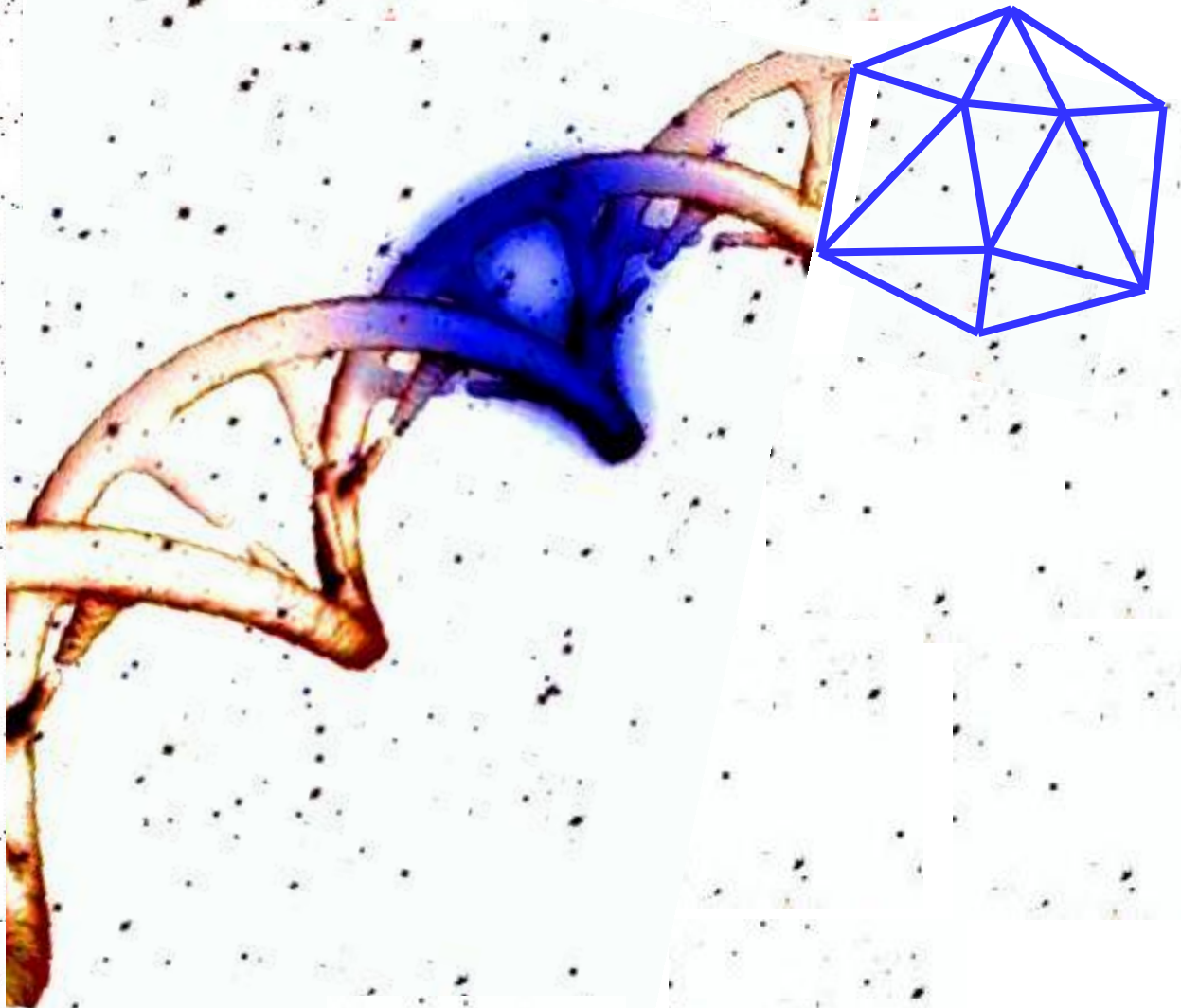


**INFLUENCIA DE MARCADORES GENÉTICOS DEL
HOSPEDADOR EN LA HISTORIA NATURAL DE LA
INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C**



Cristina Abad Molina, 2014



A mi familia



Agradecimientos

Empiezo agradeciendo a mis dos directores de tesis por haberme permitido realizar este trabajo y que esta tesis se haya hecho realidad. En concreto, a Paca, la Dra. María Francisca González Escribano, por su claridad de visión en este estudio, que ha sido asombrosa y fundamental para que éste haya podido dar sus frutos, realmente eres un referente profesional para mí; gracias por tu tiempo para la corrección de este manuscrito y por confiar en mí. A Raúl, el Dr. José Raúl García Lozano, artífice de que realmente esto haya culminado en forma de tesis doctoral, estando siempre dispuesto a ayudarme y a encontrar ese hueco para atenderme, corrigiéndome siempre tan rápido, que incluso en algunas ocasiones hasta me costaba seguir su ritmo, pero principalmente gracias por sus ánimos y su interés, que han sido fundamentales, su buen humor, siendo en general y en el día a día del laboratorio un gran apoyo para mí, y que siempre tendré presente. Gracias a mis dos directores de tesis, a los cuales aprecio y tengo muchísimo cariño.

Al tutor de esta tesis y jefe del servicio, el Dr. Antonio Núñez Roldán, por su claridad de ideas y fomentar la investigación y docencia en el servicio, creando así un caldo de cultivo que nos enriquece, y al resto de facultativos del servicio, a la Dra. Berta Sánchez, siempre tan correcta y amable conmigo, transmitiéndome un cariño, el cuál puedo decir que es mutuo, igual que el Dr. Marco Montes, gracias por despertarme siempre una sonrisa y hacerme sentir bien, ah! y algo fundamental para este trabajo, aportar las muestras de los pacientes, ya que sin ellas no se hubiese podido llevar a cabo. Al Dr. José Manuel Lucena, por sus ánimos para que terminara la tesis, y a la Dra. Ingeborg Wichmann que aunque ya se fue del servicio, me dejó su saber estar y bondad, igual que la Dra. Antonia Álvarez, todo encanto y amabilidad. Al resto del personal del servicio, que en todo este tiempo siempre me habéis puesto una sonrisa y me habéis hecho sentir querida por todos vosotros, sois la base que sustenta el día a día y hacéis que sea maravilloso ir a trabajar a este servicio; las hermanas Magariño, las Cármenes, Manolita, Teresa, José Luis, Toñi, Encarnita; y en especial, el equipo de HLA: Ana, María, Cristina e Isabel y las que ya se marcharon, Pili y Yolanda, por hacerme todas tan feliz y arroparme y cuidarme tanto. A Rocío, la súper, gracias por tu cariño y amistad, tus consejos y traer tanta alegría al laboratorio. A Lourdes y Ali, mis otras dos confidentes y tantas cosas más... amigas, a las que busco nada más llegar al laboratorio, para cargar pilas y hacer ese primer chequeo

matinal, recibir los abrazos de mi Ali y escuchar los comentarios cariñosos de María Luisa. A José Manuel Lara, gracias por su cariño y por estar siempre dispuesto a escuchar, animar y hacer reír a los demás. A Encarnita, más que una administrativa, que aunque ya se fue del servicio, desde que entré siempre me demostró su cariño. A los residentes Salva, Sergio y Ángel, por su simpatía y amabilidad, y a Fuensanta también por su ayuda. A los situados físicamente en el IBIS, pero con conexión directa al laboratorio, gracias a todos por su cariño. A la Dra. Isabel Aguilera, por su forma de ser, siempre dispuesta a ayudarme sin pedir nada a cambio, y por todo el cariño y bondad que me transmite. A Marta, siempre le digo que es un ángel de niña, de bondad absoluta, ideas claras y saber estar, por su amistad y disposición plena por ayudarme y poder aliviarme en algunos de los quehaceres de la tesis, disposición que también agradezco de las otras dos Lourdes. A Elena, Irene, sois también encantadoras y espero que hagamos muchas cosas juntas sobre trasplante. A Macarena, mi alergóloga preferida. Y a las que se fueron, Mari Carmen, las dos María José y en especial a Ana, por esas horas de trabajo felizmente compartidas, y a Raquel, por su inmensa alegría y amistad. También, a los profesionales de otros servicios de este hospital con los que he colaborado en algunos trabajos.

A mis amigas, por nuestras risas, quererme tanto y hacerme siempre sentir tan especial y valiosa. Y a esas personas que en este tiempo se han cruzado por mi camino alegrándome la vida.

Y por último dar gracias a mi familia, ellos son el pilar de mi vida, mis máximos confidentes y referentes, y les debo lo que soy. Qué sería de mí sin ellos... los necesito. Gracias a mi hermano José, pero ¿se puede ser más perfecto que él?! Su inteligencia y bondad es notoria y evidente, y quizás por eso sea tan humilde y grande a la vez. Gracias por quererme tanto, desde el primer momento que nací, y cuidar siempre de mí. A mi cuñada Eva y a esa preciosa niña y ahijada mía, Sofía, os quiero. A mis padres, ellos se merecen un capítulo aparte; son las personas que más me quieren en este mundo, y sin reservas. La maravillosa energía de mi padre junto al cariño inmenso que mi madre desprende a raudales, consiguen ser el tándem perfecto para hacerme sentir la más afortunada por pertenecer a esta familia. Y finalmente, nombrar a mis abuelos, en especial a mi abuela Modesta, que aunque ya no están aquí, siguen muy presentes en mi corazón.

INTRODUCCIÓN

1. ESTUDIO GENÉTICO EN LA PATOGÉNESIS DE ENFERMEDADES	3
2. EL VIRUS DE LA HEPATITIS C	
2.1. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES.....	6
2.2. GENOTIPOS, SUBTIPOS Y CUASIESPECIES DEL VHC.....	9
3. INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C	
3.1. HISTORIA NATURAL.....	11
3.2. TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS POR VHC Y FACTORES INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.....	13
3.2.1. FACTORES INTRÍNSECOS AL HUÉSPED Y DEL PROPIO VIRUS....	15
3.3. FIBROSIS HEPÁTICA POR VHC.....	18
3.4. INFLUENCIA DE LA INFECCIÓN POR VIH SOBRE LA HEPATITIS C CRÓNICA	19
4. GENES CANDIDATOS EN ESTE ESTUDIO	
4.1. <i>IL28B</i>	20
4.2. <i>HAVCR1</i>	23
4.3. <i>TANK</i>	26
4.4. <i>TNFSF18</i>	28
4.5. <i>IL18BP</i>	31
OBJETIVOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL	35

MATERIAL Y MÉTODOS

1. PACIENTES Y CONTROLES	39
2. MÉTODOS	
2.1. EXTRACCIÓN DE ADN.....	41
2.2. SELECCIÓN DE SNPs	
2.2.1. <i>IL28B</i>	42
2.2.2. <i>HAVCR1</i>	42
2.2.3. <i>TANK, TNFSF18 e IL18BP</i>	42
2.3. GENOTIPADO DE SNPs MEDIANTE ENSAYOS TAQMAN.....	43
2.4. GENOTIPADO DE VARIANTES ESTRUCTURALES DEL EXÓN 4	

DEL GEN <i>HAVCRI</i> MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR	
2.4.1. AMPLIFICACIÓN.....	45
2.4.2. ELECTROFORESIS CAPILAR.....	46
2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	47
RESULTADOS	
1. <i>IL28B</i>	51
2. <i>HAVCRI</i>	55
3. <i>TANK</i>	63
4. <i>TNFSF18</i>	74
5. <i>IL18BP</i>	80
DISCUSIÓN	89
CONCLUSIONES	105
BIBLIOGRAFÍA	109
APÉNDICE	
1. PUBLICACIONES DERIVADAS DEL TRABAJO DESARROLLADO EN ESTA TESIS DOCTORAL.....	125
2. OTRAS PUBLICACIONES.....	127

INTRODUCCIÓN

1. ESTUDIO GENÉTICO EN LA PATOGÉNESIS DE ENFERMEDADES

La variabilidad genética es una medida de la tendencia de los genotipos de una población a diferenciarse y es el principal hecho que sustenta la evolución. Una de las contribuciones más importantes de la secuenciación del genoma humano ha sido la caracterización e identificación de cientos de miles de loci polimórficos distribuidos a lo largo de los 3000 millones de nucleótidos que constituyen nuestro genoma. Los polimorfismos más frecuentes son cambios de una única base, y se les llama polimorfismos de un único nucleótido (SNP, *single nucleotide polymorphism*). Se encuentran presentes en más de un 1% de la población, constituyen hasta el 90% de todas las variaciones del genoma y se distribuyen aproximadamente cada 1.300 pb. Otros polimorfismos son repeticiones, en un número variable de veces, de una secuencia corta (VNTR, *variable number tandem repeat*), que pueden ser microsatélites y minisatélites según su longitud; y en otras ocasiones, los polimorfismos se deben a deleciones o inserciones de secuencias cortas de nucleótidos. Estos polimorfismos son variantes genéticas que pueden estar localizados en una región codificante o reguladora de un gen o bien localizarse en una región intergénica y pueden inducir cambios en la proteína o en el patrón de expresión del gen. Así, variaciones en la región 5' no traducida (UTR, *untranslated region*) pueden alterar los niveles de expresión, ya que es sitio de unión de factores de transcripción; lo mismo puede ocurrir si el cambio se produce en un intrón, donde cambios en su estructura pueden modular la expresión del gen; mientras que cambios en la región 3'UTR pueden afectar al transporte, estabilidad y vida media del ARNm por ser esta región sitio de unión de miRNA. Por otro lado, las variaciones que se localizan en un exón pueden generar una alteración en la secuencia del codón de forma que éste siga codificando el mismo aminoácido (cambio sinónimo), o bien que el codón pase a codificar un aminoácido diferente (cambio no sinónimo), pudiéndose alterar la secuencia de la proteína y como consecuencia, en mayor o menor grado, su función biológica. Además, los polimorfismos pueden generar la aparición de un codón de parada de la traducción y por tanto dar lugar a la síntesis de proteínas truncadas.

Como consecuencia de todo esto, los polimorfismos pueden estar implicados en la patogénesis de las enfermedades. Los estudios caso-control son uno de los diseños de estudio epidemiológico más utilizado para evaluar la asociación de un determinado polimorfismo con una enfermedad y se basan en la comparación de un grupo de individuos

que manifiestan dicha enfermedad (grupo de casos) y un grupo de individuos que no la manifiesta (grupo de controles). En estos estudios se seleccionan genes “candidatos” entre aquellos que están directa o indirectamente relacionados con la patología. Desde el punto de vista estadístico, un polimorfismo constituye una variable categórica con varios genotipos posibles y se suele considerar como categoría de referencia al grupo de individuos homocigotos para el alelo más frecuente. Para evaluar la asociación de un polimorfismo con la enfermedad se construye la tabla de contingencia correspondiente y se puede contrastar la hipótesis de asociación mediante un test de la χ^2 . De esta manera se evalúa si éste se encuentra más frecuentemente en uno u otro grupo para establecer el odds ratio (OR) que confiere y cuantificar la magnitud de la asociación. Teniendo en cuenta que el alelo variante X del polimorfismo de estudio modifica el riesgo de la enfermedad de interés y debido a que cada individuo posee una pareja de alelos, el riesgo asociado con cada genotipo puede depender del número de copias de X, lo que permite definir varios modelos de herencia posibles:

Modelo dominante. Supone que una única copia de X es suficiente para modificar el riesgo y que ser portador de 2 copias lo modifica en igual magnitud; es decir, heterocigotos X/No-X y homocigotos X/X tienen el mismo riesgo. Se puede comparar la combinación de estos 2 genotipos respecto a los homocigotos No-X/No-X.

Modelo recesivo. Supone que son necesarias 2 copias de X para modificar el riesgo; por tanto, heterocigotos X/No-X y homocigotos del alelo más frecuente No-X/No-X tienen el mismo riesgo. Se compara la combinación de ellos respecto a los homocigotos del alelo variante XX.

Modelo aditivo. Supone que cada copia de X modifica el riesgo en una cantidad aditiva; por tanto, los homocigotos XX tienen el doble de riesgo que los heterocigotos X/No-X. Se compara la combinación ponderada, donde se da peso 1 a los heterocigotos X/No-X y peso 2 a los homocigotos X/X:

Modelo codominante. Es el más general. Cada genotipo proporciona un riesgo de enfermedad diferente y no aditivo. Se comparan heterocigotos y homocigotos variantes por separado respecto a los homocigotos del alelo más frecuente (Iniesta *et al.*, 2005).

Antes de realizar un análisis de asociación se debe comprobar si se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles (como

representantes de la población general), el cual determina qué frecuencias deben observarse en la población para cada genotipo en función de las frecuencias de los alelos. En condiciones habituales, si la transmisión de los alelos de los progenitores a los descendientes es independiente y no ocurren fenómenos distorsionadores, la probabilidad de observar una combinación de alelos concreta (un genotipo) depende del producto de las probabilidades (frecuencias) de cada alelo. En el caso de que se observara una desviación del equilibrio se debería revisar el método de genotipificación, pues en ocasiones se producen sesgos al interpretar los resultados por ser más fácil de detectar un genotipo que otro. Otras posibilidades son que los individuos no sean independientes (p. ej., por consanguinidad). A pesar de los avances tecnológicos, genotipar todos los SNPs en un número elevado de individuos sería impracticable y costoso. Se ha demostrado que SNPs que se encuentran cerca en el genoma muestran desequilibrio de ligamiento (LD), es decir, tienden a heredarse juntos formando los denominados bloques de ligamiento. La combinación de alelos de los SNPs que componen estos bloques es lo que se conoce como haplotipos. Así, para poder identificar un haplotipo no hace falta genotipar todos los SNPs que lo integran, sino un conjunto mínimo de estos a los que se les denomina tag SNPs (Tenesa *et al*, 2006). De esta manera, se puede extraer la mayor información sobre la variación genética de una región con el menor coste posible. El Proyecto Internacional HapMap se diseñó con el objetivo de recoger toda la información relativa a los SNPs existentes a lo largo del genoma en diferentes poblaciones y sus haplotipos en una base de datos de dominio público (The International HapMap Consortium, 2005). Por otro lado, la asociación de una región cromosómica con una enfermedad, puede ser más prominente en ciertos haplotipos de un bloque que está en desequilibrio de ligamiento (LD) que en alelos de loci individuales. (Becker *et al*, 2004). El análisis de haplotipos es un método útil para la identificación de genes no sólo en enfermedades raras sino también en enfermedades comunes y es con frecuencia más potente que el análisis individual de un polimorfismo (Johnson *et al*, 2001).

Gracias a la secuenciación del genoma humano, los resultados del proyecto HapMap y al desarrollo de la tecnología necesaria para realizar estudios de genotipado masivo, en 2007 surgen los denominados “Genome Wide Association Studies” (GWAS). De esta manera, junto a la propuesta de genes candidatos para el estudio de la base genética de las enfermedades complejas que permiten establecer la relación genotipo-fenotipo, se une la estrategia del rastreo genómico a través de los GWAS. La primera

estrategia se fundamenta en la asunción de un modelo previo basado en los conocimientos existentes sobre la fisiopatología de la enfermedad. Sin embargo, los GWAS permiten encontrar asociaciones en genes cuya función aún no se conoce y en genes pertenecientes a rutas que no se habían considerado vinculadas a la enfermedad de estudio, ya que explora la variabilidad de todo el genoma sin realizar una selección previa de los genes a evaluar y proporciona así una amplia visión de las contribuciones relativas de varios loci a enfermedades humanas. Por otro lado, las asociaciones encontradas en este tipo de estudios deben replicarse en distintas poblaciones para asegurar tres cosas principalmente: 1) que los cálculos estadísticos, que son numerosos en los GWAS, no hayan escapado de las correcciones matemáticas y no sean falsos positivos, 2) que la asociación encontrada no se deba a una estratificación poblacional y 3) que la asociación descrita se sigue encontrando en distintas poblaciones. Debido a esta necesidad surgen los estudios *follow-up*, que seleccionan asociaciones descritas en los GWAS con objeto de replicación, para poder dar solidez a la relación encontrada entre genética y patología (McCarthy *et al.* 2008). Una vez que estos estudios de replicación aseguran que la asociación es verdadera, se puede dar paso a los estudios funcionales que investigan los mecanismos fisiopatológicos que subyacen en la enfermedad. La realización de este tipo de estudios es necesaria para poder emplear el conocimiento de la existencia de este tipo de asociaciones en el manejo clínico de esos pacientes. En este trabajo nos hemos centrado en la implicación de la genética en el curso clínico de la infección por el virus de la hepatitis C a través de la replicación de asociaciones descritas en la literatura en varios GWAS en otras poblaciones.

2. EL VIRUS DE LA HEPATITIS C.

2.1. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

Es imposible conocer el origen de este virus, aunque se especula que se originó en primates hace 35 millones de años. El comité internacional de Taxonomía de virus, clasifica al VHC como miembro del género *Hepacivirus*, uno de los cuatro géneros de la familia *Flaviviridae* (Simmonds *et al.*, 2005).

El VHC es un virus esférico rodeado de una envuelta lipoproteica que alberga una nucleocápside icosaédrica y que a su vez encierra al genoma del virus (figura 1). Su genoma consiste en una única cadena de ARN con polaridad positiva de aproximadamente 9,6 Kb, que incluye una única región de lectura abierta (ORF “open Reading frame”) de aproximadamente 9.000 nucleótidos y que codifica a una gran proteína precursora de unos

3000 aminoácidos. Flanqueando esta zona, se encuentra la región 5'UTR y la región 3'UTR. La primera, con 341 nucleótidos, es altamente conservada entre las distintas cepas, por lo que se piensa que la región 5'UTR juega un papel clave en la replicación del genoma viral así como en la traducción de las proteínas virales. Se ha encontrado que posee un sitio de entrada al ribosoma: IRES (“Internal Ribosomal Entry Site”) que permite la traducción del genoma viral. La región 3'UTR presenta tres zonas diferenciables: una región de unos 40 nucleótidos poco conservada, seguida de una secuencia poli-U de hasta 200 nucleótidos y la región terminal de 98 nucleótidos, altamente conservada entre los distintos subtipos de VHC, que es esencial para la replicación del virus.

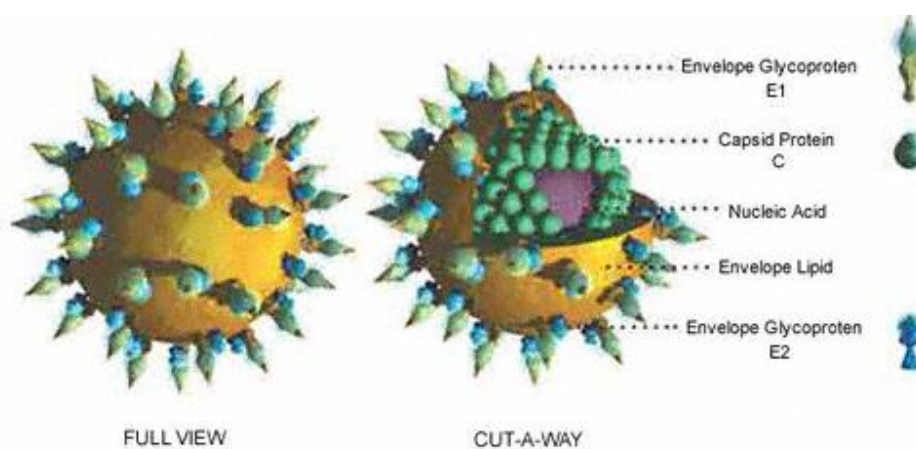


Figura 1. Esquema de los principales componentes estructurales del virus de la hepatitis C (Tomado de *Model of the human hepatitis C virus* del Dr. Louis Henderson, Frederick Cancer Research Center).

La traducción del genoma da lugar a 10 proteínas virales como resultado del procesamiento del precursor poliproteico codificado por el ORF, con modificaciones tanto co- como post-traduccionales y llevadas a cabo tanto por proteasas celulares como virales. Las proteínas estructurales que forman la partícula viral están localizadas en la región amino terminal del precursor proteico en el siguiente orden: C (core o proteína básica de la nucleocápsida), E1 y E2 (glicoproteínas de la envuelta). A continuación, aparecerían las proteínas no estructurales (NS). Separando la región estructural de la no estructural se encuentra la proteína p7, cuyo papel exacto en el ciclo de vida del VHC se desconoce; no obstante, parece que desempeña múltiples funciones en el ciclo de vida del VHC a través de su actividad como canal iónico, pudiendo tener algún papel en la liberación de partículas virales, de manera que futuras terapias podrían ir dirigidas al bloqueo de esta proteína (Griffin *et al*, 2005). A continuación de p7 aparecen las proteínas no estructurales en el siguiente orden: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. Las proteínas del virus no

sólo tienen funciones en la replicación y estructura del virus, sino que también afectan a una variedad de funciones de la célula ya que interactúan con proteínas del huésped. La proteína C forma la nucleocápside icosaédrica del virus. Es la región estructural más conservada y además, la más inmunogénica, por lo que es uno de los componentes del virus que se tiene en cuenta para en los sistemas de diagnóstico. E1 y E2 son las dos glicoproteínas de la envuelta del virus y se caracterizan por una gran variabilidad determinada por la presencia de regiones hipervariables y juegan un importante papel en la fisiopatología del virus. El procesamiento de las proteínas estructurales es llevado a cabo por proteasas de la célula infectada, mientras que las proteínas no estructurales son procesadas por dos proteasas virales: la autoproteasa NS2/NS3 dependiente de zinc, que corta la propia unión entre ambas, liberándose NS3, que es la otra proteasa encargada de escindir al resto de proteínas no estructurales. NS3 también posee actividad helicasa y fosfatasa. NS4A actúa como cofactor de la proteasa NS3 y NS4B ha sido relacionada con el complejo de replicación viral asociándose a NS5B y mejorando su actividad ARN-polimerasa (Kato, 2001). Por último, NS5A es una fosfoproteína que no posee actividad enzimática pero tiene un papel crucial en la replicación del virus. Se compone de tres dominios distintos, el dominio I es fundamental para la replicación viral, el dominio II está implicado en la unión a ciclofilina A, por lo que se ha postulado que juega un papel en antagonizar la respuesta inmune innata frente al VHC. El dominio III parece ser importante para el ensamblaje de las partículas virales infecciosas (Lok, 2013). De esta manera, la inhibición de NS5A puede tener una potente actividad antiviral. Así, debido a que NS3, NS5A y NS5B son claves en la replicación del virus, los nuevos tratamientos se están dirigiendo contra estas proteínas. La figura 2 esquematiza el genoma del VHC y sus productos proteicos.

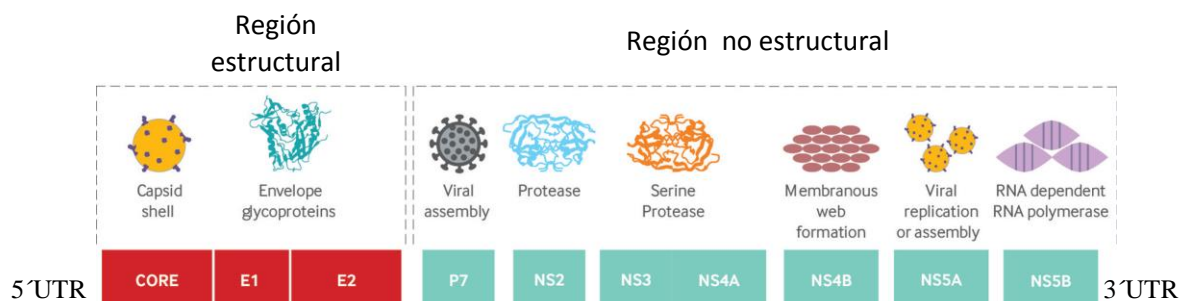


Figura 2. Representación del genoma del VHC y sus productos proteicos. (Tomado de Feeney et al, 2014).

Hoy en día, el diagnóstico de la hepatitis vírica incluye pruebas bioquímicas, con las que poder detectar la existencia de daño hepático, y pruebas serológicas, que permitan identificar la presencia de infección. En la década de los sesenta los científicos desarrollaron las técnicas de diagnóstico para identificar al virus de la hepatitis B (1963), y diez años después para la identificación de la hepatitis A (1973). Muchas de las muestras de sangre tomadas de pacientes con hepatitis adquirida tras transfusión eran negativas para el virus de la hepatitis A y de la hepatitis B, clasificando los científicos a este tipo de hepatitis como hepatitis no-A, no-B. No fue hasta la década de 1980, cuando investigadores de la CDC y del Centro Chiron, de los grupos dirigidos por Daniel W. Bradley y Michael Houghton respectivamente, identificaron el virus de la hepatitis C (Choo *et al.*, 1989). Ahora se cree que aproximadamente el 90-95% de los casos clasificados como no-A, no-B (NA/NB) eran en realidad debidos al virus de la hepatitis C. Fue a partir de entonces cuando se desarrolló un test diagnóstico para detectar anticuerpos específicos frente al VHC (Franciscus, 2010). Estos se detectan a los 32-46 días después de la viremia y todas las guías clínicas recomiendan el estudio de anticuerpos anti-VHC como el primer paso para la detección de la infección por VHC. No obstante, en individuos inmunocomprometidos hay que esperar hasta 12-48 semanas para poder detectar estos anticuerpos, por lo que se recomienda realizar pruebas de ARN del VHC en los pacientes con hepatitis aguda que presentan una respuesta inmune deteriorada (EASL, 2011).

2.2. GENOTIPOS, SUBTIPOS Y CUASIESPECIES DEL VHC

El virus de la hepatitis C es uno de los virus con mayor grado de diversidad genética ya que posee un alto grado de replicación unido a la falta de capacidad de la ARN polimerasa para corregir errores durante ese proceso. Como consecuencia de esta heterogeneidad genética aparecen grupos virales genéticamente distintos o genotipos. Estos genotipos se generaron hace muchos años y difieren entre sí en un 30-35% de su secuencia génica (Simmonds *et al.*, 1995). Se han descrito 6 genotipos diferentes, y cada genotipo puede presentar a su vez algunos subtipos (hay descritos más de 84), cuyas diferencias de nucleótidos se encuentran entre el 20-25% (Bhattacharjee *et al.*, 1995). Los genotipos se denominan mediante un número (del 1 al 6), y los subtipos mediante una letra minúscula. Además, el VHC, como la mayoría de los virus de ARN, circula como una mezcla de genomas, que se conocen como cuasiespecies, estrechamente relacionadas entre sí, que

surgen por mutaciones puntuales del genoma original, y con identidad de secuencia superior al 98% (Bukh *et al*, 1995).

Aunque todos los genotipos se distribuyen por todo el mundo, existen diferencias de prevalencia según la región (Figura 3); así, los genotipos 1a y 1b son los más frecuentes en los EE.UU. Estos subtipos son predominantes en Europa, especialmente el 1b, muy frecuente también en China y Japón. El subtipo 2a es frecuente en Japón y China y el 2b en Norteamérica y en el norte de Europa. El genotipo 3 es prevalente en Nepal, India, Pakistán y Bangladesh. El genotipo 4 es más frecuente en el Norte de África, central y Oriente próximo. Los genotipos 5 y 6 están relegados a Sudáfrica y Hong Kong respectivamente (Ebeling, 1998). En España, el genotipo mayoritario es el genotipo 1, a éste le sigue el genotipo 3, y posteriormente y de manera más minoritaria los genotipos 4 y 2. El genotipo 5 se encontraría excepcionalmente, siendo muy poco prevalente (Alberti *et al*, 2011).

Uno de los factores más influyentes en la respuesta al tratamiento frente al VHC es el genotipo viral, siendo las tasas de respuesta viral sostenida menores en pacientes con genotipo 1 que en los que están infectados por genotipos 2 y 3 (50% vs. 75% respectivamente) (Hadziyannis *et al*, 2004). Además, nuevas drogas, como telaprevir y boceprevir, son solamente efectivas contra el genotipo 1 (Jacobson *et al*, 2011; Zeuzem *et al*, 2011; Poordad *et al*, 2011). Por tanto, la determinación del genotipo viral es de gran utilidad en el tratamiento de la infección por el VHC.

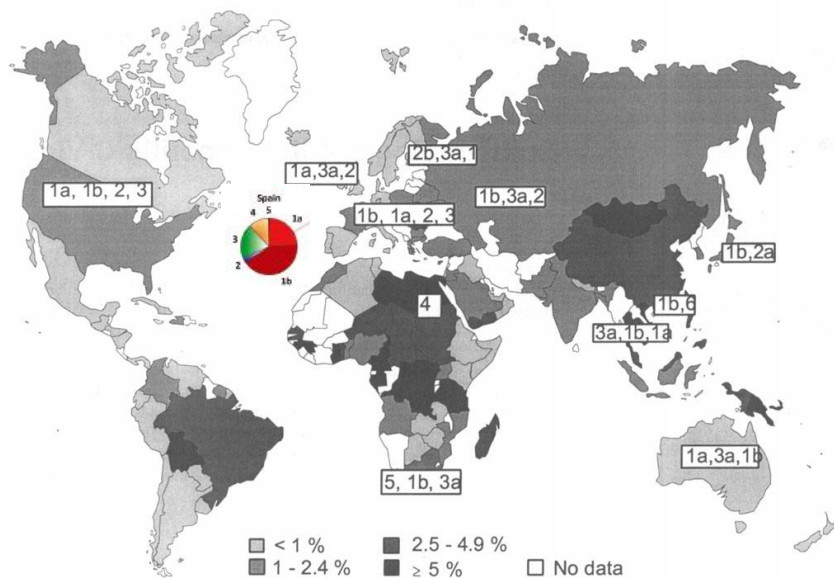


Figura 3. Distribución geográfica y prevalencia de los distintos genotipos del virus de la hepatitis C. (Tomado de Ebeling, 1998; y el círculo que representa prevalencia en España tomado de Alberti *et al*, 2011).

3. INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

3.1. HISTORIA NATURAL

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es un problema de salud global con una prevalencia del 2.35%, lo que implica que existen aproximadamente 160 millones de personas infectadas crónicamente por este virus (Lavanchy, 2011). La principal vía de contagio del VHC es a través de contacto con la sangre. Tras el inicio de la infección, se produce una fase aguda que en la mayoría de los pacientes es asintomática, por lo que no son conscientes de su enfermedad. En el resto de pacientes sintomáticos la mayoría de los signos clínicos son inespecíficos, aunque suelen presentar fatiga, náuseas, dolor abdominal, pérdida de apetito, fiebre leve, y en menor proporción ictericia. El ARN del VHC se detecta en el suero del paciente entre el séptimo y el vigésimo primer día después de la transmisión viral. Sin embargo, pueden producirse períodos de incubación más largos, especialmente en los casos en que han sido transmitidos sólo pequeñas cantidades de carga viral (Maasoumy *et al*, 2012). Los episodios de hepatitis fulminante son muy escasos, si bien, éstos podrían ser más comunes en pacientes coinfectados con otros virus *hepatotropos*, no obstante, los datos con respecto a esto son contradictorios y no concluyentes (EASL, 2011). Tras la infección aguda, alrededor de un 26% de los pacientes eliminan el virus espontáneamente, proceso denominado “aclaramiento viral espontáneo” (AVE), haciéndose indetectable el ARN del VHC entre los 3 y 4 meses desde el comienzo de la infección. En el resto de los pacientes la viremia persiste pasados los 6 meses de la infección aguda, considerándose infección crónica por VHC (Santantonio *et al*, 2008) y es muy raro que ocurra AVE. Realmente no se conoce por qué unos individuos eliminan el virus espontáneamente y otros no, aunque se ha asociado con el sexo femenino (Bakr *et al*, 2006; Rao *et al*, 2012), sufrir hepatitis aguda sintomática (Micallef *et al*, 2006) y con factores genéticos del hospedador. Entre estos últimos, encontramos diversos polimorfismos genéticos del HLA, como los alelos DRB1*11:01 y DQB1*03:01 (Alric *et al*, 1997; Yee, 2004), de los receptores KIR (Khakoo *et al*, 2004), de determinadas quimiocinas e interleuquinas y de los genes estimulados por interferones (IFNs) (Knapp *et al*, 2003). Más recientemente, un estudio con genes candidatos identificó asociación entre variaciones en el locus *IL28B* y el aclaramiento espontáneo (Thomas *et al*, 2009), resultado que posteriormente fue confirmado por otros dos trabajos (Tillmann *et al*, 2010; Rauch *et al*, 2010). Además, en un estudio de genes candidatos, se han relacionado a los genes

HAVCR1, *TANK*, *TNFSF18* e *IL18BP* con el AVE en población americana tanto de origen europeo como africano (Mosbruger *et al*, 2010). Estos genes intervienen tanto en la inmunidad innata como adaptativa, por lo que ambas ramas de la inmunidad parecen estar involucradas en la resolución de la infección por el VHC. Otros trabajos indican que el tipo de respuesta celular frente a la infección viral resulta decisiva 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 lo que alteraciones en la expresión de determinadas citocinas podrían favorecer una respuesta Th1 más eficiente en la resolución de la infección, y por el contrario, una respuesta con predominio Th2 favorecería la cronificación (Lloyd *et al*, 2007).

Una vez que se establece la infección crónica por el VHC, se produce un daño crónico continuo a nivel hepático que produce fibrosis hepática como consecuencia de la acumulación excesiva de proteínas de la matriz extracelular, principalmente de colágeno. Este proceso denominado fibrogénesis es un proceso complejo mediado por necroinflamación y activación de las células estrelladas. El conocimiento del grado de fibrosis en los pacientes con hepatitis C es fundamental para determinar el pronóstico de la enfermedad, y con ello la necesidad de tratamiento, de manera que es crucial controlar el grado de fibrosis de estos pacientes (Estrabaud *et al*, 2012). El proceso de fibrogénesis puede derivar en cirrosis, y posteriormente en hepatocarcinoma (figura 4). El curso individual de la enfermedad hepática es muy variable. Los pacientes pueden presentar síntomas tales como malestar derecho abdominal, náuseas, fatiga, mialgia o pérdida de peso, los cuáles no se asocian con la gravedad de la lesión hepática. La mayoría de los síntomas relacionados con el hígado están restringidos a la cirrosis hepática avanzada.

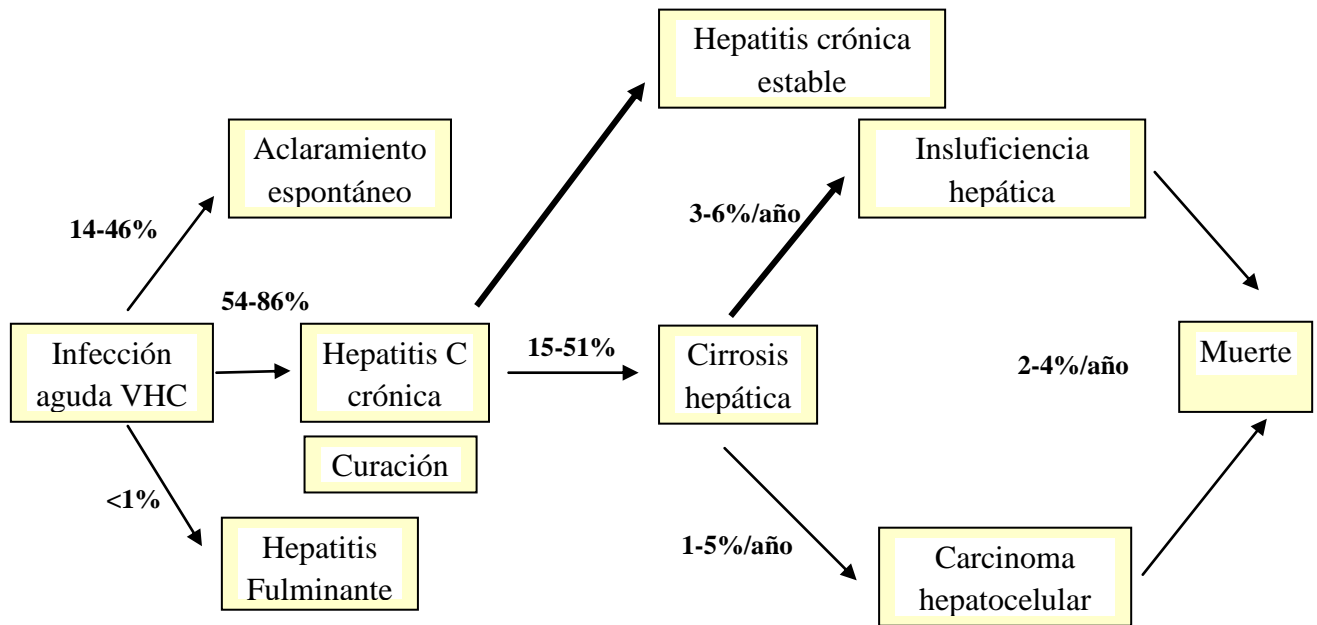


Figura 4. Historia Natural de la infección por el virus de la hepatitis C. (Adaptado de Maasoumy et al, 2012).

3.2. TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS POR VHC Y FACTORES INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

El tratamiento de la infección por el VHC persigue disminuir la infección, disminuir el riesgo de cirrosis o descompensación, disminuir el desarrollo de hepatocarcinoma y mejorar la supervivencia y calidad de vida de estos pacientes. La historia del tratamiento empleado en esta patología se describe a continuación.

En 1991, la FDA (*Food and Drug Alimentation*) aprueba el interferón alfa para tratar a la hepatitis C, consiguiéndose tasas de “respuesta virológica sostenida” (RVS) (carga viral negativa 6 meses después del tratamiento) del 9% para individuos infectados por genotipo 1 y del 30% para los infectados por genotipos 2 y 3. En 1998, la FDA aprueba el uso combinado del interferón alfa con la ribavirina para el tratamiento de la hepatitis C. La ribavirina es un nucleósido sintético con un amplio espectro de actividad antiviral que fue inicialmente desarrollado como posible tratamiento para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), pero no resultó eficaz ni con el VIH ni con el VHC; no obstante, los hallazgos de que este compuesto reducía los niveles de enzimas hepáticas en suero, condujo a los estudios de combinación con el interferón, produciéndose una sinergia que resultó ser un gran avance para el tratamiento de la hepatitis C. Así, el tratamiento con la terapia combinada aumentó las tasas de respuesta al 29% para el genotipo 1 y al 62% para los genotipos 2 y 3.

En el 2001 se produce una nueva era en el tratamiento de la hepatitis C al aprobarse el primer interferón pegilado por la FDA. Hasta ese momento, se conseguían concentraciones elevadas de interferón pero éstas se mantenían poco tiempo, por lo que durante gran parte del período posológico se daban concentraciones subinhibitorias. La unión de un polietilenglicol (PEG) a otra molécula recibe el nombre de “pegilación”, y al derivado formado se le denomina “pegilado”. La pegilación del interferón aportó mejoras farmacocinéticas y farmacodinámicas principalmente porque reduce su aclaramiento por reducir el filtrado glomerular, aumentar la resistencia a la proteólisis e incluso a la fagocitosis. El beneficio del aumento de las concentraciones de los niveles de interferón durante un período prolongado de tiempo fue la supresión constante del virus y aumento de la probabilidad de una respuesta virológica sostenida, de hecho, sólo con la monoterapia de interferón pegilado se alcanzaron tasas de respuesta al tratamiento del 14% para los genotipos 1 y del 47% para los genotipos 2 y 3. En ese mismo año, se aprobó la terapia combinada de ribavirina con el interferón pegilado (PegIFN y RBV) alcanzándose tasas del 40-50% para los genotipos 1 y del 75-80% para el resto de los genotipos (Franciscus, 2010). Curiosamente, estas tasas eran mayores en países del este que del oeste (Chuang and Yu, 2013).

En búsqueda de mejores tasas de respuesta al tratamiento de la hepatitis C, en el 2007 se inicia el desarrollo de nuevos fármacos: los agentes antivirales de acción directa (AAD). Actualmente hay tres clases de ADDs en ensayos clínicos: inhibidores de proteasas NS3/4A, inhibidores de la fosfoproteína NS5A del complejo de replicación NS5A e inhibidores de la polimerasa NS5B. Hasta la fecha, la FDA ha aprobado para su uso 4 AADs. Los primeros AADs aprobados fueron dos inhibidores de proteasas NS3: telaprevir y boceprevir, que las comercializan Vertex® y Shering® respectivamente. La triple terapia, que consiste en la terapia combinada convencional de interferón pegilado con ribavirina más el inhibidor de proteasa, consigue aumentar significativamente los ratios de respuesta virológica sostenida, con ratios de respuesta del 40 al 70% en pacientes “naive” (Jacobson *et al*, 2011; Poordad *et al*, 2011) y del 20 al 65% en los pacientes con virus G1 que no respondieron a la terapia convencional (Zeuzem *et al*, 2011; Bacon *et al*, 2011). Actualmente se ha autorizado otro inhibidor de proteasa, el simeprevir, así como el primer ADD inhibidor de la NS5B, el sofosbuvir. Estos tienen regímenes de dosificación más fácil (una pastilla al día), y parece que tienen menos efectos secundarios y de interacción con otros medicamentos (Figura 5).

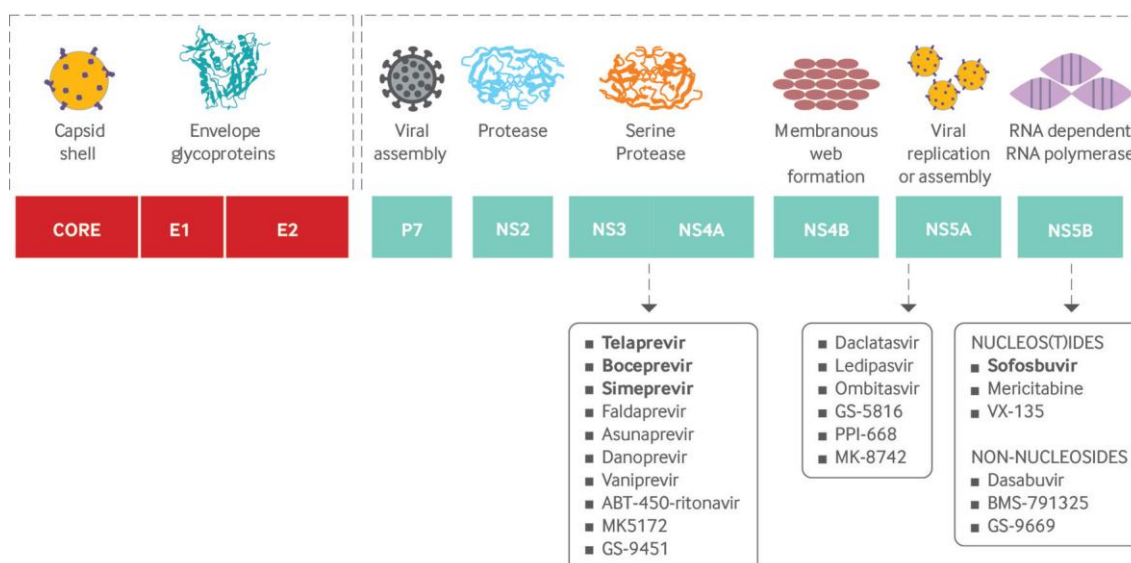


Figura 5. Representación del genoma del VHC, sus productos proteicos e inhibidores. Los agentes antivirales de acción directa que aparecen en negrita son los que tienen licencia y están aprobados; el resto se encuentra en fase II o III de estudio. (Tomado de Feeney *et al*, 2014)

3.2.1. Factores intrínsecos al huésped

Aunque ya se han señalado algunos factores relacionados con la respuesta al tratamiento (genotipo viral e IL28B), a continuación se resumen factores asociados con la respuesta al tratamiento, tanto intrínsecos al huésped como del propio virus.

- Sexo

Al igual que con el AVE, donde las mujeres aclaran la hepatitis C aguda hasta dos veces más que los hombres, la respuesta al tratamiento con Peg-IFN/RBV es mayor en mujeres premenopáusicas que en los hombres (Villa *et al*, 2011), y aunque el mecanismo subyacente no ha sido claramente explicado, podría estar relacionado con un mayor nivel de estrógenos, ya que esas diferencias desaparecen después de la menopausia (Hayashi *et al*, 1998)

- Edad

La infección por VHC a edades tempranas podría facilitar la eliminación del virus, aunque se han publicado resultados controvertidos con respecto a partir de qué edad las respuestas al tratamiento serían mucho menores, >65 años o >40 años (Huang *et al*, 2010 y Antonucci *et al*, 2007 respectivamente). Sin embargo, esto podría ser explicado porque los pacientes mayores con VHC crónica sufren más efectos adversos, con modificación de dosis o interrupción del tratamiento.

- Etnia

Desde la introducción de IFN α para el tratamiento de la VHC, se han encontrado ratios de RVS superiores en población asiática respecto al resto (Yu *et al*, 2009). Así, en los países del oeste los ratios de RVS al tratamiento convencional con IFN α -PEG más ribavirina eran del 70-80% para los pacientes infectados con genotipo 1 y del 90-95% para los infectados con genotipo 2, mientras que en los países del oeste eran del 50% y del 80% respectivamente. Además, los ratios de RVS en pacientes americanos de origen africano eran más bajos que la de los hispanicos y americanos caucásicos (Muir *et al*, 2004). Por tanto, la raza influye sustancialmente y predice cómo será la respuesta al tratamiento convencional con IFN α -PG más ribavirina en los pacientes con VHC (Chuang *et al*, 2013). Parte de esta diferencia podría explicarse por la diferente frecuencia alélica encontrada para el alelo C del polimorfismo rs12979860 del locus IL28B en las distintas etnias (Ge *et al*, 2009).

- Coinfección

En general, el ratio de RVS en pacientes que son coinfectados por el VIH y el VHC es menor que en los pacientes mono infectados VHC. Ciertas condiciones que son más frecuentes o exclusivas de los pacientes VIH pueden tener un efecto negativo en la RVS, como la interferencia entre las drogas antivirales con la terapia de la hepatitis C, la depleción de los linfocitos CD4+, la resistencia a la insulina, la esteatosis o el avance de la fibrosis (Soriano, 2006).

- Enfermedades metabólicas asociadas

Se encuentran principalmente la resistencia a la insulina y desórdenes en la síntesis de lípidos. La presencia de resistencia a insulina y diabetes mellitus tipo 2 conduce a que se den ratios más bajos de RVS en los pacientes infectados por VHC (Romero-Gómez *et al*, 2005; Conjeevaram *et al*, 2007). Interesantemente, el aclaramiento del virus revierte el desorden metabólico, atenuándose la resistencia a la insulina y restableciéndose la función de las células β pancreáticas, apoyando estos estudios una relación entre la infección crónica por VHC y la resistencia a la insulina (Kawaguchi *et al*, 2007; Arase *et al*, 2009). Niveles bajos de colesterol y de triglicéridos en suero se asocian a mayores niveles de viremia (Dai *et al*, 2008).

- Factores genéticos

Los principales factores genéticos asociados con la respuesta al tratamiento han sido:

- IL28B: Tres estudios de GWAs identificaron asociación de este mismo locus con la respuesta al tratamiento del VHC en pacientes infectados por genotipo 1 (Ge *et al*, 2009; Suppiah *et al*, 2009; Tanaka *et al*, 2009). El papel de este polimorfismo no es tan importante en los pacientes infectados por G2 ó G3, asociándose en este grupo de pacientes con la respuesta virológica rápida más que con la respuesta virológica sostenida (Rauch *et al*, 2010; Mangia *et al*, 2010; McCarthy *et al*, 2010; Sazarrin *et al*, 2011; Stättermayer *et al*, 2011)
- TNF α : Citoquina pro-inflamatoria con dos polimorfismos (-308 y -238) en su región promotora que influyen la expresión de esta citoquina. Se ha encontrado que el polimorfismo -308 puede ayudar a predecir la RVS de la terapia combinada especialmente en los pacientes con genotipo 1 y con alta carga viral (Dai *et al*, 2006)
- HLA: Molécula fundamental para la respuesta del hospedador a la infección. Varios alelos HLA se han asociado con el curso de la evolución de la infección, concretamente, los alelos A24, B40 y B44, así como los haplotipos B40-DR3, B46-DR9, Cw1-DQ3 y Cw1-DR9 se han asociado con RVS (Romero-Gómez *et al*, 2003; Dai *et al*, 2010)

- Carga viral

Una carga viral elevada se ha asociado a una peor respuesta al tratamiento, siendo un importante predictor de RVS (Poynard *et al*, 1998; Lauer *et al*, 2001).

- Genotipo viral

El genotipo viral es el mayor predictor de respuesta al tratamiento hasta la fecha; así, el porcentaje de respuesta a la terapia combinada con IFN-PEG/RBV es del 40-50% en los pacientes con genotipo 1 y del 75% en los pacientes con genotipo 2 ó 3. Además, el genotipo viral también es relevante en la respuesta al tratamiento con los AADs como el telaprevir y boceprevir, usándose para los pacientes con genotipo 1 que incrementan su porcentaje de respuesta al 75% (Doyle *et al*, 2012). En los países asiáticos, los porcentajes de respuesta a la terapia combinada son mayores en ambos grupos pero también existen diferencias (70-80% vs. 90-95%) (Chuang *et al*, 2013).

3.3. FIBROSIS HEPÁTICA POR VHC

Tras una hepatitis viral, se produce un daño hepático agudo, las células parenquimales se regeneran y sustituyen a las células que han sufrido necrosis o apoptosis, y este proceso de lesión-reparación junto a un depósito continuado de proteínas de la matriz extracelular, como colágeno, fibronectina, ácido hialurónico, etc, da como resultado la fibrosis hepática. Se ha demostrado que las células hepáticas estrelladas juegan un papel clave en este proceso siendo las principales productoras de colágeno. Este depósito 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. Entre los más frecuente sistemas de estadificación de fibrosis está la escala METAVIR que distingue 4 estadios: F0 con ausencia de fibrosis, F1 con fibrosis portal, F2 con fibrosis periportal, F3 con fibrosis en puentes y F4 que representa la fibrosis hepáticas. Otras escalas como los sistemas de puntuación de Knodell, Ishak y Scheuer evalúan semi-cuantitativamente la fibrosis en la biopsia hepática.

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, de manera que no todos los pacientes expuestos al mismo agente causal desarrollan el mismo grado de fibrosis hepática ni lo hacen a la misma velocidad. Por tanto, los factores propios del hospedador, como factores genéticos, parecen desempeñar un importante papel en este proceso (Poynard *et al*, 1997). Así, se han asociado con la progresión a fibrosis polimorfismos en el receptor de la vitamina D (*VDR*) (Baur *et al*, 2012) y de la bomba de exportación de sales biliares (*ABCB11*) (Iwata *et al*, 2011). Con respecto al gen *IL28B*, anteriormente citado en el AVE y la RVS, unos trabajos encuentran asociación con mayor frecuencia de progresión a fibrosis (Fabris *et al*, 2012; Abe *et al*, 2010), pero en otro estudio esto no se confirma esta relación (Marabita *et al*, 2011).

Los pacientes coinfectados VHC/VIH progresan más rápidamente a cirrosis que en monoinfectados, poseen un mayor desarrollo de hepatocarcinoma y mayor riesgo de muerte (Poynard *et al*, 2003; Soriano *et al*, 2010). La coinfección con otros virus hepatotropos también empeora el pronóstico y aumenta el riesgo de derivar a

hepatocarcinoma, describiéndose casos de hepatitis fulminante en coinfecciones con el virus de la hepatitis A (EASL 2011). Sin embargo, ni el genotipo ni la carga viral VHC influyen en la velocidad de progresión a fibrosis, si bien, el genotipo 3 sí podría estar favoreciendo una mayor velocidad en la progresión del daño a nivel hepático al asociarse con esteatosis y transaminasas elevadas (Barreiro *et al*, 2006). Por otro lado, también se ha asociado con un mayor riesgo de progresión a fibrosis la resistencia a la insulina (Romero-Gómez, 2006) así como la presencia de autoanticuerpos antinucleares (Hsieh *et al*, 2008). Además, clásicamente, factores como el sexo masculino, la edad, la duración de la infección por el VHC y altos niveles de consumo de alcohol se han asociado con un mayor daño hepático.

3.4. INFLUENCIA DE LA INFECCIÓN POR VIH SOBRE LA HEPATITIS C CRÓNICA.

La presencia en un mismo individuo de infección crónica por VHC y VIH conlleva interacciones complejas que modifican la historia natural de ambas infecciones. Con respecto a la evolución de la infección por VHC en pacientes con VIH, ésta se empeora en la coinfección incrementándose y acelerándose el grado de fibrosis y el riesgo de evolución a cirrosis (Di Martino *et al*, 2001; Martínez-Sierra *et al*, 2003). En un estudio multicéntrico europeo, se examinó el resultado de la biopsia hepática en 914 pacientes con coinfección VIH/VHC. Cerca de la mitad de los pacientes tenían grados avanzados de fibrosis hepática (F3-F4) después de los 40 años de edad (Martín-Carbonero *et al*, 2004). Claramente la evolución a enfermedad hepática terminal ocurre antes en esta población de coinfectados por VIH/VHC que en los mono infectados. Esto también incluye el desarrollo de hepatocarcinoma en edades más jóvenes. De forma global, el 25% de los pacientes coinfectados desarrollan cirrosis hepática a los 15 años de la exposición inicial al VHC, mientras que esto sólo ocurre en el 5% de los pacientes mono infectados por el VHC (Ruiz-Sancho *et al*, 2006). Una vez establecida la infección crónica por VHC, las concentraciones de ARN-VHC son más altas en los pacientes coinfectados con VIH/VHC, tanto en el hígado como en el plasma; además, en estos pacientes se obtiene una peor respuesta al tratamiento anti-VHC, debido a esas altas concentraciones de ARN-VHC, grado avanzado de fibrosis hepática, disfunción inmune asociada al VIH, etc.

Los mecanismos por los cuales el VIH acelera la progresión de la enfermedad hepática en los pacientes coinfectados con VHC no se conocen bien. Está descrito que

existe una correlación entre recuentos elevados de linfocitos T CD4+ y menor grado de fibrosis hepática (Martínez-Sierra *et al*, 2003), y el estado de inmunosupresión, valorado por el bajo recuento de linfocitos T CD4+, se asocia sistemáticamente a fibrosis grave. Por otro lado, el peor control de la replicación del VHC en los pacientes coinfectados por el VIH parece deberse a la menor respuesta de las células CD8+ específicas anti-VHC. En general, la disminución de la inmunidad mediada por células en los pacientes con VIH facilita una mayor replicación del VHC. El incremento de la viremia por VHC podría explicar también la mayor frecuencia de cirrosis entre los pacientes coinfectados por VIH. Por otro lado, los mecanismos que forman parte del proceso de afectación tisular, como la alteración del patrón local de citocinas, la expresión de moléculas de adhesión o la liberación de factores fibrogénicos, pueden estar modificados en pacientes inmunocomprometidos (Mastroianni *et al*, 2002).

4. GENES CANDIDATOS EN ESTE ESTUDIO

El VHC debe evadir tanto la respuesta inmunológica innata como la adaptativa, por lo que componentes de ambas ramas pueden estar involucradas en el curso de la infección por el VHC. A continuación se detallan los 5 genes seleccionados en este trabajo tras haber sido identificados en estudios genéticos a gran escala.

4.1. *IL28B*

En 2009 una serie de estudios independientes encontraron que polimorfismos en el locus *IL28B* (rs12979860 o rs8099917) estaban asociados con la respuesta al tratamiento con terapia combinada en pacientes infectados por genotipo 1 (Ge *et al*, Tanaka *et al* and Suppiah *et al*, 2009). Pacientes con ese genotipo también tenían más probabilidad de aclarar espontáneamente al virus (Thomas *et al*, 2009). Detallando sus hallazgos, el grupo de Ge *et al* encontraron que el genotipo rs12979860CC implicaba una doble respuesta al tratamiento frente al genotipo rs12979860TT en población americana, tanto de origen europeo como africano y en hispanicos. En todos ellos, el grupo de pacientes CC presentaba porcentajes de respuesta muy superiores a los pacientes CT y TT (similar entre ellos). Sumando todas las poblaciones (n=1137), los pacientes CC (un 34%) tenían tasas de respuesta al tratamiento en torno al 80%, frente al 35% de respuesta al tratamiento en los pacientes CT y TT. Además, los pacientes CC americanos de origen africano tenían ratios de respuesta al tratamiento superiores a las de los pacientes TT de origen europeo (53.3%

vs. 33.3%), lo que enfatiza la importancia del genotipo en sí frente a la etnia en la predicción de la RVS. Por otro lado, el grupo de Tanaka *et al* y el de Suppiah *et al*, realizaron dos GWAs independientes, el primero con población japonesa (n=154), cuyos hallazgos lo replican en otra cohorte independiente (n=172) y el segundo con población australiana de origen europeo (n=293). Ambos grupos detectaron que el polimorfismo rs8099917 a través de un modelo de herencia dominante del alelo minoritario (G) con la no RVS al tratamiento, prediciendo el alelo G la no respuesta con un OR de 25.1 y 2.28 respectivamente. Tras estos hallazgos, el grupo de Thomas *et al*, estudió el polimorfismo rs12979860 en seis cohortes independientes de pacientes AVE (n=388) y de pacientes crónicos con VHC (n=620), divididos en individuos de origen europeo y de origen africano, y encontraron que el alelo estaba más sobrerrepresentado en los individuos AVE tanto en los de origen europeo (80.3% vs. 66.7%) como en los de origen africano (56.2% vs. 37%). Además, como Ge *et al*, no encontraban diferencias entre los genotipos CT y TT, por lo que el efecto protector del alelo C sería a través de un modelo recesivo.

En el año 1957, los científicos descubrieron las propiedades antivirales de una sustancia natural a la que llamaron interferón (IFN) por su capacidad de "interferir" con la replicación viral (Isaacs *et al*, 1957). Actualmente los IFNs se clasifican en tres grupos: tipo I (incluyen a todos los IFN α , IFN β , IFN ϵ , IFN κ , IFN ω e IFN ν), tipo II (sólo hay uno, IFN γ) y tipo III (IFN λ s). Los IFN λ s se identificaron a principios de 2003 por dos grupos de manera independiente y se nombraron como IFN- λ 1 (IL29), IFN- λ 2 (IL28A) e IFN- λ 3 (IL28B) (Kotenko *et al*, 2003; Sheppard *et al*, 2003). Los tres genes de IFN- λ se localizan en el cromosoma 19, posición 19q13, y recientemente, se ha identificado un nuevo gen dentro de este grupo, IFN- λ 4 (Prokunina-Olsson *et al*, 2013). Las proteínas IFN λ se unen a un complejo receptor formado por una cadena IL28RA (IFN λ R1) y una cadena IL10R2, ésta última presente también en los complejos de los receptores de IL10, IL22 e IL26.

La inducción de interferones tipo I y III en las células infectadas es crucial no sólo en la defensa temprana contra los virus, sino también durante la fase crónica de la infección vírica. Se han descrito dos rutas a través de las cuáles se induce la producción de IFN tipo I y III tras infección vírica: la ruta de los receptores tipo toll (TLRs): TLR3, TLR7 y TLR9, y la de los receptores citosólicos tipo RIG-1 (RLRs): RIG-1 (ácido retinoico inducible del gen-I) y MDA5 (antígeno 5 de diferenciación asociado a melanoma). Estos receptores poseen la capacidad de reconocer a los virus a través de sus ácidos nucleicos. En el caso del VHC, virus RNA de cadena doble, se uniría al TLR3, quién a través de la proteína

adaptadora TRIF y el complejo quinasa TBK1/IKK ϵ activaría principalmente a los factores de transcripción IRF3 y NF κ B, que inducen la expresión de los genes de IFN tipo I y III. Por otro lado, la unión del ARN viral a MDA5 produce un cambio conformacional que permite la unión de MAVS, un adaptador esencial en las rutas citosólicas, que conlleva también la activación del complejo TBK1/IKK ϵ . A su vez, los IFNs tipo I y III activan un mecanismo de señalización a través del sistema JAK-STAT con la formación de un factor de transcripción conocido como ISGF3 (factor 3 de los genes estimulados por IFN), el cuál se transloca al núcleo e induce la expresión de genes estimulados por IFN (ISGs), que conlleva inducción de actividad antiviral y una mayor expresión de moléculas HLA de clase I. Esto se ilustra en la siguiente figura 6 (Heim, 2012). Debido a que la cascada de señalización de los IFN- λ es similar a la de los IFN- α o β , es lógico pensar que sus actividades biológicas sean también parecidas. No obstante, la magnitud de la respuesta inducida por los IFN- α suele ser mayor que la de IFN- λ , lo cuál puede ser reflejo de diferente fuerza de señalización de sus receptores o bien de diferentes niveles de expresión de los mismos

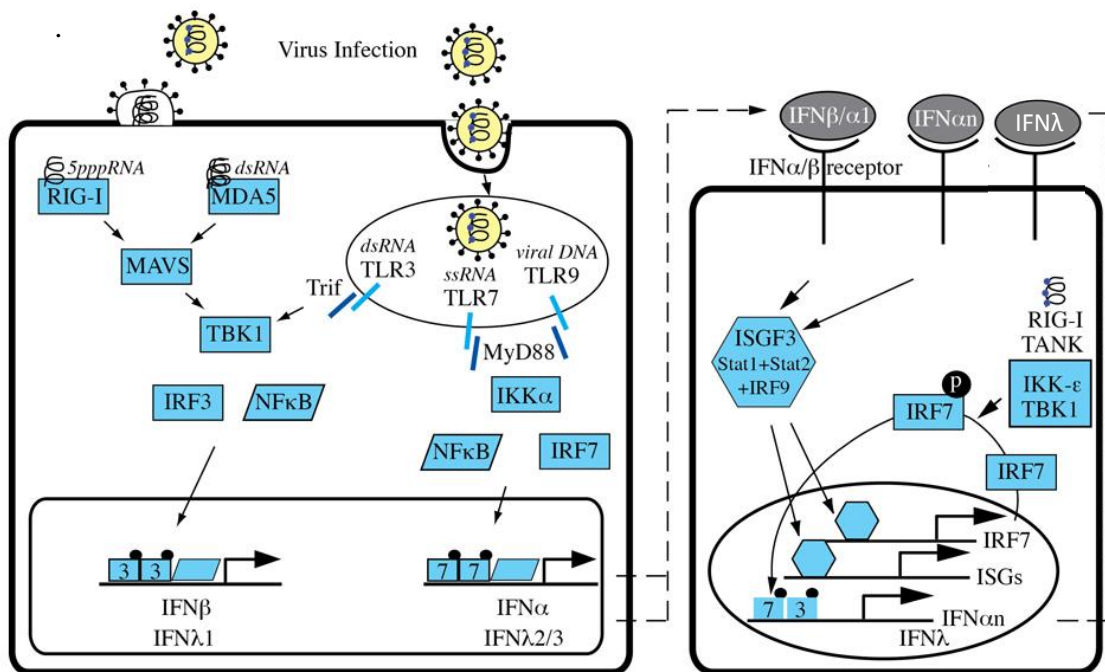


Figura 6. Inducción de IFNs tras infección vírica. (Tomado de Markus Heim 2012).

Centrándonos en los IFN λ , se ha demostrado en distintos experimentos que tiene una fuerte actividad antiviral frente a distintos virus (Dumoutier *et al*, 2004), entre los que se encuentra el VHC, donde varios trabajos señalan la capacidad de este interferón para

inhibir su replicación, lo que sugiere la posibilidad de usar IFN- λ en el tratamiento de infecciones causadas por este virus (Robek *et al*, 2005; Marcello *et al*, 2006). La importancia de la actividad antiviral de estos IFN λ s ha sido remarcada por el descubrimiento de que hay virus de la familia Poxviridae, capaces de neutralizar a través de la unión de proteínas propias no sólo a IFNs tipo I (ya observado con proteínas de otros virus) sino también a IFNs tipo III (Huang *et al*, 2007).

HAVCRI, TANK, TNFSF18 e IL18BP.

En un estudio de genes candidatos de la inmunidad en el curso de la infección por VHC, se ha relacionado a estos 4 genes con el AVE tanto en poblaciones americanas de origen europeo (AE y n= 441) como de origen africano (AA y n=352) (Mosbrugger *et al*, 2010), ya que detectan SNPs asociados en ambas poblaciones. A continuación, en caso de varios SNPs, señalamos aquellos que tienen mayor grado de significación. Con respecto al gen *HAVCRI*, tras el estudio de 16 SNPs en ambas poblaciones encuentran que hay 2 SNPs significativamente asociados con el AVE, uno en población AA (rs6880589 p=0.0007 y OR=0.41) y otro en población AE (rs953569 p=0.007 y OR=0.68). Con respecto a *TANK*, tras el estudio de 28 SNPs en ambas poblaciones encuentran que hay 5 SNPs significativamente asociados con el AVE en población AA (rs7586242 p = 0.003 y OR=0.59) y otros 5 SNPs significativamente asociados en población AE (rs1267059 p=0.0008 y OR=0.51). Por otra parte, tras el estudio de 9 SNPs de la región *TNFSF18* encuentran que hay 1 SNP significativamente asociado con el AVE en población AA (rs723858 p = 0.002 y OR=2.74) y 3 SNPs significativamente asociados en población AE (rs2236876 p=0.004 y OR=1.58). Por último, con respecto al gen *IL18BP*, tras el estudio de 12 SNPs en ambas poblaciones detectan un SNP significativamente asociado con el AVE en población AA (rs3750912 p = 0.005 y OR=2.44) y otro en población AE (rs2298455 p=0.003 y OR=1.85).

4.2. *HAVCRI*

El gen *HAVCRI* (“*hepatitis A virus celular receptor I*”) se identificó como el receptor del virus de la hepatitis A, primero en monos (Kaplan *et al*, 1996) y posteriormente en humanos (Feigelstock *et al*, 1998). Simultáneamente en 1998 se identifica como una proteína cuya expresión aumenta en el daño renal por isquemia, de ahí que se conozca también como *KIMI* (“*kidney injury molecule*”) (Ichimura *et al*, 1998).

Posteriormente, en 2001 el gen se mapeó en el locus *Tapr* (“*T cell and airway phenotype regulator*”), que se encuentra dentro de la región cromosómica 5q23-35, asociada con susceptibilidad a asma y a alergia (McIntire *et al*, 2001). *HAVCR1* codifica una glicoproteína transmembrana tipo I que posee dos dominios en su región extracelular, uno de inmunoglobulina (IgV) en el extremo amino terminal y otro de mucina, por lo que también es conocido como *TIMI* (“*T cell immunoglobulin domain and mucin domain*”). El dominio de IgV contiene un sitio amino de glicosilación y el de mucina numerosos sitios hidroxilos glicosilados. Además, el dominio de IgV podría ser también capaz de unir glúcidos a través de ácido siálico. Su región intracelular contiene residuos de tirosina susceptibles de fosforilación que estarían implicados en la señalización. Se han identificado otros genes homólogos a *HAVCR1* (*TIMI*) en la misma región cromosómica, *TIM3* y *TIM4*, y sus productos génicos mantienen una estructura conservada que incluye esos dos dominios estructurales que las definen, constituyendo estas tres proteínas la familia TIM en humanos.

El ligando de *HAVCR1* no está bien caracterizado, aunque algunos trabajos indican que se puede unir a otras proteínas *HAVCR1* (Santiago *et al*, 2007) así como a *TIM4* (Meyers *et al*, 2005). Además, ambas moléculas son proteínas de unión a fosfatidilserina y podrían interactuar a través de los exosomas mediante este glicerolfosfolípido (Miyaniishi *et al*, 2007; Freeman *et al* 2010; Rennert, 2011). (ver figura 7).

HAVCR1 se expresa en células del sistema inmunitario (mastocitos, linfocitos Th2, linfocitos B, células NK-T) y en células del epitelio tubular del riñón. Esta glicoproteína actúa como molécula coestimuladora para la activación de los linfocitos T y más recientemente se ha sugerido que juega un papel en el reconocimiento y la fagocitosis de células apoptóticas. En concreto, *HAVCR1* se expresa después de la activación de linfocitos Th vírgenes y favorece la diferenciación a linfocitos Th2. Los niveles de expresión más altos de *HAVCR1* se han encontrado en líneas de linfocitos Th2 y se han asociado con niveles bajos de IFN γ en las células mononucleares (Khademi *et al*, 2004; Souza *et al*, 2005). El uso de anticuerpos anti- *HAVCR1* junto con la estimulación simultánea del TCR aumentan en gran medida la proliferación de los linfocitos T y potencian la producción de citoquinas Th2 (IL4, IL5, IL13) (Umetsu *et al*, 2005). Sin embargo, anticuerpos de alta afinidad anti-*HAVCR1* favorecen la diferenciación de los linfocitos Th a Th1 y Th17 (Xiao *et al*, 2007). Por otra parte, la estimulación in vitro de TIM-1 reduce la expresión de Foxp3, regulando la capacidad supresora de las células Treg

(Degauque *et al*, 2008). Por tanto, parece que TIM1, además de regular la respuesta de las células Th2, esta glicoproteína también regula la respuesta de las células Th1, Th17 y Treg.

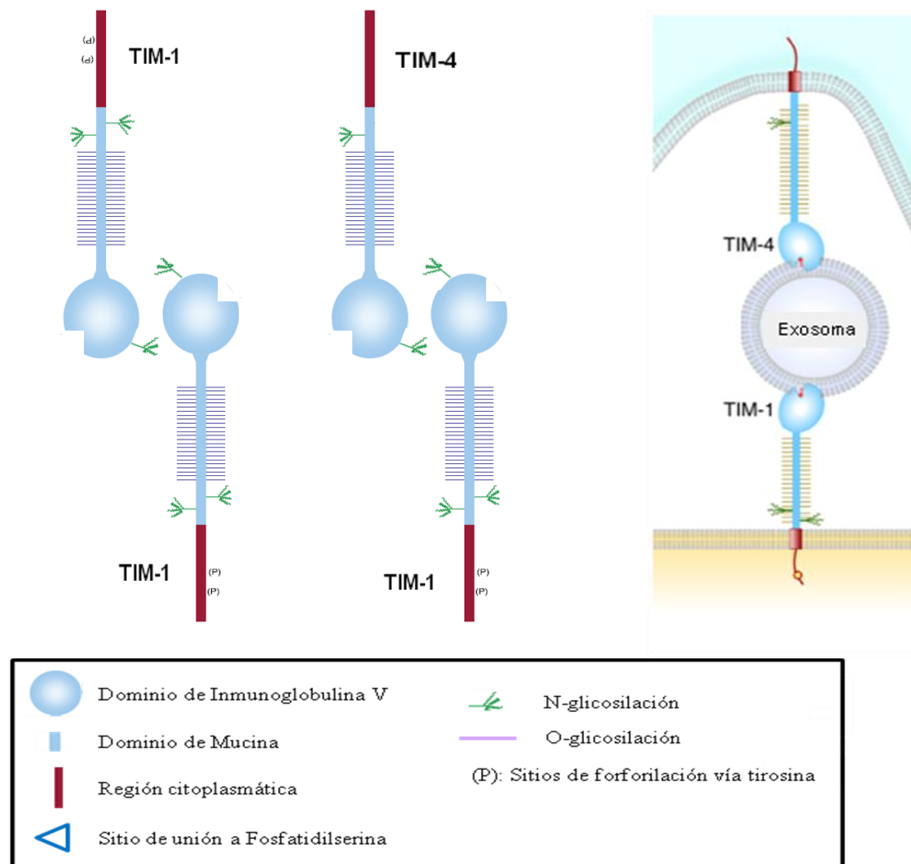


Figura 7. Esquema de la proteína HAVCR1 (TIM1) y de sus ligandos con propuesta de unión vía exosoma. Glicoproteína de superficie con un dominio inmunoglobulina V y un dominio de mucina (*Adaptado de Kuchroo et al, 2008*).

HAVCR1 se expresa en células del sistema inmunitario (mastocitos, linfocitos Th2, linfocitos B, células NK-T) y en células del epitelio tubular del riñón. Esta glicoproteína actúa como molécula coestimuladora para la activación de los linfocitos T y más recientemente se ha sugerido que juega un papel en el reconocimiento y la fagocitosis de células apoptóticas. En concreto, *HAVCR1* se expresa después de la activación de linfocitos Th vírgenes y favorece la diferenciación a linfocitos Th2. Los niveles de expresión más altos de *HAVCR1* se han encontrado en líneas de linfocitos Th2 y se han asociado con niveles bajos de $IFN\gamma$ en las células mononucleares (Khademi *et al*, 2004; Souza *et al*, 2005). El uso de anticuerpos anti- *HAVCR1* junto con la estimulación simultánea del TCR aumentan en gran medida la proliferación de los linfocitos T y potencian la producción de citoquinas Th2 (IL4, IL5, IL13) (Umetsu *et al*, 2005). Sin

embargo, anticuerpos de alta afinidad anti-HAVCR1 favorecen la diferenciación de los linfocitos Th a Th1 y Th17 (Xiao *et al*, 2007). Por otra parte, la estimulación *in vitro* de TIM-1 reduce la expresión de Foxp3, regulando la capacidad supresora de las células Treg (Degauque *et al*, 2008). Por tanto, parece que TIM1, además de regular la respuesta de las células Th2, esta glicoproteína también regula la respuesta de las células Th1, Th17 y Treg.

El locus *HAVCR1* es altamente polimórfico tanto en su región promotora como a lo largo de todo el gen. Presenta varios polimorfismos de inserciones y deleciones en el exón 4, el cuál codifica el dominio de mucina. Estas variantes estructurales pueden afectar a la función de la molécula y se han asociado con susceptibilidad a enfermedades alérgicas y autoinmunes (Chae *et al*, 2003, 2004; Li *et al*, 2006). En un estudio previo, se definieron 4 haplotipos principales de este gen en nuestra población, teniendo en cuenta tanto los polimorfismos del exón 4 como los tag SNPs a lo largo del gen. Además, en el mismo trabajo se describió un “fenotipo de expresión génica” porque uno de esos haplotipos, el haplotipo B, expresaba más ARNm que los otros; además, este haplotipo estaba más representado en el grupo de casos (pacientes con artritis) que en controles (García-Lozano *et al*, 2010).

4.3. TANK

En 1996 se identifica la proteína TANK (*TRAF family member-associated NFκB activator*) como un nuevo componente de la activación del factor de transcripción NFκB (Cheng y Baltimore, 1996) y tres años después se identifica a TBK1 (*TANK binding Kinase 1*) como mediador de la capacidad de TANK para activar a NF-κB (Pomerantz y Baltimore, 1999). Como se comentó en la ruta de la Il28b, el complejo TBK1/IKKε es activado después el reconocimiento del ARN de doble cadena del VHC por receptores de membranas (TLR3) y citoplasmáticos (RIG1 y MDA5). TANK se uniría al complejo TBK1/IKKε participando en su activación. Por otra parte TANK activaría NFκB sin la participación de este complejo. La activación de NF-κB se produce tras la fosforilación de las proteínas inhibidoras IκB por el complejo kinasa de IκB (IKK). Este complejo IKK está compuesto por un heterodímero formado por las subunidades catalíticas IKKα e IKKβ y el complejo regulador NEMO (NF-κB essential modulator)/IKKγ. TANK interaccionaría con este complejo favoreciendo la fosforilación de IκB y la activación de NF-κB (Figura 8) (Guo and Cheng, 2007).

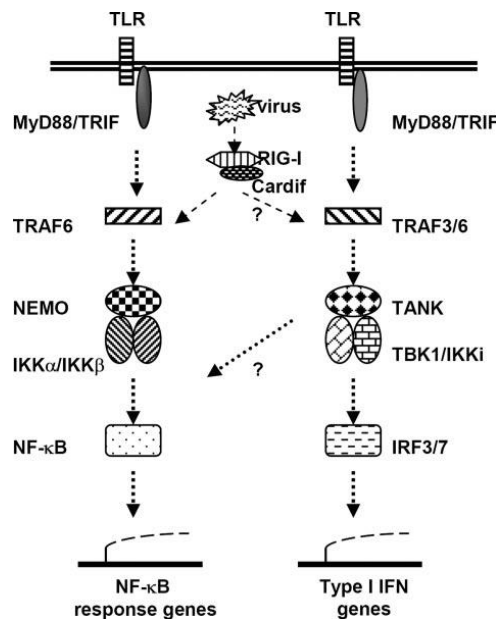


Figura 8. Papel de TANK en la producción de IFN tipo I tras infección viral y estimulación de los TLRs. (Tomado de Guo and Cheng, 2007).

Los virus han desarrollado estrategias para escapar de estas rutas del sistema inmune innato, así por ejemplo, el VHC, a través de su proteasa NS3 interaccionaría directamente con TBK1 e impediría la activación de IRF3 (Otsuka *et al*, 2005). Por otro lado, la proteína C6, tipo bcl-2, perteneciente a poxvirus, es un factor de virulencia debido a que es capaz de inhibir la activación de IRF3 e IRF7 a través de su unión directa con TANK (Unterholzner, 2011). NS5A del VHC, que es homóloga a bcl-2, también podría interferir en la activación de estos factores de transcripción a través de TANK (figura 9).

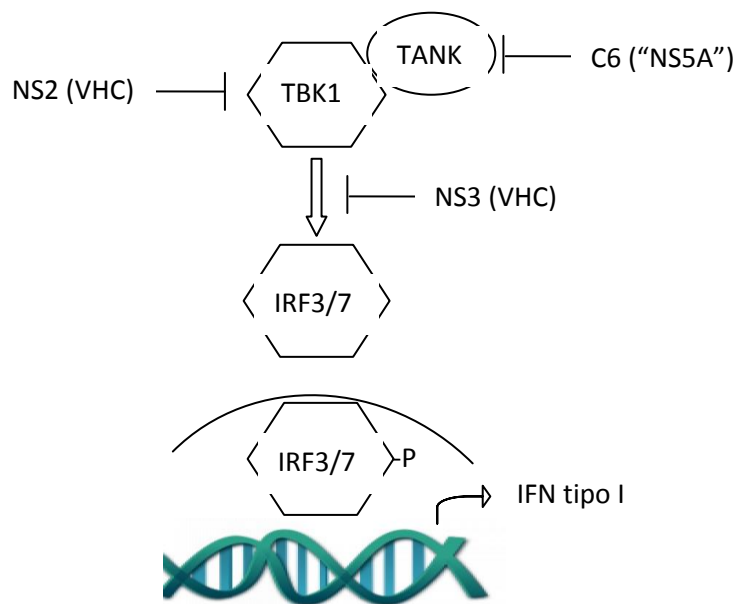


Figura 9. Evasión de la respuesta a IFN mediante la modulación de la actividad TBK1. (Adaptado de Zhao, 2013)

4.4. TNFSF18

La proteína codificada por el gen *TNFSF18* (“Tumor Necrosis Factor Superfamily, member 18”), también conocida como GITRL (ligando del receptor TNF inducido por glucocorticoides, fue descubierta en 1999 por dos grupos independientes de investigación, Gurney *et al.* y Kwon *et al.* El nombre de factor de necrosis tumoral fue usado por primera vez en los años 60 para referirse a una proteína presente en el suero de ratones activados por polisacáridos bacterianos con actividad supresora tumoral (O’Malley, 1962). No fue hasta los años 80 cuando se identificó y se purificó a TNF α (derivado de macrófagos) y a TNF β (derivado de linfocitos) (Aggarwal *et al.*, 1984 y 1985). Después de aislarse el cDNA de estos dos factores, se identificó por homología de secuencia génica a todos los miembros de la superfamilia del factor de necrosis tumoral, estando formada por 19 ligandos (TNFSF) y 29 receptores (TNFSFR), lo que implica que al menos, algunos ligandos interaccionan con más de un receptor. La unión TNF/TNFR posee una organización común donde formas triméricas del ligando, se enfrentan a formas triméricas del receptor dando lugar a una estructura 3:3. Esta estructura geométrica, que afectaría a la cola citoplasmática del receptor, promovería el reclutamiento de las proteínas adaptadoras y de señalización, incluyendo los TRAFs (factores asociados al receptor de TNF), activándose la ruta de señalización hacia abajo, terminando en NF κ B. En general, las moléculas TNFSFs son producidas por las células del sistema inmune; no obstante, algunas de estas proteínas también son producidas por otras células, como las células endoteliales, células del músculo liso, células de la piel, del tejido adiposo, neuronas, etc. Aunque estas proteínas fueron descritas inicialmente por su capacidad para causar necrosis en algunos tumores, hoy en día no sólo se les atribuye un papel en el crecimiento tumoral sino también en la protección contra patógenos, en la tolerancia, la inflamación, la proliferación y la autoinmunidad. Por ello, actualmente son dianas de estudio para el desarrollo de drogas en enfermedades como artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Crohn, etc (Aggarwal *et al.*, 2012; Croft *et al.*, 2012). En general, todos los miembros de esta superfamilia presentan actividad proinflamatoria, principalmente a través de la activación del factor de transcripción NF κ B, y de manera más particular, unos miembros de esta superfamilia de TNF poseen actividad proliferativa sobre células hematopoyéticas, otros controlan la apoptosis y finalmente otro grupo juega un papel en la diferenciación y en los cambios morfogenéticos.

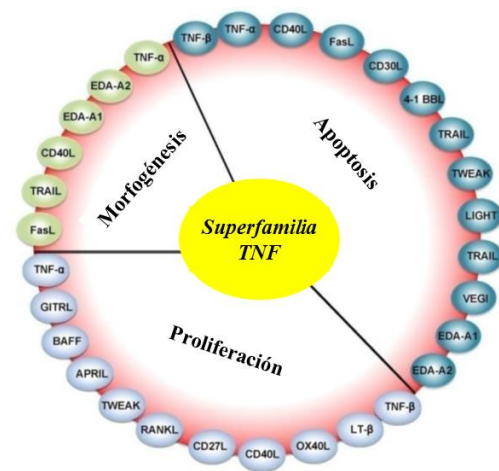


Figura 10. Papel en apoptosis, morfogénesis y proliferación de algunos miembros de la familia TNF. (Adaptado de Aggarwal *et al*, 2012).

TNFSF18 es una proteína transmembrana tipo II y su único receptor TNFRSF18 (también conocido como GITR o CD357) es una proteína transmembrana tipo I. TNFSF18 posee una tendencia a estar en un equilibrio monomérico-trimérico, que podría tener implicaciones en la señal que genera su receptor, ya que la trimerización de TNFSF18 resulta en un incremento de la afinidad con su receptor 100 veces superior. Por tanto, este comportamiento de oligomerización dinámico puede servir como mecanismo para modular el nivel de interacción ligando-receptor y asegurar un nivel óptimo de señalización a través de la ruta TNFSF18/TNFRSF18, en lugar de llegar siempre al máximo nivel posible (Chattopadhyay *et al*, 2007; Zhou *et al*, 2008).

TNFSF18 se expresa de manera constitutiva en las células presentadoras de antígenos (células dendríticas, células B y macrófagos) y en las células endoteliales, y de manera inducible en los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺. Por otra parte, su receptor se expresa de manera constitutiva en los linfocitos T reguladores, y de manera variable en otras células del sistema inmune, como son los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, células NK y NKT, células B, macrófagos y células dendríticas. Por lo tanto, la activación del TNFSF18/TNFRSF18 funciona como una señal coestimuladora entre las células presentadoras de antígenos y los linfocitos T. Así, la adición *in vitro* de anticuerpos bloqueantes de TNFSF18 conducen a una disminución de la proliferación de las células T respondedoras, lo que confirma que la estimulación fisiológica de esta ruta coestimula la respuesta de la célula T (Stephens *et al*, 2004; Shevach *et al*, 2006). En general se cree que el poder coestimulador de TNFSF18/TNFRSF18 es inferior al de CD28/B7; sin embargo,

en los experimentos donde se estimulan con anti-CD3 a linfocitos T TNFRSF18^{-/-}, la activación es totalmente nula, y ligeramente disminuida en los linfocitos T CD28^{-/-} (Nocentini *et al*, 2007).

Pero TNFSF18 se une a su receptor no sólo en células T efectoras sino también en células T reguladoras (Treg). Estas últimas, suprimen respuestas inmunes proporcionando un feedback negativo al sistema inmunológico, controlando al sistema y previniendo el desarrollo de respuestas autoinmunes. Pues bien, la unión de TNFSF18 a su receptor mermaría la función de estas células Treg, dándose un incremento de la respuesta del sistema inmunológico (Ji *et al*, 2004; Stephens *et al*, 2004). En relación con esto, la inyección de anticuerpos agonistas dirigidos contra el receptor da como resultado autoinmunidad espontánea y se acentúa la artritis, el asma y la colitis en los modelos de ratón. Por el contrario, los ratones deficientes en este receptor ven reducido sus síntomas inflamatorios (Shimizu *et al*, 2002, Croft *et al*, 2012). Por lo tanto, niveles patológicos altos de TNFSF18 en las células presentadoras de antígeno pueden ser el comienzo del desarrollo de enfermedades autoinmunes y niveles bajos del desarrollo de tumores e infecciones virales persistentes por una respuesta inmune mermada (Nocentini *et al*, 2005). En general, para que una infección viral se haga persistente debe darse una evasión de la respuesta de los linfocitos CD8⁺. Dittmer *et al* (2004) demostraron que esta evasión podía deberse al efecto supresor ejercido por las células T reguladoras, y que el uso de anticuerpos contra el receptor TNFRSF18 mejoraba la producción de IFN γ reduciéndose la carga viral; sin embargo, anticuerpos bloqueantes de TNFSF18 conducirían a una disminución de la proliferación de las células T respondedoras y a un aumento de la infección (Stephens *et al*, 2004; Shevach *et al*, 2006). Por otro lado, se cree que la expresión de TNFSF18 en la superficie de las células endoteliales es importante para la interacción entre éstas y los linfocitos T, de manera que a través de su interacción con el endotelio vascular, TNFSF18/TNFRSF18 podrían modular la supervivencia de los linfocitos T en los tejidos periféricos (Gurney *et al*, 1999).

Shevach and Stephens proponen que justo después de la activación de la célula T por reconocimiento antigénico, se incrementaría la expresión de receptor TNFRSF18 en la membrana, y su interacción con su ligando, presente en las células dendríticas, aumentaría la respuesta al promoverse la supervivencia de la célula T, la producción de IL2 y la diferenciación a células T efectoras. Como la respuesta continúa, las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺, que expresan de manera constitutiva altos niveles del receptor, interactúan

con su ligando TNFSF18 expresado por las células dendríticas y en presencia de IL2, producida inicialmente por las células T efectoras, conduce a la activación de las células T reguladoras. Posteriormente, la expresión de TNFSF18 en las células dendríticas retorna a niveles basales y permite que estas células T reguladoras inactiven a las células T efectoras permitiendo que la respuesta inmunológica finalice.

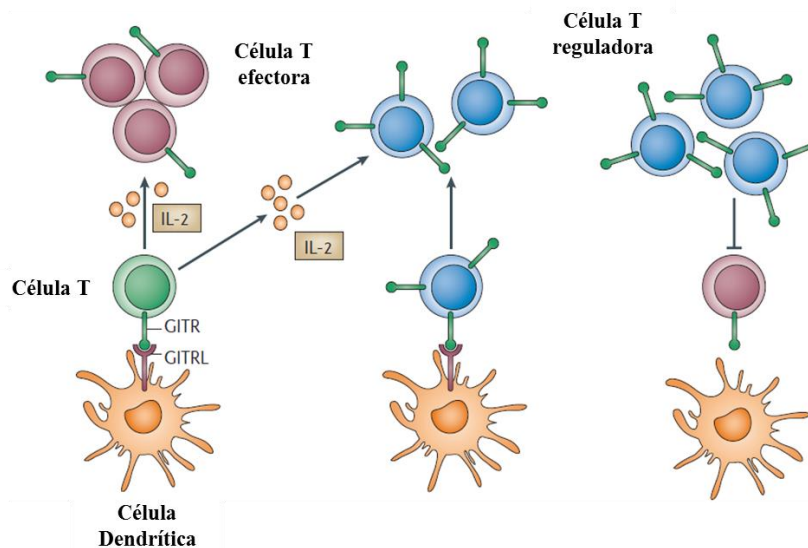


Figura 11. Modelo de interacción dinámica TNFSF18/TNFRSF18 durante una respuesta inmunológica. Las células T reguladoras realizan su función supresora tras desaparecer la unión TNFSF18/TNFRSF18. (Adaptado de Shevach *et al*, 2006).

4.5. IL18BP

En 1999 se descubrió la proteína IL18BP (proteína de unión a IL18), que se expresa y secreta de manera constitutiva en bazo y actúa como inhibidor de IL18 (Novick *et al*, 1999). La citocina IL18 fue descubierta originalmente como un factor de estimulación de IFN γ (Nakamura *et al*, 1989), por lo que se considera miembro de la familia de las citocinas Th1, participando principalmente en la defensa mediada por fagocitos y células NK, especialmente frente a los microorganismos intracelulares. Los ratones deficientes en IL18 tienen una menor respuesta de las células NK y una producción reducida de IFN γ (Takeda *et al*, 1998). Este interferón es crítico en la defensa del hombre frente a una amplia variedad de patógenos intracelulares, incluido el VHC; así, inhibe eficientemente *in vitro* la replicación del VHC (Frese *et al*, 2002) y parece estar asociada con el aclaramiento viral en chimpancés (Woollard *et al*, 2003). Apoyando esto se encuentra que el SNP -764G/C de la región promotora del gen IL18 es funcionalmente

importante para favorecer el aclaramiento tanto espontáneo como mediado por tratamiento del VHC en el hombre (Huang *et al*, 2007; An *et al*, 2008). IL18 está relacionada estructuralmente con IL1 β (Bazan *et al*, 1996). La unión de IL18 a su receptor conlleva la fosforilación de NF κ B y su translocación al núcleo.

IL18BP es una proteína secretada que se une y neutraliza a IL18, afectando por lo tanto a la respuesta Th1 y la producción de IFN γ , después de producirse una infección o estimulación del sistema inmunológico. El gen *IL18BP* codifica para al menos cuatro isoformas distintas (IL18BP_a, b, c y d) tras procesamiento diferencial del ARNm. Difieren principalmente en sus extremos carboxilo, mientras que un tercio o dos del extremo N-terminal poseen la misma secuencia aminoacídica. Junto al locus *IL18BP* se encuentra *RNF121*, que es un gen con función desconocida pero que contiene un dominio de dedo de zinc, por lo que se supone que debe interactuar con el ADN o con otras proteínas. Se encuentra junto a otros genes dentro de la región 11q13, que ha sido descrita como región de susceptibilidad a padecer cáncer de mama (Rosa-Rosa *et al*, 2009).

OBJETIVOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

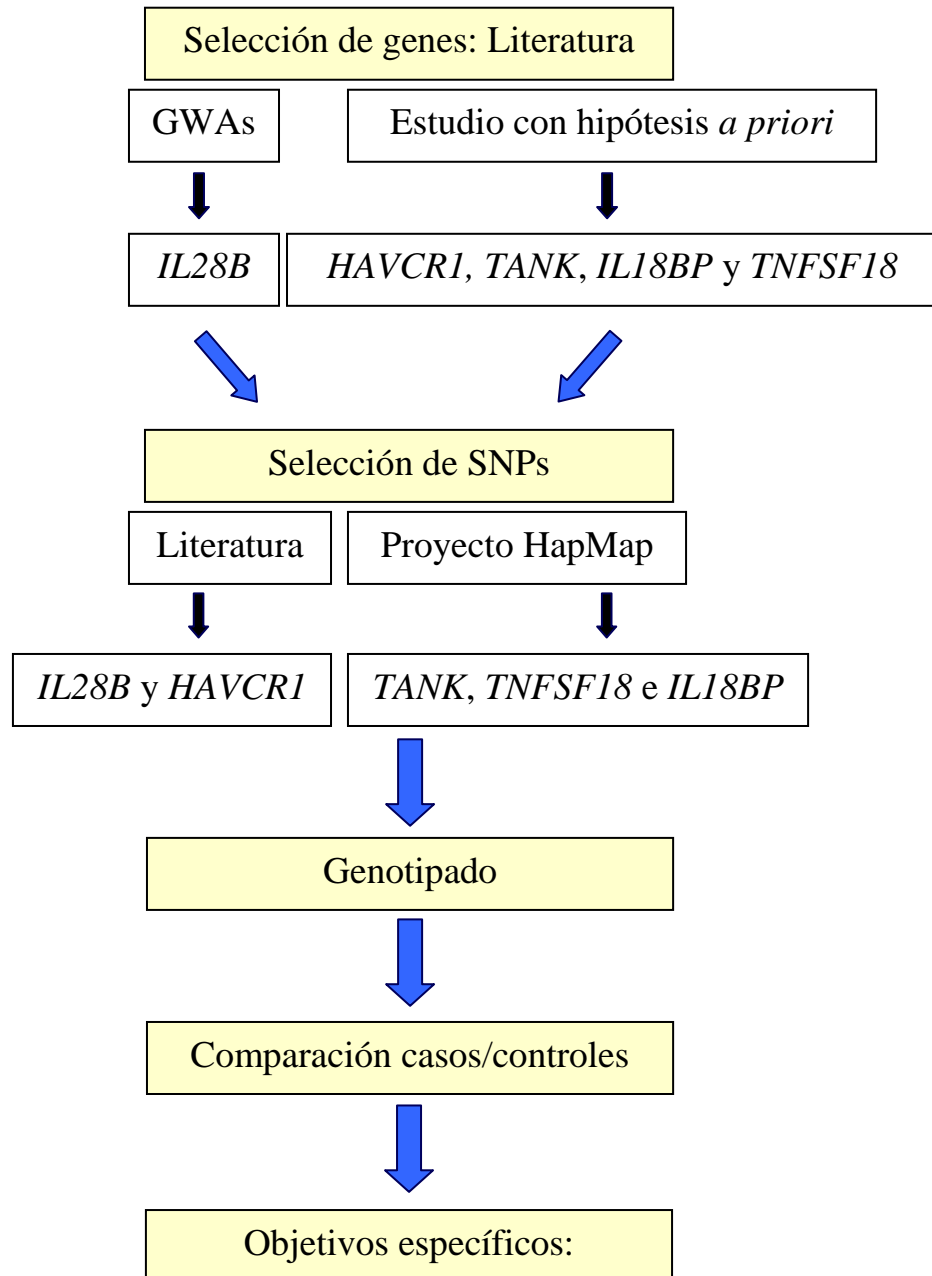
El objetivo principal de este trabajo fue estudiar la relación de diversos factores genéticos del hospedador con el curso de la infección por el VHC en población española, concretamente con el AVE (objetivo 1), la RVS (objetivo 2) y la afectación hepática (objetivo 3).

El primer gen seleccionado, *IL28B*, se incluyó en este estudio por su robusta asociación con la RVS tras publicarse en tres estudios GWA esta asociación (Ge *et al*, 2009; Suppiah *et al*, 2009; Tanaka *et al*, 2009). Los 4 genes restantes incluidos en este trabajo, *HAVCRI*, *TANK*, *TNFSF18* e *IL18BP* fueron asociados con AVE en un estudio de genes candidatos relacionados con el sistema inmunológico (Mosbrugger *et al*, 2010). Casualmente nuestro grupo, ese mismo año, había publicado un estudio de asociación entre el gen *HAVCRI* y enfermedades autoinmunes (García-Lozano *et al*, 2010), y por este motivo, decidimos incluir, no sólo este gen, sino también los otros genes, en nuestro trabajo.

El diseño experimental utilizado consistió en un estudio caso-control con tres cohortes de pacientes procedentes de nuestra área geográfica: una cohorte de pacientes que aclararon el VHC de manera espontánea, una cohorte de pacientes monoinfectados con el VHC y una cohorte de coinfectados con VIH. Con respecto a la selección de casos y controles, para alcanzar nuestro primer objetivo se asignaron como casos, los pacientes con infección crónica por VHC y como controles, los sujetos con aclaramiento viral espontáneo. Para dar respuesta a nuestro segundo objetivo se consideraron como casos aquellos sujetos sin respuesta sostenida y como controles aquellos que respondieron al tratamiento. Finalmente, el estudio de la posible asociación de estos genes con el nivel de afectación hepática se llevó a cabo dividiendo a los pacientes en dos grupos según su grado de fibrosis: F0-F2 considerados como controles y F3-F4 como casos.

La selección de los SNPs en los genes estudiados fue llevada a cabo teniendo en cuenta trabajos previamente publicados, caso *IL28B* y *HAVCRI*, o bien, utilizando la base de datos del proyecto HapMap (<http://www.hapmap.org/index.html.en>) en el caso de *TANK*, *TNFSF18* e *IL28BP*. Una vez seleccionados los SNPs, el genotipado se realizó mediante ensayos TaqMan, se establecieron los haplotipos y se compararon las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípica entre los grupos considerados casos y controles en cada objetivo. De modo esquemático este apartado se definiría de la siguiente manera:

Objetivo principal: Estudiar el papel de determinados genes en la historia natural de la infección por el VHC



- 1) Analizar la influencia de estos genes en el aclaramiento viral espontáneo
- 2) Analizar la influencia de estos genes en la respuesta a la terapia antiviral
- 3) Determinar si existe relación entre estos genes y el nivel de afectación hepática en los pacientes con infección crónica

MATERIAL Y MÉTODOS

1. PACIENTES Y CONTROLES

Se han incluido tres cohortes de pacientes:

- 1) Pacientes con aclaramiento viral espontáneo (AVE)
- 2) Pacientes con mono infección por el virus de la hepatitis C (VHC)
- 3) Pacientes con co-infección por VHC y el virus de la inmunodeficiencia humana (VHC/VIH).

Los pacientes fueron diagnosticados en los Servicios de “Aparato Digestivo” y “Enfermedades Infecciosas” del Hospital Universitario Virgen del Rocío y del Hospital Universitario de Valme. Procedían del área de Sevilla y sus alrededores, y dieron su consentimiento informado para la inclusión en este trabajo.

Las características clínico-epidemiológicas de los pacientes se muestran en la tabla 1.

Pacientes con aclaramiento viral espontáneo

Este grupo estaba compuesto por 77 pacientes (36 hombres y 41 mujeres) con anticuerpos frente al VHC sin presencia de ARN viral confirmado en dos determinaciones sucesivas.

Pacientes monoinfectados por VHC

Este grupo estaba constituido por 348 pacientes (203 hombres y 145 mujeres) con anticuerpos frente al VHC y ARN viral en el momento del diagnóstico. El dato de genotipo viral causante de la infección estuvo disponible en 285 pacientes de los cuales 213 (77%) estaban infectados por G1, 11 (4%) por G2, 43 (15%) por G3, 11 (4%) con genotipo viral 4 y 7 (2%) presentaban coinfecciones con diferentes genotipos virales.

Los pacientes fueron tratados con monoterapia con PegIFN α recombinante o con terapia combinada PegIFN α y ribavirina según el año del diagnóstico. Según la respuesta a la terapia evaluada a los seis meses del tratamiento, los pacientes se clasificaron en dos grupos:

- 1) Respuesta viral sostenida (RS) aquellos pacientes con carga viral indetectable a los 6 meses de finalizar el tratamiento.
- 2) Respuesta no sostenida (RNS), aquellos que no respondieron al tratamiento o recayeron al interrumpir la terapia.

El resultado de carga viral a los seis meses del tratamiento estuvo disponible en 267 pacientes de los cuales 114 (43%), recibieron como tratamiento PegIFN α en monoterapia,

al resto, 153 (57%) se les administró terapia combinada. Después de evaluar la respuesta, 136 pacientes se incluyeron en el grupo de RS y 131 en el de RNS.

En 283 pacientes se realizó una biopsia hepática percutánea y se clasificaron en dos categorías, según el grado de fibrosis hepática de acuerdo a los criterios Scheuer (Scheuer, 1991):

- 1) No fibróticos o fibróticos leves (F0-F2).
- 2) Fibróticos avanzados o cirróticos (F3-F4).

Este dato estuvo disponible en 283 pacientes de los que 202 quedaron encuadrados en el grupo F0-F2 y 81 en el grupo F3-F4.

Pacientes co-infectados VHC/VIH.

Esta cohorte estaba formada por 182 pacientes (153 hombres y 29 mujeres) coinfectados por VHC y VIH. Respecto al genotipo de VHC, 87 pacientes (48%) estaban infectados por G1, 2 (1%) por G2, 65 (36%) por G3 y 28 (15%) por G4. Todos los pacientes fueron tratados con terapia combinada PegIFN α y ribavirina y el dato de respuesta al tratamiento a los seis meses estuvo disponible en 126 pacientes, de los cuáles, 68 se incluyeron en el grupo RS, y 58 en el grupo RNS. Con respecto al grado de fibrosis, 57 pacientes se clasificaron como F0-F2 y 69 como F3-F4.

Sujetos controles no infectados.

En este grupo se incluyeron 378 individuos donantes de médula ósea (223 hombres y 155 mujeres) no infectados por VHC ni por VIH. Este grupo se utilizó para determinar las frecuencias de los distintos polimorfismos seleccionados en nuestra población no infectada. Los sujetos se incluyeron después de la obtención del consentimiento informado.

Tabla 1. Resumen de las características de los grupos de pacientes incluidos en este estudio.

	AVE	VHC	VHC/VIH
Varones	36 (47%)	203 (58%)	153 (84%)
Mujeres	41 (53%)	145 (42%)	29 (16%)
G1		213 (77%)	87 (48%)
G2		11 (4%)	2 (1%)
G3		43 (15%)	65 (36%)
G4		11 (4%)	28 (15%)
Varios genotipos		7 (2%)	
Monoterapia		114 (43%)	
Terapia Combinada (TC)		153 (57%)	126 (100%)
RVS		136 (51%)	
RNS		131 (49%)	
TC-RS		77/153 (50%)	68 (54%)
TC-RNS		76/153 (50%)	58 (46%)
TC-RS-G1		37/101 (36%)	22/55 (40%)
TC-RS-No-G1		35/46 (76%)	46/71 (65%)
F0-F2		202 (71%)	57 (45%)
F3-F4		81 (29%)	69 (55%)

2. MÉTODOS

2.1. Extracción de ADN

Como material de partida, se utilizó sangre periférica obtenida por venopunción y recogida directamente en tubos estériles con EDTA o ACD como anticoagulante y congelada a -20°C. El ADN fue extraído a partir de células totales con el kit comercial “QIAamp DNA Mini Kit” (Qiagen®) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN así obtenido se conservó a -20 °C hasta su utilización.

2.2. Selección de SNPs

2.2.1. *IL28B*

La selección del polimorfismo rs12979860 para el estudio de este locus, se hizo a partir de los resultados obtenidos en los estudios GWAs que sugerían asociación de este SNP con respuesta al tratamiento en individuos americanos de origen europeo y africano (Ge *et al*, 2009).

2.2.2. *HAVCR1*

La selección del polimorfismo rs953569 se hizo a partir de resultados publicados con el AVE en población americana de origen europeo (Mosbrugger *et al*, 2010). Los SNPs rs2134230, rs2277025, rs6878732, rs13173581 y rs2279804 y las 3 variantes estructurales (Ins/Del) localizadas en el exón 4 se seleccionaron por trabajos previos de nuestro grupo (García-Lozano *et al*, 2010). Los haplotipos se construyeron por combinación de los diferentes marcadores estudiados según los datos ya publicados (García-Lozano *et al*, 2010).

2.2.3. *TANK, TNFSF18 e IL28BP*

Utilizamos la base de datos del proyecto HapMap (<http://www.hapmap.org/index.html>) para seleccionar los tSNPs con frecuencia del alelo minoritario (MAF) igual o superior al 10% en población CEU, que nos permitiera capturar el 100% de los SNPs de cada una de las regiones con $r^2 > 0,8$. De esta manera, para la región Chr2:161689367..161800900 del locus *TANK* se seleccionaron 8 tSNPs con los que capturábamos los 15 SNPs de esa región. Para la región Chr11:71367189..71411859 del locus *IL18BP* se seleccionaron 3. Por último, para la región Chr1:171271937..171303871 del locus *TNFSF18* se seleccionaron 4 tSNPs con los que capturamos los 10 SNPs de la región. La tabla 2 muestra los diferentes tSNPs seleccionados y su localización en cada gen.

La distribución genotípica y alélica de los tSNPs se obtuvo mediante el programa Plink. Los haplotipos se construyeron por combinación de los diferentes marcadores estudiados en los genes *TANK*, *TNFSF18* e *IL28BP* en los sujetos controles no infectados mediante el programa Haploview (versión 4.1), disponible en: www.broad.mit.edu/mpg/haploview/download.php. La asignación de los haplotipos en la población de estudio se realizó con el programa FamHap disponible en <http://iweb.meb.uni-bonn.de/famhap/> (Becker *et al*, 2004).

2.3. Genotipado de SNPs mediante ensayos taqman

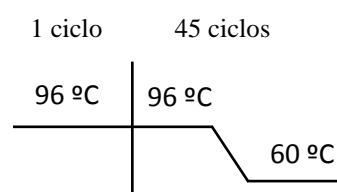
El genotipado de los SNPs se realizó utilizando ensayos TaqMan diseñados por Applied Biosystems® en un equipo 7500-Fast de PCR en tiempo real de esta misma casa comercial. Cada ensayo TaqMan consistía en una pareja de cebadores y una sonda marcada en el extremo con VIC para un alelo y con FAM para el otro. En la tabla 2 también se recoge la información del ensayo TaqMan de cada SNP. Para el SNP rs12979860 no había un ensayo comercial disponible y se diseñaron los siguientes cebadores: 5´ GCCTGTCGTGTACTGAACCA 3´ (directo) y 5´ GCGCGGAGTGCAATTCAAC 3´ (reverso); y las siguientes sondas: 5´ TGGTTCGCGCCTTC 3´ (VIC) y 5´ CTGGTTCACGCCTTC 3´ (FAM).

Las condiciones y parámetros empleados para la amplificación y discriminación de los alelos fueron las siguientes:

Mezcla de reacción (Volumen final 5 µl):

0,5 µl de ADN
 2,5 µl de tampón PCR 2x
 0,125 µl de primers/sondas 40x
 1,875 µl de agua bidestilada

Parámetros de PCR:



Los genotipos se asignaron usando el software para discriminación alélica SDS 1.3 de Applied Biosystems®.

Tabla 2: tSNPs estudiados en cada gen y localización. Referencias de los ensayos TaqMan utilizados en cada caso.

<i>IL28B</i>	Localización	Ensayo TaqMan AB®
rs12979860 (C/T)	Región 5´	No comercial
<i>HAVCRI</i>		
rs2134230 (G/C)	Intrón 8	C__16105595_10
rs2277025 (T/C)	Intrón 7	C__15883194_10
rs6878732 (T/A)	Intrón 6	C__1453968_10
rs13173581 (T/C)	Intrón 5	C__1453954_10
rs953569 (G/T)	Intrón 4	C__1453925_10
rs2279804 (T/C)	Intrón 4	C__15968668_20
<i>TANK</i>		
rs6713215 (A/G)	Región 5´	C__29129177_10
rs17705608 (A/G)	Región 5´	C__33259251_10
rs1267068 (G/T)	Intrón 1	C__8944377_10
rs7568498 (G/T)	Intrón 1	C__291291168_20
rs1267077 (A/G)	Intrón 2	C__8944385_10
rs1921310 (A/G)	Intrón 2	C__26633_10
rs11884495 (A/T)	Intrón 2	C__2860144_10
rs1267034 (A/G)	Intrón 4	C__8944392_10
<i>TNFSF18</i>		
rs723858 (A/T)	Intrón 1	C__2220685_10
rs9286880 (G/T)	Intrón 1	C__2462782_20
rs7546619 (C/T)	Región 5´	C__30243349_10
rs2223517 (A/G)	Región 5´	C__2955942_10
<i>IL28BP</i>		
rs7131230 (C/T)	Región 5´(Intrón 5 gen <i>RNF121</i>)	C__29272437_10
rs2298455 (G/T)	Intrón 1	C__16189423_10
rs3793941 (A/G)	Región 3´(Intrón 15 gen <i>NUMA1</i>)	C__27483981_10

2.4. Genotipado de variantes estructurales del exón 4 del gen *HAVCR1* mediante electroforesis capilar.

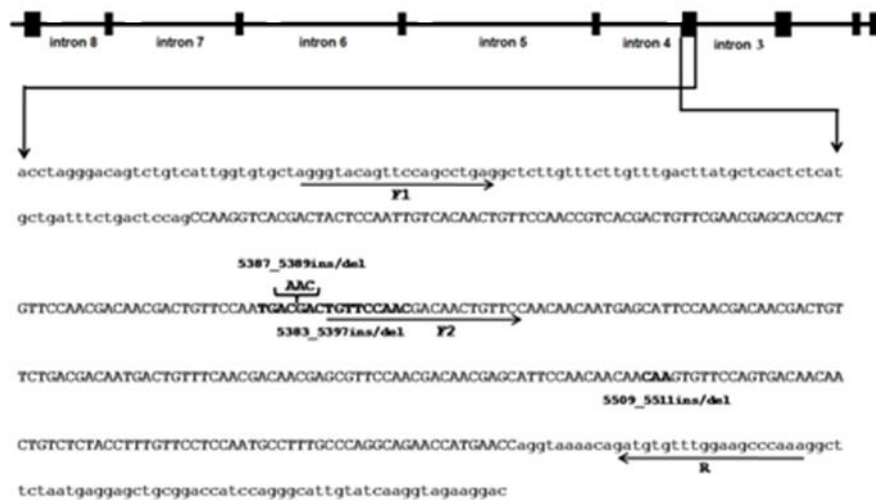
2.4.1. Amplificación

Se analizaron tres variantes localizadas en el exón 4 y consistentes en Ins/Del: 5383_5397ins/del (rs6149307), 5387_5389ins/delAAC y 5509_5511ins/delCAA (rs45439103). Las muestras se analizaron con los cebadores F1 y R marcado en el extremo 5' con WellRED D4-PA. En los casos en los que fue necesario (ver más adelante), se realizó una segunda amplificación con los cebadores F2 y R (tabla 3 y figura 12).

Tabla 3. Cebadores utilizados para amplificar el gen *HAVCR1*.

HAVCR1	Cebadores (5'-3')
F1	GGCTACAGTTCCAGCCTGAG
F2	GTTCCAACGACAACCTGTTCC
R	WellRED D4-PACTTTGGGCTTCCAAACACAT

Figura 12: Localización de los cebadores usados para genotipar las tres variantes Ins/Del del exón 4 del gen *HAVCR1*. Secuencia del gen obtenida a partir de GenBank, con número de acceso AC026777.

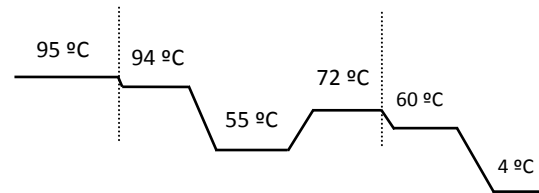


Las condiciones y parámetros empleados para las amplificaciones fueron:

Mezcla de reacción (Volumen final 10 µl):

20-40 ng de DNA
 500 µM de MgCl₂
 2,5 µM de cada cebador
 500 µM de cada dNTP
 1 µl de tampón PCR 10x
 0,25 U de Taq DNA polimerasa
 Agua bidestilada hasta un volumen final 10 µl.

Parámetros de PCR:



2.4.2. Electroforesis capilar

El producto de PCR se diluyó en proporción 1/10 con ddH₂O y 2,5 µl de esta dilución se mezcló con 0,5 µl del marcador de peso molecular Genomalab DNA Size Standard Kit 400 (Beckman Coulter) y 37 µl de SLS (Sample Loading Solution, Beckman Coulter). La electroforesis capilar se realizó en un equipo CEQ8000 Genetic Analysis Sytem (Beckman Coulter®). El tamaño de los fragmentos se determinó utilizando el programa “Fragment Analysis Module Software” que asigna el tamaño de los fragmentos interpolando los datos de cada muestra en función del marcador de peso molecular.

La amplificación del gen *HAVCRI* con los cebadores F1 y R podían dar los siguientes fragmentos: 382, 397 y 400 pb. El fragmento de 382 pb correspondía a la combinación: 5509_5511ins, 5387_5389del, 5383_5397del; y el fragmento de 400 pb a la combinación: 5509_5511ins, 5387_5389ins, 5383_5397ins. Sin embargo, el fragmento de 397 pb podía corresponder a dos combinaciones: 5509_5511del, 5387_5389ins, 5383_5397ins ó 5509_5511ins, 5387_5389del, 5383_5397ins. Para poder distinguir estas dos combinaciones, las muestras de 397 pb se amplificaron con la pareja de cebadores F2 y R. La amplificación de las muestras de 397 pb con esta pareja de cebadores origina dos fragmentos de diferentes tamaños, uno de 222 pb correspondiente a la variante 5509_551ins, y otro de 219 pb correspondiente a la variante 5509_551del (García-Lozano *et al*, 2010). La tabla 4 recoge los haplotipos formados por estas tres variantes estructurales del exón 4.

Tabla 4. Frecuencias alélicas del exón 4 del gen *HAVCRI* en población sana española.

F1-R	F2-R	5509_5511ins/del	5387_5389ins/del	5383_5397ins/del
382	222	ins	del	del
397	219	del	ins	ins
397	222	ins	del	ins
400	222	ins	ins	ins

(Obtenido del trabajo García-Lozano et al, 2010)

2.5. Análisis estadístico

Para comparar las distribuciones de los alelos y genotipos entre los diferentes grupos se utilizó el test de χ^2 de Pearson, aplicando modelos de herencia dominante y recesiva. En las tablas de contingencia 2x2, cuando algunos de los valores fueron inferiores a 5, se aplicó el test exacto de Fisher. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. En estos casos se calculó el Odds ratio (OR) con su correspondiente intervalo de confianza al 95% (95%CI). El estudio estadístico se llevó a cabo empleando el programa OpenEpi v2.3 (<http://www.openepi.com>).

RESULTADOS

A continuación se muestran los resultados de los polimorfismos seleccionados en los genes incluidos en el estudio en las cohortes de pacientes y controles, con respecto al aclaramiento viral espontáneo, la respuesta al tratamiento y el grado de fibrosis. Las frecuencias alélicas y genotípicas de cada uno de los polimorfismos seleccionados se determinaron en un grupo de controles sanos no infectados, considerándose estas frecuencias “normales” en población española. Todos los polimorfismos genéticos incluidos en este estudio estaban en equilibrio Hardy-Weinberg, tanto en la población de controles no infectados como en la población general de pacientes. Los datos referentes a los pacientes mono infectados y coinfectados con VIH se han analizado de manera independiente, tratándose como dos cohortes diferentes. En el análisis de los haplotipos, el haplotipo “R” incluye cualquier haplotipo de la población excepto el haplotipo que se está estudiando.

1. *IL28B*

El genotipo se asignó inequívocamente en el 99% de las muestras. La distribución genotípica y las frecuencias alélicas de la población general obtenidas en el grupo control fueron: CC: 44,7%, CT: 42,1% y TT: 13,2%. $f(C) = 0,66$ y $f(T) = 0,34$.

La tabla 5 muestra los datos de distribución de los genotipos del rs12979860 de los pacientes con AVE y VHC de la cohorte de mono infectados. Cuando analizamos estos resultados se observó que el 72,5% de los individuos AVE tenían genotipo CC en comparación con el 45,6% de los pacientes VHC ($p=6,2 \times 10^{-5}$; OR=0,32; 95%CI=0,17-0,59). El porcentaje de individuos con genotipo CC de los pacientes VHC fue similar al del grupo control ($p=0,82$).

Tabla 5. Distribución de los genotipos del rs12979860 en los pacientes AVE y VHC.

rs12979860	VHC (n=283)	AVE (n=69)	p	OR 95%IC
CC (%)	129 (56.6)	50 (72.5)	6.2 x 10 ⁻⁵	0.32 (0.18-0.57)
CT+TT (%)	154 (54.4)	19 (27.5)		

Debido a la relación descrita entre el sexo femenino y el AVE, para descartar un posible sesgo debido al género de los individuos, analizamos la frecuencia del genotipo CC en el grupo de AVE separando los hombres y las mujeres. La distribución genotípica de este

polimorfismo fue similar en ambos grupos, ya que el 72,4% de los hombres y el 72,5% de las mujeres presentaba este genotipo en el rs12979860 en el grupo AVE ($p=1,0$)

En la tabla 6 se recogen los datos de distribución del genotipo rs12979860 (CC vs. CT+TT) de los pacientes VHC y VHC/VIH según su respuesta al tratamiento. El genotipo CC se encontraba aumentado entre los pacientes con respuesta viral sostenida (RS) con respecto al grupo de pacientes con respuesta no sostenida (RNS), tanto en los pacientes mono infectados (60,2% vs. 32,1%; $p=3,1 \times 10^{-5}$; OR=0,31; 95% CI=0,17-0,56) como en los pacientes coinfectados (66,2% vs. 31,0%, $p=8,4 \times 10^{-5}$; OR=0,23; 95% CI=0,10-0,45). Este aumento del del genotipo CC en los pacientes con RS era independiente de que tratamiento recibido por los pacientes VHC hubiese sido monoterapia (IFN α) o terapia combinada (IFN α y Ribavirina).

Tabla 6. Distribución de los genotipos del **rs12979860** en los pacientes mono infectados VHC y en los pacientes coinfectados VHC/VIH según la **respuesta al tratamiento antiviral**. Los pacientes VHC se estratificaron también según hubiesen recibido IFN α en monoterapia o en combinación con ribavirina.

		CC (%)	CT+TT (%)	p	OR 95 %IC
VHC	Grupo Completo				
	RNS (N=106)	34 (32.1)	72 (67.9)	3.1×10^{-5}	0.31 (0.17-0.56)
	RS (N=113)	68 (60.2)	45 (39.8)		
	IFNα				
	RNS (N=54)	20 (37.0)	34 (63.0)	0.001	0.39 (0.17-0.89)
	RS (N=58)	35 (60.3)	23 (39.7)		
IFNα + RBV					
RNS (N=52)	14 (26.9)	38 (73.1)	5.6×10^{-4}	0.25 (0.10-0.60)	
RS (N=55)	33 (60.0)	22 (40.0)			
VHC/VIH	IFNα + RBV				
	RNS (N=58)	18 (31.0)	40 (69.0)	8.4×10^{-5}	0.23 (0.10-0.45)
RS (N=68)	45 (66.2)	23 (33.8)			

RS: Respuesta sostenida; RNS: Respuesta no sostenida; RBV: Ribavirina

En la tabla 7 se muestran los datos de distribución de los genotipos del rs12979860 en relación con el genotipo viral en los pacientes en los que este dato estaba disponible. El genotipo CC fue mayor en los pacientes infectados por No-G1 que en los pacientes

infectados por G1, tanto en el grupo de mono infectados (66,7% vs. 39,1%; $p=8,5 \times 10^{-5}$, OR=0,32; 95%CI=0,17-0,60), como en el grupo de coinfectados (56,8% vs. 41,4%; $p=0,03$; OR=0,53; 95%CI=0,29-0,96). El porcentaje del genotipo CC entre los pacientes infectados por G1 fue similar al del grupo control no infectado (44,7%, $p=0,40$).

Tabla 7. Distribución de los genotipos del **rs12979860** en los pacientes infectados con **genotipo viral 1 (G1)** y en los infectados por cualquier otro genotipo (No-G1).

		CC (%)	CT+TT (%)	p	OR 95 %IC
VHC	G1 (N=210)	82 (39.1)	128 (60.9)	8.5×10^{-5}	0.32 (0.17-0.60)
	No-G1 (N=66)	44 (66.7)	22 (33.3)		
VHC/VIH	G1 (N=87)	36 (41.4)	51 (58.6)	0.03	0.53 (0.29-0.96)
	No-G1 (N=95)	54 (56.8)	41 (43.2)		

Cuando los pacientes se estratificaron según sus genotipos virales, se observó que entre los pacientes infectados por No-G1, la tasa de RS fue del 87,2% para los que tenían genotipo CC y del 84.2% para los de genotipo CT+TT ($p=0.76$). Sin embargo, entre los pacientes infectados por G1, la tasa de RS fue del 53.9% en los pacientes con genotipo CC frente al 29.6% en los pacientes con genotipo CT+TT ($p=0,0019$, OR=0,36, 95%CI=0,18-0,73). Resultados similares se encontraron en el grupo de coinfectados, donde agrupamos los virus G4 con los virus G1, ya que ambos virus son los de peor RS y en esta cohorte el porcentaje de G4 era considerablemente superior que en mono infectados (15% vs. 4%). Así, los individuos infectados por G1-G4 y con genotipo CC tenían una tasa de respuesta del 70,4% frente al 23,3% de los individuos CT+TT y los individuos infectados por G2-G3 y eran CC tenían una tasa de respuesta del 72,2% frente al 65% de los individuos CT+TT. Estos datos se representan en la siguiente tabla (tabla 8).

Tabla 8. Tasas de respuesta al tratamiento teniendo en cuenta el genotipo viral y el polimorfismo *IL28B*.

	VHC	RNS (%)	RS (%)	p	OR 95 %IC
G1	CC (N=63)	29 (46.1%)	34 (53.9%)	0.0019	0.36 (0.18-0.73)
	CT+TT (N=98)	69 (70.4%)	29 (29.6%)		
No-G1	CC (N=39)	5 (12.8%)	34 (87.2%)	0.76	
	CT+TT (N=19)	3 (15.8%)	16 (84.2%)		
	VHC/VIH	RNS (%)	RS (%)	p	OR 95 %IC
G1+4	CC (N=27)	8 (29.6%)	19 (70.4%)	0.01	0.28 (0.11-0.74)
	CT+TT (N=43)	33 (76.7%)	10 (23.3%)		
G2+G3	CC (N=36)	10 (27.8%)	26 (72.2%)	0.58	
	CT+TT (N=20)	7 (35%)	13 (65%)		

Por último, en la tabla 9 se muestran los datos de distribución del genotipo del rs12979860 en relación con el grado de fibrosis, no observándose diferencias significativas en este caso.

Tabla 9. Distribución de los genotipos del rs12979860 en los pacientes divididos según su grado de fibrosis.

		CC (%)	CT+TT (%)	p	OR 95 %IC
VHC	F3-F4 (N=81)	35 (43.2)	46 (56.8)	0.61	
	F0-F2 (N=202)	94 (46.5)	108 (53.5)		
VHC/VIH	F3-F4 (N=69)	39 (56.5)	30 (43.5)	0.22	
	F0-F2 (N=57)	26 (45.6)	31 (54.4)		

2. *HAVCR1*

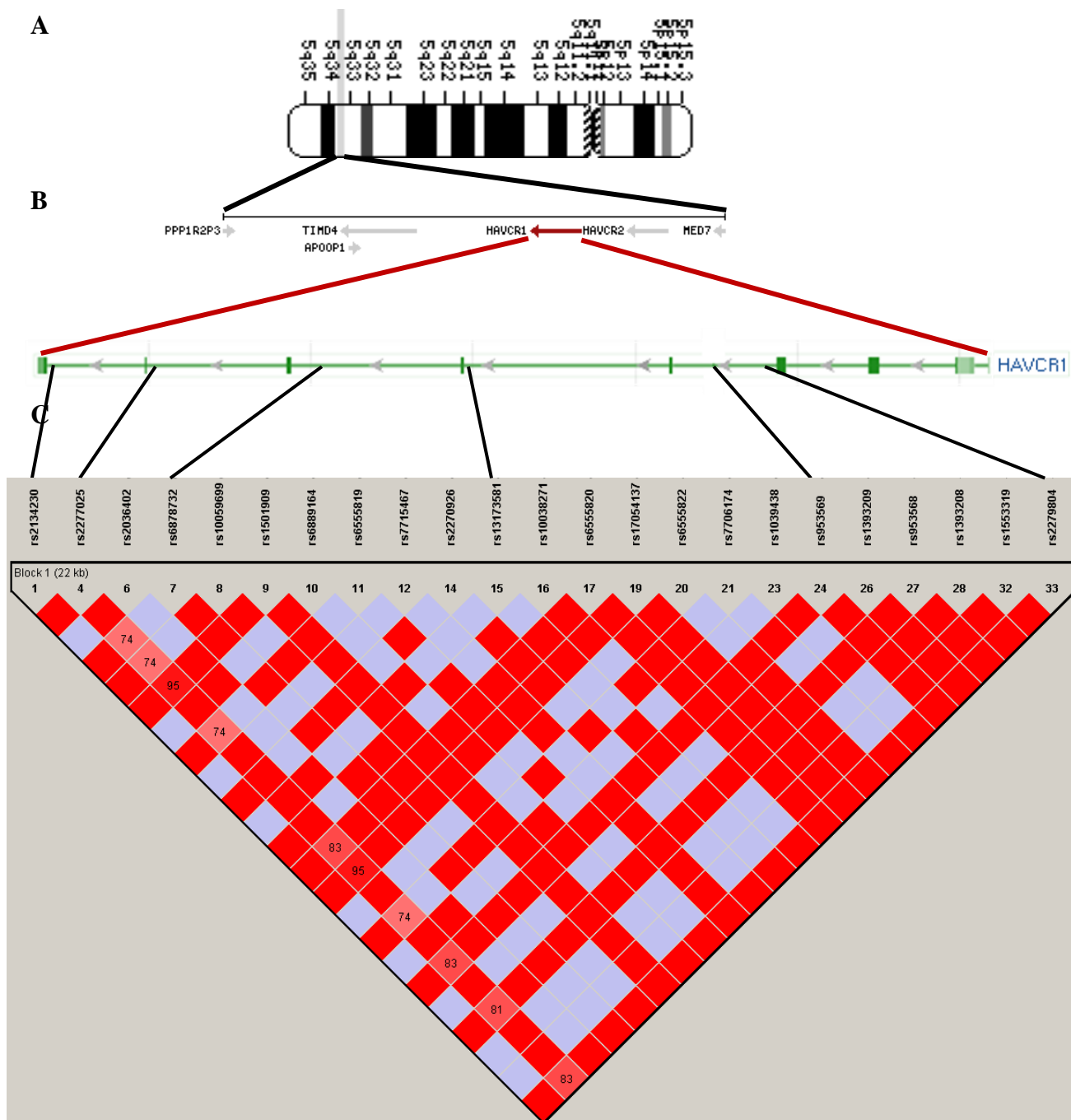


Figura 13: Esquema del gen *HAVCR1*. Localización de los SNPs analizados dentro del bloque de ligamiento descrito en la región Chr5:156389535..156412001 en población CEU en HapMap project. A) Situación del *locus HAVCR1* en el cromosoma 5. B) Entorno genómico del gen *HAVCR1* en la región 5q33.2. C) Posición relativa de los SNPs en el gen *HAVCR1* y representación gráfica del desequilibrio de unión entre los SNP estudiados (se muestra el diagrama elaborado con Haploview para el parámetro D' , correspondiente al desequilibrio de unión normalizado. Las cifras en los recuadros son los valores de los parámetros multiplicados por 100. Los recuadros rojos sin cifra indican que el valor es máximo (1)).

El estudio del gen *HAVCRI* con la historia natural de la infección por el VHC se centró, inicialmente, en el rs953569 porque se había encontrado asociado con AVE en población americana de origen africano y europeo (Timothy L *et al*, 2010). Posteriormente, y basándonos en un trabajo previo de nuestro grupo en el que describimos relación entre determinados haplotipos y los niveles de mRNA, genotipamos los tag SNPs incluidos en dicho trabajo para construir esos haplotipos. La tasa de éxito del genotipado para todos los polimorfismos estudiados fue del 99% y los haplotipos se asignaron inequívocamente en el 98% de las muestras.

Con respecto al rs953569, la distribución de los genotipos y las frecuencias alélicas en el grupo control fueron: GG: 27.18%, GT: 50.00% y TT: 22.82%. $f(G) = 0.52$ y $f(T) = 0.48$. En la tabla 10 se muestran los datos de distribución de los genotipos y alelos entre pacientes con VHC de la cohorte de mono infectados y pacientes con AVE. No se encontró asociación entre este polimorfismo y la resolución espontánea del virus con ninguno de los modelos de herencia considerados. Tampoco se encontró asociación entre este marcador y la respuesta al tratamiento o el grado de fibrosis en las dos cohortes de pacientes (tabla 11). Sin embargo, se observó que en el grupo de pacientes mono infectados, el genotipo TT estaba aumentado en los individuos infectados por No-G1 con respecto a los G1 (38,47% vs. 19,34%; $p=0,001$; $OR=0,38$; $95\%IC=0,20-0,70$); no obstante, esta asociación no se encontró en la cohorte de coinfectados.

Tabla 10: Distribución del genotipo del **rs953569** entre individuos mono infectados con **VHC** y **AVE** según los diferentes modelos considerados

Modelo	VHC (n=283)	AVE (n=69)	P	OR 95%IC
Genotípico	68/133/82	14/36/19	0.71	
Alélico	269/299	64/74	0.83	
Dominante	201/82	50/19	0.81	
Recesivo	68/215	14/55	0.51	

Alelo minoritario T, alelo mayoritario G. Los modelos dominante y recesivo se refieren al alelo minoritario por tanto, en este caso, dominante: TT+GT vs. GG y recesivo: TT vs. GT+GG

Tabla 11: Distribución de los individuos de los grupos de pacientes VHC y VHC/VIH según los resultados de su genotipado en el **rs953569** y su **respuesta al tratamiento**, el **genotipo viral** con el que se encontraron infectados (G1 y No-G1) y su **grado de fibrosis**.

Modelo	VHC		P	OR 95%IC	VHC/VIH		P	OR 95%IC
	RS (n=113)	NRS (n=106)			NRS (n=58)	RS (n=68)		
Genotípico	25/53/35	19/59/28	0.42		11/29/17	13/35/20	0.99	
Alélico	103/123	97/115	0.97		51/63	61/75	0.98	
Dominante	78/35	78/28	0.45		40/17	48/20	0.95	
Recesivo	25/88	19/87	0.44		11/46	13/55	0.97	

Modelo	VHC		P	OR 95%IC	VHC/VIH		P	OR 95%IC
	G1 (n=212)	No-G1 (n=66)			G1 (n=87)	No-G1 (n=95)		
Genotípico	41/106/65	25/23/17	0.006		15/44/27	20/50/25	0.69	
Alélico	188/236	73/57	0.018	0.62 (0.41-0.92)	74/98	90/100	0.40	
Dominante	147/65	48/17	0.482		59/27	70/25	0.45	
Recesivo	41/171	25/40	0.001	0.38 (0.20-0.70)	15/71	20/75	0.53	

Modelo	VHC		P	OR 95%IC	VHC/VIH		P	OR 95%IC
	F3-F4 (n=81)	F0-F2 (n=202)			F3-F4 (n=69)	F0-F2 (n=57)		
Genotípico	22/35/23	40/102/59	0.35		15/44/27	20/50/25	0.79	
Alélico	79/81	182/220	0.37		74/98	90/100	0.53	
Dominante	57/23	142/59	0.92		59/27	70/25	0.67	
Recesivo	22/58	40/161	0.16		15/71	20/75	0.52	

Alelo minoritario T, alelo mayoritario G. Los modelos dominante y recesivo se refieren al alelo minoritario por tanto, en este caso, dominante: TT+GT vs. GG y recesivo: TT vs. GT+GG

A continuación, la tabla 12 muestra los haplotipos (A-D) formados por la combinación de las variantes del exón 4 y los 5 tag SNPs seleccionados e identificados previamente en el gen *HAVCR1* (García-Lozano *et al.*, 2010), incluyendo también el rs953569. El alelo rs953569G estaba en desequilibrio de ligamiento con los haplotipo A y C, mientras que el alelo rs953569T lo estaba con lo haplotipo B y D. En esta tabla se recogen las frecuencias de los haplotipos establecidos previamente en población control.

Tabla 12: Distribución de los **haplotipos del gen HAVCRI** con frecuencia superior a 0.10 construidos por la combinación de las variantes Ins/Del del exón 4 y los 6 tag SNPs seleccionados en este trabajo en población española no infectada.

Haplotipo	Tag SNPs						Variantes Exón 4 (Insercion/delecion)			Frec. (n=640)
	rs2134230	rs2277025	rs6878732	rs13173581	rs953569	rs2279804	5509_5511	5387_5389	5383_5397	
A	G	T	T	T	G	T	Ins	Del	Del	0.331 (212)
B	G	C	T	C	T	C	Ins	Del	Del	0.206 (132)
C	C	T	A	C	G	T	Del	Ins	Ins	0.190 (122)
D	G	T	T	C	T	C	Ins	Del	Ins	0.109 (70)
Otros										0.164 (104)

(Obtenido del trabajo García-Lozano et al, 2010, y modificado para incluir rs953569)

En las tabla 13 y 14 se recogen los resultados de la distribución de estos haplotipos en relación con el AVE y la respuesta al tratamiento respectivamente, según los diferentes modelos estudiados. No se encontró asociación de los haplotipos *HAVCRI* con el aclaramiento viral espontáneo ni con el mediado por tratamiento, ni en los pacientes VHC ni en VHC/VIH. Sin embargo, cuando analizamos el genotipo viral (tabla 15), encontramos que entre los individuos infectados por G1, el haplotipo C fue más frecuente que entre los individuos infectados por No-G1, tanto en el grupo VHC (45,93% vs. 26,56%; $p=0,006$; OR=2,35, 95%IC=1,27-4,33) como en el grupo VHC/VIH (48,83% vs. 28,42%; $p=0,006$; OR=2,40; 95%IC=1,30-4,43), encontrándose en ambas cohortes un modelo dominante de asociación. Por otra parte, el haplotipo D se ajustaba a un modelo de asociación recesivo en la cohorte de monoinfectados, siendo más frecuente entre los pacientes infectados por No-G1 que entre los infectados por G1 (7,8% vs. 0,96%; $p=0,002$; OR=0,11; 95%IC=0,02-0,60), pero esta asociación no se confirmó en la cohorte de pacientes VHC/VIH, por lo que podría ser una falsa asociación debido a la baja frecuencia del haplotipo D. Debido a que la asociación encontrada entre el haplotipo C y genotipo viral en ambas cohortes tenía un OR similar, estudiamos la ratio de infección por virus G1 y No-G1 sumando las dos cohortes y la comparamos con la ratio de infección de los otros haplotipos. Los individuos con haplotipo C tenían la tasa de infección por virus G1 más alta que los individuos con haplotipo D (75,82% vs. 57,75%, $p=0,001$; OR=2,29; 95%CI=1,39-3,78) y haplotipo A y B (66,51% y 65,36%, respectivamente, $p=0,024$; OR=1,66; 95%CI =1,06-2,59).

Por último, con respecto a la afectación hepática, no se encontró asociación entre esta variable y el locus *HAVCRI*, ya que se observó una distribución del gen *HAVCRI* similar

entre el grupo de pacientes clasificados como fibrosis leves y el de avanzados, tanto en los pacientes VHC como VHC/VIH (tabla 16).

Tabla 13: Distribución de los **haplotipos** identificados en la **región Chr5:156389535..156412001** del locus **HAVCR1** en los pacientes **AVE** y **monoinfectados VHC**. Sólo se muestran los haplotipos con frecuencia superior a 0.10.

Locus	Haplot1	Haplot2	Modelo	VHC (n=283)	AVE (n=69)	P	OR(95%CI)
HAVCR1	A	R	Genotípico	22/118/140	5/33/31	0.69	
			Alélico	162/398	43/95	0.60	
			Dominante	140/140	38/31	0.45	
			Recesivo	22/258	5/64	0.87	
	B	R	Genotípico	22/105/153	3/32/34	0.31	
			Alélico	149/411	38/100	0.82	
			Dominante	127/153	35/34	0.42	
			Recesivo	22/258	3/66	0.31	
	C	R	Genotípico	16/98/166	4/23/42	0.96	
			Alélico	130/430	31/107	0.85	
			Dominante	114/166	27/42	0.81	
			Recesivo	16/264	4/65	0.97	
	D	R	Genotípico	6/71/203	1/19/49	0.88	
			Alélico	83/477	21/117	0.90	
			Dominante	77/203	20/49	0.80	
			Recesivo	6/274	1/68	0.71	

Tabla 14: Distribución de los **haplotipos** identificados en la **región Chr5:156389535..156412001 del locus *HAVCR1*** en las cohortes de pacientes VHC y VHC/VIH según su **respuesta al tratamiento**. Sólo se muestran los haplotipos con frecuencia superior a 0.10.

Locus	Haplot1	Haplot2	Modelo	VHC				VHC/VIH			
				RNS (n=106)	RS (n=113)	P	OR(95%CI)	RNS (n=58)	RS (n=68)	P	OR(95%CI)
<i>HAVCR1</i>	A	R	Genotípico	9/50/46	7/42/63	0.18		6/23/29	8/26/34	0.96	
			Alélico	68/142	56/168	0.09		35/81	42/94	0.90	
			Dominante	59/46	55/63	0.15		29/29	34/34	1.00	
			Recesivo	9/96	7/105	0.51		6/52	8/60	0.80	
	B	R	Genotípico	5/44/56	6/43/63	0.86		6/21/31	5/23/40	0.76	
			Alélico	54/156	55/169	0.78		33/83	33/103	0.45	
			Dominante	49/56	49/63	0.66		27/31	28/40	0.54	
			Recesivo	4/54	6/106	0.68		6/52	5/63	0.55	
	C	R	Genotípico	5/38/62	5/47/60	0.68		4/18/36	5/20/43	0.97	
			Alélico	48/162	57/167	0.52		26/90	30/106	0.94	
			Dominante	43/62	52/60	0.41		22/36	25/43	0.89	
			Recesivo	5/100	5/107	0.91		4/54	5/63	0.92	
	D	R	Genotípico	1/28/76	2/26/84	0.74		2/8/48	2/16/50	0.38	
			Alélico	30/180	30/194	0.78		12/104	20/116	0.30	
			Dominante	29/76	28/84	0.66		10/48	18/50	0.21	
			Recesivo	1/104	2/110	0.59		2/56	2/66	0.87	

Tabla 15: Distribución de los **haplotipos** identificados en la **región Chr5:156389535..156412001 del locus HAVCR1** en las cohortes de pacientes VHC y VHC/VIH infectados con G1 y No-G1. Ratio de infección por virus G1 y No-G1 sumando las dos cohortes Sólo se muestran los haplotipos con frecuencia superior a 0.10.

Locus	Haplot1	Haplot2	Modelo	VHC				VHC/VIH			
				G1 (n=213)	No-G1 (n=65)	P	OR(95%CI)	G1 (n=87)	No-G1 (n=95)	P	OR(95%CI)
HAVCR1	A	R	Genotípico	16/91/102	6/20/38	0.21		8/34/44	11/38/46	0.86	
			Alélico	123/295	32/96	0.33		50/122	60/130	0.60	
			Dominante	107/102	26/38	0.13		42/44	49/46	0.71	
			Recesivo	16/193	6/58	0.65		8/78	11/84	0.61	
	B	R	Genotípico	14/83/113	8/21/35	0.26		7/37/49	7/35/53	0.90	
			Alélico	111/309	37/91	0.58		51/135	49/141	0.72	
			Dominante	97/112	29/35	0.87		37/49	42/53	0.87	
			Recesivo	14/196	8/56	0.13		7/86	7/88	0.96	
	C	R	Genotípico	10/86/113	6/11/47	0.001		4/38/44	7/27/68	0.038	
			Alélico	106/312	23/105	0.083	1.55 (0.93-2.56)	46/126	41/163	0.123	
			Dominante	96/113	17/47	0.006	2.35 (1.27-4.33)	42/44	27/68	0.006	2.40 (1.30-4.43)
			Recesivo	10/199	6/58	0.192		4/82	7/95	0.510	
	D	R	Genotípico	2/48/159	5/18/41	0.008		2/15/69	3/23/69	0.48	
			Alélico	52/366	28/100	0.008	0.5 (0.30-0.84)	19/153	29/161	0.23	
			Dominante	50/159	23/41	0.058		17/69	26/69	0.23	
			Recesivo	2/207	5/59	0.002	0.11 (0.02-0.60)	2/84	3/92	0.76	

	Haplotipo A n (%)	Haplotipo B n (%)	Haplotipo C n (%)	Haplotipo D n (%)	Total n (%)
Cohort 1 +2					
Genotipo viral 1	149 (66.51)	134 (65.36)	138 (75.82)	67 (57.75)	488 (67,12)
Genotipo viral non-1	75 (33.49)	71 (34.64)	44 (24.18)	49 (42.25)	239 (32,88)

Haplotipo C vs. Haplotipo D: p= 0,001; OR=2,29; 95% CI (1,39-3,78)
Haplotipo C vs. Haplotipo A ó B: p=0,024; OR=1,66; 95% CI (1,06-2,59)

Tabla 16: Distribución de los **haplotipos** identificados en la **región Chr5:156389535..156412001 del locus *HAVCR1*** en las cohortes de pacientes VHC y VHC/VIH divididos según su **grado de fibrosis**. Sólo se muestran los haplotipos con frecuencia superior a 0.10.

Locus	Haplot1	Haplot2	Modelo	VHC				VHC/VIH			
				F3-F4 (n=66)	F0-F2 (n=153)	P	OR(95%CI)	F3-F4 (n=69)	F0-F2 (n=57)	P	OR(95%CI)
<i>HAVCR1</i>	A	R	Genotípico	3/26/37	12/65/76	0.54		9/21/38	5/25/27	0.30	
			Alélico	32/100	89/217	0.30		39/97	35/79	0.72	
			Dominante	29/37	77/76	0.38		30/38	30/27	0.34	
			Recesivo	3/63	12/141	0.37		9/59	5/52	0.43	
	B	R	Genotípico	4/26/36	11/61/81	0.94		8/25/35	4/17/36	0.38	
			Alélico	34/98	83/223	0.76		41/95	25/89	0.14	
			Dominante	30/36	72/81	0.82		33/35	21/36	0.18	
			Recesivo	4/62	11/142	0.76		8/60	4/53	0.36	
	C	R	Genotípico	3/29/34	8/53/92	0.42		5/21/42	3/20/34	0.81	
			Alélico	35/97	69/237	0.37		31/105	26/88	0.99	
			Dominante	32/34	61/92	0.23		26/42	23/34	0.80	
			Recesivo	3/63	8/145	0.83		5/63	3/54	0.63	
	D	R	Genotípico	1/18/47	4/38/111	0.83		2/12/54	2/14/41	0.61	
			Alélico	20/112	46/260	0.97		16/120	18/96	0.35	
			Dominante	19/47	42/111	0.83		14/54	16/41	0.32	
			Recesivo	1/65	4/149	0.61		2/66	2/55	0.85	

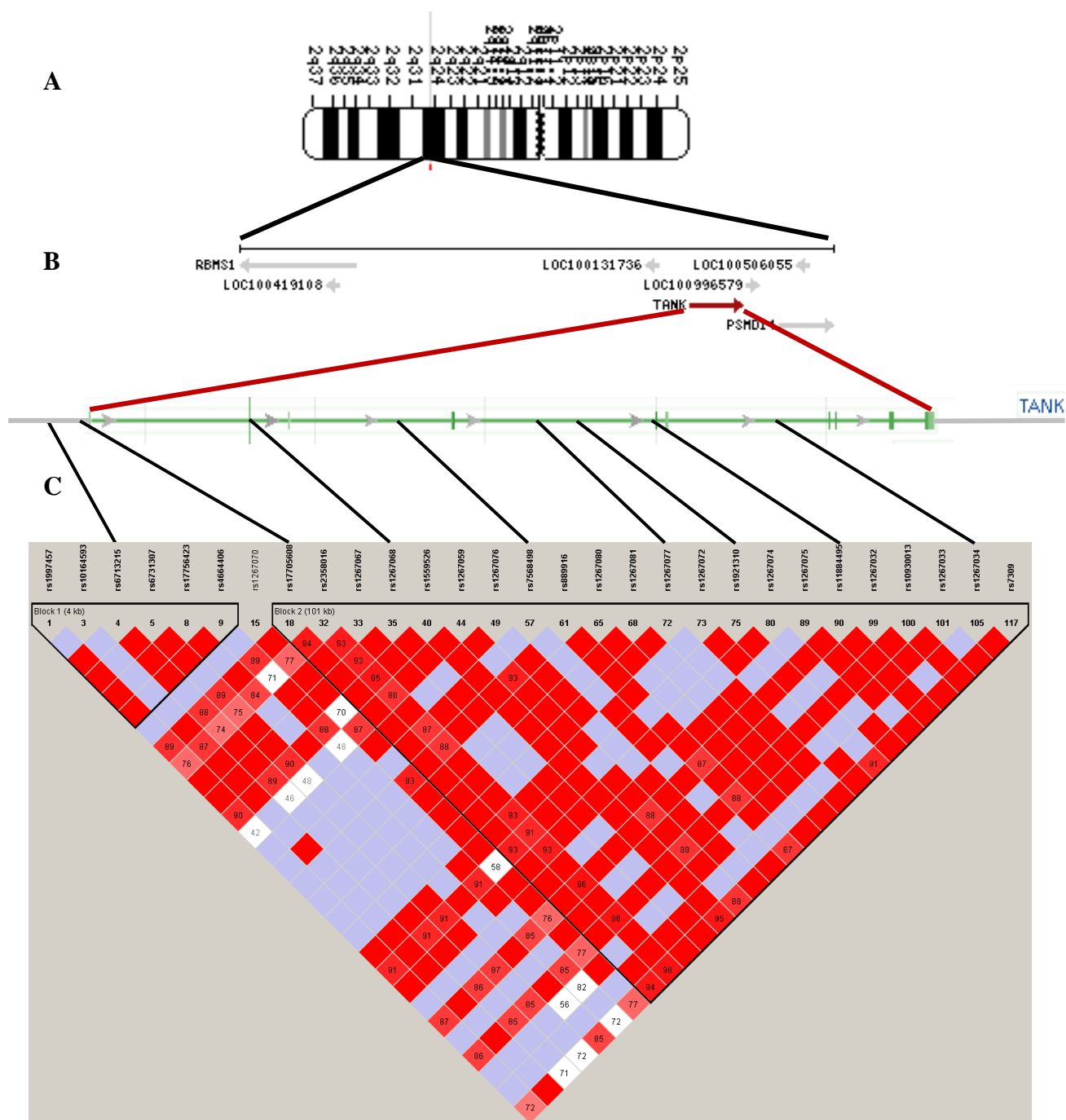
3. *TANK*

Figura 14: Esquema del gen *TANK*. Localización de los SNPs analizados dentro de los dos bloques de ligamiento descritos en la región Chr2:161689367..161800900 en población CEU en HapMap project. A) Situación del *locus TANK* en el cromosoma 2. B) Entorno genómico del gen *TANK* en la región 2q24-q31. C) Posición relativa de los SNPs en el gen *TANK* y representación gráfica del disequilibrio de unión entre los SNP estudiados (se muestra el diagrama elaborado con Haploview para el parámetro D' , correspondiente al disequilibrio de unión normalizado. Las cifras en los recuadros son los valores de los parámetros multiplicados por 100. Los recuadros rojos sin cifra indican que el valor es máximo (1)).

La tasa de éxito del genotipado para todos los polimorfismos estudiados fue del 99% y los haplotipos se asignaron inequívocamente en el 98% de las muestras. La tabla 17 recoge la distribución de los genotipos y las frecuencias alélicas de la población general obtenida en el grupo control no infectado para cada uno de los SNPs, así como los haplotipos con frecuencia superior al 10% encontrados en nuestra población teniendo en cuenta los 7 tag SNPs situados en el bloque de ligamiento de la región Chr2: 161699443..161800900 del locus *TANK*.

Tabla 17: Frecuencias genotípicas y alélicas en el grupo control no infectado.

Nombre SNP (X/Y)	Alelo Minoritario	XX	XY	YY	f (X)	f (Y)
rs6713215 (A/G)	A	3%	23.8%	73.2%	0.15	0.85
rs17705608 (G/A)	G	13%	46%	41%	0.36	0.64
rs1267068 (G/T)	G	9.7%	41.7%	48.6%	0.31	0.69
rs7568498 (G/T)	G	3.5%	25.4%	71%	0.16	0.84
rs1267077 (G/A)	G	3.8%	26.6%	69.6%	0.17	0.83
rs1921310 (G/A)	G	3.1%	33.3%	63.6%	0.20	0.80
rs11884495 (A/T)	A	24.2%	48.2%	27.6%	0.48	0.52
rs1267034 (G/A)	G	2.1%	20%	77.9%	0.12	0.88

X: Representa el alelo con frecuencia más baja, mientras que Y representa el alelo con frecuencia más alta en nuestra población

Distribución de los haplotipos con frecuencia superior a 0.10 correspondientes a la región Chr2: 161699443..161800900 del locus *TANK* en población española no infectada.

Haplotipo	rs17705608	rs1267068	rs7568498	rs1267077	rs1921310	rs11884495	rs1267034	Frec. (N=378)
A	G	T	T	A	G	A	A	0.187
B	G	T	T	A	A	A	A	0.172
C	A	T	T	G	A	T	A	0.166
D	A	G	G	A	A	T	A	0.158
E	A	G	T	A	A	T	G	0.115
F	A	T	T	A	A	A	A	0.110
Otros								0.092

Con respecto al **aclareamiento viral espontáneo**, las tablas 18 y 19 muestran la distribución de los genotipos y los datos para cada modelo de herencia de estos 8 tag SNPs y de los 6 haplotipos en los grupos AVE y VHC. No se observaron diferencias significativas en ningún caso.

Tabla 18: Distribución de los **8 SNPs** seleccionados en la región **TANK** en los pacientes VHC y AVE.

SNP	Alelo X	Alelo Y	Modelo	VHC (n=348)	AVE (n=77)	P	OR 95%IC
rs6713215	A	G	Genotípico	12/81/255	1/20/56	0.56	
			Alélico	105/591	22/132	0.80	
			Dominante	93/255	21/56	0.92	
			Recesivo	12/336	1/76	0.32	
rs17705608	G	A	Genotípico	45/160/142	10/35/32	0.99	
			Alélico	250/444	55/99	0.94	
			Dominante	205/142	45/32	0.92	
			Recesivo	45/302	10/67	0.99	
rs1267068	G	T	Genotípico	37/140/169	4/36/36	0.27	
			Alélico	214/478	44/108	0.63	
			Dominante	177/169	40/36	0.81	
			Recesivo	37/309	4/72	0.14	
rs7568498	G	T	Genotípico	14/89/245	1/19/57	0.48	
			Alélico	117/579	21/133	0.33	
			Dominante	103/245	20/57	0.53	
			Recesivo	14/334	1/76	0.24	
rs1267077	G	A	Genotípico	16/91/241	0/22/55	0.15	
			Alélico	123/573	22/132	0.31	
			Dominante	107/241	22/55	0.70	
			Recesivo	16/332	0/77	0.06	
rs1921310	G	A	Genotípico	11/115/221	2/26/49	0.96	
			Alélico	137/557	30/124	0.94	
			Dominante	126/221	28/49	0.99	
			Recesivo	11/336	2/75	0.79	
rs11884495	A	T	Genotípico	85/163/100	18/42/17	0.40	
			Alélico	333/363	78/76	0.53	
			Dominante	248/100	60/17	0.24	
			Recesivo	85/263	18/59	0.85	
rs1267034	G	A	Genotípico	8/65/275	1/20/56	0.32	
			Alélico	81/615	22/132	0.36	
			Dominante	73/275	21/56	0.22	
			Recesivo	8/340	1/76	0.98	

X: Representa el alelo con frecuencia más baja, mientras que Y representa el alelo con frecuencia más alta en nuestra población

Tabla 19: Distribución de los **haplotipos** identificados en la **región Chr2: 161699443..161800900 del locus TANK** en los pacientes AVE y VHC. Sólo se muestran los haplotipos con frecuencia superior a 0.10.

Locus	Haplot1	Haplot2	Modelo	VHC (n=348)	AVE (n=77)	P	OR(95%CI)
TANK	A	R	Genotípico	9/15/224	2/26/49	0.99	
			Alélico	33/463	30/124	0.91	
			Dominante	24/224	28/49	0.90	
			Recesivo	9/239	2/75	0.99	
	B	R	Genotípico	13/91/224	1/23/53	0.50	
			Alélico	117/539	25/129	0.63	
			Dominante	104/224	24/53	0.93	
			Recesivo	13/315	1/76	0.25	
	C	R	Genotípico	13/93/242	0/22/55	0.22	
			Alélico	119/577	22/132	0.39	
			Dominante	106/242	22/55	0.74	
			Recesivo	13/335	0/77	0.11	
D	R	Genotípico	14/88/246	1/19/57	0.48		
		Alélico	116/580	21/133	0.35		
		Dominante	102/246	20/57	0.55		
		Recesivo	14/334	1/76	0.24		
E	R	Genotípico	8/62/278	1/19/57	0.34		
		Alélico	78/618	21/133	0.39		
		Dominante	70/278	20/57	0.25		
		Recesivo	8/340	1/76	0.58		
F	R	Genotípico	5/67/276	1/20/56	0.41		
		Alélico	77/614	22/132	0.27		
		Dominante	72/276	21/56	0.20		
		Recesivo	5/343	1/76	0.99		

No se encontró asociación de los 8 tag SNPs ni de los haplotipos de la región *TANK* con el **aclareamiento viral mediado por tratamiento**, en los pacientes VHC; sin embargo, sí detectamos una distribución genotípica y alélica diferente del rs1921310 entre los pacientes VHC/VIH con RS y RNS que se ajustaba a un modelo de herencia dominante ya que la presencia de GG+AG era más frecuente entre los pacientes con RNS (56.9% vs. 33.8% p=0.01; OR=2.58; 95%IC=1.25-5.32). Además, el haplotipo A del locus *TANK*, marcado por el alelo rs1921310 G, también se encontró asociado con la respuesta al tratamiento en estos pacientes VHC/VIH, siendo más frecuente en los pacientes RNS que

en los pacientes RS (51.7% vs. 35.4%; $p=0.04$; OR=2.09, 95%IC (1.02-4.30)), con modelo de herencia dominante (tablas 20 y 21).

Cuando se analizó en función del **genotipo viral**, se encontró relación con el polimorfismo rs7568498 G/T y los haplotipos D y F de la región *TANK*, en los pacientes VHC pero no en los pacientes VHC/VIH, donde se encontró asociación con rs1921310, que también se encontraba asociado a la respuesta al tratamiento en esta cohorte de pacientes. En la cohorte de pacientes VHC, el alelo rs7568498 G y el haplotipo D eran más frecuentes entre los pacientes No-G1 que entre los pacientes G1 (24.6% vs. 15.7%; $p=0.02$; OR=0.57; 95%IC=0.35-0.92) y (24.6% vs. 15.5%; $p=0.01$; OR=0.56; 95%IC=0.34-0.90) respectivamente. Sin embargo, el haplotipo F era más frecuente entre los pacientes G1 (11.9% vs. 3.3%; $p=0.005$; OR=3.94; 95%IC=1.39-11.14), siguiendo la asociación haplotípica en ambos casos un modelo de herencia dominante (tablas 22 y 23).

Por último, el análisis de la distribución de los polimorfismos de la región *TANK* en función del **grado de fibrosis**, reveló asociación tanto en los pacientes VHC como VHC/VIH, pero con marcadores distintos. Así, el rs7568498 se asoció con el grado de fibrosis en la cohorte VHC, siendo la frecuencia de GG+GT más elevada en los pacientes F3-F4 que en los F0-F2 (38.3% vs. 26.2%; $p=0.04$; OR=1.74; 95%IC=1.00-3.01). Sin embargo, en la cohorte VHC/VIH se encontró asociado el rs1267077, siendo la frecuencia de GG+AG más alta en los pacientes F3-F4 que en los F0-F2 (40.6% vs. 22.8%; $p=0.04$; OR=2.31; 95%IC=1.05-5.05). Con respecto al estudio de haplotipos en la cohorte VHC se encontró asociado el haplotipo D, y en la cohorte VHC/VIH, el haplotipo C, ya que, haplotipo D era más frecuente en los pacientes VHC F3-F4 que en los pacientes VHC F0-F2 (38.3% vs. 26.2%; $p=0.04$; OR=1.74; 95%IC=1.00-3.01), y el haplotipo C era más frecuente en los pacientes VHC/VIH F3-F4 que en los pacientes VHC/VIH F0-F2 (40.6% vs. 22.8%; $p=0.03$; OR=2.31; 95%IC=1.05-5.05), siguiendo en ambas cohortes de pacientes la asociación un modelo de herencia dominante (tablas 24 y 25).

Al igual que en las tablas anteriores, el alelo X representa el alelo de frecuencia más baja, mientras que el alelo Y representa el alelo con frecuencia más alta en nuestra población.

Tabla 20: Distribución de los 8 SNPs seleccionados en la región *TANK* en las dos cohortes de pacientes de este estudio según su **respuesta al tratamiento**.

SNP	Alelo X	Alelo Y	Modelo	VHC			OR 95%IC	VHC/VIH			OR 95%IC
				RNS (n=131)	RS (n=136)	P		RNS (n=58)	RS (n=68)	P	
rs6713215	A	G	Genotípico	1/27/103	6/31/99	0.17		1/23/33	2/18/47	0.25	
			Alélico	29/233	43/229	0.13		25/89	22/112	0.32	
			Dominante	28/103	37/99	0.32		24/33	20/47	0.18	
			Recesivo	1/130	6/130	0.12		1/56	2/65	1	
rs17705608	G	A	Genotípico	12/63/56	21/60/54	0.29		9/28/21	5/33/30	0.29	
			Alélico	87/175	102/168	0.27		46/70	43/93	0.18	
			Dominante	75/56	81/54	0.71		37/21	38/30	0.46	
			Recesivo	12/119	21/114	0.13		9/49	5/63	0.16	
rs1267068	G	T	Genotípico	16/54/61	11/55/70	0.47		6/19/32	9/23/36	0.90	
			Alélico	86/176	77/195	0.26		31/83	41/95	0.67	
			Dominante	70/61	66/70	0.46		25/32	32/36	0.85	
			Recesivo	16/115	11/125	0.31		6/51	9/59	0.78	
rs7568498	G	T	Genotípico	4/36/91	5/34/97	0.84		2/12/44	4/14/50	0.84	
			Alélico	44/218	44/228	0.91		16/100	22/114	0.72	
			Dominante	40/91	39/97	0.78		14/44	18/50	0.83	
			Recesivo	4/127	5/131	1		2/56	4/64	0.68	
rs1267077	G	A	Genotípico	5/39/87	5/40/91	1		2/16/40	1/21/46	0.76	
			Alélico	49/213	50/222	1		20/96	23/113	1	
			Dominante	44/87	45/91	1		18/40	22/46	1	
			Recesivo	5/126	5/131	1		2/56	1/67	0.59	
rs1921310	G	A	Genotípico	2/41/88	6/47/83	0.31		4/29/25	2/21/45	0.03	2.07 (1.16-3.91)
			Alélico	45/217	59/213	0.19		37/79	25/111	0.01	
			Dominante	43/88	53/83	0.31		33/25	23/45	0.01	
			Recesivo	2/129	6/130	0.28		4/54	2/66	0.41	
rs11884495	A	T	Genotípico	29/62/40	35/63/38	0.78		15/27/16	14/35/19	0.79	
			Alélico	120/142	133/139	0.48		57/59	63/73	0.71	
			Dominante	91/40	98/38	0.68		42/16	49/19	1	
			Recesivo	29/102	35/101	0.56		15/43	14/54	0.52	
rs1267034	G	A	Genotípico	3/29/99	3/21/112	0.39		1/11/46	1/16/51	0.83	
			Alélico	35/227	27/245	0.22		13/103	18/118	0.70	
			Dominante	32/99	24/112	0.18		12/46	17/51	0.67	
			Recesivo	3/128	3/133	1		1/57	1/67	1	

Tabla 21: Distribución de los haplotipos de la región Chr2:161699443..161800900 del locus *TANK* en las dos cohortes de pacientes según RT.

Locus	Haplot1	Haplot2	Modelo	VHC				VHC/VIH			
				RNS (n=131)	RS (n=136)	P	OR(95%CI)	RNS (n=58)	RS (n=68)	P	OR(95%CI)
TANK	A	R	Genotípico	2/41/88	5/46/85	0.46		4/26/28	2/21/45	0.11	
			Alélico	45/217	56/216	0.31		34/82	25/111	0.04	1.84 (1.02-3.32)
			Dominante	43/88	51/85	0.42		30/28	23/45	0.04	2.09 (1.02-4.30)
			Recesivo	2/129	5/131	0.27		4/54	2/66	0.30	
	B	R	Genotípico	4/34/93	4/39/93	0.88		0/12/46	1/16/51	0.59	
			Alélico	42/220	47/225	0.69		12/104	18/118	0.48	
			Dominante	38/93	43/93	0.64		12/46	17/51	0.57	
			Recesivo	4/127	4/132	0.95		0/58	1/67	0.35	
	C	R	Genotípico	4/40/87	5/39/92	0.91		2/16/40	1/21/46	0.72	
			Alélico	48/214	49/223	0.92		20/96	23/113	0.94	
			Dominante	44/87	44/92	0.83		18/40	22/46	0.87	
			Recesivo	4/127	5/131	0.77		2/56	1/67	0.46	
	D	R	Genotípico	4/36/91	5/34/97	0.87		2/12/44	4/14/50	0.81	
			Alélico	44/218	44/228	0.84		16/100	22/114	0.59	
			Dominante	40/91	39/97	0.73		14/44	18/50	0.76	
			Recesivo	4/127	5/131	0.77		2/56	4/64	0.52	
	E	R	Genotípico	3/28/100	3/20/113	0.36		1/11/46	1/16/51	0.82	
			Alélico	34/228	26/246	0.21		13/103	18/118	0.63	
			Dominante	31/100	23/113	0.17		12/46	17/51	0.57	
			Recesivo	3/128	3/133	0.96		1/57	1/67	0.90	
	F	R	Genotípico	3/27/101	1/24/111	0.45		0/8/50	2/16/50	0.14	
			Alélico	33/229	26/246	0.26		8/108	20/116	0.05	
			Dominante	30/101	25/111	0.36		8/50	18/50	0.08	
			Recesivo	3/128	1/135	0.29		0/58	2/66	0.30	

Tabla 22: Distribución de los 8 tag SNPs seleccionados en la región *TANK* en las dos cohortes de pacientes de este estudio según el genotipo viral.

SNP	Alelo X	Alelo Y	Modelo	VHC			OR 95%IC	VHC/VIH			OR 95%IC
				G1 (n=213)	No-G1 (n=65)	P		G1 (n=87)	No-G1 (n=95)	P	
rs6713215	A	G	Genotípico	8/47/158	1/14/50	0.84		3/26/57	0/27/67	0.21	
			Alélico	63/363	16/114	0.56		32/140	27/161	0.32	
			Dominante	55/158	15/50	0.74		29/57	27/67	0.52	
			Recesivo	8/205	1/64	0.69		3/83	0/94	0.11	
rs17705608	G	A	Genotípico	26/108/79	9/28/27	0.58		12/35/40	11/47/37	0.47	
			Alélico	160/266	46/82	0.75		59/115	69/121	0.66	
			Dominante	134/79	37/27	0.46		47/40	58/37	0.37	
			Recesivo	26/187	9/55	0.67		12/75	11/84	0.66	
rs1267068	G	T	Genotípico	19/84/108	9/31/25	0.15		13/33/41	10/30/54	0.36	
			Alélico	122/300	49/81	0.06		59/115	50/138	0.13	
			Dominante	103/108	40/25	0.09		46/41	40/54	0.18	
			Recesivo	19/192	9/56	0.24		13/74	10/84	0.51	
rs7568498	G	T	Genotípico	6/55/152	5/22/38	0.07	0.57 (0.35-0.92)	3/24/60	4/20/71	0.61	
			Alélico	67/359	32/98	0.02		30/144	28/162	0.56	
			Dominante	61/152	27/38	0.07		27/60	24/71	0.41	
			Recesivo	6/207	5/60	0.13		3/84	4/91	1	
rs1267077	G	A	Genotípico	9/60/144	2/16/47	0.83		2/24/61	4/25/66	0.84	
			Alélico	78/348	20/110	0.51		28/146	33/157	0.78	
			Dominante	69/144	18/47	0.54		26/61	29/66	1	
			Recesivo	9/204	2/63	1		2/85	4/91	0.68	
rs1921310	G	A	Genotípico	7/75/130	2/17/46	0.39		7/25/55	1/39/55	0.03	
			Alélico	89/335	21/109	0.25		39/135	41/149	0.89	
			Dominante	82/130	19/46	0.18		32/55	40/55	0.54	
			Recesivo	7/205	2/63	1		7/80	1/94	0.05	
rs11884495	A	T	Genotípico	57/101/55	11/34/20	0.26		17/44/26	27/41/27	0.35	
			Alélico	215/211	56/74	0.16		78/96	95/95	0.34	
			Dominante	158/55	45/20	0.42		61/26	68/27	0.87	
			Recesivo	57/156	11/54	0.13		17/70	27/68	0.17	
rs1267034	G	A	Genotípico	4/39/170	2/11/52	0.79		2/21/64	2/16/77	0.42	
			Alélico	47/379	15/115	0.87		25/149	20/170	0.33	
			Dominante	43/170	13/52	1		23/64	18/77	0.28	
			Recesivo	4/209	2/63	0.62		2/85	2/93	1	

Tabla 23: Distribución de los haplotipos de la región Chr2:161699443..161800900 del locus *TANK* según el genotipo viral.

Locus	Haplot1	Haplot2	Modelo	VHC				VHC/VIH			
				G1 (n=213)	No-G1 (n=65)	P	OR(95%CI)	G1 (n=87)	No-G1 (n=95)	P	OR(95%CI)
TANK	A	R	Genotípico	5/76/132	2/17/46	0.35		7/25/55	1/35/59	0.05	
			Alélico	86/340	21/109	0.31		39/135	37/153	0.49	
			Dominante	81/132	19/46	0.19		32/55	36/59	0.87	
			Recesivo	5/208	2/63	0.74		7/80	1/94	0.05	
	B	R	Genotípico	7/59/147	2/22/41	0.63		0/20/67	3/26/66	0.18	
			Alélico	73/353	26/104	0.45		20/154	32/158	0.14	
			Dominante	66/147	24/41	0.37		20/67	29/66	0.25	
			Recesivo	7/206	2/63	0.93		0/87	3/92	0.28	
	C	R	Genotípico	6/63/144	2/15/48	0.59		2/24/61	4/25/66	0.76	
			Alélico	75/351	19/111	0.42		28/146	33/157	0.74	
			Dominante	69/144	17/48	0.34		26/61	29/66	0.92	
			Recesivo	6/207	2/63	0.91		2/85	4/91	0.47	
D	R	Genotípico	6/54/153	5/22/38	0.06		3/24/60	4/20/71	0.58		
		Alélico	66/360	32/98	0.01	0.56 (0.34-0.90)	30/144	28/162	0.51		
		Dominante	60/153	27/38	0.04	0.55 (0.31-0.98)	27/60	24/71	0.38		
		Recesivo	6/207	5/60	0.07		3/84	4/91	0.78		
E	R	Genotípico	4/36/173	2/11/52	0.84		2/21/64	2/16/77	0.46		
		Alélico	44/382	15/115	0.69		25/149	20/170	0.26		
		Dominante	40/173	13/52	0.82		23/64	18/77	0.22		
		Recesivo	4/209	2/63	0.56		2/85	2/93	0.92		
F	R	Genotípico	4/43/166	0/4/56	0.02		3/13/71	0/22/73	0.08		
		Alélico	51/375	4/116	0.005	3.94 (1.39-11.14)	19/155	22/168	0.84		
		Dominante	47/166	4/56	0.006	3.96 (1.36-11.50)	16/71	22/73	0.42		
		Recesivo	4/209	0/60	0.50		3/84	0/95	0.21		

Tabla 24: Distribución de los 8 tag SNPs seleccionados en la región *TANK* en las dos cohortes de pacientes de este estudio según el grado de fibrosis.

SNP	Alelo X	Alelo Y	Modelo	VHC			OR 95%IC	VHC/VIH			OR 95%IC
				F3-F4 (n=81)	F0-F2 (n=202)	P		F3-F4 (n=69)	F0-F2 (n=57)	P	
rs6713215	A	G	Genotípico	2/21/58	7/44/151	0.74		1/26/41	1/13/42	0.14	
			Alélico	25/137	58/346	0.79		28/108	15/97	0.17	
			Dominante	23/58	51/151	0.65		27/41	14/42	0.09	
			Recesivo	2/79	7/195	1		1/67	1/55	1	
rs17705608	G	A	Genotípico	8/39/34	28/94/80	0.70		7/33/29	7/24/26	0.84	
			Alélico	55/107	150/254	0.49		47/91	38/76	1	
			Dominante	47/34	122/80	0.78		40/29	31/26	0.72	
			Recesivo	8/73	28/174	0.43		7/62	7/50	0.77	
rs1267068	G	T	Genotípico	10/39/31	22/76/103	0.15		5/24/39	9/22/26	0.24	
			Alélico	59/101	120/282	0.11		34/102	40/74	0.10	
			Dominante	49/31	98/103	0.06		29/39	31/26	0.21	
			Recesivo	10/70	22/179	0.68		5/63	9/48	0.16	
rs7568498	G	T	Genotípico	5/26/50	7/46/149	0.11	1.64 (1.03-2.59)	0/16/53	2/15/40	0.29	
			Alélico	36/126	60/344	0.04		16/122	19/95	0.27	
			Dominante	31/50	53/149	0.04		16/53	17/40	0.42	
			Recesivo	5/76	7/195	0.33		0/69	2/55	0.20	
rs1267077	G	A	Genotípico	4/16/61	9/54/139	0.45		1/27/41	4/9/44	0.004	2.31 (1.06-5.06)
			Alélico	24/138	72/332	0.45		29/109	17/97	0.25	
			Dominante	20/61	63/139	0.31		28/41	13/44	0.04	
			Recesivo	4/77	9/193	1		1/68	4/53	0.17	
rs1921310	G	A	Genotípico	1/22/58	7/74/120	0.16		4/31/34	2/17/38	0.13	
			Alélico	24/138	88/314	0.06		39/99	21/93	0.07	
			Dominante	23/58	81/120	0.07		35/34	19/38	0.07	
			Recesivo	1/80	7/194	0.44		4/65	2/55	0.68	
rs11884495	A	T	Genotípico	21/33/27	50/96/56	0.52		15/35/19	13/27/17	0.91	
			Alélico	75/87	196/208	0.64		65/73	53/61	1	
			Dominante	54/27	146/56	0.38		50/19	40/17	0.84	
			Recesivo	21/60	50/152	0.87		15/54	13/44	1	
rs1267034	G	A	Genotípico	1/15/65	5/44/153	0.72		0/16/53	3/14/40	0.19	
			Alélico	17/145	54/350	0.40		16/122	20/94	0.20	
			Dominante	16/65	49/153	0.43		16/53	17/40	0.42	
			Recesivo	1/80	5/197	0.67		0/69	3/54	0.09	

Tabla 25: Distribución de los haplotipos de la región Chr2:161699443..161800900 del locus *TANK* según el grado de fibrosis.

Locus	Haplot1	Haplot2	Modelo	VHC				VHC/VIH			
				F3-F4 (n=81)	F0-F2 (n=202)	P	OR(95%CI)	F3-F4 (n=69)	F0-F2 (n=57)	P	OR(95%CI)
TANK	A	R	Genotípico	1/22/58	6/73/123	0.21		4/27/38	2/17/38	0.40	
			Alélico	24/138	85/319	0.10		35/103	21/93	0.18	
			Dominante	23/58	79/123	0.10		31/38	19/38	0.18	
			Recesivo	1/80	6/196	0.39		4/65	2/55	0.54	
	B	R	Genotípico	4/22/55	7/51/144	0.01		0/12/57	0/17/40	0.25	
			Alélico	30/132	65/339	0.48		12/126	17/97	0.12	
			Dominante	26/55	58/144	0.57		12/57	17/40	0.10	
			Recesivo	4/77	7/195	0.56		0/69	0/57	0.92	
	C	R	Genotípico	4/15/62	7/56/139	0.25		1/27/41	4/9/44	0.007	
			Alélico	23/139	70/334	0.36		29/109	17/97	0.21	
			Dominante	19/62	63/139	0.19		28/41	13/44	0.03	2.31 (1.05-5.05)
			Recesivo	4/77	7/195	0.56		1/68	4/53	0.11	
	D	R	Genotípico	5/26/50	7/46/149	0.12		0/12/53	2/15/40	0.16	
			Alélico	36/126	60/344	0.03	1.63 (1.03-2.59)	12/118	19/95	0.08	
			Dominante	31/50	53/149	0.04	1.74 (1.00-3.01)	12/53	17/40	0.14	
			Recesivo	5/76	7/195	0.31		0/65	2/55	0.19	
E	R	Genotípico	1/15/65	5/42/155	0.71		0/16/53	3/14/40	0.14		
		Alélico	17/145	52/352	0.43		16/122	20/94	0.17		
		Dominante	16/65	47/155	0.52		16/53	17/40	0.39		
		Recesivo	1/80	5/197	0.51		0/68	3/54	0.10		
D	R	Genotípico	2/17/62	3/35/164	0.63		0/14/55	2/11/44	0.29		
		Alélico	21/141	41/363	0.33		14/124	15/99	0.45		
		Dominante	19/62	38/164	0.37		14/55	13/44	0.73		
		Recesivo	2/79	3/199	0.57		0/69	2/55	0.18		

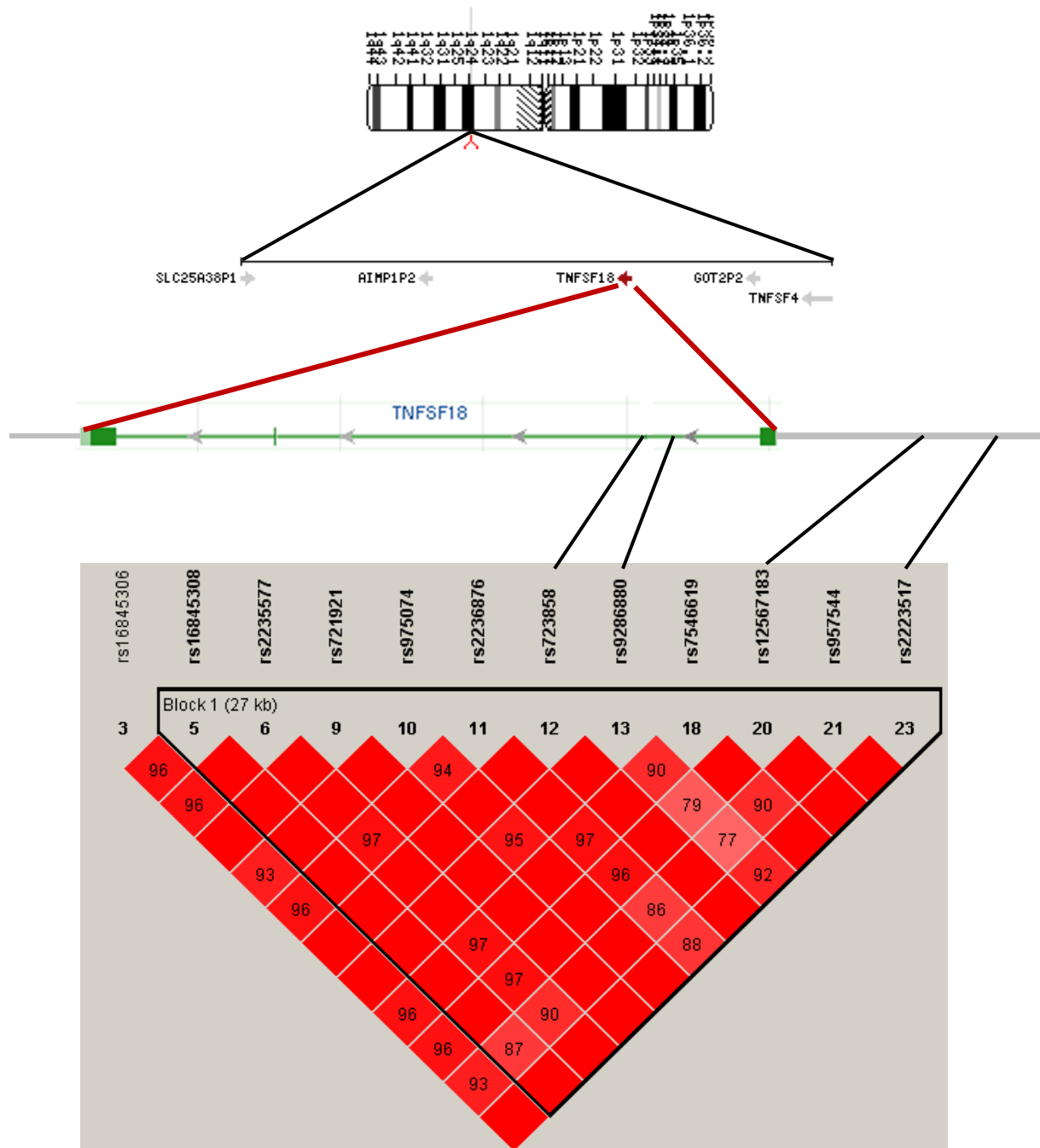
4. *TNFSF18*

Figura 15: Esquema del locus *TNFSF18*. Localización de los SNPs analizados dentro del bloque de ligamiento descrito en la región Chr1:171271937..171303871 en población CEU en HapMap project. A) Situación del locus *TNFSF18* en el cromosoma 1. B) Entorno genómico del gen *TNFSF18* en la región 1q23. C) Posición relativa de los SNPs en el locus *TNFSF18* y representación gráfica del desequilibrio de unión entre los SNP estudiados (se muestra el diagrama elaborado con Haploview para el parámetro D' , correspondiente al desequilibrio de unión normalizado. Las cifras en los recuadros son los valores de los parámetros multiplicados por 100. Los recuadros sin cifra indican que el valor es máximo (1)).

La tasa de éxito del genotipado para todos los polimorfismos estudiados fue del 99% y los haplotipos se asignaron inequívocamente en el 98% de las muestras. La tabla 26 recoge las frecuencias genotípicas y alélicas de la población general obtenida del grupo control sano para cada SNP y los haplotipos constituidos con estos SNPs con frecuencia superior al 10% encontrado en nuestra población de estudio.

Tabla 26: Frecuencias genotípicas y alélicas en el grupo control no infectado.

Nombre SNP (X/Y)	Alelo minoritario	XX	XY	YY	f (X)	f (Y)
rs723858 (A/T)	A	6.2%	38.8%	55%	0.25	0.75
rs9286880 (G/T)	G	5.2%	42.6%	52.2%	0.27	0.73
rs7546619 (A/G)	A	5.9%	45.4%	48.7%	0.29	0.71
rs2223517 (T/C)	T	15.7%	50.7%	33.6%	0.41	0.59

X: Representa el alelo con frecuencia más baja, mientras que Y representa el alelo con frecuencia más alta en nuestra población

Distribución de los haplotipos con frecuencia superior a 0.10 correspondientes a la región Chr1: 171271937..171303871 del locus *TNFSF18* en población española no infectada.

Haplotipo	rs723858	rs9286880	rs7546619	rs2223517	Frec. (N=378)
A	T	T	G	T	0.403
B	T	G	G	C	0.261
C	A	T	A	C	0.234
Otros					0.102

Como se puede observar, el haplotipo A queda definido por la variable T del rs2223517, el haplotipo B por la variable G del rs9286880 y el haplotipo C por la variable A del rs723858, por lo que no hicimos análisis de haplotipos en este locus ya que sería redundante.

El estudio del locus *TNFSF18* con el **aclaramiento viral espontáneo**, no reveló asociación entre ninguno de los tag SNP y esta variable (tablas 27).

Tabla 27: Distribución de los **4 tags SNPs** seleccionados en la región *TNFSF18* en los pacientes VHC y AVE para analizar el aclaramiento viral espontáneo.

SNP	Alelo X	Alelo Y	Modelo	VHC (n=348)	AVE (n=77)	P	OR 95%IC
rs723858	A	T	Genotípico	22/134/191	4/30/42	0.94	
			Alélico	178/516	38/114	0.87	
			Dominante	156/191	34/42	0.97	
			Recesivo	22/325	4/72	0.72	
rs9286880	G	T	Genotípico	19/143/185	3/37/36	0.46	
			Alélico	181/513	43/109	0.57	
			Dominante	162/185	40/36	0.34	
			Recesivo	19/328	3/73	0.58	
rs7546619	A	G	Genotípico	19/158/170	6/34/36	0.72	
			Alélico	196/498	46/106	0.62	
			Dominante	177/170	40/36	0.79	
			Recesivo	19/328	3/73	0.42	
rs2223517	T	C	Genotípico	53/181/112	13/33/30	0.36	
			Alélico	287/405	59/93	0.54	
			Dominante	234/112	46/30	0.23	
			Recesivo	53/293	13/63	0.69	

X: Representa el alelo con frecuencia mas baja, mientras que Y representa el alelo con frecuencia mas alta en nuestra población

Con respecto al **aclaramiento viral mediado por tratamiento y al genotipo viral** no se detectó asociación con el locus *TNFSF18* en ninguna de las dos cohortes de pacientes analizadas (tablas 28 y 29 respectivamente).

Por último, con respecto al **grado de fibrosis** (tabla 30), no se encontró asociación en los pacientes VHC, pero sí en la cohorte VHC/VIH, ya que las frecuencias de los alelos rs723858A, rs7546619A y rs2223517C eran más altas entre los pacientes F3-F4 que en los pacientes F0-F2 (34.1% vs. 19.3%; p=0.01; OR=2.16; 95%IC=1.20-3.87), (42.8% vs. 26.3%; p=0.008; OR=2.09; 95%IC=1.22-4.57) y (68,8% vs. 53,5%; p=0.01; OR=1,92 (1,15-3,22) respectivamente.

Tabla 28: Distribución de los tag SNPs y haplotipos de la región Chr1:171271937..171303871 del locus *TNFSF18* según la respuesta al tratamiento.

SNP	Alelo X	Alelo Y	Modelo	VHC			OR 95%IC	VHC/VIH		
				RNS (n=131)	RS (n=136)	P		RNS (n=58)	RS (n=68)	P
rs723858	A	T	Genotípico	11/50/70	9/56/70	0.79		5/26/27	6/28/34	0.93
			Alélico	72/190	74/196	1		36/80	40/96	0.78
			Dominante	61/70	65/70	0.81		31/27	34/34	0.72
			Recesivo	11/120	9/126	0.65		5/53	22/98	1
rs9286880	G	T	Genotípico	9/43/79	7/60/68	0.15		4/21/33	5/25/38	1
			Alélico	61/201	74/196	0.32		29/87	35/101	1
			Dominante	52/79	67/68	0.11		25/33	30/38	1
			Recesivo	9/122	7/128	0.61		4/54	23/132	1
rs7546619	A	G	Genotípico	10/64/57	7/60/69	0.44		8/30/20	13/30/25	0.65
			Alélico	84/178	74/198	0.25		46/70	56/80	0.89
			Dominante	74/57	67/69	0.27		38/20	43/25	0.85
			Recesivo	10/121	7/129	0.45		8/50	13/55	0.47
rs2223517	T	C	Genotípico	18/72/40	22/63/51	0.33		6/28/24	8/28/32	0.78
			Alélico	108/152	107/165	0.65		40/76	44/92	0.78
			Dominante	90/40	85/51	0.30		34/24	36/32	0.59
			Recesivo	18/112	22/114	0.61		6/52	22/129	1

Tabla 29: Distribución de los tag SNPs y haplotipos de la región Chr1:171271937..171303871 del locus *TNFSF18* según el genotipo viral.

SNP	Alelo X	Alelo Y	Modelo	VHC			OR 95%IC	VHC/VIH		
				G1 (n=213)	No-G1 (n=65)	P		G1 (n=87)	No-G1 (n=95)	P
rs723858	A	T	Genotípico	17/79/117	2/24/39	0.40		6/32/49	8/43/44	0.42
			Alélico	113/313	28/102	0.30		44/130	59/131	0.24
			Dominante	96/117	26/39	0.56		38/49	51/44	0.18
			Recesivo	17/196	2/63	0.26		6/81	8/87	0.78
rs9286880	G	T	Genotípico	12/82/119	2/34/28	0.11		7/31/49	6/40/49	0.67
			Alélico	106/320	38/90	0.30		45/129	52/138	0.81
			Dominante	94/119	36/28	0.11		38/49	46/49	0.55
			Recesivo	12/201	2/62	0.53		7/80	6/89	0.77
rs7546619	A	G	Genotípico	15/95/102	3/29/33	0.83		10/38/39	14/48/33	0.38
			Alélico	125/299	35/95	0.65		58/116	76/114	0.19
			Dominante	110/102	32/33	0.77		48/39	62/33	0.17
			Recesivo	15/197	3/62	0.57		10/77	14/81	0.66
rs2223517	T	C	Genotípico	29/115/67	14/28/23	0.18		17/38/32	9/42/43	0.13
			Alélico	173/249	56/74	0.68		72/102	60/128	0.06
			Dominante	144/67	42/23	0.65		55/32	51/43	0.23
			Recesivo	29/182	14/51	0.16		17/70	9/85	0.06

Tabla 30: Distribución de los tag SNPs y haplotipos de la región Chr1:171271937..171303871 del locus *TNFSF18* según el grado de fibrosis.

SNP	Alelo X	Alelo Y	Modelo	VHC			OR 95%IC	VHC/VIH			OR 95%IC
				F3-F4 (n=81)	F0-F2 (n=202)	P		F3-F4 (n=69)	F0-F2 (n=57)	P	
rs723858	A	T	Genotípico	3/28/50	14/80/107	0.37		8/31/30	0/22/35	0.01	
			Alélico	34/128	108/294	0.16		47/91	22/92	0.01	2.16 (1.20-3.87)
			Dominante	31/50	94/107	0.23		39/30	22/35	0.04	2.06 (1.01-4.23)
			Recesivo	3/78	14/187	0.41		8/61	0/57	0.008	
rs9286880	G	T	Genotípico	5/38/38	13/78/111	0.41		5/25/39	5/24/28	0.73	
			Alélico	48/114	104/300	0.34		35/103	34/80	0.47	
			Dominante	43/38	91/111	0.23		30/39	29/28	0.47	
			Recesivo	5/76	13/189	1		5/64	5/52	0.75	
rs7546619	A	G	Genotípico	2/35/44	9/91/101	0.71		13/33/23	3/24/30	0.02	
			Alélico	39/123	109/293	0.52		59/79	30/84	0.008	2.09 (1.22-4.57)
			Dominante	37/44	100/101	0.59		46/23	27/30	0.03	2.22 (1.08-4.57)
			Recesivo	2/79	9/192	0.73		13/56	3/54	0.03	4.17 (1.13-15.48)
rs2223517	T	C	Genotípico	11/47/23	32/103/66	0.62		7/29/33	14/25/18	0.05	
			Alélico	69/93	167/235	0.85		43/95	53/61	0.01	0.52 (0.31-0.87)
			Dominante	58/23	135/66	0.57		36/33	39/18	0.07	
			Recesivo	11/70	32/169	0.71		7/62	14/43	0.03	0.34 (0.12-0.93)

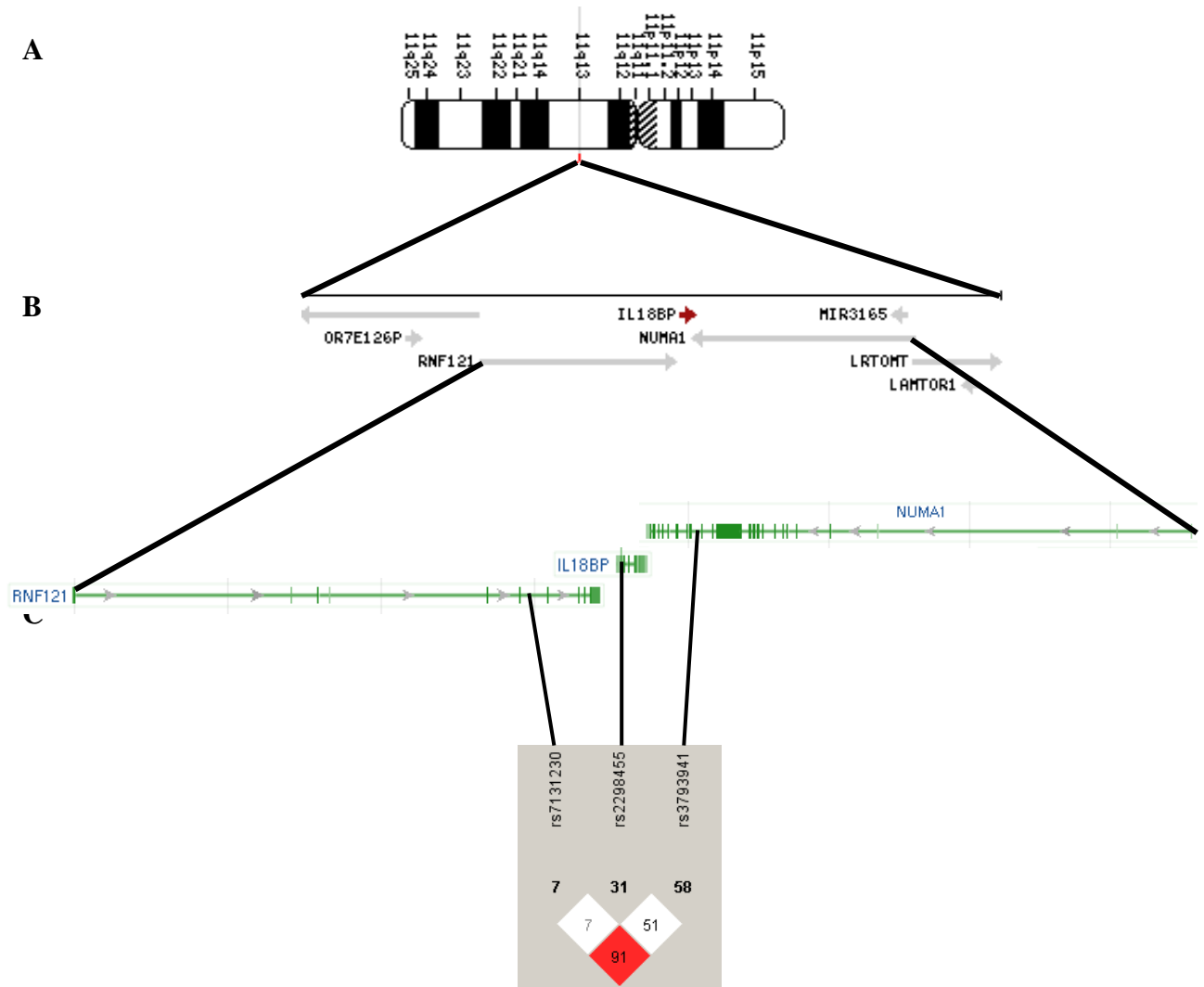
5. *IL18BP*

Figura 16: Esquema del gen *IL18BP*. Localización de los SNPs analizados dentro de la región Chr11:71367189..71411859 en población CEU en HapMap Project. A) Situación del *locus IL18BP* en el cromosoma 11. B) Entorno genómico del gen *IL18BP* en la región 11q13. C) Posición relativa de los SNPs seleccionados en el locus *IL18BP* y representación gráfica del desequilibrio de unión entre los SNP estudiados (se muestra el diagrama elaborado con Haploview para el parámetro D' , correspondiente al desequilibrio de unión normalizado. Las cifras en los recuadros son los valores de los parámetros multiplicados por 100).

La tasa de éxito del genotipado para todos los polimorfismos estudiados fue del 99% y los haplotipos se asignaron inequívocamente en el 98% de las muestras. La tabla 31 recoge las frecuencias genotípicas y alélicas de la población general obtenidas del grupo control sano para cada SNP y los haplotipos constituidos con estos SNPs con frecuencia superior al 10% encontrado en nuestra población de estudio.

Tabla 31: Frecuencias genotípicas y alélicas en el grupo control no infectado.

SNP (X/Y)	Alelo minoritario	XX	XY	YY	f(X)	f(Y)
rs7131230 (C/T)	C	8%	42%	50%	0.29	0.71
rs2298455 (G/T)	G	0.7%	27.3%	72%	0.14	0.86
rs3793941 (A/G)	A	16%	52%	32%	0.42	0.58

X: Representa el alelo con frecuencia más baja, mientras que Y representa el alelo con frecuencia más alta en nuestra población

Distribución de los haplotipos con frecuencia superior a 0.10 correspondientes a la región Chr11: 71367189..71411859 del locus *IL18BP* en población española no infectada

Haplotipo	rs7131230	rs2298455	rs3793941	Frec. (N=378)
A	T	T	A	0.397
B	C	T	G	0.275
C	T	T	G	0.163
D	T	G	G	0.129
Otros				0.036

La tabla 32 muestra los datos de los 3 SNPs seleccionados en el locus *IL18BP* en los pacientes con AVE y VHC. Según nuestros resultados se observó asociación del rs7131230 C/T con el AVE según un modelo dominante, ya que el 61.1% de los individuos AVE eran CC+CT en comparación con el 47.8% de los pacientes VHC ($p=0.04$; $OR=0.58$; $95\%CI=0.35-0.97$). El porcentaje de pacientes VHC con este genotipo fue similar al del grupo control (47.8% vs. 50.2% $p=0.51$), por tanto, los individuos CC+CT estaban sobrerrepresentados en el grupo AVE.

Debido a la relación descrita entre el sexo femenino y el AVE, analizamos la distribución CC+CT en el grupo de AVE separando los hombres de las mujeres para descartar un posible sesgo por el sexo de los individuos. Observamos que la distribución genotípica de este polimorfismo en función del sexo seguía la tendencia de la distribución genotípica en función del AVE, aunque sin llegar a ser estadísticamente significativo. Así, se encontró que

en el grupo AVE, el 71% de las mujeres tenían el genotipo CC+CT frente al 50% de los hombres ($p=0.06$).

Tabla 32: Distribución de los 3 tag SNPs seleccionados en la región *IL18BP* en los pacientes VHC y AVE.

SNP	Alelo X	Alelo Y	Modelo	VHC (n=348)	AVE (n=77)	P	OR 95%IC
rs7131230	C	T	Genotípico	29/136/180	5/42/30	0.05	0.58 (0.35-0.97)
			Alélico	194/496	52/102	0.16	
			Dominante	165/180	47/30	0.04	
			Recesivo	29/316	5/72	0.58	
rs2298455	G	T	Genotípico	3/96/248	0/19/54	0.69	
			Alélico	102/592	19/127	0.59	
			Dominante	99/248	19/54	0.66	
			Recesivo	3/344	0/73	0.92	
rs3793941	A	G	Genotípico	61/182/104	9/38/30	0.22	
			Alélico	304/390	56/98	0.09	
			Dominante	243/104	47/30	0.12	
			Recesivo	61/286	9/68	0.21	

X: Representa el alelo con frecuencia más baja, mientras que Y representa el alelo con frecuencia más alta en nuestra población

Por otro lado, en el estudio de haplotipos (tabla 33) se encontró asociación entre el AVE y el haplotipo B a través de un modelo de herencia dominante, y con la misma magnitud que con el polimorfismo rs7131230 C/T, esperable al definir la variable C de este SNP el haplotipo B. Así, el genotipo BB+BX era más frecuente en los aclaradores que en los crónicos [47 (61.0%) vs. 164 (47.1%); $p=0.02$; OR=0.56; 95%IC=0.34-0.94]. No obstante, también aquí, al estratificar los individuos AVE por el sexo, obtuvimos lo mismo que al analizar el SNP rs7131230, de manera que un 71% de las mujeres eran BB+BX frente a un 50% de los hombres ($p=0.06$).

Tabla 33: Distribución de los **haplotipos** identificados en la **región Chr11:71367189..71411859 del locus *IL18BP*** en los pacientes AVE y VHC para analizar el **aclareamiento viral espontáneo**. Sólo se muestran los haplotipos con frecuencia superior a 0.10.

Locus	Haplot1	Haplot2	Modelo	VHC (n=348)	AVE (n=77)	P	OR(95%CI)
<i>IL18BP</i>	A	R	Genotípico	55/181/112	9/38/30	0.43	
			Alélico	291/405	56/98	0.21	
			Dominante	236/112	47/30	0.25	
			Recesivo	55/293	9/68	0.36	
	B	R	Genotípico	27/137/184	5/42/30	0.04	
			Alélico	191/505	52/102	0.11	
			Dominante	164/184	47/30	0.02	0.56 (0.34-0.94)
			Recesivo	27/321	5/72	0.70	
	C	R	Genotípico	10/89/249	2/23/52	0.74	
			Alélico	109/587	27/127	0.56	
			Dominante	99/249	25/52	0.48	
			Recesivo	10/338	2/75	0.89	
	D	R	Genotípico	3/82/263	0/19/58	0.70	
			Alélico	88/608	19/135	0.91	
			Dominante	85/263	19/58	0.96	
			Recesivo	3/345	0/77	0.41	

Con respecto al **aclareamiento viral mediado por tratamiento**, no se encontró asociación ni con estos 3 tag SNPs ni con los haplotipos de la región *IL18BP* en los pacientes VHC ni en los pacientes VHC/VIH (tabla 34).

Además, cuando se analizó en función del **genotipo viral** que causa la infección, tampoco se encontró relación con estos 3 tag SNPs ni con los haplotipos de la región *IL18BP* ni en los pacientes VHC ni en los pacientes VHC/VIH (tabla 35).

Por último, el análisis de la distribución de los polimorfismos de la región *IL18BP* en función del **grado de fibrosis**, tampoco reveló asociación de este locus con esta variable en las dos cohortes de pacientes (tabla 36).

Tabla 34: Distribución de los tag SNPs y haplotipos de la región Chr11:71367189..71411859 del locus *IL18BP* según la respuesta al tratamiento.

SNP	Alelo x	Alelo y	Modelo	VHC			OR 95%IC	VHC/VIH			OR 95%IC
				RNS (n=131)	RS (n=136)	P		RNS (n=58)	RS (n=68)	P	
rs7131230	C	T	Genotípico	9/51/70	11/54/70	0.91		6/20/32	8/23/37	1	
			Alélico	69/191	76/194	0.69		32/84	39/97	0.88	
			Dominante	60/70	65/70	0.80		26/32	31/37	1	
			Recesivo	9/121	11/124	0.81		6/52	8/60	1	
rs2298455	G	T	Genotípico	2/37/91	1/42/93	0.76		2/13/43	1/14/53	0.74	
			Alélico	41/219	44/228	0.91		17/99	16/120	0.57	
			Dominante	39/91	43/93	0.79		15/43	15/53	0.67	
			Recesivo	2/128	1/135	0.61		2/56	1/67	0.59	
rs3793941	A	G	Genotípico	25/66/39	22/69/45	0.76		12/32/14	18/27/23	0.22	
			Alélico	116/144	113/159	0.48		56/60	63/73	0.80	
			Dominante	91/39	91/45	0.60		44/14	45/23	0.24	
			Recesivo	25/105	22/114	0.52		12/46	18/50	0.53	
Haplot1		Haplot2									
<i>IL18BP</i>	A	R	Genotípico	23/65/43	18/69/48	0.62		11/32/15	18/27/23	0.22	
			Alélico	111/151	105/165	0.41		54/62	63/70	0.89	
			Dominante	88/43	87/48	0.63		43/15	45/23	0.33	
			Recesivo	23/108	18/117	0.34		11/47	18/50	0.31	
	B	R	Genotípico	8/51/72	10/55/70	0.84		4/22/32	8/22/38	0.58	
			Alélico	67/195	75/195	0.56		30/86	38/98	0.71	
			Dominante	59/72	65/70	0.61		26/32	20/38	0.25	
			Recesivo	8/123	10/125	0.67		4/54	8/60	0.35	
	C	R	Genotípico	3/36/92	4/36/95	0.93		1/12/45	2/15/51	0.88	
			Alélico	42/220	44/226	0.93		14/102	19/117	0.65	
			Dominante	39/92	40/95	0.97		13/45	17/51	0.73	
			Recesivo	3/128	4/131	0.73		1/57	2/66	0.65	
	D	R	Genotípico	2/30/99	1/36/98	0.66		2/11/45	1/13/54	0.76	
			Alélico	34/228	38/232	0.71		15/101	15/121	0.64	
			Dominante	32/99	37/98	0.57		13/45	14/54	0.80	
			Recesivo	2/129	1/134	0.54		2/56	1/67	0.46	

Tabla 35: Distribución de los tag SNPs y haplotipos de la región Chr11:71367189..71411859 del locus *IL18BP* según el genotipo viral.

SNP	Alelo X	Alelo Y	Modelo	VHC			OR 95%IC	VHC/VIH			OR 95%IC
				G1 (n=213)	No-G1 (n=65)	P		G1 (n=87)	No-G1 (n=95)	P	
rs7131230	C	T	Genotípico	18/82/111	6/24/35	0.93		9/32/46	9/35/51	1	
			Alélico	118/304	36/94	1		50/124	53/137	0.91	
			Dominante	100/111	30/35	0.89		41/46	44/51	1	
			Recesivo	18/193	6/59	0.81		9/78	9/86	1	
rs2298455	G	T	Genotípico	2/57/153	1/19/45	0.73		1/21/65	2/20/73	0.84	
			Alélico	61/363	21/109	0.67		23/151	24/166	0.87	
			Dominante	59/153	20/45	0.64		22/65	22/73	0.86	
			Recesivo	2/210	1/64	0.55		1/86	2/93	1	
rs3793941	A	G	Genotípico	39/110/63	11/36/18	0.91		14/46/27	24/46/25	0.31	
			Alélico	188/236	58/72	1		74/100	94/96	0.21	
			Dominante	149/63	47/18	0.87		60/27	70/25	0.51	
			Recesivo	39/173	11/54	0.85		14/73	24/71	0.14	
Haplot1 Haplot2											
IL18BP	A	X	Genotípico	35/110/68	10/37/18	0.74		14/45/28	23/47/25	0.35	
			Alélico	180/246	57/73	0.74		73/101	93/97	0.18	
			Dominante	145/68	47/18	0.51		59/28	70/25	0.38	
			Recesivo	35/178	10/55	0.84		14/73	23/72	0.17	
	B	X	Genotípico	17/82/114	5/25/35	0.99		7/31/49	9/33/53	0.94	
			Alélico	116/310	35/95	0.94		45/129	51/139	0.83	
			Dominante	99/114	30/35	0.96		38/49	42/53	0.94	
			Recesivo	17/196	5/60	0.93		7/80	9/86	0.73	
	C	X	Genotípico	6/56/151	1/15/49	0.71		5/22/60	0/22/73	0.05	
			Alélico	68/358	17/113	0.42		32/142	22/168	0.06	
			Dominante	62/151	16/49	0.48		27/60	22/73	0.23	
			Recesivo	6/207	1/64	0.56		5/82	0/95	0.05	
	D	X	Genotípico	2/47/164	1/17/47	0.71		1/17/69	2/17/76	0.85	
			Alélico	51/375	19/111	0.42		19/155	21/169	0.96	
			Dominante	49/164	18/47	0.43		18/69	19/76	0.90	
			Recesivo	2/211	1/64	0.68		1/86	2/93	0.61	

Tabla 36: Distribución de los tag SNPs y haplotipos de la región Chr11:71367189..71411859 del locus *IL18BP* según el grado de fibrosis.

SNP	Alelo X	Alelo Y	Modelo	VHC			OR 95%IC	VHC/VIH			OR 95%IC
				F3-F4 (n=81)	F0-F2 (n=202)	P		F3-F4 (n=69)	F0-F2 (n=57)	P	
rs7131230	C	T	Genotípico	6/35/40	16/82/102	0.96		7/22/40	7/23/27	0.50	
			Alélico	47/115	114/286	0.92		36/102	37/77	0.32	
			Dominante	41/40	98/102	0.89		29/40	30/27	0.28	
			Recesivo	6/75	16/184	1		7/62	7/50	0.77	
rs2298455	G	T	Genotípico	0/22/59	2/58/142	0.94		2/10/57	0/11/46	0.46	
			Alélico	22/140	62/342	0.69		14/124	11/103	1	
			Dominante	22/59	60/142	0.77		12/57	11/46	0.81	
			Recesivo	0/81	2/200	1		2/67	0/57	0.50	
rs3793941	A	G	Genotípico	10/49/22	37/100/65	0.23		17/33/19	12/27/18	0.84	
			Alélico	69/93	174/230	0.92		67/71	51/63	0.61	
			Dominante	59/22	137/65	0.47		50/19	39/18	0.69	
			Recesivo	10/71	37/165	0.28		17/52	12/45	0.67	
Haplot1		Haplot2									
IL18BP	A	R	Genotípico	10/47/24	33/98/71	0.34		17/32/20	11/28/18	0.77	
			Alélico	67/95	164/240	0.86		66/72	50/64	0.52	
			Dominante	57/24	131/71	0.37		49/20	39/18	0.75	
			Recesivo	10/71	33/169	0.39		17/52	11/46	0.47	
	B	R	Genotípico	5/36/40	16/81/105	0.74		6/23/40	7/26/29	0.43	
			Alélico	46/116	113/291	0.91		35/103	40/84	0.21	
			Dominante	41/40	97/105	0.69		29/40	33/29	0.20	
			Recesivo	5/76	16/186	0.61		6/63	7/55	0.62	
	C	R	Genotípico	3/21/57	6/50/146	0.92		1/20/48	2/14/41	0.66	
			Alélico	27/135	62/342	0.69		22/116	18/96	0.97	
			Dominante	24/57	56/146	0.74		21/48	16/41	0.77	
			Recesivo	3/78	6/196	0.75		1/68	2/55	0.45	
	D	R	Genotípico	0/19/62	2/51/149	0.62		2/10/57	0/8/49	0.43	
			Alélico	19/143	55/349	0.54		14/124	8/106	0.38	
			Dominante	19/62	53/149	0.62		12/57	8/49	0.61	
			Recesivo	0/81	2/200	0.36		2/67	0/57	0.16	

DISCUSIÓN

Los estudios caso-control son considerados como uno de los principales avances de la epidemiología moderna (Rothman *et al*, 1998) y en ellos se asume que las diferencias observadas entre los grupos de casos y controles pueden estar relacionadas con el parámetro estudiado. Los estudios que investigan la asociación de genes con susceptibilidad a enfermedades deben ser repetidos en diferentes poblaciones y series para confirmar los resultados obtenidos, descartar errores estadísticos, sesgos debido a los criterios de selección de los pacientes o a la propia heterogeneidad genéticas que existen entre poblaciones y que en muchas ocasiones se utilizan cohortes con un número limitado de pacientes (McCarthy *et al*, 2008). Nuestros resultados confirman en población española algunas de las asociaciones genéticas encontradas en otras poblaciones en relación con la evolución de la infección por el VHC, y aportamos nuevas asociaciones no descritas.

En el 2009, tres GWAS detectaron una asociación entre el locus **IL28B** y la respuesta al tratamiento con IFN- α y ribavirina en pacientes infectados por VHC (Ge *et al*. 2009, Suppiah *et al*. 2009 and Tanaka *et al*. 2009). En estos estudios, se constató que en poblaciones de origen caucásico, asiático y africano, los individuos con genotipo rs12979860CC o rs8099917TT (según la población estudiada), respondían mejor al tratamiento. En nuestro estudio en población española se confirmó que el genotipo rs12979860CC estaba asociado con una mejor respuesta al tratamiento, tanto en la cohorte de pacientes mono infectados (60,2% vs. 39,8%) como en la cohorte de coinfectados (66,2% vs. 33,8%). Pero a diferencia de los estudios anteriores, en nuestra cohorte de mono infectados, había pacientes tratados con monoterapia (IFN- α) y pacientes tratados con terapia combinada (IFN- α y RBV). Nuestros datos demostraron que los pacientes con genotipo rs12979860CC respondían mejor al tratamiento independientemente de que el tratamiento recibido por los pacientes VHC hubiese sido monoterapia (60,3% vs. 39,7%) o terapia combinada (60% vs. 40%). Estos hallazgos son replicados a través del polimorfismo rs8099917TT en población japonesa infectada con genotipo 1b, respondiendo mejor al tratamiento tanto los pacientes que recibieron monoterapia como los de terapia combinada (92.2% vs. 73.9% y 88,1% vs. 68.6% respectivamente) (Ochi *et al*, 2011). Aunque la terapia combinada es el tratamiento recomendado, estos análisis y resultados son importantes porque en determinados pacientes no siempre puede administrarse el interferón con ribavirina.

En estos primeros trabajos se incluyeron exclusivamente pacientes infectados por virus G1, pero en nuestro trabajo se incluyeron también pacientes infectados por virus No-G1. En un estudio inicial en la cohorte de mono infectados, donde el 23% de los pacientes estaban infectados por No-G1, observamos que había una asociación entre genotipo viral y genotipo del locus IL28B. Los pacientes con genotipo rs12979860CC eran mayoritariamente infectados por No-G1 en comparación con G1 (66,7% vs 39,1%). Estudiamos este hallazgo en la otra cohorte de pacientes coinfectadas con VIH donde el porcentaje de individuos con infección No-G1 era mayor (52%). La asociación se confirmó al encontrarse que el genotipo CC de IL28B estaba también sobrerrepresentado en los pacientes infectados con No-G1 en comparación con G1 (56,8% vs. 41,4%). Estos resultados de distribución del genotipo IL28B entre los individuos estratificados por sus genotipos virales fueron posteriormente confirmados por otros grupos en otras cohortes de pacientes. Poco después de nuestro trabajo, en un estudio de 649 pacientes caucásicos se constató también que el genotipo CC era más frecuente en pacientes infectados por G3 (55%) que en los infectados por G1 (33.5%) (McCarthy *et al*, 2010). En otro estudio posterior en población española con pacientes VHC coinfectados con VIH (n=68) también se encontró esta asociación entre el genotipo CC y el genotipo viral VHC, el 56% de los pacientes infectados por G3 eran CC, frente al 41% con G1 (Pineda *et al*, 2010). Con respecto al genotipo rs8099917TT, el grupo de Huang analizó en una cohorte de pacientes del sur de Taiwán (n=1005 pacientes) la distribución del polimorfismo rs8099917T/G, identificando que el genotipo favorable a la resolución del virus, rs8099917TT, era más frecuente en los pacientes infectados por No-G1 que en los G1 (91,4% vs 85,0%) (Huang *et al*, 2011). Muy recientemente, el grupo de Alavian ha realizado un meta-análisis con 50 trabajos, 18662 pacientes y 1313 controles sanos, y confirman esta relación inesperada entre genotipo viral y genotipo IL28B, ya que encuentran asociación entre los genotipos virales favorables (G2 y G3) y los genotipos favorables de IL28B (rs12979860CC y rs8099917TT) (Aalaei-Andabili *et al*, 2014).

Ya que el genotipo rs12979860CC estaba asociado con genotipo viral y la respuesta al tratamiento, y por otra parte, existen diferencias de respuesta al tratamiento según el genotipo viral, siendo mayores las tasas de respuesta a la terapia en el grupo infectado por No-G1 en comparación con G1 (en nuestras cohortes 76% y el 36%,

respectivamente), estudiamos la respuesta al tratamiento estratificando a los pacientes por su genotipo viral y por su genotipo IL28B. En la cohorte de mono infectados, los individuos infectados por G1 y CC tenían una tasa de respuesta del 53,9% frente al 29,6% de los individuos CT+TT, mientras que los individuos infectados por No-G1 y eran CC tenían una tasa de respuesta del 87,2% frente al 84,2% de los individuos CT+TT. Esto se confirmó en la cohorte de coinfectados, aunque en este segundo estudio, donde el porcentaje de G4 era del 15% en comparación con el 4% del primer estudio, se agruparon los pacientes infectados con virus G1 y G4 por ser los virus con peor RS. Los individuos infectados por G1-G4 y con genotipo CC tenían una tasa de respuesta del 70,4% frente al 23,3% de los individuos CT+TT y los individuos infectados por G2-G3 y eran CC tenían una tasa de respuesta del 72,2% frente al 65% de los individuos CT+TT. Según estos resultados, la respuesta al tratamiento no se asoció al genotipo IL28B en los pacientes infectados por G2 y G3 y sí en los pacientes infectados por G1 y probablemente G4. Varios trabajos confirmaron posteriormente que la influencia del genotipo del hospedador con respecto a la respuesta al tratamiento podría ser más fuerte entre las personas infectadas por el G1 que entre las personas infectadas por No-G1, bien a través del genotipo rs12979860CC (McCarthy *et al*, 2010; Thompson *et al*, 2010) o de rs8099917TT (Rauch *et al*, 2010; Ochi *et al*, 2011).

Debido a la asociación de este polimorfismo y la RS, en nuestro trabajo nos propusimos también abordar su relación con el AVE. Nuestros resultados demostraron que el genotipo rs12979860CC era mucho más frecuente en los individuos con AVE que en los individuos VHC crónicos (72,5% vs 45,6%). Mientras elaborábamos el manuscrito, el grupo de Mary Carrington (Thomas *et al*, 2009) publicó unos meses antes estas mismas conclusiones. Estudiaron las distribuciones genéticas del rs12979860 en cohortes de pacientes de distinto origen étnico, y concluyeron que el genotipo CC favorecía fuertemente la resolución de la infección del VHC entre individuos americanos tanto de origen europeo como africano. Por lo tanto, nuestros resultados en una cohorte española apoyan la misma conclusión que este estudio. Posteriormente, otros trabajos han corroborado en otras poblaciones esta asociación, bien a través del genotipo rs12979860CC (Tillmann *et al*, 2010; Knapp *et al* 2011) como del genotipo rs8099917TT (Grebely *et al*, 2010; Rauch *et al*, 2010). Además, esta

asociación parece ser independiente del sexo, factor asociado de manera consistente con esta propiedad.

Con respecto al grado de fibrosis, nuestro estudio no encontró asociación con este polimorfismo, ni en la cohorte de mono infectados ni en la de coinfectados, distribuyéndose de forma similar las frecuencias genotípicas (CC vs CT+TT) entre los pacientes F0-F2 y F3-F4. Al igual que nosotros, otros grupos tampoco han encontrado asociación entre este locus y esta variable (Marabita *et al*, 2011); sin embargo, otros trabajos encuentran una asociación entre el genotipo rs12979860TT con un mayor grado de fibrosis (Falleti *et al*, 2011). Recientemente, el grupo de Sato *et al*, 2014, ha realizado un meta-análisis con 28 trabajos, y sí concluyen que el polimorfismo de este locus parece modificar la historia natural del curso de la enfermedad, ya que encuentran que el genotipo rs12979860CC está significativamente asociado con un mayor grado de fibrosis. Como vemos, mientras que en el resto de variables estudiadas (respuesta al tratamiento, aclaramiento viral espontáneo y genotipo viral) hay consenso en su asociación con el locus *IL28B*, siendo replicado en diferentes poblaciones, no está claro si la variación genética del locus *IL28B* afecta a la severidad y ritmo de la progresión de la enfermedad hepática, donde el papel del sexo masculino, la edad (Poynard *et al*, 1997) y el G3 (Bochud *et al*, 2009; De Nicola *et al*, 2009) sí están más establecidos.

Se han dado varias hipótesis, aunque sin un mecanismo inmunológico bien contrastado, para explicar la asociación del locus *IL28B* con la evolución de la infección del VHC. Así, se ha especulado que el alelo rs12979860C estaría relacionado con mayores tasas de mortalidad de los hepatocitos infectados (Scott *et al*, 2011) o a menores tasas de replicación viral (Hsu *et al*, 2011), lo que conllevaría a una respuesta virológica más intensa y conducirían a que los individuos con genotipo CC presentaran mayores tasas de eliminación del virus tanto espontánea como por el tratamiento. Con respecto a que la mayoría de los pacientes infectados por No-G1 eran CC, se especulaba con una posible selección positiva de los individuos CC por el virus No-G1, o a la inversa, una selección negativa de estos pacientes por los virus con G1. La identificación reciente del IFN- λ 4 ha dado algo de luz a la relación entre estos IFNs y la infección por el VHC, explicando el posible mecanismo inmunológico. En 2013 se identificó un polimorfismo di-nucleótido, ss469415590 (TT/ Δ G), localizado a 367 pb del polimorfismo rs12979860 y a 4 Kb del polimorfismo rs8099917, que crea (Δ G) o no

(TT) un nuevo marco abierto de lectura dando lugar a un nuevo gen de la familia de IFN- λ , al que se denominó IFN- λ 4 (Prokunina-Olsson *et al*, 2013). El alelo ss469415590 Δ G, creando IFN- λ 4, está en desequilibrio de ligamiento con el alelo desfavorable rs12979860T en poblaciones asiáticas ($r^2=1$) y europeas ($r^2=0,91$), aunque en población africana el desequilibrio de ligamiento es sólo moderado ($r^2=0,71$). Por otra parte, el desequilibrio de ligamiento entre ss469415590 Δ G y rs8099917G, es alto en poblaciones asiáticas ($r^2=0,91$), moderado en europeas ($r^2=0,44$) y muy bajo en africanas ($r^2=0,008$). Cuando el grupo de Prokunina-Olsson y colaboradores estudiaron la relación entre el polimorfismo ss469415590 e infección por VHC, concluyeron que el genotipo ss469415590TT/TT tiene una asociación más fuerte con el AVE y RS en población africana, mientras que es similar en europeos y asiáticos (Prokunina-Olsson *et al*, 2013).

IFN- λ 4 e IFN- λ 3 tienen gran homología en la región que interactúa con la cadena IFN λ R1 del receptor IFN- λ 3, pero difiere de la región de IFN- λ 3 que interactúa con la segunda cadena del receptor, IL10R2. Se desconoce si IFN- λ 4 activa la ruta JAK-STAT interactuando únicamente a través de la cadena IFN λ R1, o ésta se une con otra cadena formando un receptor específico de IFN λ 4. Estudios *in vitro* han demostrado que las células que expresan IFN λ 4 inducen una expresión constitutivamente alta de los ISGs, y no responden (no aumenta los ISGs) a la activación con IFN tipo I y III (Prokunina-Olsson *et al*, 2013). Aunque el mecanismo exacto de esta “no inducción” no se conoce, podría explicarse por un bloqueo de la cadena común (IFN λ R1) de los IFN λ , o por un proceso de feed-back negativo que regule negativamente la señalización JAK-STAT. En estudios previos ya se había observado que pacientes con el alelo rs12979860T, presentaban en hepatocitos una continua activación de los ISGs en presencia de ARN del VHC, pero el hepatocito no sólo no era capaz de eliminar al virus, sino tampoco de inducir una expresión mayor de estos genes cuando el IFN era administrado en la terapia. En el caso del alelo favorable, rs12979860C, ocurría lo contrario, estaba disminuida la expresión de los ISGs, activándose fuertemente después de administración de IFN- α , lo que resultaba en una eliminación más eficaz del virus (Hayes *et al*, 2012; Urban *et al*, 2012).

Teniendo en cuenta esta hipótesis, se podría especular que los individuos con genotipo CT o TT, tendrían una expresión constitutiva de los ISGs, que sería suficiente

para eliminar de forma espontánea a los virus No-G1 pero no G1; mientras que en los individuos con genotipo CC tendrían una expresión inducida de los ISGs durante la infección viral, lo que conllevaría en determinados individuos la eliminación espontánea del virus, independientemente del genotipo viral. Esta teoría explicaría que la infección por virus No-G1 sea más frecuente en individuos con genotipo CC (66,7% vs. 33,3%) y que este genotipo esté asociado con AVE (72,5% vs. 27,5%). Según esta teoría, aquellas poblaciones con menor frecuencia del alelo rs12979860C tendrían una mayor tasa de infección por virus G1, y en este sentido, se ha descrito que en las poblaciones africanas se dan las menores frecuencias del alelo rs12979860C y las mayores frecuencias de infección por virus G1 (Ge *et al*, Yu *et al*, 2009). Con respecto al tratamiento, cuando se administra el tratamiento con IFN, los individuos con genotipo CT o TT no responderían al tratamiento pero seguirían eliminando espontáneamente los virus No-G1. Por el contrario, los individuos con genotipo CC, si responderían al tratamiento, eliminando los virus tanto G1 como No-G1. Esto explicaría la asociación del genotipo CC en individuos infectados por virus G1 con RS (53,9% vs. 29,6%), mientras que en individuos con genotipo CT o TT la eliminación espontánea de virus No-G1 sería similar a la eliminación inducida por el tratamiento en individuos con genotipo CC (87,2% vs. 84,2).

Esta teoría también explicaría que el porcentaje de RS, en pacientes infectados por virus G1 y tratados con agentes antivirales de acción directa (AAD), utilizados en la triple terapia, no esté relacionada con los genotipos rs12979860 (Chuang *et al*, 2013). Los AADs inhiben directamente las proteínas virales por un mecanismo independiente de la acción de los IFNs. A pesar de que con la triple terapia se consiguen mayores porcentajes de RS con independencia del genotipo viral y genotipos rs12979860, la triple terapia, además del coste económico que genera, también ocasiona más efectos secundarios, como exantema cutáneo, anemia o dispepsia, lo que requiere un seguimiento más exhaustivo de los pacientes y más frecuente. Actualmente, el genotipo IL28B es de gran utilidad clínica para el manejo de los pacientes “naive” sin afectación hepática importante (F0-F2). La triple terapia solamente se utiliza como primera línea de tratamiento en los pacientes infectados con virus G1 y genotipos desfavorables (CT o TT), pacientes en los que se espera que el porcentaje de RS a la combinación de PegIFN y RBV, sea baja. Por el contrario en los pacientes infectados con virus G1 y genotipo

CC, o pacientes infectados por virus No-G1 con independencia del genotipo rs12979860, se sigue utilizando como tratamiento de primera línea la combinación de PegIFN y RBV.

Poco después de describirse la asociación entre el locus *IL28B* y la infección por VHC, se identificó el locus *HAVCR1* asociado con AVE en poblaciones de origen europeo (rs953569) y africano (rs6880589) (Mosbrugger *et al*, 2010). La investigación del rs953569 en nuestra cohorte de pacientes aclaradores espontáneos no confirmó esta asociación, de la misma manera que tampoco encontramos relación entre este polimorfismo, la RS o el grado de fibrosis en nuestras dos cohortes de pacientes. Sin embargo, en la cohorte de monoinfectados se observó una relación entre los genotipos rs953569 y el genotipo viral, ya que el genotipo rs953569TT era más frecuente entre los pacientes infectados por virus No-G1 que entre los que estaban infectados por G1 (38,47% vs. 19,34%); pero esta asociación no se confirmó en la cohorte de pacientes infectados por VIH. No se estudió el polimorfismo rs6880589 porque el alelo minoritario tiene una frecuencia inferior al 5% en población europea (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Debido a que nuestro grupo había estudiado la asociación de este gen con enfermedades autoinmunes, como artritis reumatoides y lupus eritematoso sistémico (García-Lozano *et al*, 2010), decidimos profundizar en el estudio genético de este gen, estudiando los SNPs y las variantes de inserción/delección en el exón 4 que definían los 4 haplotipos (A-D) identificados en este gen. No se encontró asociación entre los haplotipos y el AVE, ni tampoco con la RS y el grado de fibrosis en las dos cohortes de pacientes. Sin embargo, encontramos diferencias estadísticamente significativas cuando analizamos la distribución del genotipo viral en función del haplotipo del gen, tanto en la cohorte de monoinfectados como en la cohorte de coinfección con VIH. Los pacientes con haplotipo C tenían la mayor tasa de infección por virus G1 (75,82%), por el contrario los individuos con haplotipo D tenían la menor tasa de infección por virus G1 (57,72%), mientras que los individuos con haplotipo A o B tenían valores intermedios (66%). Nuestros resultados sugieren que las diferentes tasas de infección entre genotipo viral y haplotipos *HAVCR1* se deberían a diferencias localizadas en el exón 4 y no a diferencias de expresión del ARNm, ya que los haplotipos A y B, que tienen la misma combinación ins/del en el exón 4, pero presentan niveles diferentes de ARNm, poseen la

misma tasa de infección por G1. Y al igual que ocurría para el locus *IL28B*, en población africana se dan las mayores frecuencias del haplotipo C del gen *HAVCR1* y la mayor tasa de infección por G1, y en población asiática el escenario es el opuesto: menores tasas de infección por G1 y frecuencia más baja del haplotipo C (Nakajima *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2009).

A diferencia de *IL28B*, el gen *HAVCR1* no está asociado con AVE o respuesta al tratamiento, por lo que no es probable que su asociación con el genotipo viral sea por un mecanismo inmunológico, es decir, por su función en la respuesta inmunitaria. Se han descubierto los ARN de interferencia (ARNi), pequeños ARN que bloquean la expresión de los genes, y de entre sus muchas funciones reguladoras, estaría la de mediar en la respuesta del hospedador a la infección viral. En las células infectadas por virus se han identificado ARNi cuyas secuencias coinciden con genoma del hospedador y del virus (Parameswaran *et al.* 2010). Esto plantea la hipótesis de que pequeños ARNi del hospedador, con perfecta homología con el genoma viral, participen en los mecanismos de control de la infección, al unirse al ARN viral y bloquear su traducción. Varios trabajos han demostrado que el ARNi sintético se podría utilizar para controlar la infección por virus de ARN como el VHC y el VIH a través de una inhibición específica de secuencia (Aliyari *et al.*, 2009); no obstante, el alto porcentaje de mutación del VHC y que las variantes escaparían rápidamente de la inhibición por el ARNi, complican esta posibilidad terapéutica (Wilson *et al.*, 2005). Analizando la secuencia del ARNm del gen *HAVCR1*, se observa que la secuencia del exón 4 tiene homología con secuencias del genoma del VHC (figura 17), y se podría postular que al degradarse el ARN del gen *HAVCR1* en las células infectadas, estos fragmentos homólogos actuarían de ARNi y bloquearían la expresión de los genes virales. La secuencia del exón 4 del haplotipo C contiene dos secuencias en tándem con homología a regiones del genotipo viral, tanto G1 como No-G1, siendo mayor el grado de complementariedad con estos últimos, lo que podría favorecer la resistencia de estos individuos a ser infectados por virus No-G1. Esto explicaría que el ratio G1/No-G1 esté aumentado con respecto a la población total. Por su parte, el haplotipo D tiene dos regiones con homología para los virus G1 y una para los virus No-G1, lo que favorecería la resistencia a las infecciones por los virus G1 y explicaría que el ratio G1/No-G1 esté disminuido con respecto a la población total. Los haplotipos A y B tienen solo una región complementaria para virus

G1 y No-G1, por lo que presentarían igual resistencia a ser infectados por ambos genotipos y explicaría que el ratio sea similar a la población total. Hay que mencionar, que no hemos realizado ningún estudio funcional en este sentido.

Figura 17. Alineación entre el ARNm del exón 4 del gen *HAVCRI* y secuencias complementarias de la cadena negativa del ARN del VHC (las discordancias se muestran en rojo). Se muestran las variantes de inserción en el exón 4 del gen *HAVCRI*: 5383_5397ins (marcada en negrita) y 387_5389insAAC (marcada en negrita mayúscula).

		Identidad (nt)
Haplotipo A-B	aacgacaacgacuguuccaacgacaacuguuccaacaacaauga	
Genotipo 1b	uugcugacaagguugc	16/16
Genotipo 2	uugcugacaagguu ac ugu	18/19
Genotipo 3	guugcugacaagguu acc gu	18/20
Haplotipo C	aacgacaacgacuguucaa ugacAACgacuguu ccaa cg acaaa	
Genotipo 1b	uugcugacaagguu	14/14
	uugcugacaagguugc	16/16
Genotipo 2	uugcugacaagguu ac ugu	19/19
	uugcugacaagguu ac ugu	18/19
Genotipo 3	guugcugacaagguu acc gu	19/20
	guugcugacaagguu acc gu	18/20
Haplotipo D	aacgacaacgacuguucaa ugacgacuguu ccaa cg acaa cu guu	
Genotipo 1	uugcugacaagguu	14/14
	ugcugacaagguugc	15/15
Genotipo 2	uugcugacaagguu ac ug	18/18
	ugcugacaagguu ac ugu	17/18
Genotipo 3	guugcugacaagguu ac	17/17
	ugcugacaagguu acc gu	16/18

Recientemente en otro estudio realizado por el mismo grupo que describió la asociación del gen *HAVCRI* con AVE en poblaciones europeas y africanas, no pudieron confirmar en otra cohorte de pacientes europeos la asociación del gen con AVE, aunque si se confirmó en otra cohorte de origen africano (Wojcik *et al*, 2014). Estos resultados, junto con los nuestros, avalarían la hipótesis que el gen *HAVCRI* estaría asociado con AVE en población africana pero no en europea. Como hemos comentado en la introducción, *HAVCRI* favorece la diferenciación de linfocitos T a Th2 y está implicado en la respuesta inmunológica en la fase aguda de la infección por VHC. La hipótesis de

este grupo es que las regiones reguladoras de la expresión del gen es más polimórfica en población africana que europea, y que ciertos polimorfismos en estas regiones estarían relacionados con la expresión del gen.

Con respecto al estudio del gen *TANK* y para cubrir toda la región, seleccionamos 8 tSNPs, uno de ellos, el rs1267059 estaba en desequilibrio de ligamiento ($r^2=1$) con el rs1267077, descrito por Mosbrugger *et al* como asociado con AVE en población europea. Nuestro estudio no confirmó esta asociación, ni con este SNP ni con el resto de SNPs estudiados. Sin embargo, sí encontramos diferencias significativas entre la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de algunos de estos polimorfismos con las otras variables. Lo más significativo, fue encontrar asociación con el grado de fibrosis en las dos cohortes de pacientes estudiadas, mono infectados y coinfectados. El rs7568494 y el haplotipo D (marcado por este SNP) se encontraron asociados con fibrosis en la cohorte de pacientes mono infectados, y el rs1267077 y el haplotipo C (marcado por este SNP) en la cohorte de pacientes VHC/VIH. Así, la frecuencia de los genotipos del rs7568494 GG+GT (modelo dominante) estaba aumentada en los pacientes con grado F3-F4 con relación a los F0-F2 en los pacientes mono infectado (38% vs. 26%), mientras que la frecuencia de los genotipos rs1267077 GG+GT (modelo dominante) estaba elevada en los pacientes F3-F4 con respecto a los F0-F2 en los pacientes coinfectados (40% vs. 23%). En el resto de variables estudiadas, respuesta al tratamiento y genotipo viral, encontramos asociación bien en la cohorte de pacientes mono infectados o en la de coinfectados, pero no en las dos a la vez. De esta manera, encontramos asociación entre el gen y la RS en el grupo de pacientes coinfectados pero no en el grupo de mono infectados, y por el contrario, encontramos asociación con genotipo viral en los pacientes mono infectados y no en los coinfectados. El hecho de que la asociación detectada en un grupo no se detecte en el otro, nos lleva a no poder confirmar dicha asociación en población española. No obstante, estas diferencias pueden deberse a que no son cohortes idénticas, donde es bien conocido que la infección por el VIH modifica el curso de la del VHC.

En resumen, nuestros datos parecen indicar que este gen puede estar implicado en la evolución de la infección por el VHC, pero no hay ningún otro trabajo publicado analizando esta relación. Como se ha comentado, *TANK* es una proteína que interviene en la activación del complejo TBK1/IKK ϵ y este, a su vez, activa los factores de

transcripción IRF3 y NFκB que inducen la expresión de los genes de IFN tipo I y III. Con respecto a la fibrosis, citoquinas de la respuesta Th1, como los interferones, acelerarían la disolución de la matriz (fibrólisis), mientras que citoquinas de la respuesta Th2 (TGF-β1, IL4, IL10) promoverían la fibrogénesis. Por tanto, ciertos polimorfismo podrían modular la unión de esta proteína adaptadora con el complejo TBK1/IKKε y regular la producción de IFN (Guo, 2007), y de esta manera influir en la evolución de la infección por VHC.

Para la investigación del gen *TNFSF18* con la infección del VHC, seleccionamos 4 tSNPs con los que se cubrían todos los polimorfismos de esta región en población CEU. Entre estos tSNPs estaba el rs7546619, en desequilibrio de ligamiento con el rs2236876, asociado con AVE en población americana de origen europeo, y el rs723858, asociado con AVE en población americana de origen africano (Mosbrugger *et al*, 2010). El estudio en nuestras cohortes de pacientes no confirmó la asociación de este gen con AVE en población europea. Tampoco encontramos ninguna asociación ni con el tratamiento ni con el genotipo viral en las dos cohortes de pacientes incluidas. Sin embargo, sí se encontró una asociación con el grado de fibrosis en la cohorte de pacientes coinfectados, sin embargo, esta asociación no se encontró en los pacientes mono infectados.

Como se ha comentado en la introducción, TNFSF18 es una proteína que se expresa fundamentalmente en células presentadoras de antígeno e interacciona con su receptor en linfocitos T efectores y linfocitos Treg. Los niveles de expresión de TNFSF18 en las células presentadoras de antígenos estarían relacionados con el curso evolutivo de las infecciones virales. Altos niveles de expresión activaría a los linfocitos T efectores y controlarían la infección viral, mientras que niveles bajos, activarían los linfocitos Treg, favoreciendo infecciones virales persistentes por una respuesta inmune mermada (Nocentini *et al*, 2005). Así, el hecho de que esta proteína esté implicada tanto en la activación de linfocitos T efectores como de linfocitos Treg a través de sus niveles de expresión, polimorfismos de su secuencia podrían estar relacionados con una mayor o menor expresión de la proteína o con la formación de trímeros de TNFSF18 que resulta en un incremento de la afinidad con su receptor 100 veces superior, y por lo tanto estar implicados en la regulación de la respuesta inmunológica. Esta teoría podría explicar la asociación encontrada con el AVE (Mosbrugger *et al*, 2010), sin embargo,

nuestro trabajo no replica esta asociación en población española. Hasta la fecha no hay ningún otro trabajo publicado que haya replicado en otras poblaciones la asociación encontrada por Mosbrugger *et al.*

Esta regulación de la activación de los linfocitos Treg podría explicar la asociación encontrada entre este gen y el grado de fibrosis en los pacientes coinfectados con VHC/VIH. Los linfocitos Treg se encuentran aumentados en biopsias de hígados de pacientes con infección crónica y con grado más severo de fibrosis, lo que sugiere que la activación de estas células estaría implicada en la gravedad de la patología hepática (Delhem *et al.*, 2008). El hecho de que no se confirme esta asociación con la cohorte de mono infectados, puede ser debido a que la presencia de infección por VIH es un factor que acelera la progresión y la gravedad de la patología del hígado, y en ese escenario más hostil, es donde se puede evidenciar más el papel de los linfocitos Treg activados por la interacción de TNFSF18 con su receptor.

Por último, para la investigación del locus *IL18BP* con la infección del VHC, seleccionamos el rs2298455, asociado con AVE en población americana de origen europeo (Mosbrugger *et al.* 2010), y otros 2 tSNPs (rs3793941 y rs7131230) con los que cubríamos todos los polimorfismos de esta región en población CEU. En nuestro estudio no se confirmó la asociación del rs2298455 con el AVE, sin embargo, el rs7131230 sí se encontraba asociado a través de un modelo dominante. Los genotipos CC+CT eran más frecuentes entre los individuos con AVE que entre los individuos VHC crónicos (61,1% vs. 47,8%). La explicación del porqué en población española esté asociado otro SNP distinto al encontrado en población americana, sería explicable por el hecho de que las frecuencias de los distintos SNPs es diferente de unas poblaciones a otras y porque los bloque de ligamientos de los SNPs es variable también entre poblaciones. No obstante, al igual que hicimos con el estudio del locus *IL28B*, debido a que el sexo femenino ha sido asociado con el AVE (Bakr *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2012), analizamos la frecuencia del genotipo CC+CT de las mujeres AVE y de los hombres AVE, y obtuvimos que en las mujeres estaba también más representado el genotipo CC+CT que en los hombres (71% vs. 50%). Aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p=0,06$), pero nos alerta de un posible sesgo de la asociación del rs7131230 con el aclaramiento, por lo que no podemos asegurar que la asociación de este polimorfismo con el AVE sea independiente del sexo. Al darnos

asociado este polimorfismo, también nos lo dio el haplotipo B, ya que dicho SNP marcaba este haplotipo, pero como era de esperar también se detectaron diferencias en la distribución del haplotipo B entre las mujeres y los hombres. Hasta la fecha no hay ningún otro trabajo publicado que pueda confirmar o descartar la asociación de *IL28BP* con AVE. Con el resto de variables analizadas: respuesta al tratamiento, genotipo viral y fibrosis, no se encontró asociación en ninguna de las dos cohortes de pacientes estudiadas.

El estudio del locus *IL18BP* era atractivo ya que IL18BP es una proteína secretada que puede unirse y neutralizar a IL18, que es una interleucina estimuladora de IFN γ . Este interferón es crítico en la defensa del hombre frente a una amplia variedad de patógenos intracelulares, incluido el VHC; así, inhibe eficientemente *in vitro* la replicación del VHC (Frese *et al*, 2002) y parece estar asociada con el aclaramiento viral en chimpancés (Woollard *et al*, 2003). Apoyando esto se encuentra que el SNP -764G/C de la región promotora del gen IL18 es funcionalmente importante para favorecer el aclaramiento tanto espontáneo como mediado por tratamiento del VHC en el hombre (Huang *et al*, 2007; An *et al*, 2008). Por lo tanto es posible que polimorfismos en IL18BP puedan favorecer o inhibir su unión con IL18, controlando la actividad de la interleucina y con ello una mayor o menor producción de IFN γ . Sin embargo, en este trabajo no hemos podido demostrar que IL18BP tenga alguna influencia en el curso de la infección por VHC.

CONCLUSIONES

- 1. Se ha replicado en nuestra población la relación del gen *IL28B* con en el aclaramiento viral espontáneo y la respuesta al tratamiento con interferón y ribavirina.**
- 2. El gen *TANK* está relacionado con el grado de afectación hepática.**
- 3. Se han identificado factores genéticos del hospedador, *IL28B* y *HAVCR1*, relacionados con el tipo de genotipo viral infectante.**

BIBLIOGRAFÍA

Aalaei-Andabili SH, Behnava B, Salimi SH, *et al.* Mysterious Linkages Between Hepatitis C Virus Genotypes, Interleukin-28B Genotypes and Viral Clearance- A Meta-Analysis. 2014. *Hepat Mon.* 14(3): e15895

Abe H, Ochi H, Maekawa T, *et al.* Common variation of IL28 affects γ GTP levels and inflammation of the liver in chronically infected Hepatitis C virus patients. 2010. *J. Hepatol.* 53: 439–443

Aggarwal BB, Moffat B, Harkins RN. Human lymphotoxin: production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. 1984. *J Biol Chem.* 259(1): 686-691.

Aggarwal BB, Henzel WJ, Moffat B, *et al.* Primary structure of human lymphotoxin derived from 1788 lymphoblastoid cell line. 1985. *J Biol Chem.* 260(4): 2334-2344.

Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. 2012. *Blood.* 119: 651-665

Alberti A, Negro F. The Global health burden of hepatitis C virus infection. 2011. *Liver International.* 31 (2): 1-3

Alric L, Fort M, Izopet J, *et al.* Genes of the major histocompatibility complex class II influence the outcome of hepatitis C virus infection. 1997. *Gastroenterology.* 113:1675–1681.

Aliyari R, Ding SW. RNA-based viral immunity initiated by the Dicer family of host immune receptors. 2009. *Immunol Rev* 227:176-188.

An P, Thio CL, Kirk GD, *et al.* Regulatory polymorphisms in the interleukin-18 promoter are associated with hepatitis C virus clearance. 2008. *J Infect Dis* 198(8):1159–1165.

Antonucci G, Longo MA, Angeletti C, *et al.* The Effect of Age on Response to Therapy With Peginterferon alpha Plus Ribavirin in a Cohort of Patients With Chronic HCV Hepatitis Including Subjects Older Than 65 Yr. 2007. *The American Journal of Gastroenterology* 102 1383–1391

Arase Y, Suzuki F, Suzuki Y, *et al.* Sustained virological response reduces incidence of onset of type 2 diabetes in chronic hepatitis C. 2009. *Hepatology* 49:739–744.

Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, *et al.* Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. 2011. *N Engl J Med* 364: 1207–17.

Bakr I, Rekacewicz C, El Hosseiny M, *et al.* Higher clearance of hepatitis C virus infection in females compared with males. 2006. *Gut* 55(8):1183–1187.

Barreiro P, Martín-Carbonero L, Nuñez M, *et al.* Predictors of Liver Fibrosis in HIV-Infected Patients with Chronic Hepatitis C Virus (HCV) Infection: Assessment Using

Transient Elastometry and the Role of HCV Genotype 3. 2006. *Clinical Infectious Diseases* 42:1032–1039

Baur K, Mertens JC, Schmitt J, *et al.* Combined effect of 25-oh Vitamin D plasma levels and genetic Vitamin D receptor (nr 1i1) variants on fibrosis progression rate in HCV patients. 2012. *Liver Int.* 32: 635–643.

Bazan JF, Timans JC, Kaselein RA. A newly defined interleukin-1?. 1996. *Nature.* 379 (15): 591.

Becker T, Knapp M. Maximum-Likelihood Estimation of Haplotype. Frequencies in Nuclear Families. 2004. *Genetic Epidemiology* 27: 21–32.

Bhattacharjee V, Prescott L, Pike I, *et al.* Use of NS-4 peptides to identify type-specific antibody to hepatitis C virus genotypes 1, 2, 3, 4, 5 and 6. 1995. *J Gen Virol* 76:1737-1748

Bochud PY, Cai T, Overbeck K, *et al.* Genotype 3 is associated with accelerated fibrosis progression in chronic hepatitis C. 2009. *J Hepatol* 51:655-666

Bukh J, Miller R, Purcell R. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. 1995. *Semin Liver Dis.* 15:41-54

Chae SC, Song JH, Lee YC, *et al.* The association of the exon 4 variations of *Tim-1* gene with allergic diseases in a Korean population. 2003. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 312:346-350

Chattopadhyay K, Ramagopal UA, Mukhopadhaya A, *et al.* Assembly and structural properties of glucocorticoid-induced TNF receptor ligand: Implications for function. 2007. *PNAS* 104 (49): 19452-19457

Cheng G, Bahimore D. TANK, a co-inducer with TRAF2 of TNF- and CD40L-mediated NF-KB activation. 1996. *Genes Dev.* 10: 963-973

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, *et al.* Isolation of cDNA clone derived from blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. 1989. *Science.* 244:359-362.

Chuang WL, Yu ML. Host factors determining the efficacy of hepatitis C treatment. 2013. *J Gastroenterol* 48: 22-30

Conjeevaram HS, Kleiner DE, Everhart JE, *et al.* Race, insulin resistance and hepatic steatosis in chronic hepatitis C. 2007. *Hepatology* 45:80–87.

Croft M, Duan W, Choi H, *et al.* TNF superfamily in inflammatory disease: translating basic insights. 2012. *Trends in Immunology* 33 (3): 144-152

Dai CY, Chuang WL, Chang WY, *et al.* Tumor necrosis factor- α promoter polymorphism at position -308 predicts response to combination therapy in hepatitis C virus infection. 2006. *J Infect Dis.* 193:98–101.

Dai CY, Chuang WL, Ho CK, *et al.* Associations between hepatitis C viremia and low serum triglyceride and cholesterol levels: a community-based study. 2008. *J Hepatol* 49:9–16.

Dai CY, Chuang WL, Hsieh MY, *et al.* Human leukocyte antigen alleles and the response to pegylated interferon/ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. 2010. *Antivir Res.* 85:396–402

Delhem N, Cottrez F, Carpentier A, *et al.* Role of the Regulatory T lymphocytes in hepatitis C fibrosis progression. 2008. *Bull Cancer* 95 (11): 1029-1038

De Nicola S, Aghemo A, Rumi MG, Colombo M. HCV genotype 3: an independent predictor of fibrosis progression in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2009;51:964-966

Degauque N, Mariat Ch, Kenny J *et al.* Immunostimulatory Tim-1-specific antibody deprograms Tregs and prevents transplant tolerance in mice. 2008. *J. Clin. Invest.* 118:735–741

Di Martino V, Rufat P, Boyer N, *et al.* The Influence of Human Immunodeficiency Virus Coinfection on Chronic Hepatitis C in Injection Drug Users: A Long-Term Retrospective Cohort Study. 2001. *Hepatology* 34: 1193-1199

Dittmer U, He H, Messer RJ, *et al.* Functional Impairment of CD8 T Cells by Regulatory T Cells during Persistent Retroviral Infection. 2004. *Immunity* 20:293-303

Doyle JS, Hellard ME, Thompson AJ. The role of viral and host genetics in natural history and treatment of chronic HCV infection. 2012. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 26: 413–427

Dumoutier L, Tounsi A, Michiels Th, *et al.* Role of the Interleukin (IL)-28 Receptor Tyrosine Residues for Antiviral and Antiproliferative Activity of IL-29/Interferon- λ 1. 2004. *J. Biological Chemistry.* 279 (31): 32269–32274

Ebeling F. Epidemiology of the Hepatitis C Virus. 1998. *Vox Sanguinis* 1998; 74 (Suppl. 2): 143-146

EASL. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. 2011. *Journal of Hepatology* 55: 245–264

Estrabaud E, Vidaud M, Marcellin P, Asselah T. Genomics and HCV infection: Progression of fibrosis and treatment response. 2012. *Journal of Hepatology.* 57: 1110–1125

- Fabris C**, Falleti E, Cussigh A, *et al.* The interleukin 28b rs12979860 C/T polymorphism and serum cholesterol as predictors of fibrosis progression in patients with chronic Hepatitis C and persistently normal transaminases. 2012. *J. Med. Virol.*84, 747–755
- Falleti E**, Bitetto D, Fabris C, *et al.* Role of Interleukin 28B rs12979860 C/T Polymorphism on the Histological Outcome of Chronic Hepatitis C: Relationship with Gender and Viral Genotype. 2011. *J Clin Immunol*; 31(5): 891–899.
- Feeney ER**, Chung RT. Antiviral treatment of hepatitis C. 2014. *BJM. Clinical Research.* Jul(7): 348-361
- Feigelstock D**, Thompson P, Mattoo P, *et al.* The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. 1998. *J Virol* 72:6621–6628.
- Franciscus A.** A brief history about hepatitis C. 2010. Hepatitis C Support Project (HCSP. Version 5.1, March) www.hcvadvocate.org
- Freeman GJ**, Casanovas JM, Umetsu DT, DeKruyff RH. *TIM* genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. 2010. *Immunol Rev.* 235:172-189
- Frese M**, Schwärzle V, Barth K, *et al.* Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. 2002. *Hepatology.* 35(3):694-703.
- García-Lozano JR**, Abad C, Escalera A, *et al.* Identification of HAVCR1 gene haplotypes associated with mRNA expression levels and susceptibility to autoimmune diseases. 2010. *Hum Genet* 128:221-9.
- Ge D**, Fellay J, Thompson AJ, *et al.* Genetic variation in *IL28B* predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. 2009. *Nature* 46:399-401.
- Grebely J**, Petoumenos K, Hellard M *et al.* Potential role for IL28B genotype in treatment decision-making in recent hepatitis C virus infection. 2010. *Hepatology* 52(4): 1216–1224
- Griffin S**, Clarke D, McCormick C, *et al.* Signal peptide cleavage and internal targeting signals direct the hepatitis C virus p7 protein to distinct intracellular membranes. *J. Virol.* 2005 (24):15525-15536
- Guo B**, Cheng G. Modulation of the Interferon Antiviral Response by the TBK1/IKKi Adaptor Protein TANK. 2007. *The Journal of Biological Chemistry* 282 (16): 11817–11826
- Gurney AL**, Marsters SA, Huang A, *et al.* Identification of a new member of the tumor necrosis factor family and its receptor, a human ortholog of mouse GITR. 1999. *Current Biology* 9:215–218

Hadziyannis SJ, Sette H, Morgan TR, *et al.* Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. 2004. *Ann Intern Med.* 140(5): 346–355.

Hayashi J, Kishihara Y, Ueno K, *et al.* Age-related response to interferon alfa treatment in women vs men with chronic hepatitis C virus infection. 1998. *Arch Intern Med* 26;158(2):177–181.

Hayes CN, Imamur M, Aikata H, Chayama K. Genetics of IL28B and HCV-response to infection and treatment. 2012. *Nature Rev. Gastroenterology&Hepatology.* 9:406-417

Heim MH. Interferons and hepatitis C virus. 2012. *Swiss Medical Weekly.* 142:1-13

Huang ChF, Yang JF, Dai ChY, *et al.* Efficacy and Safety of Pegylated Interferon Combined with Ribavirin for the Treatment of Older Patients with Chronic Hepatitis C. 2010. *The Journal of Infectious Diseases* 201:751–759

Huang ChF, Dai Ch-Y, Huang JF, *et al.* Linkage of the Hepatitis C Virus Genotype and Interleukin-28B Genetic Polymorphisms in Asian Patients. 2011. *Hepatology*, January: 367-368

Huang J, Smirnov SV, Lewis-Antes A, *et al.* Inhibition of type I and type III interferons by a secreted glycoprotein from Yaba-like disease virus. 2007. *PNAS.* 5(104): 9822–9827

Huang Y, Yang H, Borg BB, *et al.* A functional SNP of interferon-gamma gene is important for interferon-alpha-induced and spontaneous recovery from hepatitis C virus infection. 2007. *PNAS* 104(3):985–990.

Hsieh MY, Dai CY, Lee LP, *et al.* Antinuclear antibody is associated with a more advanced fibrosis and lower RNA levels of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. 2008. *J Clin Pathol.* 61:333–337.

Hsu CS. *et al.* Association of *IL28B* gene variations with mathematical modeling of viral kinetics in chronic hepatitis C patients with IFN plus ribavirin therapy. 2011. *PNAS* 108, 3719–3724.

Ichimura T, *et al.* Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. 1998. *J Biol Chem* 273:4135–4142

Iniesta R, Elisabet Guinó, Víctor Moreno. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. 2005. *Gac Sanit.* 19(4): 333-341

International HapMap Consortium: A haplotype map of the human genome. 2005. *Nature*, 437:1299-1320.

Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference I. The interferon. 1957. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. 147(927):258–267.

Iwata R, Baur K, Stieger B, *et al.* A common polymorphism in the *abcb11* gene is associated with advanced fibrosis in Hepatitis C but not in non-alcoholic fatty liver disease. 2011. Clin. Sci. (Lond.) 120: 287–296.

Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, *et al.* Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. 2011. N Engl J Med. 364(25): 2405–2416.

Ji Hb, Liao G, Faubion WA, *et al.* Cutting Edge: The Natural Ligand for Glucocorticoid-Induced TNF Receptor-Related Protein Abrogates Regulatory T Cell Suppression. 2004. J Immunol; 172:5823-5827

Johnson GC, Esposito L, Barratt BJ, *et al.* Haplotype tagging for the identification of common disease genes. 2001. Nat Genet. 29: 233–237.

Kaplan G, Totsuka A, Thompson P, *et al.* Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. 1996. EMBO J 15: 4282–4296.

Kato N. Molecular Virology of Hepatitis C Virus. 2001. Acta Med. Okayama. 55(3):133-159

Kawaguchi T, Ide T, Taniguchi E, *et al.* Clearance of HCV improves insulin resistance, beta-cell function, and hepatic expression of insulin receptor substrate 1 and 2. 2007. Am J Gastroenterol 102:570–576

Khademi M, Illés Z, Gielen AW, *et al.* T Cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-3 (TIM-3) and TIM-1 molecules are differentially expressed on human Th1 and Th2 cells and in cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis. 2004. J. Immunol. 172(11):7169-7176

Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, *et al.* HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. 2004. Science 305:872–874

Knapp S, Hennig BJW, Frodsham AJ, *et al.* Interleukin-10 promoter polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection. 2003. Immunogenetics 55: 362–369

Knapp S, Yee LJ, Frodsham AJ, *et al.* Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of MxA, OAS-1 and PKR. 2003. Genes and Immunity 4: 411–419

Knapp S, Warshow U, Alexander Ho KM *et al.* A Polymorphism in *IL28B* Distinguishes Exposed, Uninfected Individuals From Spontaneous Resolvers of HCV Infection. 2011. Gastroenterology. 141(1): 320–325

Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, *et al.* IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. 2003. *Nat Immunol.* 4(1): 69–77.

Kuchroo VK, Dardalhon V, Xiao S, Anderson AC. New roles for TIM family members in immune regulation. 2008. *Nature Reviews Immunology* 8:577-580

Kwon B, Yu KY, Ni J, *et al.* Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand. 1999. *J. Biol. Chem.* 274: 6056–6061.

Lauer GM, Walker DW. Hepatitis C Virus Infection. 2001. *New England Journal of Medicine* 345(1): 41-52

Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. 2011. *Clin Microbiol Infect* 17: 107–115

Li JS, Liu QJ, Wang P *et al.* Absence of association between two insertion/deletion coding genetic polymorphisms of TIM-1 gene and asthma in Chinese Han population. 2006. *Int J Immunogenet* 22:417-422

Lloyd AR, Jagger E, Post JJ, *et al.* Host and viral factors in the immunopathogenesis of primary hepatitis C virus infection. 2007. *Immunol Cell Biol.* 85(1): 24-32

Lok A. HCV NS5A Inhibitors in Development.2013. *Clin Liver Dis* 17: 111–121

Maasoumy B, Wedemeyer H. Natural history of acute and chronic hepatitis C. 2012. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 26: 401–412

Mangia A, Thompson AJ, Santoro R, *et al.* An *IL28B* polymorphism determines treatment response of hepatitis C virus genotype 2 or 3 patients who do not achieve a rapid virologic response. 2010. *Gastroenterology* 139: 821–827

Marabita F, Aghemo A, De Nicola S, *et al.* Genetic variation in the interleukin-28b gene is not associated with fibrosis progression in patients with chronic Hepatitis C and known date of infection. 2011. *Hepatology* 54: 1127–1134.

Marcello T, Grakoui A, Barba-Spaeth G, *et al.* Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. 2006. *Gastroenterology.* 131(6):1887-1898

Martín-Carbonero L, Benhamou Y, Puoti M, *et al.* Incidence and Predictors of Severe Liver Fibrosis in Human Immunodeficiency Virus–Infected Patients with Chronic Hepatitis C: A European Collaborative Study. 2004. *Clinical Infectious Diseases* 38:128–133

- Martínez-Sierra C**, Arizcorreta A, Díaz F, *et al.* Progression of chronic hepatitis C to liver fibrosis and cirrhosis in patients coinfecting with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. 2003. *Clinical Infectious Diseases* 36:491-498
- Mastroianni CM**, Liuzzi GM, D'Ettoire G, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1 in plasma of patients co-infected with HCV and HIV. 2002. *HIV Clinical Trials*. 3(4):310-315
- McCarthy JJ**, Li JH, Thompson A, *et al.* Clinical advances in liver, pancreas, and biliary tract 2010. *Gastroenterology* 138: 2307-2314
- McCarthy MI**, Abecasis GR, Cardon LR, *et al.* Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenge. 2008. *Nature Reviews Genetics*. 9: 356-369
- McIntire JJ**, *et al.* Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. 2001. *Nat Immunol* 2:1109–1116.
- Meyers JH**, Chakravarti S, Schlesinger D, *et al.* TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1–TIM-4 interaction regulates T cell proliferation. 2005. *Nat Immunology* 6:455-464.
- Micallef J**, Kaldor J, Dore G. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. 2006. *J Viral Hepat.* 13(1):34–41.
- Miyanishi M**, Tada K, Koike M, *et al.* Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. 2007. *Nature* 450:435-439
- Mosbrugger TL**, Duggal P, Goedert JJ, *et al.* Large-Scale candidate gene analysis of spontaneous hepatitis C virus clearance. 2010. *J Infect Dis.* 201(9): 1371–1380
- Muir AJ**, Bornstein JD, Killenberg PG. Peginterferon alfa-2b and ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C in blacks and non-Hispanic whites. 2004. *New Engl J Medicine* 350:2265–2271
- Nakajima T**, Wooding S, Satta Y, *et al.* Evidence for natural selection in the HAVCR1 gene: high degree of amino-acid variability in the mucin domain of human HAVCR1 protein. 2005. *Genes Immun* 6:398-406.
- Nakamura K**, Okamura H, Wada M, *et al.* Endotoxin-Induced Serum Factor That Stimulates Gamma Interferon Production. 1989. *Infection and Immunity* 57 (2): 590-595.
- Nocentini G**, Riccardi C. GITR: a multifaceted regulator of immunity belonging to the tumor necrosis factor receptor superfamily. 2005. *Eur. J. Immunol.* 35: 1016–1022

- Nocentini G**, Ronchetti S, Cuzzocrea S, Riccardi C. GITR/GITRL: More than an effector T cell co-stimulatory system. 2007. *Eur. J. Immunol.* 37: 1165–1169
- Novick D**, Kim S-H, Fantuzzi G, *et al.* Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. 1999. *Immunity.* 10:127–36.
- Ochi H**, Maekawa T, Abe h, *et al.* IL-28B predicts response to chronic hepatitis C therapy – fine-mapping and replication study in Asian populations. 2011. *Journal of General Virology*, 92: 1071–1081
- O'Malley**. Action of bacterial polysaccharide on tumors: II. Damage of Sarcoma 37 by serum of mice treated with *Serratia marcescens* polysaccharide, and induced tolerance. 1962. *J Natl Cancer Inst.* 29:1169-1175.
- Otsuka M**, Kato N, Moriyama M, *et al.* Interaction between the HCV NS3 protein and the host TBK1 protein leads to inhibition of cellular antiviral responses. 2005. *Hepatology* 41:1004–1012
- Parameswaran P**, Sklan E, Wilkins C, *et al.* Six RNA viruses and forty-one hosts: viral small RNAs and modulation of small RNA repertoires in vertebrate and invertebrate systems. 2010. *PLoS Pathog* 6(2):e1000764
- Pineda JA**, Caruz A, Rivero A, *et al.* Prediction of response to pegylated interferon plus ribavirin by *IL28B* gene variation in patients coinfecting with HIV and hepatitis C virus. 2010. *Clin Infect Dis* 51: 788-795.
- Pomeranz JL** y Baltimore D. NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. 1999. *EMBO.* 18(23):6694-6704
- Poordad F**, McCone J, Bacon BR, *et al.* Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. 2011. *N Engl J Med.* 364(13): 1195–1206.
- Poynard T**, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. 1997. *Lancet.* 349: 825-832
- Poynard T**, Marcellin P, Lee SS, *et al.* Randomised trial of interferon α 2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon α 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. 1998. *Lancet* 352: 1426–1432
- Poynard T**, Mathurin P, Lai ChL, *et al.* A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. 2003. *Journal of Hepatology* 38:257–265
- Prokunina-Olsson L**, Muchmore B, Tang W, *et al.* A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a novel interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. 2013. *Nat Genet* 45(2): 164–171

Rao H, Sun D, Jiang D, *et al.* IL28B genetic variants and gender are associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus infection. 2012. *J Viral Hepat.* 19(3):173–181.

Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, *et al.* Genetic variation in IL28b is associated with chronic hepatitis c and treatment failure: a genome-wide association study. 2010. *Gastroenterology* 138(4):1338–1345

Rennert PD. Novel roles for TIM-1 in immunity and infection. 2011. *Immunology Letters.* Review. 141 (30): 28-35

Robek MD, Boyd BS, Chisari FV. Lambda Interferon Inhibits Hepatitis B and C Virus Replication. 2005. *J. Virol* 79 (6): 3851-3854

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. 2003. *Am J Gastroenterol.* 98:1621–6.

Romero-Gómez M, Del Mar Vilorio M, Andrade RJ, *et al.* Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. 2005. *Gastroenterology* 128: 636–641.

Romero-Gómez M. Insulin resistance and hepatitis C. 2006. *World J Gastroenterol.* 12(44): 7075-7080.

Rosa-Rosa JM, Pita G, González-Neira A, *et al.* A 7 Mb region within 11q13 may contain a high penetrance gene for breast cancer. 2009. *Breast Cancer Research and Treatment* 118 (1): 151.159

Rothman KJ. Case-Control studies. 1998. *Modern Epidemiology.* 2^a Ed. Philadelphia; Lippincott-Raven Publishers.

Ruiz-Sancho A, Soriano V. Coinfección por el VIH y el virus de la hepatitis C. 2006. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24(5):335-346

Santantonio T, Wiegand J, Gerlach JT. Acute hepatitis C: Current status and remaining challenges. 2008 *Journal of Hepatology* 49: 625–633

Santiago C, Ballesteros A, Tami C, *et al.* Structures of T Cell Immunoglobulin Mucin Receptors 1 and 2 Reveal Mechanisms for Regulation of Immune Responses by the TIM Receptor Family. 2007. *Immunity* 26, 299–310

Sarrazin C, Susser S, Doehring A, *et al.* Importance of IL28B gene polymorphisms in hepatitis C virus genotype 2 and 3 infected patients. 2011. *J Hepatol.* 54:415–21

- Sato M**, Kondo M, Tateishi R *et al.* Impact of IL28B Genetic Variation on HCV-Induced Liver Fibrosis, Inflammation, and Steatosis: A Meta-Analysis. 2014. Plos One. 9(3): 1-11
- Scott J.** *et al.* IL28B genotype effects during early treatment with peginterferon and ribavirin in difficult-to-treat hepatitis C virus infection. 2011. J. Infect. Dis. 204, 419–425.
- Sheppard P**, Kindsvogel W, Xu W, *et al.* IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. 2003. Nat Immunol. 4(1):63–68
- Shevach EM**, Stephens GL. The GITR–GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity? 2006. Nature reviews immunology 6: 613-618
- Shimizu J**, Yamazaki S, Takahashi T, *et al.* Stimulation of CD25+CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological selftolerance. 2002. Nat. Immunol. 3:135-142
- Simmonds P.** Variability of hepatitis C virus. 1995. Hepatology 21:570-583
- Simmonds P**, Bukh J, Combet C, *et al.* Consensus Proposals for a Unified System of Nomenclature of Hepatitis C Virus Genotypes. 2005. Hepatology 42:962-973
- Soriano V.** Treatment of chronic hepatitis C in HIV-positive individuals: selection of candidates. 2006. J Hepatol 44: 44-48.
- Soriano V**, Vispo E, Labarga P, *et al.* Viral hepatitis and HIV co-infection. 2010. Antiviral Res. 198:1337-1344
- Souza AJ**, Oriss TB, O'Malley KJ, *et al.* T cell Ig and mucin 1 (TIM-1) is expressed on in vivo-activated T cells and provides a costimulatory signal for T cell activation. 2005. PNAS 102(47): 17113–17118
- Stättermayer AF**, Stauber R, Hofer H, *et al.* Impact of IL28B Genotype on the Early and Sustained Virologic Response in Treatment-Naïve Patients With Chronic Hepatitis C. 2011. Clinical Gastroenterology and Hepatology 9(4): 344-350
- Stephens GL**, McHugh RS, Whitters MJ, *et al.* Engagement of Glucocorticoid-Induced TNFR Family-Related Receptor on Effector T Cells by its Ligand Mediates Resistance to Suppression by CD4⁺ CD25⁺ T Cells. 2004. J Immunol 173:5008-5020
- Suppiah V**, Moldovan M, Ahlenstiel G, *et al.* IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-a and ribavirin therapy. 2009 Nature Genetics 41:1100-1104.
- Takeda K**, Tsutsui H, Yoshimoto T, *et al.* Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. 1998. Immunity. 8:383–390

Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, *et al.* Genome-wide association of *IL28B* with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. 2009. *Nature Genetics* 41:1105-1109.

Thomas DL, Thio Ch-L, Martin MP *et al.* Genetic variation in *IL28B* and spontaneous clearance of C virus. 2009. *Nature* 461:798-802

Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS *et al.* Interleukin-28B Polymorphism Improves Viral Kinetics and Is the Strongest Pretreatment Predictor of Sustained Virologic Response in Genotype 1 Hepatitis C Virus. 2010. *Gastroenterology*. 139:120–129

Tillmann H, Thompson A, Patel K, *et al.* A polymorphism near *IL28B* is associated with spontaneous clearance of acute hepatitis C virus and jaundice. 2010. *Gastroenterology* 139(5):1586–1592

Umetsu SE, Lee WL, McIntire JJ, *et al.* TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. 2005. *Nat. Immunol.* 6(5):447-54

Unterholzner L, Sumner RP, Baran M, *et al.* Vaccinia virus protein C6 is a virulence factor that binds TBK-1 adaptor proteins and inhibits activation of IRF3 and IRF7. 2011. *PLoS Pathogens* 7(9):1-15

Urban Th, Charlton MR, Goldstein DB. Introduction to the genetics and biology of interleukin-28B. 2012. *Hepatology*. 56(1):361-366

Villa E, Karampatou A, Camma C, *et al.* Early menopause is associated with lack of response to antiviral therapy in women with chronic hepatitis C. 2011. *Gastroenterology* 140(3): 818–829

Wilson JA, Richardson CD. Hepatitis C virus replicons escape RNA interference induced by a short interfering RNA directed against the NS5b coding region. 2005. *J Virol* 79:7050-7058.

Wojcik G, Latanich R, Mosbrugger T, *et al.* Variants in HAVCR1 Gene Region Contribute to Hepatitis C Persistence in African Americans. 2014. *The Journal of Infectious Diseases* 209(3): 355-359

Woollard DJ, Grakoui A, Shoukry NH, *et al.* Characterization of HCV-Specific *CD4⁺* T Cell Responses in an Acutely Infected Chimpanzee. 2003. *Hepatology*. 38:1297-1306.

Xiao S, Najafi N, Reddy J, *et al.* Differential engagement of Tim-1 during activation can positively or negatively costimulate T cell expansion and effector function. 2007. *JEM* 204(7):1691-1702

Yee LJ. Host genetic determinants in hepatitis C virus infection. 2004. *Genes and Immunity* 5: 237–245

Yu ML, Chuang WL. Treatment of chronic hepatitis C in Asia: when East meets West. 2009. *J Gastroenterol Hepatol* 24:336-345.

Zeuzem S, Andreone P, Pol S, *et al.* Telaprevir for retreatment of HCV infection. 2011. *N Engl J Med.* 364(25): 2417–2428.

Zhao W. Negative regulation of TBK1-mediated antiviral immunity. 2013. *FEBS Letters* 587:542–548

Zhou Z, Song X, Berezov A, *et al.* Human glucocorticoid-induced TNF receptor ligand regulates its signaling activity through multiple oligomerization states. 2008. *PNAS* 105 (14): 5465–5470

APÉNDICE

**PUBLICACIONES DERIVADAS DEL TRABAJO
DESARROLLADO DURANTE ESTA TESIS DOCTORAL.**

Marco Antonio Montes-Cano, José Raúl García-Lozano, **Cristina Abad-Molina**, Manuel Romero-Gómez, Natalia Barroso, José Aguilar-Reina, Antonio Núñez-Roldán and María Francisca González-Escribano. Interleukin-28B Genetic Variants and Hepatitis Virus Infection by Different Viral Genotypes. **2010**. *Hepatology* 52(1): 33-37

Marco Antonio Montes-Cano, José Raúl García-Lozano, **Cristina Abad-Molina**, Manuel Romero-Gómez, Natalia Barroso, José Aguilar-Reina, Antonio Núñez-Roldán and María Francisca González-Escribano. Replay to: Observed and Calculated Interleukin-28B Genotype Frequencies in Hepatitis C Virus Infection. **2010**. *Hepatology* 52(5): 1861-1862

Marco Antonio Montes-Cano, José Raúl García-Lozano, **Cristina Abad-Molina**, Fuensanta Torrecillas, Almudena Torres, Luis Fernando López-Cortés, Antonio Núñez-Roldán and María Francisca González-Escribano. Replay to: Linkage of the Hepatitis C Virus Genotype and Interleukin-28B Genetic Polymorphisms in Asian Patients. **2011**. *Hepatology* 53(1): 368

Cristina Abad-Molina, José-Raúl García-Lozano, Marco-Antonio Montes-Cano, Almudena Torres-Cornejo, Fuensanta Torrecillas, José Aguilar-Reina, Manuel Romero-Gómez, Luis-Fernando López-Cortés, Antonio Núñez-Roldán, and María-Francisca González-Escribano. *HAVCRI* Gene Haplotypes and Infection by Different Viral Hepatitis C Virus Genotypes. **2012**. *Clinical and Vaccine Immunology* 19(2): 223-227

OTRAS PUBLICACIONES

Cazorla FM, Codina JC, **Abad C**, Arrebola E, Torés JA, Murillo J, Pérez-García A, de Vicente A. 62-kb plasmids harboring *ruAB* homologues confer UV-tolerance and epiphytic fitness to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* mango isolates. **2008**. *Microb Ecol.* 56(2):283-91.

García-Lozano JR, **Abad C**, Escalera A, Torres B, Fernández O, García A, Sánchez-Román J, Sabio JM, Ortego-Centeno N, Raya-Alvarez E, Núñez-Roldán A, Martín J and González-Escribano MF. Identification of *HAVCRI* gene haplotypes associated with mRNA expression levels and susceptibility to autoimmune diseases. **2010**. *Hum Genet.* 128(2): 221-229.

Abad C, González-Escribano MF, Díaz-Gallo LM, Lucena-Soto JM, Márquez JL, Leo E, Crivell C, Gómez-García M, Martín J, Núñez-Roldán A and García-Lozano JR. Association of Toll-like receptor 10 and susceptibility to Crohn's disease independent of NOD2. **2011**. *Genes Immun.* 12(8):635-642.

Kawthar Machmach, **Cristina Abad-Molina**, María C. Romero-Sánchez, María A. Abad, Sara Ferrando-Martínez, Miguel Genebat, Ildefonso Pulido, Pompeyo Viciano, María F. González-Escribano, Manuel Leal and Ezequiel Ruiz-Mateo. IL28B Single-Nucleotide Polymorphism rs12979860 Is Associated With Spontaneous HIV Control in White Subjects. **2013**. *The Journal of Infectious Diseases.* 207(4):651-655

Torres-Cornejo A, Ruiz-Valderas R, Jimenez-Jimenez L, **Abad-Molina C**, Gutierrez-Valencia A, Viciano P and Lopez-Cortes LF. Impact of the peginterferon- α 2a and ribavirin plasma levels on viral kinetics and sustained virological response in genotype 1 HCV/HIV-co-infected patients with the unfavourable non-CC IL28B genotypes. **2014**. *Journal of Viral Hepatitis.* 21(3): 178–188

