastroenterology*. 118:1149-56.

Bataller R, North KE, Brenner DA. Genetics polymorphism and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal. **2003**. *Hepatology*. 37: 493-503.

Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. **1997**. *Nature*. 385: 640-4.

Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Whittle HC, Hill AV. Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. **1998**. *N Engl J Med*. 338: 640-4.

Bellamy R. Susceptibility to mycobacterial infections: The importance of host genetics. **2003**. *Genes Immun*. 4: 4-11.

Ben-Ari Z, Pappo O, Druzd T, Sulkes J, Klein T, Samra Z, Gadba R, tambur Ar, Tur-Kaspa R, Mor E. Role of cytokine gene polymorphism and hepatic transforming growth factor beta 1 expression in recurrent hepatitis C after liver transplantation. **2004**. *Cytokine*. 27: 7-14.

Bieche I, Asselah T, Laurendeau I, Vidaud D, Degot C, Paradis V, Bedossa P, Valla DC, Marcellin P, Vidaud M. Molecular profiling of early stage liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. **2005**. *Virology*. 332: 130-44.

Bigger CB, Brasky KM, Lanford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. **2001**. *J. Virol*. 75:7059-66.

Blackwell JM, Searle S, Mohamed H, White JK. Divalent cation transport and susceptibility to infectious and autoimmune disease: continuation of the Ity/Lsh/Bcg/Nramp1/Slc11a1 gene story. **2003**. *Immunol Lett*. 85:197-203.

Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. **2000**. *N Engl J Med*. 342:1350-8.

Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. **1994**. *N Engl J Med*. 331:1286-92.

Bowen DG, Walker CM. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. **2005**. *Nature*. 436: 946-52.

Butera D, Marukian S, Iwamaye AE, Hembrador E, Chambers TJ, Di Bisceglie AM, Charles ED, Talal AH, Jacobson IM, Rice CM, Dustin LB. Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C. **2005**. *Blood*. 106: 1175-1182.

Byung Lae Park, Yoon Jun Kim, Hyun Sub Cheong, Lyoung Hyo Kim, Yoo Hyun Choi, Hyo-Suk Lee, Hyoung Doo Shin. Association of common promoter polymorphisms of MCP1 with hepatitis B virus clearance. **2006**. *Exp Mol Med*. 38: 694-702.

Cambien F, Ricard S, Troesch A, Mallet C, Generenaz L, Evans A, Arveiler D, Luc G, Ruidavets JB, Poirier O. Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. **1996**. *Hypertension*. 28: 881-7.

Carrington MS, Wang S, Martin MP, Gao X, Schiffman M, Cheng J, Herrero R, Rodriguez AC, Kurman R, Mortel R. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of KIR and HLA loci. **2005**. *J. Exp. Med*. 201: 1069-1075.

Chang KM. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. **2003**. *Clin Liver Dis*. 7: 89-105.

Charo IF, Myers SJ, Herman A, Franci C, Connolly AJ, Coughlin SR. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. **1994**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91: 2752-6.

Chitturi S, Weltman M, Farrel GC, McDonald D, Kench J, Liddle C, Samamrasinghe D, Lin R, Abeygunasekera S, George J. HFE mutations, hepatic iron, and fibrosis: ethnic-specific association of HASH with C282Y but not with fibrotic severity. **2002**. *Hepatology*. 36: 142-9.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of cDNA clone derived from blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **1989**. *Science*. 244: 359-362.

Constantini PK, Wawrzynowicz-Syczewska M, Clare M, Boron-Kaczmarek A, McFarlane IG, Cramp ME, Donaldson PT. Interleukin-1, interleukin-10 and

tumour necrosis factor alpha gene polymorphisms in hepatitis C virus infection: an investigation of the relationships with spontaneous viral clearance and response to alpha-interferon therapy. **2002**. *Liver*. 22: 404-412.

Contreras AM, Hiasa Y, He W, Terella A, Schmidt EV, Chung RT. Viral RNA mutations are region specific and increased by ribavirin in a full-length hepatitis C virus replication system. **2002**. *J Virol*. 76:8505-17.

Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, Houghton M, Parham P, Walker CM. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. **1999**. *Immunity*. 10: 439-49.

Cox AL, Mosbrugger T, Lauer GM, Pardoll D, Thomas DL, Ray SC. Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C. **2005**. *Hepatology*. 42:104-12.

Cramp ME, Rossol S, Chokshi S, Carucci P, Williams R, Naoumov NV. Hepatitis C virus-specific T-cell reactivity during interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C. **2000**. *Gastroenterology*. 118:346-55.

Dai CY, Chuang WL, Lee LP, Chen SC, Hou NJ, Lin ZY, Hsieh MY, Hsieh MY, Wang LY, Chang WY, Yu ML. Associations of tumour necrosis factor alpha promoter polymorphisms at position -308 and -238 with clinical characteristics of chronic hepatitis C. **2006a**. *J Viral Hepat*. 13: 770-4.

Dai CY, Wan-Long Chuang, Wen-Yu Chang, Shinn-Cherng Chen, Li-Po Lee, Ming-Yen Hsieh, Nai-Jen Hou, Zu-Yau Lin, Jee-Fu Huang, Ming-Yuh, Liang-Yen Wang, Ming-Lung Yu. Tumor necrosis factor a promoter polymorphism at position -308 predicts response to combination therapy in hepatitis c virus infection. **2006b**. *JID*. 193: 98–101.

D'Alfonso S, Richiardi PM. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. **1994**. *Immunogenetics*. 39: 150-154.

Darling JM, Wright TL. Immune responses in hepatitis C: is virus or host the problem?. **2004**. *Curr. Opin. Infect. Dis*. 17:193-8.

Davis GL, Albright JE, Cook SF, Rosenberg DM. Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. **2003**. *Liver Transpl*. 9: 331-338.

Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R,

Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. **1996**. Science. 273: 1856-62.

Densem CG, Hutchinson IV, Cooper A, Yonan N, Brooks NH. Polymorphism of the transforming growth factor-beta 1 gene correlates with the development of coronary vasculopathy following cardiac transplantation. **2000**. J Heart Lung Transplant. 19: 551-6.

Di Bisceglie AM, Axiotis CA, Hoofnagle JH, Bacon BR. Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis. **1992**. Gastroenterology. 102: 2108-2113.

Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH. Optimal therapy of hepatitis C. **2002** Hepatology. 36: S121-7.

Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, Bansal A, Shorthouse C, Powell EE. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. **1999**. Hepatology. 30: 526-530.

Elliot LN, Lloyd AR, Ziegler JB, Ffrench RA. Protective immunity against hepatitis C virus infection. **2006**. Immunol. Cell Biol. 84:239-49.

Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R Jr, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ,

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. **1975**. N Engl J Med. 292: 767-70.

Feld JJ, Hoofnagle JH. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. **2005**. Nature. 436: 967-72.

Forrest EH, Thorburn D, Spence E, Oien KA, Inglis G, Smith CA, McCrudden EA, Fox R, Mills PR. Polymorphisms of the renin-angiotensin system and the severity of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. **2005**. J Viral Hepat. 12: 519-24.

Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL Jr, Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. **2002**. N Engl J Med. 347: 975-82.

Gehrke SG, Stremmel W, Mathes I, Riedel HD, Bents K, Kallinowski B. Hemochromatosis and transferrin receptor gene polymorphisms in chronic hepatitis C: impact on iron status, liver injury and HCV genotype. **2003**. J Mol Med. 81: 780-7.

Gewaltig J, Mangasser-Stephan K, Gartung C, Biesterfeld S, Gressner AM. Association of polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis. **2002**. Clin Chim Acta. 316: 83-94.

Glas J, Torok HP, Tonenchi L, Schiemann U, Folwaczny C. The -2518 promotor polymorphism in the MCP-1 gene is not associated with liver cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. **2004**. Gastroenterology. 126:1930-1

Glue P, Schenker S, Gupta S, Clement RP, Zambas D, Salfi M. The single dose pharmacokinetics of ribavirin in subjects with chronic liver disease. **2000**. Br J Clin Pharmacol. 49: 417-21.

Gonzalez-Amaro R, Garcia-Monzon C, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R, Alonso JL, Yague E, Pivel JP, Lopez-Cabrera M, Fernandez-Ruiz E, Sanchez-Madrid F. Induction of tumor necrosis factor alpha production by human hepatocytes in chronic viral hepatitis. **1994**. J Exp Med. 179: 841-8.

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. **2004**. J Med Virol. 72: 60-65.

Goulding C, Murphy A, MacDonald G, Barret S, Crowe J, Hegarty J, McKiernan S, Kelleher D. The CCR5delta32 mutation: impact on disease outcome in individuals with hepatitis C infection from a single source. **2005**. Gut. 54: 1157-1161.

Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, Carter ND, Spector TD. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. **1999**. Hum Mol Genet. 8: 93-7.

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

Gramenzi A, Andreone P, Loggi E, Foschi FG, Cursaro C, Margotti M, Biselli M, Bernardi M. Cytokine profile of peripheral blood mononuclear cells from patients with different outcomes of hepatitis C virus infection. **2005**. J Viral Hepat. 12: 525-30.

Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. **2006**. J Cell Mol Med. 10:76-99.

Gruenheid S, Pinner E, Desjardins M, Gros P. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: The Nramp1 is recruited to the membrane of the phagosome. **1997**. J Exp Med 185: 717-30.

Guido M, De Franceschi L, Olivari N, Leandro G, Felder M, Corrocher R, Rugge M, Pasino M, Lanza C, Capelli P, Fattovich G. Effects of interferon plus ribavirin treatment on NF-kappaB, TGF-beta1, and metalloproteinase activity in chronic hepatitis C. **2006**. Mod Pathol. 19:1047-54.

Havens WP Jr. Experiment in cross immunity between infectious hepatitis and homologous serum jaundice. **1945**. Proc Soc Exp Biol Med. 59: 148-50.

Heathcote EJ, Shiffman ML, Cooksley WGE, Dusheiko GM, Lee SS, Balart L, Reindollar R, Reddy RK, Wright TL, Lin A, Hoffman J, De Pamphilis J.

Heathcote J, Main J. Treatment of hepatitis C. **2005**. Journal of viral hepatitis. 12: 223-235.

Hellier S, Frodsham AJ, Hennig BJ, Klenerman P, Knapp S, Ramaley P, Satsangi J, Wright M, Zhang L, Thomas HC, Thursz M, Hill AV. Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection. **2003**. Hepatology. 38: 1468-76.

Hezode C, Cazeneuve C, Coue O, Roudot-Thoraval F, Lonjon I, Bastie A, Duvoux C, Pawlotsky JM, Zafrani ES, Amselem S, Dhumeaux D. Liver iron accumulation in patients with chronic active hepatitis C: prevalence and role of hemochromatosis gene mutations and relationship with hepatic histological lesions. **1999**. J Hepatol. 31: 979-84.

Hohler T, Kruger A, Gerken G, Schneider PM, Meyer zum Buschenfelde KH, Rittner C. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism at position -238 is associated with chronic active hepatitis C infection. **1998**. J Med Virol. 54: 173-7.

Hokeness KL, Kuziel WA, Biron CA, Salazar-Mather TP. Monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 interactions are required for IFN-alpha/beta-induced inflammatory responses and antiviral defense in liver. **2005**. J Immunol. 174:1549-1556.

Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB, Rustgi V, Di Bisceglie A, Peters M, Waggoner JG, Park Y, Jones EA. Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. **1986**. N Engl J Med. 315: 1575-8.

Hu J, Bumstead N, Barrow P, Sebastiani G, Olien L, Morgan K, Malo D. Resistance to salmonellosis in the chicken is linked to NRAMP1 and TNC. **1997**. Genome Res. 7: 693-704.

Inoue G, Horiike N, Michitaka K, Onji M. Hepatitis C virus clearance is prominent in women in an endemic area. **2000**. J Gastroenterol Hepatol. 15:1054-8.

Janczewska-Kazek E, Marek B, Kajdaniuk D, Borgiel-Marek H. Effect of interferon alpha and ribavirin treatment on serum levels of transforming growth factor-beta1, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in patients with chronic hepatitis C. **2006**. World J Gastroenterol.12: 961-5.

Janeway Jr C, Travers P, Walport M, Shlomick MJ. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. **2003**. En: Inmunología. Masson. Barcelona. España. 167-184.

Jiménez W, Claria J, Arroyo V, Rodés J. Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. **1992**. J Gastroenterol Hepatol. 7: 90-97.

Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Miyagi T, Suzuki T, Kanazawa Y, Hiramatsu N, Hayashi N. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic

cell functions in chronic hepatitis C virus infection. **2004**. *J. Immunol.*173: 6072-81.

Jonsson JR, Clouston AD, Ando Yuichi, Kelemen LI, Horn MJ, Adamson MD, Purdie DM, Powell EE. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Attenuates the Progression of Rat Hepatic Fibrosis. **2001**. *Gastroenterology*. 121: 148-155.

Just JJ. Genetic predisposition to HIV-1 infection and acquired immune deficiency virus syndrome: a review of the literature examining associations with HLA. **1995**. *Hum Immunol*. 44: 156-69. (Erratum; 45: 78, 1996).

Kandemir O, Polat A, Kaya A. Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis and its relation with histological severity of disease. **2002**. *J Viral Hepat*. 9:419-23.

Kenny-Walsh E. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. Irish Hepatology Research Group. **1999**. *N Engl J Med*. 340: 1228-33.

Kenny-Walsh E. The natural history of hepatitis C virus infection. **2001**. *Clin Liver Dis*. 5: 969-77.

Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little AM, Alexander GJ, Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg WM, Thomas DL, Carrington M. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. **2004**. *Science*. 305: 872-4.

Kimura T, Saito T, Yoshimura M, Yixuan S, Baba M, Ji G, Muramatsu M, Kawata S. Association of transforming growth factor-beta 1 functional polymorphisms with natural clearance of hepatitis C virus. **2006**. *J Infect Dis*. 193:1371-4.

Kitagawa K, Wada T, Furuichi K, Hashimoto H, Ishiwata Y, Asano M, Takeya M, Kuziel WA, Matsushima K, Mukaida N, Yokoyama H. Blockade of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney. **2004**. *Am J Pathol*. 165: 237-46.

Konishi I, Horiiike N, Hiasa Y, Michitaka K, Onji M. CCR5 promoter polymorphism influences the interferon response of patients with chronic hepatitis C in Japan. **2004**. *Intervirology*. 47: 114-120.

Kusumoto K, Uto H, Hayashi K, Takahama Y, Nakao H, Suruki R, Stuver SO, Ido A, Tsubouchi. Interleukin-10 or tumor necrosis factor-alpha polymorphisms and natural course of hepatitis C virus infection in hyperendemic area of Japan. **2006**. *Cytokine*. 34: 24-31.

Larrea E, Garcia N, Qian C, Civera MO, Prieto J. Tumor necrosis factor alpha gene expression and the response to interferon in chronic hepatitis C. **1996**. *Hepatology*. 23: 210-217.

Lau DT, Kleiner DE, Ghany MG, Park Y, Schmid P, Hoofnagle JH. 10-Year follow-up after interferon-alpha therapy for chronic hepatitis C. **1998**. *Hepatology*. 28: 1121-7.

Lavoie JL, Sigmund CD. Overview of the rennin-angiotensin system-an endocrine and paracrine system. **2003**. *Endocrinology*. 144: 2179-83.

Lebron JA, Bennett MJ, Vaughn DE, Chirino AJ, Snow PM, Mintier GA, Feder JN, Bjorkman PJ. Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. **1998**. *Cell*. 93: 111-23.

Levy JE, Montross LK, Andrews NC. Genes that modify the hemochromatosis phenotype in mice. **2000**. *J Clin Invest*. 105: 1209-16.

Lio D, Caruso C, Di Stefano R, Colonna Romano G, Ferraro D, Scola L, Crivello A, Licata A, Valenza LM, Candore G, Craxi A, Alkmasio PL. IL-10 and TNF- α polymorphism and the recovery from HCV infection. **2003**. *Hum Immunol*. 64: 674-680.

Lloyd AR, Jagger E, Post JJ, Crooks LA, Rawlinson WD, Hahn YS, French RA. Host and viral factors in the immunopathogenesis of primary hepatitis C virus infection. **2007**. *Immunol Cell Biol*. 85: 24-32.

Longman RS, Talal AH, Jacobson IM, Rice CM, Albert ML. Normal functional capacity in circulating myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients with chronic hepatitis C. **2005**. *J. Infect. Dis*. 192:497-503.

Lozach PY, Amara A, Bartosch B, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Cosset FL, Altmeyer R. C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. **2004**. *J. Biol. Chem*. 279:32035-45.

Mangia A, santoro R, Piattelli M, Paziienza V, Grifa G, Iacobellis A, Andriulli A. IL-10 haplotypes as possible predictors of spontaneous clearance of HCV infection. **2004**. *Cytokine*. 25: 103-109.

Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. **2001**. *Lancet*. 358: 958-65.

Marek B, Kajdaniuk D, Mazurek U, Janczewska-Kazek E, Kos-Kudla B, Strzalka B, Fila A, Niedziolka D, Beniowski M, Ostrowska Z, Borgiel-Marek H, Kajdaniuk J, Sieminska L, Nowak M, Wilczok T, Pakula D, Filipczyk P. TGF-beta1 mRNA expression in liver biopsy specimens and TGF-beta1 serum levels in patients with chronic hepatitis C before and after antiviral therapy. **2005**. *J Clin Pharm Ther*. 30:271-7.

Marquet S, Sanchez FO, Arias M, Rodriguez J, Paris SC, Skamene E, Schurr E, Garcia LF. Variants of the human NRAMP1 gene and altered human immunodeficiency virus infection susceptibility. **1999**. *J Infect Dis*. 180:1521-5.

Marra F, DeFranco R, Grappone C, Milani S, Pastacaldi S, Pinzani M, Romanelli RG, Laffi G, Gentilini P. Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. **1998**. *Am J Pathol*. 152: 423-430.

Marra F, Romanelli RG, Giannini C, Failli P, Pastacaldi S, Arrighi MC, Pinzani M, Laffi G, Montalto P, Gentilini P. Monocyte chemoattractant protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. **1999**. *Hepatology*. 29: 140-8.

Marsh S, Parham P, Barber LD. "HLA class I antigens and alleles: Workshops and nomenclature. **2000**. En: "The HLA Factsbook". Academic Press. London. UK, 14-25.

Martin MP, Gao XJ, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, Trowsdale J. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. **2002**. *Nat Genet*. 31: 429-434.

Martinelli AL, Franco RF, Villanova MG, Figueiredo JF, Secaf M, Tavella MH, Ramalho LN, Zucoloto S, Zago MA. Are haemochromatosis mutations related to

the severity of liver disease in hepatitis C virus infection?. **2000**. *Acta Haematol.*102:152-6.

Mascheretti S, Hinrichsen H, Ross S, Buggisch P, Hampe J, Foelsch UR, Schreiber S. Genetic variants in the CCR gene cluster and spontaneous viral elimination in hepatitis C-infected patients. **2004**. *Clin Exp Immunol.* 136:328-33.

Matsushima K, C Larsen, GC Dubois, JJ Oppenheim. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. **1989**. *J Exp Med.* 169: 1485-1490.

Mazzeo C, Azzaroli F, Giovanelli S, Dormi A, Festi D, Colecchia A, Miracolo A, Natale P, Nigro G, Alberti A, Roda E, Mazzella G. Ten year incidence of HCV infection in northern Italy and frequency of spontaneous viral clearance. **2003**. *Gut.* 52: 1030-1034.

McHutchison JG, Poynard T. Combination therapy with interferon plus ribavirin for the initial treatment of chronic hepatitis C. **1999**. *Semin Liver Dis.* 19:57-65.

Messick K, Sanders JC, Goedert JJ, Eyster ME. Hepatitis C viral clearance and antibody reactivity patterns in persons with haemophilia and other congenital bleeding disorders. **2001**. *Haemophilia.* 7: 568-74.

Metwally MA, Zein CO, Zein NN. Clinical significant of hepatic iron deposition and serum iron values in patients with chronic hepatitis C infection. **2004**. *Am J Gastroenterol.* 99: 286-91.

Micallef JM, Kaldor JM, Dore GJ. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. **2006**. *J Viral Hepat.* 13: 34-41

Moore BB, Kolodsick JE, Thannickal VJ, Cooke K, Moore TA, Hogaboam C, Wilke CA, Toews GB. CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic Injury **2005**. *Am J Pathol.* 166: 675-84.

Muhlbauer M, Bosserhoff AK, Hartmann A, Thasler WE, Weiss TS, Herfarth H, Lock G, Scholmerich J, Hellerbrand C. A novel MCP-1 gene polymorphism is

associated with hepatic MCP-1 expression and severity of HCV-related liver disease. **2003**. *Gastroenterology*. 125: 1085-93.

Muir AJ, Bornstein JD, Killenberg PG; Atlantic Coast Hepatitis Treatment Group. Peginterferon alfa-2b and ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C in blacks and non-Hispanic whites. **2004**. *N Engl J Med*. 350: 2265-71.

Munz C, Steinman RM, Fujii S. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. **2005**. *J. Exp. Med.* 202: 203-7.

Nakamura T, Sakata R, Ueno T, Sata M, Ueno H. Inhibition of transforming growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. **2000**. *Hepatology*. 32: 247-55.

Nakayama E, Tanaka Y, Nagai Y, Iwamoto A, Shioda T. A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. **2004**. *AIDS*. 18: 729-38.

Narumi S, Tominaga Y, Tamaru M, Shimai S, Okumura H, Nishioji K, Itoh Y, Okanoue T. Expression of IFN-inducible protein-10 in chronic hepatitis. **1997**. *J Immunol*. 158: 5536-44.

Nathan C. Natural resistance and nitric oxide. **1995**. *Cell*. 82:873-6.

Nelson DR, Lim HL, Marousis CG, Fang JW, Davis GL, Shen L, Urdea MS, Kolberg JA, Lau JY. Activation of tumor necrosis factor-alpha system in chronic hepatitis C virus Infection. **1997**. *Dig Dis Sci*. 42: 2487-94.

Neumann-Haefelin C, Blum HE, Chisari FV, Thimme R. T cell response in hepatitis C virus infection. **2005**. *J. Clin. Virol*. 32:75-85.

Neumann-Haefelin C, McKiernan S, Ward S, Viazov S, Spangenberg HC, Killinger T, Baumert TF, Nazarova N, Sheridan I, Pybus O, von Weizsacker F, Roggendorf M, Kelleher D, Klenerman P, Blum HE, Thimme R. Dominant influence of an HLA-B27 restricted CD8+ T cell response in mediating HCV clearance and evolution. **2006**. *Hepatology*. 43: 563-72.

Nischalke HD, Nattermann J, Fischer HP, Sauerbruch T, Spengler U, Dumoulin FL. Semiquantitative analysis of intrahepatic CC-chemokine mRNAs in chronic hepatitis C. **2004**. *Mediators Inflamm*. 13: 357-9.

Noble NA, Border WA. Angiotensin II in renal fibrosis: should TGF-beta rather than blood pressure be the therapeutic target? *Semin Nephrol.* **1997.** 17: 455-66.

Ocaranza MP, Díaz-Arraya G, Carreño JE, Muñoz D, Riveros JP, Jalil JE, Lavander S. Polymorphism in gene coding for ACE determines different development of myocardial fibrosis in rats. **2004.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286: H498-H506.

Pachiadakis I, Pollara G, Chain BM, Naoumov NV. Is hepatitis C virus infection of dendritic cells a mechanism facilitating viral persistence?. **2005.** *Lancet Infect Dis.*5:296-304.

Paizis G, Cooper ME, Schembri JM, Tikellis C, Burrell LM, Angus PW. Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver. **2002.** *Gastroenterology.* 123: 1667-76.

Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. **2005.** *Nature Reviews.* 5: 201-214.

Peginterferon alpha-2a in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. **2000.** *N Engl J Med.* 1673-1680.

Pietrangelo A, Montosi G, Totaro A, Garuti C, Conte D, Cassanelli S, Fraquelli M, Sardini C, Vasta F, Gasparini P. Hereditary hemochromatosis in adults without pathogenic mutations in the hemochromatosis gene. **1999.** *N Engl J Med.* 341: 725-32.

Pietrangelo A. Iron-induced oxidant stress in alcoholic liver fibrogenesis **2003.** *Alcohol.* 30:121-9.

Pinzani M. Liver fibrosis. **1999.** *Springer Seminars Immunopathol.* 21: 475-490.

Piperno A, Vergani A, Malosio I, Parma L, Fossati L, Ricci A, Bovo G, Boari G, Mancina G. Hepatic iron overload in patients with chronic viral hepatitis: role of HFE gene mutations. **1998.** *Hepatology.* 28: 1105-9.

Polyak SJ. Hepatitis C virus--cell interactions and their role in pathogenesis. **2003.** *Clin Liver Dis.* 7: 67-88.

Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, Purdie DM, JonssonJR. Host genetics factors influence disease progression in chronic hepatitis C. **2000.** *Hepatology.* 31: 828-833.

Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural History of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. **1997**. *Lancet*. 349: 825-832.

Promrat K, McDermott DH, Gonzalez CM, Kleiner DE, Koziol DE, Lessie M, Merrell, M, Soza A, Heller T, Ghany M, Park Y, Alter HJ, Hoofnagle JH, Murphy PM, Liang TJ. Associations of chemokine system polymorphisms with clinical outcomes and treatment responses of chronic hepatitis C. **2003**. *Gastroenterology*. 124: 352-60.

Racanelli V, Rehermann B. Hepatitis C virus infection: when silence is deception. **2003**. *Trends Immunol*. 24: 456-64.

Rajagopalan S, Long EO. Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. **2005**. *J Exp Med*. 201: 1025-1029.

Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells. A key issue in liver fibrosis. **2002**. *Front Biosci*. 7: d 808-26.

Richardson MM, Powell EE, Barrie HD, Clouston AD, Purdie DM, Jonsson JR. A combination of genetic polymorphism increases the risk of progressive disease in chronic hepatitis C. **2005**. *J Med Genet*. 42: e45 (<http://www.jmedgenet.com/cgi/content/full/42/7/e45>).

Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Convol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. **1990**. *J Clin Invest*. 86: 1343-1346.

Rockey DC, Boyles JK, Gabbiani G, Friedmann SL. Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and in culture. **1992**. *J. submicrosc. Cytol Pathol*. 24: 193-203.

Rodriguez MR, Gonzalez-Escribano MF, Aguilar F, Valenzuela A, Garcia A, Nunez-Roldan A. Association of NRAMP1 promoter gene polymorphism with the susceptibility and radiological severity of rheumatoid arthritis. **2002**. *Tissue Antigens*. 59:311-5.

Rollins, BJ. Chemokines. **1997**. *Blood*. 90: 909-928.

Rook AH, Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Sporn MB, Burlington DB, Lane HC, Fauci AS. Effects of transforming growth factor beta on the functions of

natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. **1986**. J Immunol. 136: 3916-20.

Rosen HR, Lentz JJ, Rose SL, Rabkin J, Corless CL, Taylor K, Chou S. Donor polymorphism of tumor necrosis factor gene: relationship with variable severity of hepatitis C recurrence after liver transplantation. **1999**. Transplantation. 68:1898-902.

Rosen HR, Mchutchison JG, Conrad AJ, lentz JJ, Marousek G, Rose SL, Zaman A, Taylor K, Chou S. Tumor necrosis factor genetic polymorphism and response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. **2002**. Am J Gastroenterol. 97: 714-20.

Rovin BH, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. **1999**. Biochem Biophys Commun. 259: 344-348.

Rudolph KL, Chang S, Millard M, Schreiber-Agus N, DePinho RA. Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. **2000**. Science. 287: 1253-1258.

Ruiz-Ferrer M, Barroso N, Antinolo G, Aguilar-Reina J. Analysis of CCR5-Delta 32 and CCR2-V64I polymorphisms in a cohort of Spanish HCV patients using real-time polymerase chain reaction and fluorescence resonance energy transfer technologies. **2004**. J Viral Hepat. 11:319-23.

Salazar-Mather TP, Hokeness KL. Cytokine and chemokine networks: pathways to antiviral defense. **2006**. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 303:29-46.

Schalm SW, Weilan O, Hansen BE, Milella M, Lai MY, Hollander A, Michielsen PP, Bellobuono A, Chemello L, Pastore G, Chen DS, Brouwer JT. Interferon-ribavirin for chronic hepatitis C with and without cirrhosis: analysis of individual patient data of six controlled trials. **1999**. Gastroenterology. 117: 408-413.

Schiemann U, Glas J, Torok P, Simperl C, Martin K, Konig A, Schmidt F, Schaefer M, Folwaczny C. response to combination therapy with interferon alfa-2a and ribavirin in chronic hepatitis C according to a TNF-alpha promoter polymorphism. **2003**. Digestion. 68: 1-4.

Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. **1991**. J Hepatol. 13:372-4.

Schuppan D, Krebs A, Hahn EG. Hepatitis C and liver fibrosis. **2003**. Cell Death Differentiation. 10 (supl1): S59-S67.

Schweisfurth H, Wernze H. Changes of serum angiotensin I converting enzyme in patients with viral hepatitis and liver cirrhosis. **1979**. Acta hepatogastroenterol. 26: 207.

Searle S, Blackwell JM. Evidence for a functional repeat polymorphism in the promoter of the human NRAMP1 gene that correlates with autoimmune versus infectious disease susceptibility. **1999**. J Med Genet. 36:295-9.

Sen GC. Annu. Viruses and interferons. 2001. Rev. Microbiol.55:255-81.

Shanmugam V, Sell KW, Saha BK. Mistyping ACE heterocigotes. **1993**. Methods Appl. 3: 120-121.

Shaw MA, Clayton D, Atkinson SE, Williams H, Miller N, Sibthorpe D, Blackwell JM. Linkage of rheumatoid arthritis to the candidate gene NRAMP1 on 2q35. **1996**. J Med Genet. 38: 672-7.

Shoukry NH, Grakoui A, Houghton M, Chien DY, Ghayeb J, Reimann KA, Walker CM. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. **2003**. J. Exp. Med.197:1645-55.

Shoukry NH, Cawthon AG, Walker CM. Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection. **2004**. Annu. Rev. Microbiol. 58:391-424.

Smith BC, Gorge J, Guzail MA, Day CP, Daly AK, Burt AD, Bassendine MF. Heterozygosity for hereditary hemochromatosis is associated with more fibrosis in chronic hepatitis C. **1998**. Hepatology. 27: 1695-9.

Smith MW, Carrington M, Winkler C, Lomb D, Dean M, Huttley G, O'Brien SJ. CCR2 chemokine receptor and AIDS progresión. **1997**. Nat Med. 3:1052-3.

Smith MW, Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Lomb DA, Goedert JJ, O'Brien TR, Jacobson LP, Kaslow R, Buchbinder S, Vittinghoff E, Vlahov D, Hoots K, Hilgartner MW, O'Brien SJ. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. **1997**. Science. 277: 959-65.

Sport MB, Roberts AB. Transforming growth factor: Recent progress and new challenges. **1992**. *J Cell Biol*; 119: 1017-1021.

Suzuki S, Tanaka Y, Orito E, Sugauchi F, Hasegawa I, Sakurai M, Fujiwara K, Ohno T, Ueda R, Mizokami M. Transforming growth factor-beta-1 genetic polymorphism in Japanese patients with chronic hepatitis C virus infection. **2003**. *J Gastroenterol Hepatol*. 18: 1139-43.

Tam RC, Pai B, Bard J, Lim C, Averett DR, Phan UT, Milovanovic T. Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile. **1999**. *J Hepatol*.30: 376-82.

Thio CL, Carrington M, O'Brien SJ, Vlahov D, Nelson KE, Astemborski JA, Thomas DL. The associations of HLA alleles and clearance of hepatitis B among Africans Americans. **1999**. *J Infect Dis*. 179: 1004-1006.

Thio CL, Gao X, Goedert JJ, Vlahov D, Nelson KE, Hilgartner MW, O'Brien SJ, Karacki P, Astemborski JA, Carrington M, Thomas DL. HLA-Cw*04 and hepatitis C virus persistence. **2002**. *J Virol*. 76: 4792-4797.

Thio CL, Goedert JJ, Mosbrugger T, Vlahov D, Strathdee SA, O'Brien SJ, Astemborski J, Thomas DL. An analysis of tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms and haplotypes with natural clearance of hepatitis C virus infection. **2004**. *Genes Immun*. 5: 294-300.

Thorburn D, Curry G, Spooner R, Spence E, Oien K, Halls D, Fox R, McCrudden EA, MacSween RN, Mills PR. The role of iron and haemochromatosis gene mutations in the progression of liver disease in chronic hepatitis C. **2002**. *Gut*. 50: 248-52.

Thursz M, Yallop R, Goldin R, Trepo C, Thomas HC. Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. **1999**. *Lancet*. 354: 2119-2124.

Tilg H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nolchen B, Judmaier G, Huber C. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. **1992**. *Gastroenterology*. 103: 264-74.

Tung BY, Emond MJ, Bronner MP, Raaka SD, Cotler SJ, Kowdley KV. Hepatitis C, iron status, and disease severity: relationship with HFE mutations. **2003**. *Gastroenterology*.124: 318-26.

Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, Dolly T, Lanier LL, Parham P. Human Diversity in Killer Cell Inhibitory Receptor Genes. **1997**. *Immunity*. 7: 753-763.

Varagic J, Frohlich ED. Local cardiac renin-angiotensin system: hypertension and cardiac failure. **2002**. *J Mol Cell Cardiol*. 34:1435-42.

Vidigal PG, Germer JJ, Zein NN. Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta1 genes in chronic hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin. **2002**. *J Hepatol*. 36: 271-7.

Vielhauer V, Anders HJ, Mack M, Cihak J, Strutz F, Stangassinger M, Luckow B, Grone HJ, Schlondorff D. Obstructive nephropathy in the mouse: progressive fibrosis correlates with tubulointerstitial chemokine expression and accumulation of CC chemokine receptor 2- and 5-positive leukocytes. **2001**. *J Am Soc Nephrol*. 12:1173-87.

Wada T, Furuichi K, Sakai N, Iwata Y, Kitagawa K, Ishida Y, Kondo T, Hashimoto, H, Ishiwata Y, Mukaida N, Tomosugi N, Matsushima K, Egashira K, Yokoyama H. Gene therapy via blockade of monocyte chemoattractant protein-1 for renal fibrosis. **2004**. *J Am Soc Nephrol* 15: 940-8.

Wang H, Mengsteab S, Tag CG, Gao CF, Hellerbrand C, Lammert F, Gressner AM, Weiskirchen R. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms are associated with progression of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection. **2005**. *World J Gastroenterol*. 11:1929-36.

Webster JC, Oakley RH, Jewell CM, Cidlowski JA. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. **2001**. *Proc Natl Acad Sci*. 98: 6865-70.

Vidigal PG, Germer JJ, Zein NN. Polymorphism in the interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta 1 genes in chronic hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin. **2002**. *J Hepatol*. 36: 271-277.

Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. **1997**. Proc Natl Acad Sci U S A. 94: 3195-3199.

Winter CC, Gumperz JE, Parham P, Long EO, Wagtmann N. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. **1998**. J Immunol. 161: 571-7.

Woitars RP, Ahlenstiel G, Iwan A, Rockstroh JK, Brackmann HH, Kupfer B, Matz B, Offergeld R, Sauerbruch T, Spengler U. Frequency of the HIV-protective CC chemokine receptor 5-Delta32/Delta32 genotype is increased in hepatitis C. **2002**. Gastroenterology. 122:1721-8.

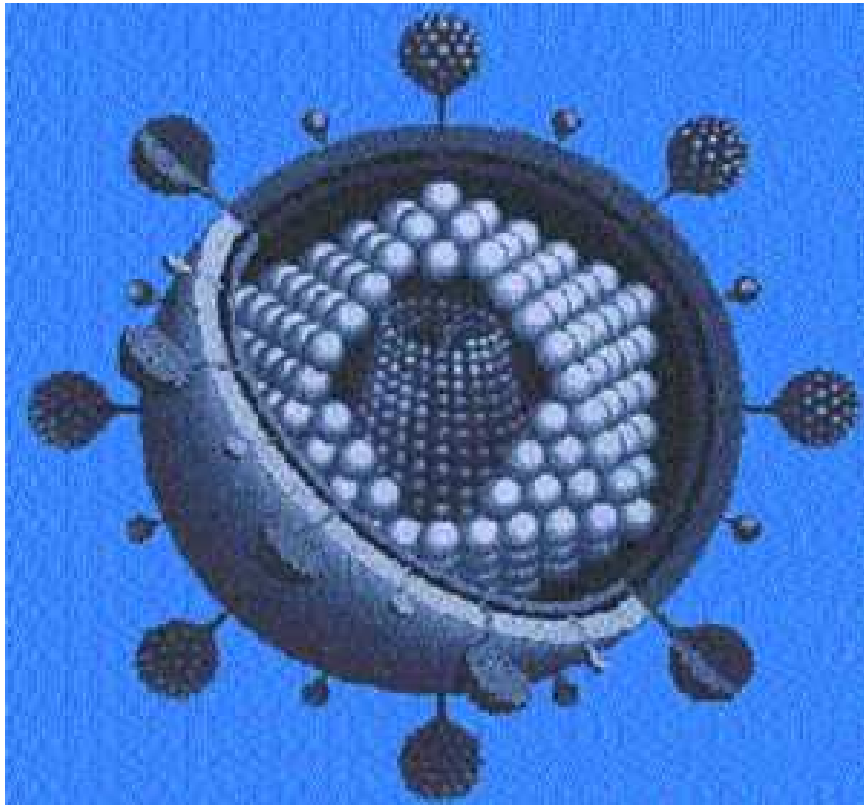
Wright H, Alex P, Nguyen T, Bader T, Gurakar A, Sebastián A, Gonzales L, Wallis G, Taylor M, Dozmorov I, Centola M, Tour B. Multiplex cytokine profiling of initial therapeutic response in patients with chronic hepatitis C virus infection. **2004**. Dig Dis Sci. 50: 1793-803.

Xu Y, Rojkind M, Czaja MJ. Regulation of monocyte chemoattractant protein 1 by cytokines and oxygen free radicals in rat hepatic fat-storing cells. **1996**. Gastroenterology. 110: 1870-7.

Yee LJ, Herrera J, Kaslow RA, Van Leeuwen DJ. Tumor necrosis factor gene polymorphism in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection. **2000**. Genes Immun. 1: 386-390.

Yee LJ, Tang J, Gibson AW, Kimberly R, Van Leeuwen DJ, Kaslow RA. Interleukin 10 polymorphisms as predictors of sustained response in antiviral therapy for chronic hepatitis C infection. Hepatology. **2001**. 33: 708-712.

Yu ML, Dai CY, Chiu CC, Lee LP, Lin ZY, Chen SC, Hsieh MY, Wang LY, Chen CJ, Chuang WY. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism at position -308 in Taiwanese chronic hepatitis C patients treated with interferon-alpha. **2003**. Antiviral Res. 59: 35-40.



APÉNDICE

VIII. APÉNDICE

PUBLICACIONES DERIVADAS DEL TRABAJO DESARROLLADO DURANTE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

Montes-Cano MA, García-Lozano JR, Aguilar-Reina J, Romero-Gómez M, Barroso N, Núñez-Roldán A, González-Escribano MF. CCL-2518A/G and CCR2 do not influence the outcome of hepatitis C virus infection in the Spanish population. *World J Gastroenterol.* **2007.** 13: 2187-2192.

Pandey JP, **Montes-Cano MA**, Aguilar-Reina J, Gonzalez-Escribano MF. Interactive effects of immunoglobulin gamma and human leucocyte antigen genotypes on clearance and persistence of infection with hepatitis C virus. *Clin Exp Immunol.* **2007** Oct. 9

Montes-Cano MA, Caro-Oleas JL, Romero-Gómez M, Diago M, Andrade R, Carmona I, Aguilar Reina J, Núñez-Roldán A, González-Escribano MF. HLA-C and KIR genes in hepatitis C virus infection. *Hum Immunol.* **2005.** 66:1106-9. *Epub 2006 Mar 9.*

Romero-Gómez M, **Montes-Cano MA**, Otero-Fernández MA, Torres B, Sánchez-Muñoz D, Aguilar F, Barroso N, Gómez-Izquierdo L, Castellano-Megías VM, Núñez-Roldán A, Aguilar-Reina J, González-Escribano MF. SLC11A1 promoter gene polymorphisms and fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Gut.* **2004.** 53:446-50.

Romero-Gómez M, González-Escribano MF, Torres B, Barroso N, **Montes-Cano MA**, Sánchez-Muñoz D, Núñez-Roldán A, Aguilar-Reina J. HLA class I B44 is associated with sustained response to interferon + ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol.* **2003.** 98:1621-6.

OTRAS PUBLICACIONES

Montes-Cano MA, de la Horra C, Dapena J, Mateos I, Friaza V, Respaldiza N, Muñoz-Lobato F, Medrano FJ, Calderón EJ, Varela JM. Dynamic colonisation by different *Pneumocystis jirovecii* genotypes in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect.* **2007,** 13:1008-1011.

Montes-Cano MA, de la Horra C, Respaldiza N, Medrano FJ, Varela JM, Calderón EJ. Polymorphisms in *Pneumocystis jirovecii* strains in Spanish children with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* **2006.** 193:1332-3.

Respaldiza N, **Montes-Cano MA**, Friaza V, Muñoz-Lobato F, Medrano FJ, Varela JM, Calderón E, Horra CD. Usefulness of Oropharyngeal Washings For Identifying *Pneumocystis jirovecii* Carriers. *J Eukaryot Microbiol.* **2006.** 53: S100-S101.

Medrano FJ, **Montes-Cano M**, Conde M, de la Horra C, Respaldiza N, Gasch A, Pérez-Lozano MJ, Varela JM, Calderón EJ. *Pneumocystis jirovecii* in general population. *Emerg Infect Dis.* **2005 Feb;** 11(2):245-50.

Respaldiza N, **Montes-Cano MA**, Dapena FJ, de la Horra C, Mateos I, Medrano FJ, Calderón E, Varela JM. Prevalence of colonisation and genotypic characterisation of *Pneumocystis jirovecii* among cystic fibrosis patients in Spain. *Clin Microbiol Infect.* **2005.** 11:1012-5.

Montes-Cano MA, de la Horra C, Martín-Juan J, Varela JM, Torronteras R, Respaldiza N, Medrano FJ, Calderón EJ. Pneumocystis jiroveci genotypes in the Spanish population. *Clin Infect Dis.* **2004.** 39:123-8.

Montes-Cano MA, Rodríguez-Muñoz F, Franco-Osorio R, Núñez-Roldán A, Gonzalez-Escribano MF. Hereditary spherocytosis associated with mutations in HFE gene. *Ann Hematol.* **2003.** 82:769-72.

Wichmann I, **Montes-Cano MA**, Respaldiza N, Álvarez A, Walter K, Franco E, Sánchez-Roman J, Núñez-Roldán A. Clinical significance of anti-multiple nuclear dots/Sp100 autoantibodies. *Scand J Gastroenterol.* **2003.** 38:996-9.

Montes-Cano M, González-Escribano MF, Aguilar J, Núñez-Roldán A. Juvenile hemochromatosis in a Spanish family. *Blood Cells Mol Dis.* **2002.** 28:297-300.

HLA Class I B44 Is Associated With Sustained Response to Interferon + Ribavirin Therapy in Patients With Chronic Hepatitis C

Manuel Romero-Gómez, M.D., María Francisca González-Escribano, M.D., Belén Torres, M.D., Natalia Barroso, M.D., Marco Antonio Montes-Cano, M.D., Diego Sánchez-Muñoz, M.D., Antonio Núñez-Roldan, M.D., and José Aguilar-Reina, M.D.

Hepatology Unit, Hospital Universitario de Valme; and Immunology Department and Hepatology Section, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain

OBJECTIVE: The aim of this study was to assess the influence of host genetic factors on response to combination therapy for chronic hepatitis C infection.

METHODS: Patients with biopsy-proved chronic hepatitis C infection were treated with interferon alone ($n = 143$) or combined therapy of interferon + ribavirin ($n = 105$; 46 treatment naïve, 59 relapsers). Human leukocyte antigen (HLA) class I was determined by microlymphocytotoxicity and class II by polymerase chain reaction-single specific oligonucleotide. The two biallelic tumor necrosis factor- α promoter polymorphisms were studied by a polymerase chain reaction-amplification refractory mutation system. Other variables measured were viral genotype, hepatitis C virus RNA load, liver function tests, and ferritin concentration.

RESULTS: Univariate analysis indicated that patients bearing HLA B44+, DRB1*03, infected by genotype non-1, with higher concentrations of transaminases and shorter duration of infection showed a higher sustained response (SR) rate than those on combination therapy. HLA class II and TNF- α promoter polymorphisms were not related to SR. In multivariate analysis, non-1 genotype (OR 2.42, 95% CI 1.12–5.55, $p = 0.026$) and HLA B44+ (OR 4.84, 95% CI 1.3–17.8, $p = 0.017$) were the independent variables associated with SR. However, HLA B44+ was not associated with SR in patients treated with interferon alone.

CONCLUSIONS: HLA class I B44 is related to a higher rate of SR in combination therapy but not in interferon monotherapy, whereas HLA class II, tumor necrosis factor- α –238A or –308A seem not to influence response to the antiviral therapy. These findings may be of value in therapy selection for hepatitis C-infected patients. (Am J Gastroenterol 2003;98:1621–1626. © 2003 by Am. Coll. of Gastroenterology)

INTRODUCTION

The sustained response (SR) to interferon- α + ribavirin combined therapy is related to viral as well as host factors.

Initial and dynamic changes in the serum viral load during the first month of therapy have been described in relation to hepatitis C virus (HCV) genotypes, as have host factors affecting SR including age, gender, ethnicity, and human leukocyte antigen (HLA) polymorphisms (1). The HLA class II polymorphism has been implicated in the spontaneous clearance of HCV infection (2, 3) as well as response to interferon (4–6). However, possible relationships between HLA polymorphism and combination therapy response have not been clarified to date.

Tumor necrosis factor (TNF)- α is a potent proinflammatory cytokine, and high levels have been observed to correlate with poor response to interferon therapy (7). Two biallelic variants at the –238 and –308 positions in the promoter region of the TNF gene have been shown to be associated with variations in serum TNF concentrations. An increase in the frequency of individuals with –238A among HCV patients compared with ethnically matched healthy controls has been reported (8), whereas the –238A and –308A types have been associated with increased risk of cirrhosis (9). Thus, our hypothesis is that TNF- α polymorphisms could be implicated in posttreatment response to interferon + ribavirin in HCV. To test this, we assessed the influence of the HLA and TNF- α promoter region polymorphisms on the response to interferon + ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C.

PATIENTS AND METHODS

Subjects

Patients with biopsy-proven chronic hepatitis C with compensated liver disease were enrolled from among those attending our Liver Clinics at the Hospital Universitario de Valme and the Hospital Virgen del Rocío, both in Seville. Fully informed written consent was obtained before entry into the study, and the hospitals' ethics committees approved the protocol.

All the patients were hepatitis B surface antigen negative, anti-HIV negative, anti-HCV positive, serum HCV RNA

positive, and had raised ALT levels. Between January 1995 and December 1999, 143 patients were treated with interferon- α three times/wk over a period of 1 yr, and 105 patients received a standard schedule of combination therapy (3 MU three times/wk and ribavirin 1000–1200 mg/day) over 1 yr. Of these, 46 were naïve to treatment, and 59 had relapsed after a previous interferon- α treatment cycle. Based on the combination therapy response, patients were classified into three groups. These were: nonresponder (NR; when HCV RNA remained detectable at the end of the treatment period); sustained responder (SR; when viral levels were undetectable 6 months after therapy discontinuation); and relapsed responder (RR; when HCV RNA was not detected during therapy but reappeared after discontinuation).

Virology Methods

Anti-HCV (EIA3), hepatitis B surface antigen, and anti-HIV were determined by commercially available methods (Abbott Laboratories, Chicago, IL). Serum HCV RNA level was quantified using Amplicor-HCV-Monitor (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). Serum HCV genotypes were available in 88 nonselected patients and had been performed with INNO-LIPA HCV II (Innogenetics, Zwijnaarden, Belgium). All commercial kits were used according to the manufacturer's instructions.

Liver Histology

Percutaneous liver biopsy under ultrasonographic control was performed, and a portion was used in the histology diagnosis. Disease staging was defined according to Scheuer (10) ranging from F0 (fibrosis absence) to F4 (cirrhosis stage). Necroinflammatory activity was graded according to Knodell's index (11).

HLA and TNF Promoter Polymorphism Typing

HLA class I (A and B) was determined using complement-dependent cytotoxicity techniques. Genomic DNA from patients was extracted from peripheral blood as previously described (12) (R1). HLA DRB1* low-resolution typing was performed using Dynal RELI SSO HLA DRB typing kits (Dynal, Oslo, Norway). TNF -238 and -308 promoter region genotyping was performed employing a polymerase chain reaction (PCR)-amplification refractory mutation system carried out in a Perkin-Elmer 9600 Thermal Cycler (Perkin-Elmer, Foster City, CA) with mixes consisting of 1 μ l of genomic DNA, 2.5 pmoles of each primer, 200 μ mol/L of each dNTPs and 0.2U Taq DNA polymerase in a final volume of 10 μ l. Primers were designed according to the published human TNF sequence (access number 1353717) obtained from the GeneBank (13) (R2). Forward primers were: 5' ATAGGTTTTGAGGGGCATGG 3' and 5' ATAGGTTTTGAGGGGCATGA 3' for -308 and 5' GAA-GACCTCTCTCAGATCA 3' and 5' GAAGACCTCTCTA-GAATCG 3' for -238. Reverse primer for both cases was 5' GGTTTCTTCTCCATCACTGG 3'. For each sample, two independent PCR reactions were carried out for each dimor-

phism. The following thermal profile was run in the case of -308 position: initial denaturation at 95°C for 5 min followed by 10 cycles at 94°C for 10 s, 62°C for 20 s, and 20 cycles at 94°C for 10 s, 52°C for 30 s, and 72°C for 30 s. In the case of -238, the thermal profile was: initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 50°C for 30 s, and 72°C for 30 s. The PCR-amplified fragments were separated in 2% agarose gel stained with ethidium bromide. Samples showing the expected fragments (171 base-pair for -308 or 101 base-pair for -238) were assigned as homozygous genotypes (AA or GG), whereas samples showing amplification for both fragments were assigned as a heterozygous genotype (AG).

Statistical Analysis

All data were analyzed using SPSS 10.0 for Windows (Chicago, IL). Patients showing SR were compared with non-SR patients (NR + RR). An analysis comparing SR with NR but excluding RR was also performed, but no differences were observed. Comparisons between groups with and without SR were made using the Mann-Whitney *U* test or the Student's *t* test for continuous variables and χ^2 or Fisher's exact probability test for categorical data. All values are presented as means \pm SD. A probability value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. To adjust for statistical bias that could result from the high numbers of repetitive tests conducted, the *p* value was multiplied by the

Table 1. Demographic Characteristics of Monotherapy and Combined Therapy groups

	Interferon + Ribavirin	Interferon Alone
Age (yr)	39 \pm 10	41 \pm 11
Treatment naïve	46	143
Relapsed	59	
Infection duration (yr)	18.2 \pm 9.8	17.4 \pm 9.4
Genotype 1*	70	70
Genotype non-1*	18	11
Fibrosis	1.08 \pm 0.28	1.4 \pm 0.5
HAI	6.04 \pm 2.25	6.56 \pm 2.7
Viral load (copies \times 10 ³ /ml)	1080 \pm 1328	1531 \pm 2673
AST (U/L)	66 \pm 53	70 \pm 53
ALT (U/L)	120 \pm 98	124 \pm 99
AP (U/L)	168 \pm 69	174 \pm 68
GGT (U/L)	48 \pm 41	44 \pm 34
Ferritin (ng/ml)	112 \pm 76	122 \pm 115
HLA B44+	26	43
HLA B44-	79	100
DRB1*03+	23	32
DRB1*03-	82	111
-238 TNF- α		
AG	8	15
GG	97	128
-308 TNF- α		
AG	23	87
GG	82	106

* Genotype was available in nonselected patients.

AP = alkaline phosphatase; GGT = gammaglutamil transpeptidase; HAI = Histologic Activity Index.

Table 2. Haplotypes Segregated With Respect to Treatment and Response

Haplotype	Interferon + Ribavirin				Interferon Alone			
	SR (%) (n = 53)	NR (%) (n = 52)	<i>p</i>	OR (95% CI)	SR (%) (n = 38)	NR (%) (n = 105)	<i>p</i>	OR (95% CI)
A29	7 (13.2)	3 (5.7)	0.196	2.48 (0.53–13.02)	11 (28.94)	13 (12.4)	0.019	2.8 (1.05–7.86)
A33	6 (11.3)	6 (11.5)	0.972	0.97 (0.25–3.96)	1 (2.63)	16 (15.23)	0.04	0.15 (0.01–1.17)
B7	5 (9.4)	5 (9.6)	0.974	0.97 (0.22–4.24)	10 (26.31)	11 (10.47)	0.018	3.05 (1.06–8.72)
B44	19 (35.8)	7 (13.4)	0.008	3.59 (1.24–10.72)	13 (34.21)	30 (28.57)	0.517	1.3 (0.54–3.08)
DRB1*03	7 (13.2)	16 (30.7)	0.03	0.34 (0.11–1)	8 (21.05)	24 (22.85)	0.81	0.9 (0.32–2.4)
DRB1*11	11 (20.7)	9 (17.3)	0.654	1.25 (0.42–3.7)	14 (36.84)	21 (20)	0.039	2.33 (0.95–5.69)

number of comparisons made (*pc*). A multivariate analysis based on a backward and forward logistic regression was used to establish association between SR and viral as well as host factors including gender, age, genotype, duration of infection, HLA B44+, necroinflammatory activity, HCV RNA load, and fibrosis.

RESULTS

Variables Associated With Treatment Outcome

Fifty-three of 105 patients (50.5%) receiving combination therapy were considered SR, 42 (49.5%) NR, and 10 patients were classified as RR. Twenty-four of 46 treatment-naïve patients (52.1%) and 49.1% (29 of 59) of the individuals having relapsed (RR) after interferon- α treatment presented as SR (*p* = ns). Table 1 summarizes the characteristics of the 105 patients treated with combination therapy as well as the results of the univariate and multivariate analysis. No significant differences were detected between SR and NR with respect to age or gender distribution and pretreatment HCV RNA. However, SR patients had significantly higher ALT and AST concentrations than NR patients. A strong relationship between HCV genotype and response was also detected. Indeed, only 27 of 70 patients (38.5%) infected by genotype 1 were SR compared with 15 of 18 (81.2%) infected by a non-1 genotype (*p* = 0.001).

Patients bearing HLA DRB1*03 showed a lower SR to interferon + ribavirin than negative DRB1*03 patients (seven of 23; 30.4% vs 46 of 82; 56.1%; *p* = 0.03). Twenty of 26 patients (76.9%) bearing HLA B44 achieved SR, whereas only 33 of 79 (41.7%) HLA B44 negative patients achieved SR (*p* = 0.0081). However, in patients treated with interferon alone, no differences in the distribution of HLA B44 was observed (SR in B44+ = 13 of 38 patients [30.2%] vs SR in B44- = 30 of 105 patients [36.5%]; *p* = ns) nor with respect to DRB1*03. HLA A29, B7, and DRB1*11 seemed to be associated with a greater SR rate in interferon treatment alone (Table 2), whereas HLA A33 was associated with a poorer response. However, there were no statistically significant differences in phenotype frequency after statistical adjustment for the number of HLA antigens (*n* = 46) tested.

There were no differences in the distribution of the TNF -238 or -308 promoter polymorphisms among patients

with different responses to therapy. In multivariate analysis age, genotype non-1 and HLA B44+ were the independent variables associated with SR (Table 3). HLA phenotype distribution did not differ between SR patients from both groups (treatment naïves and previous relapsers) receiving combination therapy.

Viral and Host Factors in Treatment-Naïve Patients Receiving Combination Therapy: Multivariate Analysis

HCV genotype was strongly related to response: 11 of 12 patients infected by non-1 genotype virus achieved response versus only 10 of 30 patients infected by genotype 1 (*p* = 0.0012). Nine of 11 patients (81.8%) bearing B44 achieved SR versus only 15 of 35 (42.8%) B44 negative patients (*p* = 0.03). HLA class II specificities and TNF promoter polymorphisms were not related to SR in the treatment-naïve group. In the multivariate logistic regression analysis, B44 positive (OR 23.5, 95% CI 1.7–321, *p* = 0.017), age (OR 1.4, 95% CI 1.09–1.88, *p* = 0.008), and viral genotype non-1 (OR 4.0, 95% CI 1.01–16.6, *p* = 0.047) were independently associated with SR, whereas gender, fibrosis stage, necroinflammatory activity, pretreatment viral load, and baseline ALT concentrations were nonsignificant on multivariate analysis (Table 4).

DISCUSSION

Our results suggest that HLA B44 as host and genotype non-1 as guest factors could determine a better response to treatment. HLA molecules seem to play a key role in antigen presentation, immune-response modulation, and clearance of virus-infected cells during HCV infection. Both anti-HCV-specific T-helper as well as HCV-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) response may contribute to SR to interferon therapy (14, 15), with an inverse correlation between the vigor of the CTL response to HCV and serum viral load in chronic HCV infection patients having been reported recently (16). This superior response to combination therapy could be related to a higher capacity of HLA B44 to bind HCV-derived peptides, thus increasing the T-cell response (17). *In vitro* studies have demonstrated a stronger CTL response by HLA B44-restricted cytotoxic T lymphocytes against infected hepatocytes in patients with chronic hepatitis C (18). Indeed, HLA B44 positive cells

Table 3. Viral and Host Factors Related to Sustained Response in Patients Treated With Interferon + Ribavirin (n = 105)

Factor	Univariate		Multivariate			
	Sustained Response		OR (95% CI)	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i>
Age (yr)	37.1 ± 8.8	41.5 ± 11.1	1.04 (0.99–1.09)	0.08		ns
Naïve	24 (52.1%)	22 (47.9%)	1.03	0.93		
Relapsed	29 (49.1%)	30 (50.9%)	(0.47–2.23)			
Infection duration (yr)	15.4 ± 7.2	22.0 ± 11.7	1.07 (1.008–1.15)	0.01		ns
Genotype 1*	27 (38.6%)	43 (61.4%)	0.33	0.0002	2.42	0.026
Genotype non-1*	15 (83.3%)	3 (16.6%)	(0.17–0.64)		(1.12–5.55)	
Fibrosis	1.35 ± 0.63	1.52 ± 1.07	1.95 (0.30–12.69)	0.47		
HAI	6.51 ± 2.26	5.8 ± 2.22			0.91	0.35
					(0.76–1.1)	
Viral load (copies × 10 ³ /ml)	975 ± 1258	1236 ± 1151	1.7 (0.2–25.1)	ns		
AST (U/L)	82.1 ± 66.4	47.6 ± 23.4	0.96 (0.94–0.99)	0.006		ns
ALT (U/L)	158.5 ± 119.4	76.4 ± 29.3	0.97 (0.96–0.99)	0.0001		ns
AP (U/L)	164.2 ± 56.3	171.3 ± 73.1	1.00 (0.99–1.01)	0.45		
GGT (U/L)	40.3 ± 33.1	57.1 ± 48	1.01 (0.99–1.02)	0.09		
Ferritin (ng/ml)	110.4 ± 96.7	154.4 ± 106.7	1.00 (0.99–1.00)	0.87		
HLA B44+	20 (76.9%)	6 (23.07%)	3.78 (1.42–10.03)	0.005	4.84	0.017
					(1.31–17.8)	
HLA B44–	33 (41.7%)	46 (58.2%)				
DRB1*03+	7 (30.4%)	16 (69.6%)	0.35 (0.13–0.96)	0.036		
DRB1*03–	46 (56.1%)	36 (43.9%)				
–238 TNF-α						
AG	3 (37.5%)	5 (62.5%)	0.95	0.49		
GG	50 (51.5%)	47 (48.5%)	(0.81–1.10)			
–308 TNF-α						
AG	12 (52.2%)	11 (47.8%)	0.99	0.89		
GG	41 (50%)	41 (50%)	(0.90–1.09)			

* Genotype was available in 88 nonselected patients.

AP = alkaline phosphatase; GGT = gammaglutamyl transpeptidase; HAI = Histologic Activity Index.

corresponding to an HLA B44-restricted epitope efficiently expressed a small peptide from core protein containing aminoacids 87 to 96. Nevertheless, other major histocompatibility complex class I molecules, such as HLA A2, can, as has been reported recently, express this peptide (19). Although a role for HLA molecule interaction with HCV protein in the spontaneous clearance (20), fibrosis progression (21), and the interferon-associated antiviral response (22) has been proposed, the underlying mechanism remains to be delineated, because the processing and presentation of HLA class I molecules are not affected by HCV proteins (23). We, on the other hand, did not find any association between HLA B44 and SR to interferon alone. This aspect could be related to the immunomodulation effect of ribavirin, because ribavirin inhibits the production of Th2 and preserves Th1 cytokine response (24). This discrepancy has also been observed with respect to the influence of interleukin-10 polymorphisms on combination therapy or interferon monotherapy (25, 26).

The relationship between HLA and SR in interferon monotherapy remains controversial and inconclusive. SR has been associated with DR7 and DRB1*0404 in the United States (5), DR2 in Asia (4), and DRB1*0701, DQA1*0201-DQB1*02 in Europe (27), but other authors

have not been able to confirm these associations (28). In our current study, the SR to interferon monotherapy was found to be lower in patients bearing HLA A33 and was observed more often in patients bearing HLA A29, B7, and DRB1*11. One possibility is that the fine balance between HLA and SR relies on the class I genes more often than class II, and the discrepancies observed in HLA class II could be secondary to differences in linkage disequilibrium. An alternative explanation for the discrepancies could be the relatively low numbers of individuals in each arm of the study.

TNF is involved in the pathogenesis of chronic hepatitis C, but the influence of variants in TNF-α promoter region on the clinical history of chronic hepatitis C remains controversial. Yee *et al.* (9) observed a strong relationship between both of the current promoter variants investigated and cirrhosis progression, whereas in a similar study by Powell *et al.* (29), no association was found. The functional consequences of TNF promoter variants are not clear. Although some investigators have observed that TNF-α –308A/G variant is associated with higher TNF-α concentrations in serum (30), others have not (31). Also, the function of TNF-α –238A/G has not been clarified either. In the present study, TNF-α promoter polymorphisms were not

Table 4. Viral and Host Factors Related to Sustained Response in Therapeutically Naïve Patients Treated With Interferon + Ribavirin (n = 46)

Factor	Univariate		OR (95% CI)	p	Multivariate	
	Sustained Response				OR (95% CI)	p
	Yes	No				
Age (yr)	32.7 ± 5.3	44.8 ± 6.8	1.3 (1.09–1.75)	0.001	1.4 (1.09–1.88)	0.008
Males	17 (62.9%)	10 (37.1%)	3.68 (1.06–12.7)	0.03		
Females	7 (36.8%)	12 (43.2%)				
Infection duration (yr)	15.5 ± 6.6	25.4 ± 12.8	1.1 (1.00–1.21)	0.01		
Genotype 1*	10 (33.3%)	20 (66.6%)	0.19 (0.06–0.59)	0.001	4 (1.01–16.6)	0.047
Genotype non-1*	11 (91.6%)	1 (8.4%)				
Fibrosis	1.27 ± 0.63	1.52 ± 1.07	1.35 (0.64–2.85)	0.41		
HAI	5.77 ± 1.54	6.11 ± 2.16	1.22 (0.85–1.75)	0.26		
Viral load (copies × 10 ³ /ml)	707 ± 964	1081 ± 1499	1.5 (0.68–2.61)	0.85		
ALT (U/L)	182.1 ± 141.5	80.1 ± 37.3	0.97 (0.95–0.99)	0.002		
GGT (U/L)	46.5 ± 39.2	67.4 ± 68.1	1.00 (0.99–1.02)	0.28		
HLA B44+	9 (81.8%)	2 (18.2%)	3.55 (0.80–15.71)	0.07	23.5 (1.7–321)	0.017
HLA B44–	15 (42.8%)	20 (57.2%)				
DRB1*03+	4 (33.3%)	8 (66.6%)	0.39 (0.09–1.56)	0.17		
DRB1*03–	19 (55.8%)	15 (44.2%)				
–238 TNF-α						
AG	1 (25%)	3 (75%)	0.89 (0.70–1.12)	0.30		
GG	23 (54.7%)	19 (45.3%)				
–308 TNF-α						
AG	6 (60%)	4 (40%)	1.50 (0.87–1.15)	0.93		
GG	17 (48.6%)	18 (51.4%)				

* Genotype was available in 42 nonselected naïve patients.

AP = alkaline phosphatase; GGT = gamma-glutamyl transpeptidase; HAI = Histologic Activity Index.

associated with SR to combination therapy, a finding that is concordant with others recently reported (28, 32).

In summary, to the best of our knowledge, there have been no reports published on the influence of HLA on the outcome of interferon + ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C infection. HLA class I could play a major role in the immune response to HCV infection in patients treated with interferon + ribavirin. HLA B44 is one of the most common HLA B alleles in the white population (33) and is independently related to SR. As such, the findings of the present study, if confirmed by other investigators, would suggest that this viral genotype test could be used to predict the likelihood of SR in patients with chronic hepatitis C infection undergoing combined antiviral therapy.

Reprint requests and correspondence: Manuel Romero-Gómez, M.D., C/Juan Antonio Cavestany 1-4^oG, 41003 Seville, Spain.

Received July 22, 2002; accepted Jan. 9, 2003.

REFERENCES

- Hu KQ, Vierling JM, Redeker AG. Viral, host and interferon-related factors modulating the effect of interferon therapy for chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2001;8:1–18.
- Mangia A, Gentile R, Cascavilla I, et al. HLA class II favors clearance of HCV infection and progression of the chronic liver damage. *J Hepatol* 1999;30:984–9.
- Zavaglia C, Martinetti M, Silini E, et al. Association between HLA class II alleles and protection from or susceptibility to chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1998;28:1–7.
- Almarri A, El Dwick N, Al Kabi S, et al. Interferon-alpha therapy in HCV hepatitis. HLA phenotype and cirrhosis are independent predictors of clinical outcome. *Hum Immunol* 1998;59:239–42.
- Sim H, Wojcik J, Margulies M, et al. Response to interferon therapy: Influence of human leucocyte antigen alleles in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 1998;5:249–53.
- Alric L, Fort M, Izopet J, et al. Genes of the major histocompatibility complex class II influence the outcome of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 1997;113:1675–81.
- Larrea E, Garcia N, Qian C, et al. Tumor necrosis factor alpha gene expression and the response to interferon in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996;23:210–7.
- Höhler T, Kruger A, Gerken G, et al. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism at position –238 is associated with chronic active hepatitis C infection. *J Med Virol* 1998;54:173–7.
- Yee LJ, Tang J, Herrera J, et al. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection. *Genes Immun* 2000;1:386–90.
- Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: A need for reassessment. *J Hepatol* 1991;13:372–3.
- Knodell RG. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981;1:431–5.
- Kawasaki E. Sample preparation from blood, cells and other fluids. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T, eds. *PCR*

- protocols: A guide to methods and applications. San Diego, CA: Academic Press, 1990:146–52.
13. National Laboratory of Medicine. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
 14. Nelson D, Marousis C, Ohno T, et al. Intrahepatic hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocyte activity and response to interferon alpha therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998;28:225–30.
 15. Chang KM, Thimme R, Melpolder JJ, et al. Differential CD4+ and CD8+ T-cell responsiveness in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001;33:267–76.
 16. Hiroishi K, Kita H, Kojima M, et al. Cytotoxic T lymphocyte response and viral load in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1997;25:705–12.
 17. Cepellini R, Frumento G, Ferrara GB, et al. Binding of labeled influenza matrix peptide to HLA DR in living B cells. *Nature* 1989;339:392–4.
 18. Kita H, Moriyama T, Kaneko T, et al. HLA B44-restricted cytotoxic T lymphocytes recognizing an epitope on hepatitis C virus nucleocapsid protein. *Hepatology* 1993;18:1039–44.
 19. Schweitzer S, Schneiders AM, Langhans B, et al. Flow cytometric analysis of peptide binding to major histocompatibility complex class I for hepatitis C virus core T-cell epitopes. *Cytometry* 2000;41:271–8.
 20. Barret S, Ryan E, Crowe J. Association of the HLA-DRB1*01 allele with spontaneous viral clearance in an Irish cohort infected with hepatitis C virus via contaminated anti-D immunoglobulin. *J Hepatol* 1999;30:979–83.
 21. Höhler T, Gerken G, Notghi A, et al. MCH class II genes influence the susceptibility to chronic active hepatitis C. *J Hepatol* 1997;27:259–64.
 22. Saito H, Ebinuma H, Satoh I, et al. Immunological and virological predictors of outcome during interferon-alpha therapy of chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2000;7:64–74.
 23. Moradpour D, Grabscheid B, Kammer AR, et al. Expression of hepatitis C virus proteins does not interfere with major histocompatibility complex class I processing and presentation in vitro. *Hepatology* 2001;33:1282–7.
 24. Ning Q, Brown D, Parodo J, et al. Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *J Immunol* 1998;160:3487–93.
 25. Vidigal PG, Germer JJ, Zein NN. Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and transforming grown factor-beta1 genes in chronic hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin. *J Hepatol* 2002;36:271–7.
 26. Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, et al. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alpha. *Hepatology* 1999;30:526–30.
 27. Wawrzynowicz-Syczewska M, Underhill JA, Clare MA, et al. HLA class II genotypes associated with chronic hepatitis C virus infection and response to alpha-interferon treatment in Poland. *Liver* 2000;20:234–9.
 28. Alric L, Izopet J, Fort M, et al. Study of association between major histocompatibility complex class II genes and the response to interferon alpha in patients with chronic hepatitis C infection. *Hum Immunol* 1999;60:516–23.
 29. Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, et al. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000;31:828–33.
 30. Wilson AG, di Giovine FS, Blackmore AIF, et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:391–9.
 31. Brickman BMN, Zuuuijdgeest D, Kaijzel EL, et al. Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) –308 promoter polymorphism in TNFalpha gene regulation. *J Inflamm* 1996;46:32–41.
 32. Yee LJ, Tang J, Gibson AW, et al. Interleukin 10 polymorphisms as predictors of sustained response in antiviral therapy for chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 2001;33:708–12.
 33. DiBrino M, Parker KC, Margulies DH, et al. Identification of the peptide binding motif for HLA B44, one of the most common HLA-B alleles in the Caucasian population. *Biochemistry* 1995;34:10130–8.



SLC11A1 promoter gene polymorphisms and fibrosis progression in chronic hepatitis C

M Romero-Gómez, M A Montes-Cano, M A Otero-Fernández, B Torres, D Sánchez-Muñoz, F Aguilar, N Barroso, L Gómez-Izquierdo, V M Castellano-Megias, A Núñez-Roldán, J Aguilar-Reina and M F González-Escribano

Gut 2004;53:446-450
doi:10.1136/gut.2003.028274

Updated information and services can be found at:
<http://gut.bmjournals.com/cgi/content/full/53/3/446>

These include:

References This article cites 29 articles, 6 of which can be accessed free at:
<http://gut.bmjournals.com/cgi/content/full/53/3/446#BIBL>

Email alerting service Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article

Topic collections Articles on similar topics can be found in the following collections

[Genetics](#) (3800 articles)
[Liver, including hepatitis](#) (905 articles)
[Nutrition and Metabolism](#) (1201 articles)
[Infection](#) (355 articles)

Notes

To order reprints of this article go to:
<http://www.bmjournals.com/cgi/reprintform>

To subscribe to *Gut* go to:
<http://www.bmjournals.com/subscriptions/>

LIVER FIBROSIS

SLC11A1 promoter gene polymorphisms and fibrosis progression in chronic hepatitis C

M Romero-Gómez, M A Montes-Cano, M A Otero-Fernández, B Torres, D Sánchez-Muñoz, F Aguilar, N Barroso, L Gómez-Izquierdo, V M Castellano-Megias, A Núñez-Roldán, J Aguilar-Reina, M F González-Escribano

Gut 2004;53:446–450. doi: 10.1136/gut.2003.028274

See end of article for authors' affiliations

Correspondence to:
Dr M Romero-Gómez,
Hepatology Unit, Hospital
Universitario de Valme,
Ctra Cádiz s/n, 41014
Sevilla, Spain;
mromerog@supercable.es

Accepted for publication
20 October 2003

Background and aims: The solute carrier family 11 member 1 (SLC11A1) gene (formerly Nramp1) encodes for the protein solute carrier family 11, member 1. It affects susceptibility and clinical outcome of autoimmune and infectious diseases. We investigated the possible role of the functional polymorphism located in the promoter region of SLC11A1 and tumour necrosis factor (TNF) genes in the progression of fibrosis in chronic hepatitis C.

Methods: A total of 242 Caucasian Spanish patients with biopsy proven chronic hepatitis C and 194 healthy control subjects were genotyped for SLC11A1 and TNF promoter polymorphisms.

Results: No significant differences in the distribution of frequencies among patient and control groups were observed. The SLC11A1 homozygous 2/2 genotype was rarely detected among patients showing advanced fibrosis (2/82; 2.4%) but was highly represented in those with mild fibrosis (29/160; 18.1%; odds ratio (OR) 8.85 (95% confidence interval (CI) 1.9–55.2, $p_c=0.002$). In patients carrying allele 3 of SLC11A1, the presence of –238 TNF A/G was associated with advanced fibrosis (14/26 (53.8%) v 68/216 (31.4%); OR 2.53 (95% CI 1.03–6.23); $p=0.02$).

Conclusions: SLC11A1 gene promoter polymorphism could influence fibrosis progression in chronic hepatitis C in that the homozygous genotype 2/2 exerts a protective effect against cirrhosis development. Also, the combination of TNF –238 A/G and the presence of allele 3 is conducive to progression to pre-cirrhotic or cirrhotic stages of the disease.

The pathogenesis of hepatitis C virus (HCV) induced hepatic injury remains unclear but the major role played by the immune response mechanism in the control of viral replication and persistence in HCV induced liver disease has been well documented.¹ Recently, several studies seeking candidate genes that may be involved in hepatitis C have been conducted and the results indicate that genes coding for interleukin 10 (IL-10) or tumour growth factor β (TGF- β) are particularly involved in fibrosis progression in chronic hepatitis C.^{2–3} Solute carrier family 11 member 1 (SLC11A1) protein is located in the late endosomal compartment of resting macrophages, and is recruited to the phagosome by phagocytosis.⁴ Functional studies with murine SLC11A1 implicate its involvement in macrophage function, including upregulation of chemokine/cytokine genes such as tumour necrosis factor (TNF) and IL-1 β , and induction of nitric oxide synthase (iNOS).⁵ These functions play an important role in the immune response against HCV infection. Several mutations resulting in polymorphic mRNA expression have been identified in the SLC11A1 gene.⁶ One of them, consisting of a variable number of tandem GT repeats, is located in the promoter region. Four alleles have been found in different populations: allele 1 (GT)₅AC(GT)₁₁G, allele 2 (GT)₅AC(GT)₁₀G, allele 3 (GT)₅AC(GT)₉G, and allele 4 (GT)₉G (the subscript numbers refer to the number of repeats at the polymorphic site). Functional differences relating to these alleles have been described. For example, in the absence of external stimuli, alleles 1, 2, and 4 are poor promoters whereas allele 3 drives high expression.⁷ One hypothesis has been that the SLC11A1 protein is an iron transporter that becomes saturated at high circulating iron concentrations^{8–9} and hence, in circumstances of iron overload (which can occur in chronic hepatitis C infection),

the result is fibrosis progression, a characteristic of the disease.¹⁰

TNF has been shown to be involved in the immune response to HCV infection and fibrosis progression.¹¹ Conflicting results have been reported with respect to the association of two biallelic polymorphisms located in the promoter region of the TNF gene (at positions –238 TNF A/G and –308 TNF A/G) and cirrhosis development in chronic hepatitis C.^{3 12 13} Indeed, higher serum concentrations of liver TNF have been shown to impair responses to antiviral therapy.¹⁴

The aim of this study was to analyse the possible involvement of known polymorphisms in the promoter regions of the SLC11A1 and TNF genes in the progression of fibrosis in chronic hepatitis C infection.

PATIENTS AND METHODS

Patients

Spanish patients (n = 242) of Caucasian descent and with biopsy proven chronic hepatitis C infection were enrolled. The control group of subjects comprised 194 (105 men and 89 women) age and ethnicity matched volunteer bone marrow donors. Patients with alcohol consumption >80 g/day were excluded. No patient had been treated with interferon or with

Abbreviations: SLC11A1, solute carrier family 11 member 1; HCV, hepatitis C virus; TGF, tumour growth factor; IL, interleukin; NOS, nitric oxide synthase; TNF, tumour necrosis factor; HIV, human immunodeficiency virus; PCR, polymerase chain reaction; OR, odds ratio; F, fibrosis; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; AP, alkaline phosphatase; GGT, gamma glutamyl transpeptidase

Table 1 Epidemiological, biochemical, and histopathological features of the 242 patients with hepatitis C virus included in the study

Age (y)	44.9 (11.7)
Infection duration (y)	16.5 (9.6)
Genotype	
Genotype 1	175
Genotype non-1	37
Unknown	30
Risk factors	
Drug user	55
Transfusion	78
Tattoos/piercing	16
Others/unknown	93
Sex	
Male	170 (70.2%)
Female	72 (29.7%)
Alcohol consumption >30 g/day	
Yes	65 (26.8%)
No	177 (73.2%)
Fibrosis stage	
F0–F2	160 (66.1%)
F3–F4	82 (33.9%)
Portal inflammation	2.48 (1.02)
Lobular inflammation	1.56 (0.94)
Hepatocyte steatosis	
Present	95 (42.1%)
Absent	129 (57.8%)
Perl's staining	
Positive	66 (29.5%)
Negative	158 (70.5%)
Viral load (IU x10 ³ /ml)	1156 (1390)
AST (U/l)	70 (53)
ALT (U/l)	122 (100)
AP (U/l)	181 (76)
GGT (U/l)	48 (43)
Ferritin (ng/ml)	148 (121)
Antinuclear antibody positive	25 (10.3%)

AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; AP, alkaline phosphatase; GGT, gamma glutamyl transpeptidase.

other antiviral drugs prior to liver biopsy. The protocol was approved by the ethics committees of the Hospital Universitario de Valme and Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla). All biopsies from patients and genetic analyses on patients and volunteers were performed with fully informed written consent and with anonymity of the data being guaranteed.

Laboratory analyses

All patients had raised alanine aminotransferase (ALT) concentrations and positive anti-HCV and HCV RNA in serum, but were hepatitis B surface antigen and anti-human immunodeficiency virus (HIV) negative. Additionally, serum HCV RNA levels were quantified using Amplicor-HCV-Monitor (Perkin-Elmer, Norwalk, Connecticut, USA) and HCV genotypes were determined using Inno-lipa HCV II (Innogenetics, Zwijnaarden, Belgium). All commercial kits were used according to the manufacturer's instructions.

Liver biopsies

Percutaneous liver biopsies were performed under ultrasonographic guidance. Grading and staging assignments were according to the system of Scheuer.¹⁵ These were: *necro-inflammatory activity (grade)*: (a) portal inflammation and interface hepatitis ranging in grade from absent (P0) to severe and widespread interface hepatitis (P4); (b) lobular activity ranging from none (L0) to bridging confluent necrosis (L4); *fibrosis (stage)*: ranging from no fibrosis (F0) to cirrhosis (F4). Hepatocyte steatosis and iron staining were also evaluated. Grading of hepatic iron deposition was performed on paraffin embedded sections of liver biopsy specimens stained with Perl's Prussian blue. Liver biopsy was

Table 2 Allele and genotype frequencies of the SLC11A1 polymorphisms in chronic hepatitis C (HCV) patients and in a healthy control group of subjects

SLC11A1	HCV patients (n = 242)	Healthy controls (n = 194)
Allele frequencies		
(48 bp) 1	0.006	0.008
(46 bp) 2	0.311	0.278
(44 bp) 3	0.671	0.714
(34 bp) 4	0.000	0.000
Genotype frequencies		
1/1	0 (0%)	0 (0%)
1/2	3 (1.2%)	1 (1%)
1/3	5 (2.1%)	2 (1%)
1/4	0 (0%)	0 (0%)
2/2	28 (11.6%)	15 (8%)
2/3	92 (38%)	76 (39%)
2/4	0 (0%)	0 (0%)
3/3	114 (47.1%)	100 (52%)
3/4	0 (0%)	0 (0%)
4/4	0 (0%)	0 (0%)

No statistically significant differences were observed in any of the variables.

not available from 18 patients who had biochemical, endoscopic, and ultrasound features of liver cirrhosis. These patients were classified as F4.

Genotyping

Genetic studies were performed on genomic DNA isolated from peripheral blood samples from patients and control subjects using standard extraction methods.¹⁶ In the case of SLC11A1 microsatellite promoter region polymorphism, genotyping was performed using the polymerase chain reaction (PCR) carried out in a Perkin-Elmer 9600 Thermal Cycler (Perkin-Elmer, Foster City, California, USA) with reaction mixtures consisting of 1 µl of genomic DNA, 2.5 pmol of each primer, 200 µM of each dNTP and 0.2 U Taq DNA polymerase in a final volume of 10 µl. The polymorphic region was amplified using sense (5'-ACTCGCATTAGGCCAACGAG-3') 5'-end labelled with HEX (Perkin-Elmer) and antisense (5'-TGTGCCCCACAACACATCTG-3') primers. The thermal cycle profile was: initial denaturation at 95°C over five minutes followed by 30 cycles of 94°C for one minute, 55°C for one minute, and 72°C for one minute, and a final extension at 72°C for seven minutes. PCR amplified fragments were separated by electrophoresis in a capillary system (ABI PRISM 310; Perkin-Elmer). The lengths of the fragments were analysed using Genescan 672 software (Perkin-Elmer). Fragment size markers (500 TAMRA; Perkin-Elmer) were used as reference.

Table 3 Relationship between the tumour necrosis factor (TNF) and solute carrier family 11 member 1 (SLC11A1) polymorphisms and liver fibrosis

Polymorphisms	Fibrosis		p Value
	F0–F2	F3–F4	
TNF –238 A/G	17	14	
TNF –238 G/G	143	68	0.303
TNF –308 A/G	45	20	
TNF –308 G/G	115	62	0.223
Genotype 2/2	29†	2	
Genotype 3/3 or 3/others	131	80	0.0005*

*Odds ratio 8.85 (95% confidence interval 1.9–55.2); p_c = 0.002.

†Three patients bearing genotype 2/1 showed F0–F2 fibrosis.

Table 4 Biochemical, histological, and virological features divided with respect to the solute carrier family 11 member 1 (SLC11A1) polymorphisms

	SLC11A1 genotype		p Value
	2/2	3/3 or 3/other	
Infection duration (y)	15.2 (8.8)	16.7 (9.8)	NS
Alcohol			
Yes	7	58	NS
No	21	153	
Body mass index (kg/m ²)	26.1 (5.3)	27.2 (5.7)	NS
AST (U/l)	74 (53)	69 (53)	NS
ALT (U/l)	110 (86)	124 (102)	NS
AP (U/l)	175 (56)	182 (79)	NS
GGT (U/l)	57 (41)	46 (43)	NS
Ferritin (ng/ml)	150 (125)	148 (145)	NS
HCV viral load (Th IU/ml)	336 (421)	1290 (1345)	0.012
Portal inflammation	1.9 (1.1)	2.5 (1.0)	0.031
Lobular inflammation	1.8 (0.8)	1.8 (0.9)	NS
Perl's stain (+)	7	59	NS
Perl's stain (-)	21	134	
Steatosis (yes)	8	87	NS
Steatosis (no)	20	106	

HCV, hepatitis C virus; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; AP, alkaline phosphatase; GGT, gamma glutamyl transpeptidase.

TNF -238 and -308 promoter genotyping was performed employing a PCR-amplification refractory mutation system carried out in a Perkin-Elmer 9600 Thermal Cycler with reaction mixtures consisting of 1 µl of genomic DNA, 2.5 pmol of each primer, 200 µM of each dNTP, and 0.2 U Taq DNA polymerase in a final volume of 10 µl. Primers were designed according to the published human TNF sequence obtained from the GeneBank (accession No 1353717)¹⁷ (R2). Forward primers were: 5' ATAGGTTTTGAGGGGCATGG 3' and 5' ATAGGTTTTGAGGGGCATGA 3' for the -308 mutation, and 5' GAAGACCTCTCTCAGATCA 3' and GAAGACCTCTCTAGAATCG for the -238 mutation. Reverse primer was 5' GGTTCCTCTCCATCACTGG 3' in both cases. For each sample, two independent PCR reactions were carried out for each dimorphism. The following thermal profile applied to the -308 position: initial denaturing at 95°C over five minutes, followed by 10 cycles of 94°C for 10 seconds and 62°C for 20 seconds, and 20 cycles of 94°C for 10 seconds, 52°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds. In the case of the -238 mutation, the thermal profile was: initial denaturing at 95°C over five minutes, followed by 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 50°C for 30 seconds, and 72°C

for 30 seconds. Amplified fragments were separated on 2% agarose gel stained with ethidium bromide. Samples showing the expected fragments (171 bp for -308 and 101 bp for -238) in a single tube were assigned as the homozygous AA or GG genotype while samples showing amplification in both tubes were assigned the heterozygous AG genotype.

Statistical analysis

Allelic and genotype frequencies were obtained by direct counting. Data are presented as mean (SD) in the text and tables. Data were compared with n×2 or 2×2 contingency tables using the Statcalc program (Epi Info version 6.0; Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA). The χ^2 test was used in statistical comparisons. Fisher's exact test was used when one expected value was less than 5 and p values were corrected (p_c) by multiplying by the number of comparisons. Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (95% CI) were calculated using the same software. Backward logistic regression was used to analyse the influence of alcohol, steatosis, sex, age, duration of disease, body mass index, and gene polymorphism in relation to progression of liver fibrosis.

Table 5 Biochemical, histological, and virological features divided with respect to tumour necrosis factor (TNF) polymorphisms

	TNF		p Value	TNF		p Value
	-238 A/G	-238 G/G		-308 A/G	-308G/G	
Infection duration (y)	19 (12)	16 (9)	NS	17 (10)	15 (9)	NS
Alcohol						
Yes	8	57		21	44	NS
No	23	154	NS	44	133	
Body mass index (kg/m ²)	27.1 (5.4)	26.4 (5.4)	NS	25.4 (5.7)	27.6 (5.8)	NS
AST (U/l)	69 (63)	70 (51)	0.24	74 (49)	68 (54)	NS
ALT (U/l)	123 (130)	122 (96)	NS	138 (93)	119 (103)	NS
AP (U/l)	188 (68)	181 (78)	NS	183 (68)	181 (80)	NS
GGT (U/l)	60 (47)	47 (42)	NS	47 (44)	49 (42)	NS
Ferritin (ng/ml)	214 (144)	140 (139)	NS	150 (167)	149 (133)	NS
HCV Viral load (Th IU/ml)	1026 (1048)	1170 (1425)	NS	1157 (1432)	1115 (1332)	NS
Portal inflammation	2.7 (0.9)	2.4 (1.1)	NS	2.5 (1.03)	2.5 (1.0)	NS
Lobular inflammation	1.93 (0.9)	1.8 (0.9)	NS	1.85 (1.02)	1.8 (0.9)	NS
Perl's stain (+)	6	60	NS	18	48	NS
Perl's stain (-)	21	137		42	116	
Steatosis (yes)	15	80	NS	24	71	NS
Steatosis (no)	12	117		36	93	

HCV, hepatitis C virus; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; AP, alkaline phosphatase; GGT, gamma glutamyl transpeptidase.

Table 6 Distribution of advanced or early fibrosis, divided with respect to the presence of allele 3 of the solute carrier family 11 member 1 (SLC11A1) and tumour necrosis factor (TNF) polymorphisms

SLC11A1 allele/–238 TNF polymorphisms	Fibrosis		% Fibrosis
	F0–F2	F3–F4	
Non-allele 3 TNF –238 A/G	6	0	0
Non-allele 3 TNF –238 G/G	23	2	8
Allele 3 TNF –238 A/G	12	14	54
Allele 3 TNF –238 G/G	119	66	36

Patients carrying allele 3 and TNF –238 A/G showed a higher proportion of advanced fibrosis than patients with allele 3 and wild-type TNF.

Pearson χ^2 : 14.03; $p=0.002$; $p_c=0.016$.

RESULTS

Population sample

Epidemiological, biochemical, and histological features of the population studied are summarised in table 1. No significant differences were noted between patients and control subjects with respect to age or sex distributions. The distribution of SLC11A1 genotypes in patients and control subjects are presented in table 2. The frequencies of the genotypes were found to be not significantly different from those predicted from the Hardy-Weinberg equilibrium in patients as well as in the control population. No significant differences were observed in the distributions of allele and genotype frequencies of SLC11A1 promoter region polymorphisms between HCV infected patients and healthy control subjects.

Genetic factors in fibrosis progression

After stratification with respect to fibrosis status in group F0–F2 and group F3–F4, no significant differences in the distribution of the –238 TNFA and –308 TNFA genotypes were observed between these patient groups (table 3). However, there was a significant deviation between the patient groups (χ^2 test, $p=0.0005$) with respect to the distribution of the most frequent SLC11A1 genotypes. This deviation was caused by a significantly different distribution of the 2/2 genotype among patients showing advanced fibrosis (2.4%) and patient displaying fibrosis stages F0–F2 (18.1%) (OR 8.85 (95% CI 1.9–55.2); $p_c=0.002$).

Relationship between SLC11A1 genotypes and inflammatory activity and viraemia

Patients carrying the 2/2 genotype showed lower HCV RNA levels (336 (421) ν 1290 (1345) IU $\times 10^3$ /ml; $p=0.012$) and lower degree of portal inflammation (1.9 (1.1) ν 2.6 (1.0); $p=0.031$) than the other genotypes (table 4). No differences among TNFA genotypes were observed with respect to biochemical, histology, or clinical features (table 5).

Interaction between –238 TNF and SLC11A1 genotype 3/3 in the development of advanced fibrosis

A significant deviation in the distribution of patients with respect to their SLC11A1/–238 TNF alleles between both patient groups was observed (χ^2 test, $p=0.002$). This deviation was caused by a difference in the distribution of individuals carrying the allele 3 of SLC11A1 and the A/G –238 TNF among patients showing advanced fibrosis (14/26 (53.8%) ν 68/216 (31.4%) of the other genotypes, $p=0.039$; OR 2.53 (95% CI 1.03–6.23)) (table 6).

Multivariate analysis (backward logistic regression)

To analyse the influence of age, sex, duration of infection (years), alcohol consumption, presence of steatosis, body

mass index, iron staining, portal inflammation, SLC11A1 genotype 2/2, and haplotypes SCL11A1–TNF 238 on fibrosis stage in the liver samples, a backward logistic regression analysis was performed. The results indicated that alcohol (OR 4.59 (95% CI 1.85–11.36); $p=0.001$), age (OR 0.92 (95% CI 0.89–0.96); $p=0.0001$), sex (OR 0.41 (95% CI 0.18–0.95); $p=0.03$), and genotype 2/2 of SLC11A1 (OR 25 (95% CI 2.41–272.9); $p=0.007$) were independent variables associated with fibrosis stage. Perl's staining for iron, portal inflammation, TNF polymorphism, and steatosis did not enter into the equation.

DISCUSSION

The 2/2 genotype of the promoter region of the SLC11A1 gene (that is, homozygosity for allele 2 (GT)₅AC(GT)₁₀G) has been found, in the current study, to be associated with lower HCV replication in serum and mild portal inflammation, together with a lack of advanced fibrosis. SLC11A1 is located at 2q35 and mutations giving rise to polymorphisms in the promoter region have been related to susceptibility to rheumatoid arthritis,¹⁶ tuberculosis,¹⁸ and HIV infection.¹⁹ A role for genetic factors in the regulation of serum HCV levels has been proposed which implicates mainly the HLA class II haplotypes.²⁰ However, explanations for the underlying mechanism remain elusive. Several aspects of the functional activity of SLC11A1 could explain our results, at least in part. Firstly, SLC11A1 could regulate secretion of several cytokines such as TNF or TGF- β ²¹ which are involved in the activation of hepatic stellate cells and progression of fibrosis in chronic hepatitis C.²² Secondly, one of the mechanism proposed to explain the higher susceptibility to tuberculosis of individuals bearing the SLC11A1 2/2 genotype has been upregulation of IL-10 production by monocytes.²³ Indeed, IL-10 shows an important anti-inflammatory and antifibrogenic activity and this could be responsible for the low rate of cirrhosis in HCV patients carrying this SCL11A1 genotype.²⁴ Thirdly, the SLC11A1 gene could modulate Kupffer cell activation with higher TNF production in individuals carrying the 3 allele.²⁵ Fourthly, SLC11A1 has been associated with increased nitric oxide production and enhanced iNOS in hepatocytes and macrophages.²⁶ Nitric oxide has been implicated in the pathogenesis of chronic hepatitis C, mainly via peroxynitrite; a potential oxidant that is produced by the reduction of superoxide anion with nitric oxide.²⁷ Recently, cooperation between TNF and SLC11A1 genes was shown to result in raised nitric oxide production following cytokine stimulation.²⁸ This mechanism could explain the advanced fibrosis found in patients carrying the 3/3 SLC11A1 genotype and the A/G –238 TNF mutation. Fifthly, it is possible that alleles of some other gene in linkage disequilibrium with the ones currently studied is the underlying cause of a modified immune response that induces cirrhosis progression in the presence of allele 3 of the SLC11A1 gene.²⁹ Indeed, IL-8 receptor gene is in an adjacent location to the SLC11A1 gene

and this chemokine has been associated with viral persistence and resistance to interferon therapy.³⁰

Although the association between genotype 2/2 and lack of fibrosis progression achieved statistical significance and the SLC11A1 gene has potential functional importance in fibrosis progression, these results need to be confirmed in further studies. Although the number of individuals in each group was too low to make definite conclusion regarding outcome, the mechanisms proposed (above) could explain, at least in part, why patients carrying the 2/2 genotype have less severe fibrosis. Allele 3 of SLC11A1, together with the A/G -238 TNF, was associated with precirrhotic or cirrhotic stages in patients with chronic hepatitis C. Nevertheless, multivariate analysis indicated that genotype 2/2 of SLC11A1 was strongly associated with mild fibrosis and excluded interactions between SLC11A1 and TNF -238 A/G from being independent variables. An interaction between several polymorphisms of genes causing progressive fibrosis in chronic hepatitis C had been reported. Patients carrying the TGF- β 1 25 Arg/Arg and the AT-6 A/A combined had higher fibrosis scores than patients bearing either one alone or carrying the wild types.³ It is important however to remember that these genes account for only a small proportion of the total genetic background implicated in the progression of fibrosis in chronic hepatitis C. A better understanding of the molecular bases of this observation could have major implications for the development of novel therapies and vaccines.

In summary, our data suggest that the SLC11A1 gene may be implicated in the regulation of fibrosis; the genotype 2/2 exerting a protective effect against fibrosis progression. Also, interaction between allele 3 of SLC11A1 and the -238 A/G mutation in the promoter region of the TNF gene appears to induce advanced fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported in part by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 00/0566) and Plan Andaluz de Investigación (PAI, grupos CTS-913, CTS-197 and CTS-102) and a grant (16/01) from Junta de Andalucía and (G03/155) from the Spanish Ministry of Health.

Authors' affiliations

M Romero-Gómez, M A Otero-Fernández, D Sánchez-Muñoz, Hepatology Unit, Hospital Universitario de Valme, Sevilla, Spain
M A Montes-Cano, B Torres, F Aguilar, A Núñez-Roldán, M F González-Escribano, Immunology Department, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain
N Barroso, J Aguilar-Reina, Hepatology Section (Digestive Service), Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain
L Gómez-Izquierdo, Pathology Unit, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain
V M Castellano-Megias, Pathology Unit, Hospital Universitario de Valme, Sevilla, Spain

REFERENCES

- 1 Chang KM. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2003;**7**:89-105.
- 2 Vidigal PG, Germer JJ, Zein NN. Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta1 genes in chronic

- hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin. *J Hepatol* 2002;**36**:271-7.
- 3 Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, et al. Most genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000;**31**:828-33.
- 4 Gruenheid S, Pinner E, Desjardins M, et al. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J Exp Med* 1997;**185**:717-30.
- 5 Blackwell JM, Searle S, Mohamed H, et al. Divalent cation transport and susceptibility to infectious and autoimmune disease: continuation of the lty/Lsh/Bcg/Nramp1/Slc11a1 gene story. *Immunol Lett* 2003;**85**:197-203.
- 6 Liu J, Fujiwara TM, Buu NT, et al. Identification of polymorphisms and sequence variants in the human homologue of the mouse natural resistance-associated macrophage protein gene. *Am J Hum Genet* 1995;**56**:845-53.
- 7 Bellamy R. Susceptibility to mycobacterial infections: the importance of host genetics. *Genes Immun* 2003;**4**:4-11.
- 8 Levy JE, Montross LK, Andrews NC. Genes that modify the hemochromatosis phenotype in mice. *J Clin Invest* 2000;**105**:1209-16.
- 9 Barton CH, Biggs TE, Baker ST, et al. Nramp1: a link between intracellular iron transport and innate resistance to intracellular pathogens. *J Leukoc Biol* 1999;**66**:757-62.
- 10 Tung BY, Emond MJ, Bronner MP, et al. Hepatitis C, iron status, and disease severity: relationship with HFE mutations. *Gastroenterology* 2003;**124**:318-26.
- 11 Crespo J, Rivero M, Fabrega E, et al. Plasma leptin and TNF-alpha levels in chronic hepatitis C patients and their relationship to hepatic fibrosis. *Dig Dis Sci* 2002;**47**:1604-10.
- 12 Romero-Gómez M, González-Escribano MF, Torres B, et al. HLA Class I B44 is associated with sustained response to interferon+ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2003;**98**:1621-6.
- 13 Yee LJ, Tang J, Herrera J, et al. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection. *Genes Immun* 2000;**1**:386-90.
- 14 Kimball P, Elswick RK, Shiffman M. Ethnicity and cytokine production gauge response of patients with hepatitis C to interferon-alpha therapy. *J Med Virol* 2001;**65**:510-16.
- 15 Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991;**13**:372-3.
- 16 Rodríguez MR, González-Escribano MF, Aguilar F, et al. Association of NRAMP1 promoter gene polymorphism with the susceptibility and radiological severity of rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 2002;**59**:311-5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- 17 Searle S, Blackwell JM. Evidence for a functional repeat polymorphism in the promoter of the human NRAMP1 gene that correlates with autoimmune versus infectious disease susceptibility. *J Med Genet* 1999;**36**:295-9.
- 18 Marquet S, Sanchez FO, Arias M, et al. Variants of the human NRAMP1 gene and altered human immunodeficiency virus infection susceptibility. *J Infect Dis* 1999;**180**:1521-5.
- 19 Fanning LJ, Levis J, Kenny-Walsh E, et al. HLA class II genes determine the natural variance of hepatitis C viral load. *Hepatology* 2001;**33**:224-30.
- 20 Gershwin ME. The natural history of primary biliary cirrhosis: of genes and cooperation. *J Hepatol* 2001;**35**:412-5.
- 21 Schuppan D, Krebs A, Bauer M, et al. Hepatitis C and liver fibrosis. *Cell Death Differ* 2003;**10**(suppl 1):S59-67.
- 22 Awomoyi AA, Marchant A, Howson JMM, et al. Interleukin-10, polymorphism in SLC11A1 (formerly Nramp1), and susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis* 2002;**186**:1808-14.
- 23 Napoli J, Bishop GA, McGuinness PH, et al. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology* 1996;**24**:759-65.
- 24 Wyllie S, Seu P, Gao FQ, et al. Disruption of the Nramp1 (also known as Slc11a1) gene in Kupffer cells attenuates early-phase, warm ischemia-reperfusion injury in the mouse liver. *J Leukoc Biol* 2002;**72**:885-97.
- 25 Nathan C. Natural resistance and nitric oxide. *Cell* 1995;**82**:873-6.
- 26 Kandemir O, Polat A, Kaya A. Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis and its relation with histological severity of disease. *J Viral Hepat* 2002;**9**:419-23.
- 27 Ables GP, Takamatsu D, Noma H, et al. The roles of Nramp1 and TNF α genes in nitric oxide production and their effect on the growth of Salmonella typhimurium in macrophages from Nramp1 congenic and tumor necrosis factor-alpha -/- mice. *J Interferon Cytokine Res* 2001;**21**:53-62.
- 28 Yip SP, Leung KH, Lin CK. Extent and distribution of linkage disequilibrium around the SLC11A1 locus. *Genes Immun* 2003;**4**:212-21.
- 29 Polyak SJ, Khabar KS, Rezeiq M, et al. Elevated levels of interleukin-8 in serum are associated with hepatitis C virus infection and resistance to interferon therapy. *J Virol* 2001;**75**:6209-11.

HLA-C and KIR Genes in Hepatitis C Virus Infection

Marco Antonio Montes-Cano, José Luis Caro-Oleas,
Manuel Romero-Gómez, Moisés Diago, Raul Andrade,
Isabel Carmona, José Aguilar Reina,
Antonio Núñez-Roldán, and
María Francisca González-Escribano

ABSTRACT Natural killer (NK) cells are key components of the innate antiviral immune response. NK cell function is regulated by the interaction of major histocompatibility complex class I molecules with NK inhibitory receptors. The aim of this study was to investigate the role of the HLA-C/KIR pair in hepatitis C virus clearance in our population. A total of 196 hepatitis C virus-infected patients (65 resolved and 131 with persistent infection) were included in the study. Genotyping of HLA-C was carried out using polymerase chain reaction followed by a reverse sequence-specific oligonucleotide probe detection system. NK receptor-specific polymerase chain reaction typing of KIR2DL1, KIR2DL2, and KIR2DL3 was performed on the same patient group. Frequencies of the KIR2DL2 gene and the KIR2DL2/KIR2DL2 genotype were lower among pa-

tients with persistent infection (32.3% vs 45.4% among resolved, $P = 0.01$, OR = 0.57, 95% CI = 0.36–0.91; and 16.2% vs 32.3% among resolved, $P = 0.02$, OR = 0.41, 95% CI = 0.19–0.87). Nevertheless, the frequency of the KIR2DL3 gene was higher among patients with persistent infection (66.9% vs 54.6% among resolved $P = 0.02$, OR = 1.68, 95% CI = 1.07–2.65). Trends toward lower frequencies of the HLA-C2C2 genotype and NK-HLA interactions with strong and moderate affinity among the patients with persistent infection were also observed. *Human Immunology* 66, 1106–1109 (2005). © American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2006. Published by Elsevier Inc.

KEYWORDS: HLA-C; KIR; hepatitis C virus

ABBREVIATIONS

HbsAg hepatitis B surface antigen
HCV hepatitis C virus
HLA human leukocyte antigen

KIR killer cell immunoglobulin-like receptors
MHC major histocompatibility complex
NK natural killer

INTRODUCTION

Natural killer (NK) cells are key components of the innate antiviral immune response. NK cell function is regulated by the interaction of the major histocompatibility complex (MHC) class I molecules with inhibitory

receptors [1, 2]. Effector functions occur only when activating signals overcome inhibitory signals [3, 4]. The family of killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) is composed of activating and inhibitory receptors of NK cells. At present, 15 KIR genes and 2 pseudo-genes have been described in humans [5], but there are only four KIRs with clearly defined human MHC (HLA) specificities: KIR2DL2 and KIR2DL3 bind HLA-C molecules with Asn80 (HLA-C group 1), KIR2DL1 recognizes HLA-C molecules with Lys80 (HLA-C group 2), and KIR3DL1 binds with the HLA-Bw4 epitope [6]. KIR haplotypes vary in number and type of genes, but, in general, KIR haplotypes could be divided into two groups, A and B, according to the genes they contain. Group A is simpler than group B and contains the

From the Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain (M.A.M.-C., J.L.C.-O., A.N.-R., M.F.G.-E.); Unidad de Hepatología, Servicio de Digestivo, Hospital Universitario de Valme, Sevilla, Spain (M.R.-G.); Sección de Hepatología, Hospital General, Valencia, Spain (M.D.); Unidad de Hepatología, Hospital Virgen de la Victoria, Málaga, Spain (R.A.); Unidad de Gastroenterología, Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla, Spain (I.C.); Unidad de Hepatología, Servicio de Digestivo, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain (J.A.R.).

Address reprint requests to: Dr. Maria Francisca González-Escribano, Servicio de Inmunología, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Avenida Manuel Siurot s/n, 41013 Sevilla, Spain. Tel: +34 955013228; Fax: +34 955013221; E-mail: mariaf.gonzalez.sspa@juntadeandalucia.es.

KIR2DL3 gene. Group B could be subdivided into different groups, the majority of which contain the KIR2DL2 gene [7]. KIR genes map in chromosome 19, whereas their ligands map in chromosome 6; thus, some individuals lack specific receptor–ligand pairs. The presence or absence of KIR genes is usually associated with gain or loss of specificity. That the lack of specificity caused by the absence of a determinate KIR gene cannot be functionally compensated by the presence of others results in functional holes in the repertoire [8]. The population diversity and rapid evolution of the KIR genes strongly suggest that they are under pathogen-mediated selection [9, 10].

Hepatitis C virus (HCV) is a common infection worldwide, causing cirrhosis and hepatocellular carcinoma. HCV infection leads to chronic disease in 50–70% of infected individuals; 15–35% remain asymptomatic, and only about 15% of infected people spontaneously clear the virus [11, 12]. The factors that determine the development of chronic hepatitis have not been clarified, but several factors, including route of infection, size of inoculum, and viral genotype, could be involved [13, 14]. Association between the human MHC polymorphism and spontaneous clearance or self-limited infection has also been reported in HCV infection (see a recent review in [15]). Recently, the direct influence of KIR2DL3 and its ligand HLA-C1 in the resolution of HCV infection has been described, suggesting that diminished inhibitory NK responses confer protection against HCV [16]. The aim of this study was to investigate the role of the HLA-C/KIR pair in HCV clearance in our population.

MATERIAL AND METHODS

Enrolled in this study were 131 Caucasian Spanish patients (81 males, 50 females) with biopsy-proven chronic hepatitis C with compensated liver disease followed in the outpatient clinic of Hospital Universitario Virgen del Rocío (Seville), Hospital Universitario de Valme (Seville), Hospital Virgen Macarena (Seville), Hospital General de Valencia (Valencia), and Hospital Virgen de la Victoria (Malaga). All patients were HbsAg-negative, HIV-negative, and anti-HCV-positive with raised ALT levels and positive HCV RNA in serum. Anti-HCV, HbsAg, and HIV were determined by commercially available methods. Sixty-five Caucasian Spanish patients (28 males, 37 females) who were anti-HCV-positive and HCV RNA-negative constituted the group with spontaneous viral clearance. Patients agreed to a blood examination according to the guidelines of the hospital bioethics committee.

The HLA-C locus was genotyped using the RELI SSO HLA-C SSP Typing Kit (Dynal Biotech, Bromborough,

UK). Ambiguities were resolved by sequencing analysis. Individuals from the different groups (persistent and resolved) were categorized as HLA-C1 and HLA-C2 according to their genotyping data.

NK receptor-specific polymerase chain reaction (PCR) typing of KIR2DL1, KIR2DL2, and KIR2DL3 was performed with a pair of sense and antisense primers, each possessing a 3' residue matching a polymorphic position on a given NK receptor gene, as previously described [9]. Data from individuals with negative results for the three loci were discarded from the analysis.

RESULTS

There were more HLA-C2C2 individuals in the group with resolved infection (23.1%) than in the group with persistent infection (13.7%), although this difference was not statistically significant ($p = 0.1$) (Table 1). With respect to the genotyping of KIR genes KIR2DL1, KIR2DL2, and KIR2DL3 (Table 2), only one sample obtained from one individual with persistent infection did not amplify in any loci; this sample was eliminated from the analysis. The frequency of KIR2DL3 was higher in patients with persistent infection (66.9%) than in patients with resolved infection (54.6%, $p = 0.02$, OR = 1.68, 95% CI = 1.07–2.65). On the contrary, the frequency of both the KIR2DL2 gene and the KIR2DL2/KIR2DL2 genotype was lower in patients with persistent infection (32.3 and 16.2%, respectively) than in patients with resolved infection (45.4%, $p = 0.01$, OR = 0.57, 95% CI = 0.36–0.91; and 32.3%, $p = 0.02$, OR = 0.41, 95% CI = 0.19–0.87 respectively). We tested the hypothesis that no receptor–ligand or weaker receptor–ligand interaction would be protective. Samples were divided into two groups on the basis of genotyping results for both HLA-C1/C2 and KIR genes: samples having strong or intermediate interactions (presence of KIR2DL1 and C2 or KIR2DL2 and C1) and samples having weak or no interactions (the remainder). Results are summarized in Table 2. Although no significant differences in the distribution of frequencies were observed, strong or intermediate interactions were more frequent in the group with resolved infection (87.7%)

TABLE 1 Frequency of the HLA-C1/C2 genotypes in patients with resolved and persistent HCV infection

HLA-C group genotype	Persistent infection ($n = 131$)	Resolved infection ($n = 65$)	p	OR (95% CI)
C1C1	40 (30.5%)	18 (27.7%)	0.6	1.15 (0.57–2.34)
C1C2	73 (55.7%)	32 (49.2%)	0.4	1.30 (0.69–2.46)
C2C2	18 (13.7%)	15 (23.1%)	0.1	0.53 (0.23–1.22)

TABLE 2 Frequencies of KIR2DL2 and KIR2DL3 genes and of interactions with different affinity and number of KIR2DL3-C1 homozygous individuals (weak interaction) among patients with resolved and persistent HCV infection

	Persistent infection (2n = 260)	Resolved infection (2n = 130)	p	OR (95% CI)
KIR genes				
2DL2	84 (32.3%)	59 (45.4%)	0.01	0.57 (0.36–0.91)
2DL3	174 (66.9%)	71 (54.6%)	0.02	1.68 (1.07–2.65)
KIR genotypes	(n = 130)	(n = 65)		
2DL2/2DL2	21 (16.2%)	21 (32.3%)	0.02	0.41 (0.19–0.87)
2DL2/2DL3	42 (32.3%)	17 (26.2%)		
2DL3/2DL3	66 (50.8%)	27 (41.5%)		
Interactions	(n = 130)	(n = 65)		
Strong + intermediate ^a	104 (80.0%)	57 (87.7%)	0.3	0.56 (0.22–1.41)
Weak + no interaction ^b	26 (20.0%)	8 (12.3%)		1.78 (0.71–4.60)
KIR2DL3-C1 homozygous individuals	22 (16.9%)	8 (12.3%)	0.5	1.45 (0.57–3.81)

^a Strong + intermediate: simultaneous presence of KIR2DL1 and C2 (homozygous or heterozygous) or simultaneous presence of KIR2DL2 and C1 (homozygous or heterozygous).

^b Weak + no interaction: the remainder.

than in the group with persistent infection (80.0%) ($p = 0.3$). The distribution of KIR2DL3/HLA-C1 homozygous individuals was similar in the two patient groups (12.3% among those with resolved infection vs 16.9% among those with persistent infection) (Table 2). No significant differences in the distribution of HLA-C1/C2 genotypes and KIR genes were observed when patients were stratified according to potentially confounding factors, such as gender and virus genotype.

DISCUSSION

The aim of this work was to investigate the role of the HLA-C/KIR pair in HCV clearance in our population. Although the statistical power in our sample was low, the frequency of the low-affinity receptor of HLA-C1 (KIR2DL3) was statistically significantly higher among patients with persistent infection. On the contrary, both the frequency of the KIR2DL2 gene, which has intermediate affinity for HLA-C1, and the frequency of KIR2DL2 homozygous individuals were higher among patients in whom infection resolved. With respect to the distribution of HLA-C1/C2, a trend toward a higher frequency of C2C2 homozygous individuals among those with resolved infection was observed. Data recently reported by Khakoo *et al.* suggest that a weak interaction between the inhibitory receptor of the NK cells and its ligand would be protective against HCV infection in individuals inoculated with low doses of HCV. Although the present study has some limitations because of the sample size, in contrast with the results obtained by Khakoo *et al.* [16] demonstrating that the presence of KIR2DL2 is a risk factor for viral persistence, we found

the presence of KIR2DL2 to be associated with viral clearance. Likewise, the trend toward a higher frequency of HLA-C2C2 among patients with resolved infection is also opposite that observed by Kakoo *et al.*, who reported a higher frequency of HLA-C2C2 among patients with persistent infection. Lastly, we noted a trend toward a higher frequency of inhibitory interactions with higher affinity among patients with resolved infection and a similar distribution of KIR2DL3/HLA-C1 homozygous individuals in both patient groups. The discrepancies could be explained by the differences in KIR haplotypes and in the frequency of the different HLA-C alleles among populations. Each KIR haplotype has a set of genes that encode both activating and inhibitory receptors. Briefly, KIR haplotypes could be split into two groups, A and B, on the basis of the genes they contain. Group A is simpler than group B and contains the KIR2DL3 gene. Group B could be subdivided into different groups, the majority of which contain KIR2DL2. In general, group B haplotypes contain more genes that encode activating KIRs than group A haplotypes [7]. Combining this fact with our results: a higher frequency of the KIR2DL3 gene in individuals with persistent infection, we can expect a smaller quantity of genes encode activating receptors in this group of patients. The situation would be the opposite for those patients with resolved infection, explaining the greater capacity of these individuals to clear the virus. An alternative explanation for the discrepancies could be differences in the route of infection. Khakoo and colleagues' hypothesis was supported only in individuals inoculated with low doses of HCV (nontransfused). Unfortunately, we could not check this point because the number of individuals in

which the route of infection was known was too small in our sample.

In summary, our results support a role for the HLA-C/KIR pair in the evolution of HCV infection. The role of inhibitory or activating receptors could be influenced by the population under study.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by a grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS, PI 04/0067) and Plan Andaluz de Investigación (PAI, grupos CTS-0197, CTS-0102, and CTS-532).

REFERENCES

1. Ljunggren HG, Karre K: In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11: 237, 1990.
2. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Arnett KL, D'Andrea A, Phillips JH, Lanier LL, Parham P: Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 7:739, 1997.
3. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T: Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285:727, 1999.
4. Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R: Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319: 675, 1986.
5. Marsh SG, Parham P, Dupont B, Geraghty DE, Trowsdale J, Middleton D, Vilches C, Carrington M, Witt C, Guethlein LA, Shilling H, Garcia CA, Hsu KC, Wain H: Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Tissue Antigens* 62:79, 2003.
6. Vilches C, Parham P. KIR: Diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 20:217, 2002.
7. Parham P: MHC Class I molecules and KIRs in human history health and survival. *Nat Rev Immunol* 5:201, 2005.
8. Uhrberg M: The KIR gene family: life in the fast line of evolution. *Eur J Immunol* 35:1, 2005.
9. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, Tyan D, Lanier LL, Parham P: Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 7:753, 1997.
10. Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, Trowsdale J, Wilson M, O'Brien SJ, Carrington M: Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 31:429, 2002.
11. Cuypers HT, Reesink HW. Hepatitis C virus six years on. *Lancet* 344:1475, 1994.
12. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PY, Miller JK, Gerber MA, Sampliner RE, *et al.*, for the Sentinel Counties Chronic Non-A, Non-B Hepatitis Study Team: The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 327:1899, 1992.
13. Tong MJ, el-Farra NS, Reikes AR, Co RL: Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med* 332:1463, 1995.
14. Kenny-Walsh E, for the Irish Hepatology Research Group: Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. *N Engl J Med* 340:1233, 1999.
15. Yee LJ. Host genetic determinants in hepatitis C virus infection. *Genes Immun* 5: 237, 2004.
16. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little AM, Alexander GJ, Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg WM, Thomas DL, Carrington M: HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 305:872, 2004.

RAPID COMMUNICATION

CCL2-2518 A/G and CCR2 190 A/G do not influence the outcome of hepatitis C virus infection in the Spanish population

MA Montes-Cano, JR García-Lozano, J Aguilar-Reina, M Romero-Gómez, N Barroso, A Núñez-Roldán, MF González-Escribano

MA Montes-Cano, JR García-Lozano, A Núñez-Roldán, MF González-Escribano, Servicio de Inmunología Hospital Universitario Virgen del Rocío, Spain
J Aguilar-Reina, N Barroso, Servicio de Digestivo Hospital Universitario Virgen del Rocío, Spain
M Romero-Gómez, Sección Hepatología. Hospital Universitario de Valme. Servicio Andaluz de Salud, Seville, Spain
Supported by Plan Andaluz de Investigación (PAI, grupos CTS-0197 and CTS-0102) and Fundación Reina Mercedes. MA Montes-Cano is the recipient of a fellowship from Instituto de Salud Carlos III (04/0146)

Correspondence to: Maria Francisca González-Escribano, Servicio de Inmunología. Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville 41013, Spain. mariaf.gonzalez.sspa@juntadeandalucia.es
Telephone: +34-95-5013228 Fax: +34-95-5013221
Received: 2007-02-09 Accepted: 2007-03-01

studied in the gene pair CCL2/CCR2 do not play a major role in the outcome and response to treatment for HCV infection in the Spanish population.

© 2007 The WJG Press. All rights reserved.

Key words: CCL2; CCR2; Polymorphism; Hepatitis C virus; Treatment; Fibrosis stage

Montes-Cano MA, García-Lozano JR, Aguilar-Reina J, Romero-Gómez M, Barroso N, Núñez-Roldán A, González-Escribano MF. CCL2 -2518 A/G and CCR2 190 A/G do not influence the outcome of hepatitis C virus infection in Spanish population. *World J Gastroenterol* 2007; 13(15): 2187-2192

<http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/2187.asp>

Abstract

AIM: To assess whether CCL2 or interactions between this chemokine and its receptor (CCR2) are associated with outcomes of chronic hepatitis C and with responses to antiviral therapy.

METHODS: Two hundred and eighty-four patients with chronic hepatitis C and 193 non-infected matched controls were included in this study. Patients were categorized according to their Scheuer score of hepatic fibrosis as F0-F2 ($n = 202$) or F3-F4 ($n = 82$) and according to their response to anti-HCV therapy as sustained response (SR, $n = 101$) or non-sustained response (NSR, $n = 98$). Genotyping of the -2518 (A/G) CCL2 was performed using PCR-RFLP, genotyping of the 190 (A/G) CCR2 using a PCR-ARMS system, and genotyping of the rs3138042 (G/A) CCR2 using Taqman probes.

RESULTS: Univariate analyses identified 4 parameters (infection duration time, viral genotype, gender and AST levels) that tended to influence fibrosis and 7 parameters (CCL2G, CCL2ACCR2A, viremia levels, fibrosis stage, viral genotype, infection duration time and AST levels) that significantly influenced or tended to influence response to treatment. Multivariate analysis identified gender and AST levels as parameters that independently influenced fibrosis stage and viral genotype and infection duration time were the two parameters that independently influenced response to treatment.

CONCLUSION: Our results indicate that the mutations

INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) infection results in chronic active hepatitis in more than 80% of infected patients, with 20%-30% developing progressive fibrosis and cirrhosis^[1-3], whereas only about 10%-20% of the HCV infected people spontaneously eliminate the virus^[3]. The morbidity and mortality associated with chronic infection is due to the development of cirrhosis and represents a high risk factor for hepatocellular carcinoma^[1,4]. Different factors may influence both the ability to spontaneously clear the virus and the progression of chronic infection. Viral load, viral genotype, quasispecies, gender, alcohol consumption, iron load and age of infection have been evaluated and shown to be predictors of the natural course of HCV infection, with controversial results^[5-7]. Currently, the most effective initial therapy for viral clearance is the combination of IFN α and ribavirin (RBV). Sustained response to antiviral therapy is also influenced by different viral and host factors^[8,9].

Chemokines and chemokine receptor genes are candidates in HCV infection progression and in the response to anti-HCV therapy. Chemokines play important roles in leukocyte trafficking to the site of infection and in regulating T_H1/T_H2 balance. Chemokine-chemokine receptor interactions are likely to be important in chronic hepatitis C, in which T cells are recruited to the liver where they mediate virus clearance^[10,11].

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) is a β -chemokine that has been suggested to be responsible

for monocyte and lymphocyte T recruitment in acute inflammatory conditions and may be an important mediator in chronic inflammation. In fact, it has been proposed that CCL2 is responsible for tissue inflammation in autoimmune diseases, as documented with tissue expression in human and experimental autoimmune animal models^[12-15]. Additionally, CCL2 appears to be an important regulator of cytokine homeostasis within the liver^[16,17]. Thus, genetic polymorphisms in the regulatory regions of the CCL2 gene could be involved in the outcome of HCV infection.

A biallelic G/A polymorphism at position -2518 of the CCL2 gene has been described^[18]. This polymorphism seems to influence transcriptional activity since cells obtained from GG or AG individuals produced more CCL2 than those isolated from AA individuals^[18], and it has been associated with the outcome of chronic hepatitis C^[19-21]. Furthermore, higher CCL2 serum levels have been found in patients with chronic HCV infection^[22]. Although CCL2 is a good candidate for influencing the course of HCV infection and response to treatment, there are few studies investigating the role of the functional -2518 CCL2 polymorphism in the progression of this viral infection^[19-21].

The main receptor for CCL2 is CCR2, which plays an important role in the recruitment of cells and is highly expressed in chronic inflammation^[23]. A 190-G/A transition has been described in the CCR2 gene, which leads to an amino acid change Val64Ile located in the first transmembrane domain of the protein. This polymorphism has been reported to be associated with a delay in disease progression in HIV-1 infected individuals^[24]. Moreover, the CCR2-64Ile variant has been related to the lack of a capacity to clear the virus infection in individuals with HCV^[25]. Association between fibrosis and CCR2-64Ile has been investigated in several studies^[20,25-28]. In a previous study, with a limited cohort of patients, we could not find any relationship between this polymorphism and the outcome of the HCV infection^[29]. However, a relationship between this polymorphism and the response to the treatment has not been investigated sufficiently^[28,30,31].

In a murine model with a hepatotropic virus, such as CMV, a significant role for the CCL2/CCR2 pair in the recruitment of macrophages and NK cells to the liver, and in the regulation of cytokines, has been demonstrated. In the same model, authors demonstrated that CCL2 and CCR2 are critical factors in the control of virus replication and in the outcome of liver disease^[17].

The aims of this study were to: (1) analyze the possible association of CCL2 with the outcome of chronic hepatitis after HCV infection, (2) investigate the influence of both CCL2 and CCR2 in the response to anti-HCV therapy, and (3) analyze the possible association of interactions between the chemokine and its receptor with the outcome of HCV infection.

MATERIAL AND METHODS

Patients

Two hundred and eighty-four Caucasian Spanish patients (166 males and 118 females, average age of 42.6 ± 11.3 years)

Table 1 Demographic profile of patients with chronic HCV infection

Patients	<i>n</i> = 284	
Gender M/F	166/118	
	mean \pm SD	Range
Age (yr)	42.6 \pm 11.3	21-75
Age of Infection (yr)	24.3 \pm 11.4	1-57
Age of liver biopsy (yr)	40.1 \pm 11.8	16-70
ALT IU/L	121.3 \pm 100.9	16-660
AST IU/L	67.6 \pm 44.3	16-300
GGT IU/L	53.9 \pm 53.8	10-472
AP IU/L	181.35 \pm 65.6	73-637
Viral load (10 ⁶) copies/mL	1.29 \pm 1.3	0.0015-6.3
Viral genotypes	<i>n</i> = 205 (%)	
I	159 (77.6)	
II	7 (3.4)	
III	27 (13.2)	
IV	5 (2.4)	
I + another	7 (3.4)	

who were suffering from biopsy-proven chronic hepatitis C with compensated liver disease and were followed in the outpatient clinic of the Hospital Universitario Virgen del Rocío and Hospital Universitario de Valme (Sevilla, Spain) were enrolled in this study. All patients were HBsAg and HIV negative, anti HCV positive and HCV RNA positive in serum. Anti-HCV, HbsAg and HIV were determined by commercially available methods (HCV 3.0 test, ORTHO, and Enzygnost HBsAg-5.0 and anti-HIV-1/2 plus, DADE Behring, respectively). Demographic data of patients and data from viral genotype, viral load and biochemical feature ALT, AST, GGT and AP levels are displayed in Table 1. Patients and controls agreed to a blood examination according to the guidelines of the Hospital Bioethics Committee. A total of 193 bone marrow donors were included as healthy controls and were considered as representative of the "normal" frequencies of the SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) studied in the Spanish population.

Genotyping

DNA from patients and controls was extracted from peripheral blood using standard methods. **-2518 CCL2 genotyping:** The regulatory region of the CCL2 gene (from -2746 at -1817) was amplified by polymerase chain-reaction (PCR) using the forward primer 5' CCGAGATGTTCCAGCACAG 3' and the reverse primer 5' CTGCTTTGCTTGTCCTCTT 3'^[18]. PCR was performed using buffer 10 \times (10 mmol/L Tris-HCl pH 9, 2.0 mmol/L MgCl₂, 50 mmol/L KCl), 200 μ mol/L dNTPs (Pharmacia, Uppsala, Sweden), 2.5 pmoles of each primer, 0.5 μ L of DNA, 0.5 U Taq polymerase (Pharmacia) and ddH₂O up to a final volume of 10 μ L. The following thermal profiles were run: 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 1.5 min. After a final extension of 10 min at 72°C, 7 μ L of the PCR products were resolved in 2% agarose gels and stained with ethidium bromide previously diluted in blue juice buffer to detect the expected 930 bp band. After detection, 3 μ L of PCR products were digested with 5 U of PvuII (Boehringer Mannheim, Germany) in buffer 10 \times (Boehringer Mannheim) and ddH₂O up to 10 μ L of final volume incubating at 37°C overnight. Digested

products were resolved in 2% agarose gels. Samples with a 930 bp band were assigned as AA, samples with two bands of 708 and 222 bp were typed as GG and samples with three bands of 930, 708 and 222 bp were assigned as AG^[18].

190 CCR2 Genotyping: The genotyping at this position was performed with a PCR amplification refractory mutation system (ARMS) using the primers CCR2-F1 5' TTGTGGGCAACATGCTGGTCA 3', CCR2-F2 5' TTGTGGGCAACATGCTGGTCG 3' and CCR2-R 5' ACTGTGAATAATTTTGCACATTGC 3'^[32]. For each sample, two separate PCR reactions were carried out, one with the primers CCR2-F1 and CCR2-R and the other with CCR2-F2 and CCR2-R. PCR reactions were performed in a Perkin Elmer 9600 Thermal Cycler with mixes consisting of 1 µL of genomic DNA, buffer 10 × (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 3.0 mmol/L MgCl₂, 100 mmol/L KCl, 0.005% gelatine), 400 µmol/L of each dNTP, 20 ng of cresol red, 10% of glycerol, 2 pmoles of each primer (Perkin Elmer, Foster City, CA), 0.4 U of Taq polymerase (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and ddH₂O to a final volume of 10 µL. The following thermal profile was run: initial denaturation at 95°C for 2 min, 10 cycles consisting of 94°C for 10 s and 67°C for 1 min, and finally 20 cycles consisting of 94°C for 10 s, 62°C for 50 s and 72°C for 30 s. PCR products were resolved in 2% agarose. Samples showing the expected size fragment in only one tube were genotyped as homozygous whereas samples showing amplification in both tubes were assigned as heterozygous.

rs3138042 CCR2 genotyping: The genotyping of this SNP was performed using the TaqMan 5' allelic discrimination assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The primers used were 5' CGT GTG GAA CCA CTG CAG AA 3' (forward) and 5' CCT TCC TGG CTC TCT CCA CTT A 3' (reverse), and the TaqMan MGB probe sequences were 5' CTA TTT CCG AAA TCA AC 3', and 5' TTT CCG GAA TCA AC 3'. The probes were labeled with the fluorescent dyes VIC and FAM, respectively. PCR reactions were carried out in a total volume of 8 µL with the following amplification protocol: denaturation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 92°C for 15 s and finished with annealing and extension at 60°C for 1 min. Genotyping of each sample was automatically attributed by the SDS 1.3 software for allelic discrimination.

Liver biopsies

Percutaneous liver biopsies were performed under ultrasonographic control. A portion of the biopsy was used for the histology diagnosis. Disease staging was defined according to Scheuer *et al.*^[33] with ranking from F0 (absence of fibrosis) to F4 (cirrhosis stage). Patients were stratified into two groups: F0-F2, absence of fibrosis to moderate fibrosis, and group F3-F4 with advanced fibrosis-cirrhosis.

Treatment response

One hundred and ninety-nine patients were treated with recombinant IFN α three times per wk over a period of 1 year. One hundred and four patients received a standard

schedule of combination therapy (IFN α 3 MU three times per week and ribavirin 100-1200 mg/d) over 1 year. Of these, 58 were naïve to treatment and 46 had relapsed after a previous IFN α treatment cycle. Based on therapy response, the patients were classified into two groups: those with sustained response (SR), when HCV RNA levels remained undetectable during 6 mo after therapy discontinuation, and those with non-sustained response (NSR), including non-responder patients (HCV RNA levels detectable during the completed period of the treatment) and relapsed responder patients (undetectable HCV RNA during the therapy but detectable after discontinuation).

Statistical analysis

Genotypic frequencies were obtained by direct counting. Statistical analysis was performed by the χ^2 test calculated on 2 × 2 contingency tables using the Statcalc program (Epi Info version 6.0; Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA). The odd ratio (OR) with 95% confidence intervals (95% CI) was calculated using the same program. Univariate and multivariate logistic regression analyses were used to determinate factors that significantly contribute to the development of advanced fibrosis-cirrhosis and those that contribute to NSR after treatment. Variables that achieved statistical significance ($P < 0.05$) or marginal significance ($P < 0.30$) on univariate analysis were entered into a multiple logistic regression analysis to identify significant independent factors (Epi Info version 6.0).

RESULTS

Variables included in the univariate analysis, except for genetic factors studied, are summarized in Table 1. HCV genotypes could be determined in 205 of the 284 patients. The predominant viral genotype was genotype 1b alone, which was present in 61.0% of cases. The genotypic frequencies for all the polymorphisms studied were not significantly different from those predicted by Hardy-Weinberg equilibrium in the healthy control group. The distribution of the -2518 CCL2 A/G genotypes was not significantly different when comparing patient and control groups. Since previous studies reported functional differences between bearing G and non-bearing G genotypes, we grouped GG and AG individuals for further analysis. We did not find differences in the distribution of bearing G and non-bearing G individuals for demographic features such as sex, age, genotype of HCV and route of infection (data not shown). No significant differences were observed among CCL2 genotypes and the mean serum AST concentration (mean AST in AA: 71.43 ± 48.28 *vs* mean AST in AG + GG: 61.62 ± 37.02, $P = 0.10$). When the patients were stratified according to their fibrosis stage, 202 patients were included in the F0-F2 group and 82 patients were included in the F3-F4 group. No statistically significant differences in the distribution of carriers of the G allele *vs* non-carriers were found between these fibrosis stage groups. Regarding the response to therapy, 199 patients received antiviral therapy. Among them, 101 (50.7%) presented SR to IFN α monotherapy or IFN α plus ribavirin combined therapy (Table 2). No significant

Table 2 Genotypic and allelic distribution of the -2518 CCL2 (A/G) and CCR2 polymorphisms in Spanish patients with chronic hepatitis C (CHC) and healthy controls

Genotypes	CHC n = 284 (%)	F0-F2 n = 202 (%)	F3-F4 n = 82 (%)	SR n = 101 (%)	NSR n = 98 (%)	Healthy controls n = 193 (%)
-2518 CCL2 AA	168 (59.2)	123 (60.9)	45 (54.0)	64 (63.4)	55 (56.1)	119 (61.6)
-2518 CCL2 AG + GG	116 (40.9)	79 (39.1)	37 (46.0)	37 (36.6)	43 (43.9)	74 (38.4)
190 CCR2 GG	205 (72.2)	146 (72.3)	59 (72.0)	72 (71.3)	74 (75.5)	156 (80.8%)
190 CCR2 AG + AA	79 (27.8)	56 (27.7)	23 (28.0)	29 (28.7)	24 (24.5)	37 (19.1%)
CCR2 rs3138042 AA	134 (47.2)	93 (46.0)	41 (50.0)	48 (47.5)	46 (46.9)	102 (52.9)
CCR2 rs3138042 AG	124 (43.7)	91 (45.1)	33 (40.2)	42 (41.6)	45 (45.9)	72 (37.3)
CCR2 rs3138042 GG	26 (9.2)	18 (8.9)	8 (9.8)	11 (10.9)	7 (6.9)	19 (9.8)

F0-F2 = no fibrosis-mild fibrosis, F3-F4 = severe fibrosis-cirrhosis. SR: sustained response; NSR: no sustained response.

Table 3 Interactions between -2518 CCL2 G and 190 CCR2 A mutations

		Chronic hepatitis n = 284 (%)	F0-F2 n = 202 (%)	F3-F4 n = 82 (%)	SR n = 101 (%)	NSR n = 98 (%)	Healthy controls n = 193 (%)
CCL2G	CCR2A	31 (10.9)	22 (10.9)	9 (11.0)	10 (9.9)	11 (11.2)	13 (6.7)
CCL2G	CCR2G	85 (29.9)	57 (28.2)	28 (34.1)	27 (26.7)	32 (32.6)	61 (31.6)
CCL2A	CCR2A	48 (16.9)	34 (16.8)	14 (17.1)	19 (18.8)	13 (13.3)	24 (12.4)
CCL2A	CCR2G	120 (42.2)	89 (44.1)	31 (37.8)	45 (44.5)	42 (42.8)	95 (49.2)

F0-F2 = no fibrosis-mild fibrosis, F3-F4 = severe fibrosis-cirrhosis. SR: sustained response; NSR: no sustained response.

differences in the distribution of CCL2 polymorphisms and response to anti-HCV treatment were observed. Nevertheless, a slight increase of G carriers was observed among the NSR group (Table 2).

Regarding the SNP CCR2 190 G/A, we had previously found no association between this polymorphism and susceptibility and histological damage in a group of HCV patients^[29]. Data from the present cohort confirm previous results from a smaller cohort studied by our group. No statistically significant differences were found in the distribution of carriers of the A allele vs non-carriers of A with regards to AST levels (AA + AG 73.42 ± 52.31 vs GG 65.32 ± 40.83 $P = 0.20$) or to the fibrosis stage. In the previous study, we did not include response to treatment because data were available for only a few patients. While analyzing data from the current cohort, no significant differences in the response to treatment were found when comparing carriers of the A allele vs non-carriers of A (Table 2). Controversial results have been reported regarding association of CCR2 and the outcome of HCV infection. The CCR2 190A allele has a relatively low allelic frequency in our population. Additionally, CCR2 190 G/A SNP represents a conservative change (Val64Ile), and thus the molecular mechanism associated with the infection would be unclear. For these reasons, we investigated another possible area of association by genotyping another SNP in the same gene. The rs3138042 G/A SNP located within the intron 2 at 1.8 kb of the CCR2 190 G/A was selected because it is a SNP with a frequency that has been studied in different populations and it has a high heterozygosity index and thus may be informative. Results obtained for rs3138042 G/A are displayed in Table 2. No significant differences were found between patients with chronic HCV infection and healthy controls and no significant differences were found for any outcome

parameter.

To explore possible interactions between -2518 CCL2G and 190 CCR2A, patients were categorized according to having mutations in both genes, a mutation in only one of the genes or the absence of mutation in both genes. No statistical differences were observed in any comparison (Table 3). Noteworthy, a slight increase was observed in the frequency of individuals who had CCL2A CCR2A in the SR group.

Two different univariate analyses were performed. The first with fibrosis stage (F3-F4 yes/no) as a dependent variable and CCL2G (yes/no), CCR2A (yes/no), CCL2G CCR2A (yes/no), CCL2G CCR2G (yes/no), CCL2A CCR2G (yes/no), CCL2A CCR2A (yes/no), viral load, viral genotype 1 (yes/no), infection duration time, gender or AST levels as an independent variable. This analysis identified 4 parameters (infection duration time, viral genotype, gender and AST levels) that tended to influence fibrosis stage. The second univariate analysis included SR (yes/no) as a dependent variable and the variables described above plus fibrosis stage as independent variables. This analysis identified 7 parameters: (CCL2G, CCL2A CCR2A, viremia levels, fibrosis stage, viral genotype, infection duration time and AST levels) that significantly influenced the response or tended to influence the response to treatment. Multivariate analysis identified gender and AST levels as parameters that independently influence fibrosis stage; and the two parameters that independently influenced response to treatment were viral genotype and infection duration time.

DISCUSSION

The role of CCL2 in the pathophysiology of chronic liver diseases is well-documented and there is evidence

demonstrating that HCV is capable of inducing CCL2 gene expression in both nonhepatic and hepatic cells^[16]. Moreover, it has been demonstrated in a murine CMV infection model that CCL2 expression in liver is dependent on IFN α / β . Also, the same study reported that CCL2 deficiency was associated with a dramatic reduction in the accumulation of macrophages and NK cells, as well as decreased production of MIP-1 α and IFN γ ^[17]. Moreover, correlation between plasma chemokine levels and the outcome of antiviral therapy has been described in patients with chronic hepatitis C^[34]. However, to our knowledge, there are only three studies investigating the role of functional -2518 CCL2 polymorphisms in the progression of HCV infection in Caucasian populations. These studies produced controversial results and do not include any analysis of the response to treatment^[19-21]. In the present study no statistically significant differences between both liver damage and response to treatment with the presence of -2518 CCL2 G were found, although in the univariate analysis a trend to a higher frequency of -2518 CCL2 G individuals in the NSR group was observed. Nevertheless, no independent association for this mutation was found in the multivariate analysis. Thus, our results rule out a major role for -2518 CCL2 polymorphisms in the development of liver damage and in the response to antiviral therapy in HCV infection in the Spanish population.

Regarding CCR2 and susceptibility to develop chronic hepatitis and liver damage, the present study confirms data obtained by our group from a previous cohort with a more limited number of HCV patients. We did not find statistically significant differences to analyze the possible relationship between the presence of the mutation 190 CCR2 A with response to treatment. Controversial results in the association of CCR2 with progression of HCV infections have been reported^[24-31]. This occurs frequently when the putative associated allele is relatively rare in the population under study (frequency under 15%), which is the case for the 190 CCR2 mutation in the Caucasian population. It has been proposed that the association of this variant with the progression of HCV infection may be due to linkage disequilibrium with the true causative variant^[25]. Several SNPs have been described within the CCR2 gene, with six of them located in exons and only three as non-synonymous. Among the three that are non-synonymous, the most extensively studied is the SNP Ile64Val, whereas the other two have a low heterozygosity index. In order to explore another region of the gene, a SNP located in intron 2 with a high heterozygosity index was chosen for study. No association was found between this SNP and HCV infection outcome.

CCL2 and CCR2 interaction is a key factor in early liver inflammatory response and in cytokine regulation which is critical for an effective antiviral defense^[17]. Thus, it is possible that alteration in the expression of both CCL2 and CCR2 genes modifies the course of HCV infection. We tested this hypothesis by analyzing the simultaneous presence of mutations in both genes, in only one of the two genes or absence of mutation in both. Although the univariate analysis detected a trend to a higher frequency of CCL2A CCR2A individuals among SR, no independent association for this parameter was detected in the

multivariate analysis.

In conclusion, our results discard a major role for the mutations studied in the gene pair CCL2/CCR2 in the outcome and response to treatment for HCV infection in the Spanish population.

REFERENCES

- 1 **Alter MJ**, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PY, Miller JK, Gerber MA, Sampliner RE. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med* 1992; **327**: 1899-1905
- 2 **Kiyosawa K**, Sodeyama T, Tanaka E, Gibo Y, Yoshizawa K, Nakano Y, Furuta S, Akahane Y, Nishioka K, Purcell RH. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* 1990; **12**: 671-675
- 3 **van der Poel CL**, Cuypers HT, Reesink HW. Hepatitis C virus six years on. *Lancet* 1994; **344**: 1475-1479
- 4 **Tong MJ**, el-Farra NS, Reikes AR, Co RL. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med* 1995; **332**: 1463-1466
- 5 **Dusheiko G**, Schmilovitz-Weiss H, Brown D, McOmish F, Yap PL, Sherlock S, McIntyre N, Simmonds P. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 1994; **19**: 13-18
- 6 **Farci P**, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, Strazzer A, Chien DY, Munoz SJ, Balestrieri A, Purcell RH, Alter HJ. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 2000; **288**: 339-344
- 7 **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**: 825-832
- 8 **Manns MP**, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001; **358**: 958-965
- 9 **Ferenci P**, Brunner H, Nachbaur K, Datz C, Gschwantler M, Hofer H, Stauber R, Hackl F, Jessner W, Rosenbeiger M, Munda-Steindl P, Hegenbarth K, Gangl A, Vogel W. Combination of interferon induction therapy and ribavirin in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001; **34**: 1006-1011
- 10 **Shields PL**, Morland CM, Salmon M, Qin S, Hubscher SG, Adams DH. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J Immunol* 1999; **163**: 6236-6243
- 11 **Kusano F**, Tanaka Y, Marumo F, Sato C. Expression of C-C chemokines is associated with portal and periportal inflammation in the liver of patients with chronic hepatitis C. *Lab Invest* 2000; **80**: 415-422
- 12 **Noris M**, Bernasconi S, Casiraghi F, Sozzani S, Gotti E, Remuzzi G, Mantovani A. Monocyte chemoattractant protein-1 is excreted in excessive amounts in the urine of patients with lupus nephritis. *Lab Invest* 1995; **73**: 804-809
- 13 **Rovin BH**, Rumancik M, Tan L, Dickerson J. Glomerular expression of monocyte chemoattractant protein-1 in experimental and human glomerulonephritis. *Lab Invest* 1994; **71**: 536-42
- 14 **Harigai M**, Hara M, Yoshimura T, Leonard EJ, Inoue K, Kashiwazaki S. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflammatory joint diseases and its involvement in the cytokine network of rheumatoid synovium. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; **69**: 83-91
- 15 **Asano T**, Ogawa S. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in Kawasaki disease: the anti-inflammatory effect of gamma globulin therapy. *Scand J Immunol* 2000; **51**: 98-103

- 16 **Marra F**, DeFranco R, Grappone C, Milani S, Pastacaldi S, Pinzani M, Romanelli RG, Laffi G, Gentilini P. Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. *Am J Pathol* 1998; **152**: 423-430
- 17 **Hokeness KL**, Kuziel WA, Biron CA, Salazar-Mather TP. Monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 interactions are required for IFN-alpha/beta-induced inflammatory responses and antiviral defense in liver. *J Immunol* 2005; **174**: 1549-1556
- 18 **Rovin BH**, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **259**: 344-348
- 19 **Muhlbauer M**, Bosserhoff AK, Hartmann A, Thasler WE, Weiss TS, Herfarth H, Lock G, Scholmerich J, Hellerbrand C. A novel MCP-1 gene polymorphism is associated with hepatic MCP-1 expression and severity of HCV-related liver disease. *Gastroenterology* 2003; **125**: 1085-1093
- 20 **Hellier S**, Frodsham AJ, Hennig BJ, Klenerman P, Knapp S, Ramaley P, Satsangi J, Wright M, Zhang L, Thomas HC, Thursz M, Hill AV. Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection. *Hepatology* 2003; **38**: 1468-1476
- 21 **Glas J**, Torok HP, Tonenchi L, Schiemann U, Folwaczny C. The -2518 promotor polymorphism in the MCP-1 gene is not associated with liver cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2004; **126**: 1930-1931; author reply 1931-1932
- 22 **Narumi S**, Tominaga Y, Tamaru M, Shimai S, Okumura H, Nishioji K, Itoh Y, Okanoue T. Expression of IFN-inducible protein-10 in chronic hepatitis. *J Immunol* 1997; **158**: 5536-5544
- 23 **Segeer S**, Nelson PJ, Schlondorff D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 2000; **11**: 152-176
- 24 **Smith MW**, Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Lomb DA, Goedert JJ, O'Brien TR, Jacobson LP, Kaslow R, Buchbinder S, Vittinghoff E, Vlahov D, Hoots K, Hilgartner MW, O'Brien SJ. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. *Science* 1997; **277**: 959-965
- 25 **Mascheretti S**, Hinrichsen H, Ross S, Buggisch P, Hampe J, Foelsch UR, Schreiber S. Genetic variants in the CCR gene cluster and spontaneous viral elimination in hepatitis C-infected patients. *Clin Exp Immunol* 2004; **136**: 328-333
- 26 **Promrat K**, McDermott DH, Gonzalez CM, Kleiner DE, Koziol DE, Lessie M, Merrell M, Soza A, Heller T, Ghany M, Park Y, Alter HJ, Hoofnagle JH, Murphy PM, Liang TJ. Associations of chemokine system polymorphisms with clinical outcomes and treatment responses of chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003; **124**: 352-360
- 27 **Goulding C**, McManus R, Murphy A, MacDonald G, Barrett S, Crowe J, Hegarty J, McKiernan S, Kelleher D. The CCR5-delta32 mutation: impact on disease outcome in individuals with hepatitis C infection from a single source. *Gut* 2005; **54**: 1157-1161
- 28 **Goyal A**, Suneetha PV, Kumar GT, Shukla DK, Arora N, Sarin SK. CCR5Delta32 mutation does not influence the susceptibility to HCV infection, severity of liver disease and response to therapy in patients with chronic hepatitis C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006; **12**: 4721-4726
- 29 **Ruiz-Ferrer M**, Barroso N, Antinolo G, Aguilar-Reina J. Analysis of CCR5-Delta 32 and CCR2-V64I polymorphisms in a cohort of Spanish HCV patients using real-time polymerase chain reaction and fluorescence resonance energy transfer technologies. *J Viral Hepat* 2004; **11**: 319-323
- 30 **Dorak MT**, Folyan GO, Niwas S, van Leeuwen DJ, Yee LJ, Tang J, Kaslow RA. C-C chemokine receptor 2 and C-C chemokine receptor 5 genotypes in patients treated for chronic hepatitis C virus infection. *Immunol Res* 2002; **26**: 167-175
- 31 **Konishi I**, Horiike N, Hiasa Y, Michitaka K, Onji M. CCR5 promoter polymorphism influences the interferon response of patients with chronic hepatitis C in Japan. *Intervirology* 2004; **47**: 114-120
- 32 **Aguilar F**, Nunez-Roldan A, Torres B, Wichmann I, Sanchez-Roman J, Gonzalez-Escribano MF. Chemokine receptor CCR2/CCR5 polymorphism in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2003; **30**: 1770-1774
- 33 **Scheuer PJ**. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991; **13**: 372-374
- 34 **Butera D**, Marukian S, Iwamaye AE, Hembrador E, Chambers TJ, Di Bisceglie AM, Charles ED, Talal AH, Jacobson IM, Rice CM, Dustin LB. Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C. *Blood* 2005; **106**: 1175-1182

S- Editor Liu Y L- Editor Lutze M E- Editor Wang HF