

TESIS DOCTORAL

Marcadores farmacogenéticos como
factores predictivos de respuesta
al tratamiento del VHC
en pacientes VIH

José María GUARDIOLA TEY

Director de la tesis:
Dr. Pere DOMINGO PEDROL

Departamento de Medicina
Facultad de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona
Barcelona, Noviembre 2011

A la meva dona Gala
Als nostres fills Ia, Pol, Jan, Ìu
Als meus pares

AGRAÏMENTS

Són moltes les persones que –de manera indirecta o directa– m’han ajudat a portar a terme la tesi doctoral que tens a les teves mans.

En primer lloc, sense cap mena de dubte, el primer agraïment va dirigit a tots els malalts i malaltes que formen part d’aquest estudi. El treball és per a ells; tant de bo que es puguin beneficiar dels nostres resultats!

Moltes gràcies a tots els meus companys del Servei d’Urgències. Al meu cap, la Dra. Mireia Puig que només m’ha donat facilitats, així com el Dr. Josep Ris, i el Dr. Salvador Benito.

Moltes gràcies a tots els companys de la sala D0. Com diu el seu nom, son un autèntic “do”, i és un plaer treballar amb l’Albert Mauri i el José Antonio Montiel. A totes les persones que fan possible l’excel·lència de la sala: Luisa, Maria, Juanito, Pilar... A tot l’equip de supervidores (Dolors, Marta, Gemma...), infermeres (Maria Jesús, Cristina, Esther, Marta, Antonia, Thais, Munt, Camila, Ascen, Maria del Mar, Iris, Alberto,...) i auxiliars que no puc citar personalment, ja que és força nombrós.... No puc oblidar a Mn. Davessa que ha trobat un raconet d’estima a la antiga sala de “La Puríssima”.

És obligat en justícia citar alguns dels companys del servei d’Urgències com l’Ivan, la Maite i Míriam, el Polo i la Marta, la Olga, el Sergio, la Montse, Vero, Paco, i tots el demés. Bons metges, millors companys, gent molt maca!!.

A les secretaries de Medicina Interna, Roseta; de Malalties Infeccioses, Lúdia; de Urgències Montse i Sílvia. També a la Carmeta, autèntica reina del dispensari.

Ha sigut fonamental la implicació del servei de Genètica, encapçalat per la Dra. Montserrat Baiget. Per a ella no hi ha dificultats. La col·laboració de la Dra. Juliana Salazar ha estat decisiva i imprescindible. Moltes gràcies.

El circuit per la recollida de mostres ha comptat amb l’ajut inestimable dels metges i infermeres del Hospital de Dia de Malalties Infeccioses. Estic molt agraït a les Dres. M.A. Sambeat, G. Mateo, M. Gutiérrez, C. Cabeza, I. Fernández i a les infermeres À. Fontanet, E. Martín i J. Muñoz.

Tres residents de Medicina Interna i tres residents de Digestiu, m’han ajudat a fer la recollida de dades. Moltes gràcies a la Cristina Pacho, Karuna Lamarca, Jordi Martín, Mercedes Blasi, Patricia Huelin, i Edilmar Alvarado.

El meu reconeixement també per el Dr. Ignasi Gich per la molta paciència i dedicació en l’anàlisi estadístic de les dades. En l’apartat de mètodes m’han ajudat la Dra. Núria Margall, del Servei de Microbiologia i la Dra. Mila García del servei d’Immunologia. Moltes gràcies al Nuno Soares i també a la Ingrid Sánchez pel seu ajut irremplaçable en la maquetació i edició de la tesi. Al Manel, Victoria i a la Eli els vull agrair també la seva col·laboració.

Del servei de Malalties Infeccioses-Medicina Interna vull agrair l'ajut del Dr. Cadafalch, que em va introduir al món del VHC. Els consells de la Dra. Mercè Gurgú i el Dr. Jordi Casademont han estat de gran vàlua per a mi.

El servei de Farmàcia ocupa un lloc prominent en el seguiment i assessorament dels malalts VIH-VHC. Ara és un bon moment per agrair la feina de la Dra. Laura Tuneu, Montse Masip i Dra. M^a Antonia Manges.

També vull mostrar el meu agraïment als components del servei de Patología Digestiva, Dr. Jaime Enriquez, Dr. Xavier Torras, Dr. Adolfo Gallego i el Dr. Carles Guarner, per la seva il·lusió i col·laboració en la feina realitzada.

Del món del VIH/VHC és obligat citar amb agraïment els Drs. Vicens Soriano, Pablo Labarga, Pablo Barreiro, Juan Berenguer, Juan González, Cristina Tural, Josep Llibre, Manel Crespo, Miguel Angel Von Wichmann, i Josep Mallolas, i tots els companys del grup de GESIDA. Treballar amb ells és una constant font d'aprenentatge !!!.

Del món de les infeccioses-urgències vull compartir aquests moments amb els Drs Juan González Castillo, Agustín Julián i tots els companys del grup INFURG-SEMES.

Vull agrair també l'amistat de tants i tants amics de dins i fora del hospital: Hector, Totonó, Laia, Josep Maria, Susana, Josep Maria, Tina, Julio, Emma, Santi, Helena, Eva, Nuria, Marian, Tonina, Toni, Carles, Quique, Montse, Sara, Claudia, Isa, Jose, Ana, Marta, Ignasi, Jordi, Ana, Ester, Carol, Marta, Diego, Jaume, Javier, Mercedes....

Finalment vull tenir un record especial per els meus germans Pere, Hury, M^a Luisa, M^a Eulalia, Manel i Maria; per tots els meus cunyats y cunyades, i per tots els meus nebots; també la Tia Francis i la laia gran. Menció d'honor mereixen els meus sogres Frederic i M^a Carmen. Sense ells –i els seus “cangurs” – no hagués pogut trobat temps per fer aquesta tesi.

Per últim agrair sincerament al meu director de tesi, Dr. Pere Domingo. La seva important dedicació i implicació ha estat fonamental per a que aquest treball arribi a bon port.

A Estavar, Cerdanya Catalana, DOG.

Diumenge 11 de setembre 2011.

CONTENIDO

Abreviaturas	13
A. Justificación de la tesis	15
B. Introducción.....	17
B.1. VHC	17
B.1.1. Estructura del virus	17
B.1.2. Variabilidad genómica del VHC. Cuasiespecies y genotipos	19
B.1.3. Ciclo de replicación viral	21
B.1.4. Diagnóstico del VHC.....	22
B.1.5. Epidemiología y transmisión del VHC.....	22
B.1.6. Historia natural de la infección por el VHC	24
B.2. VIH	25
B.2.1. Estructura viral	26
B.2.2. Ciclo de replicación	27
B.2.3. Detección del VIH	30
B.2.4. Transmisión del VIH	30
B.3. Coinfección VIH-VHC	31
B.3.1. Interacción recíproca entre VIH-VHC.....	32
B.3.1.1. Impacto del VIH sobre la evolución de la infección por VHC.....	32
B.3.1.2. Impacto del HCV sobre la evolución de la infección por HIV	34
B.3.2. TARGA en VHC	35
B.3.2.1. Efecto beneficioso del TARGA en VHC.....	35
B.3.2.2. Toxicidad Hepática del TARGA	35
B.4. Tratamiento del VHC en pacientes con infección por VIH	36
B.4.1. Tratamiento del VHC.....	36
B.4.1.1. Interferón	37
B.4.1.2. RBV	37
B.4.2. Objetivos del tratamiento de la infección crónica por VHC	38
B.4.3. Recomendaciones en pacientes coinfectados	40
B.4.4. Resumen de los estudios más importantes en pacientes coinfectados.....	40

B.4.5. Efectos del tratamiento del VHC en la evolución de la enfermedad por el VHC y por el VIH.....	44
B.5. Factores predictivos de respuesta.....	44
B.5.1. Factores predictivos de respuesta modificables.....	46
B.5.2. Factores no modificables.....	51
B.6. Factores genéticos.....	52
B.6.1. Conceptos básico de genética.....	52
B.6.2. Polimorfismos.....	55
B.6.3. Haplotipo. Desequilibrio de ligamiento.....	56
B.7. Farmacogenética.....	57
B.7.1. Estudios GWAS.....	57
B.8. Gen de la interleucina 28B (<i>IL28B</i>) y RVS.....	59
B.8.1. Localización y función del gen <i>IL28B</i>	60
B.8.2. Sistema JAK-STAT.....	61
B.8.3. Mecanismo de acción <i>IL28B</i>	61
B.8.4. SNPs del gen <i>IL28B</i> . Análisis de los estudios más representativos	62
B.8.4.1. rs12979860.....	62
B.8.4.2. rs8099917.....	63
B.8.5. Infección aguda.....	64
B.8.6. Distribución de SNP <i>IL28B</i>	64
B.8.6.1. Diferencias entre pacientes VHC vs VHC/VIH.....	64
B.8.6.2. Diferencias étnicas.....	65
B.8.7. Genotipos 2 y 3.....	67
B.8.8. <i>IL28B</i> y respuesta al tratamiento en pacientes VIH.....	67
B.8.9. Trasplante hepático.....	69
B.9. Gen de la <i>ITPA</i> (Inosina trifosfato pirofosfatasa).....	69
B.9.1. Riesgo de anemia hemolítica inducida por RBV.....	69
B.9.2. Control de la anemia por RBV.....	70
B.9.3. Descripción del gen de la <i>ITPA</i> . Primer estudio publicado en Nature.....	71
B.9.4. Polimorfismos <i>ITPA</i> y niveles de Hb: rs1127354 y rs7270101.....	71
B.9.5. Disminución de la actividad ITPasa.....	72
B.9.6. Acción de la enzima <i>ITPA</i>	74

B.9.6.1. Bases púricas. Definición e importancia	75
B.9.6.2. Síntesis de las bases púricas	75
B.9.6.3. Catabolismo de las purinas	75
B.9.6.4. Presencia de otras bases púricas: Inosina y Xantinas.....	75
B.9.7. Papel de la ITPA	78
B.9.8. Aumento de ITP y reducción de la anemia. Posibles mecanismos	78
B.9.9. Estudios publicados acerca de la interacción ITPA-Anemia	80
B.10. Nuevos polimorfismos	80
C. Objetivo de la tesis	87
D. Pacientes y métodos	89
D.1. Pacientes	89
D.1.1. Criterios de inclusión	89
D.1.2. Criterios de exclusión.....	90
D.2. Medida de parámetros analíticos fundamentales.....	90
D.2.1. Genotipo VHC	90
D.2.2. Carga viral VHC	90
D.2.3. Carga viral del VIH.....	91
D.2.4. Recuento de linfocitos T CD4+.....	91
D.3. Estudio de la fibrosis hepática.....	91
D.4. Estudio genético	92
D.4.1. Extracción de ADN a partir de sangre periférica.....	92
D.4.2. Análisis molecular de SNPs con sondas TaqMan®	92
D.4.3. Secuenciación de controles positivos para los SNPs de estudio..	94
D.5. Análisis estadístico	95
E. Resultados	97
E.1. Población global	97
E.2. Cumplimiento del tratamiento	97
E.2.1. Cumplimiento correcto del tratamiento y RVS.....	98
E.3. estudio biviariado de la respuesta vírica sostenida (RVS)	98
E.3.1. Genotipo rs12979860 <i>IL28B</i> y RVS	99
E.3.1.1. Caracterización de la muestra en función del genotipo <i>rs12979860 IL28B</i>	99

E.3.1.2. Influencia de las variantes alélicas de rs12979860 <i>IL28B</i> (CC vs CT/TT) en la RVS.....	101
E.3.2. Influencia del genotipo rs1127354 <i>ITPA</i> (CC vs CA/AA) en la RVS.....	101
E.3.3. Influencia del genotipo VHC en la RVS.....	102
E.3.4. Influencia de la carga viral basal ARN-VHC en la RVS.....	103
E.3.5. Influencia de la presencia de cirrosis en la RVS.....	103
E.3.6. Influencia del sexo, la edad y el IMC en la RVS.....	103
E.3.7. Influencia de la RVR en la RVS.....	104
E.3.8. Modificación de la dosis de RBV y RVS.....	105
E.4. Análisis Multivariado.....	105
E.4.1. Estudio multivariado de la RVS incluyendo seis variables.....	106
E.4.2. Estudio multivariado de la RVS incluyendo cinco variables.....	106
E.4.3. Estudio multivariado de la RVS incluyendo dos variables farmacogenéticas.....	107
E.4.4. Estudio multivariado de la RVS incluyendo dos variables farmacogenéticas en los pacientes con genotipo viral VHC 1/4.....	107
E.4.5. Análisis final sobre los factores que afectan a la RVS.....	109
E.5. Estudio de la anemia asociada al tratamiento del VHC.....	109
E.5.1. Caracterización de la muestra en función del polimorfismo rs1127354 <i>ITPA</i>	109
E.5.2. Caracterización de la muestra en función del polimorfismo rs7270101 <i>ITPA</i>	109
E.5.3. Influencia del polimorfismo rs1127354 <i>ITPA</i> en el descenso de los niveles de Hemoglobina (Hb) durante el tratamiento con PEG-IFN más RBV.....	111
E.5.4. Influencia del polimorfismo rs7270101 <i>ITPA</i> en el descenso de los niveles de Hemoglobina (Hb) durante el tratamiento con PEG-IFN más RBV.....	115
E.5.5. Influencia del genotipo rs1127354 <i>ITPA</i> en la modificación de las dosis de RBV durante el tratamiento con PEG-IFN más RBV.....	115
E.5.6. Influencia del genotipo rs1127354 <i>ITPA</i> en la administración de Eritropoyetina (EPO) durante el tratamiento con PEG-IFN más RBV.....	117

E.5.7. Análisis Bivariado	117
E.5.7.1. Análisis comparativos de la BPMS12. Variables categorías	118
E.5.7.2. Análisis comparativos de la BPMS12. Variables cuantitativas	120
E.5.7.3 Análisis multivariado respecto la bajada de Hb	120
F. Discusión	121
F.1. Sobre <i>cantidad</i> de la muestra	121
F.2. Sobre la <i>calidad</i> de la muestra	122
F.3. Discusión acerca de los datos de la toxicidad (anemia) por RBV	123
F.3.1. Factores con influencia sobre el descenso de Hb	124
F.3.2. Variantes alélicas y administración de EPO	125
F.4. Discusión de los resultados sobre factores predictivos de RVS	126
F.4.1. Análisis univariado	126
F.4.2. Discusión acerca del estudio multivariado	127
F.4.3. Marcadores farmacogenéticos y RVS	128
F.5. Administración de dosis de RBV	130
F.6. Posicionamiento del gen de la <i>ITPA</i> y la RVS	131
F.7. Validez práctica de estos resultados	131
G. Conclusiones	133
H. Bibliografía	135

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxiribonucleico
AMP	Adenosina-mono-fosfato
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
EMEA	Agencia Europea del Medicamento
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Agencia Norte-americana del Medicamento)
G1, G2, G3, G4	Genotipo 1, 2, 3, y 4 del VHC
GMP	Guanosina-mono-fosfato
GTP	Guanosina-tri-fosfato
GWAS	<i>Genome-wide association studies</i> (Estudios de asociación del genoma completo)
Hb	Hemoglobina
ICR5	Inhibidores del receptor CCR5
IF	Inhibidores de la fusión
IG	Inhibidores de la integrasa
IL28B	Gen de la interleucina 28b
IMC	Índice de masa corporal
IMP	Inosina-mono-fosfato
IMP-DH	Inosina mono-fosfato deshidrogenasa
INF	Interferón
IP	Inhibidores de la proteasa
ISG	<i>Interferon Stimulated Genes</i> (Genes estimuladores del interferón)
ITIAN	Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos
ITPA	Gen de la ITPA. Inosina trifosfato pirofosfatasa
ITPA	Enzima ITPA. Inosina trifosfatasa
JAK	Just Another Kinase
LD	Desequilibrio de ligamiento
NN	Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleósidos
PEG-IFN	Interferón pegilado
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PRPP	5-fosforibosil-1-pirofosfato
RBV	Ribavirina
RBV-TP	Ribavirina trifosfato
RFT	Respuesta al final del Tratamiento VHC (24, 48 o 72 semanas)
RVP	Respuesta virológica precoz (12 semanas de tratamiento)
RVR	Respuesta viral rápida (4 semanas de tratamiento)
RVS	Respuesta Viral Sostenida (24 semanas tras finalizar el tratamiento)
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de un solo nucleótido)
SNPs	Plural de polimorfismo
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TARGA	Tratamiento antirretroviral de gran actividad
TH	Transplante hepático
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus Hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
XMP	Xantina-mono-fosfato

A. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS

En el año 2011 se cumplen 30 años desde el primer caso de SIDA. Esta enfermedad se ha cobrado más de 25 millones de vidas y más de 60 millones de personas están infectadas por el VIH. Según datos de ONU-SIDA, cada día se infectan con el virus más de 7.000 personas, de entre los cuales 1.000 son niños. Todavía hay 10 millones de personas en espera de tratamiento del VIH, y por cada persona que inicia el tratamiento se producen dos nuevas infecciones (Cita web 1).

El VHC fue descrito por vez primera en 1989 (Choo, 1989; Kuo, 1989). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (WHO) se estima que alrededor de 160-180 millones de personas, el 3% de la población mundial, pueden estar infectadas por el virus de la hepatitis C, permaneciendo asintomáticos la mayor parte de los pacientes (Cita web 2).

En nuestro medio, hasta un 50% de los pacientes VIH están coinfectados con el VHC. La coinfección conlleva una peor evolución de estas dos patologías: tanto de la infección crónica por el VIH como de la hepatitis crónica por el VHC. Asimismo la respuesta global al tratamiento del VHC oscila entre el 30-40% de RVS en los pacientes VIH, porcentaje de respuesta significativamente inferior a la de los pacientes con mono infección por el VHC.

Dada la dificultad de la realización del tratamiento del VHC disponible en la actualidad, y del bajo porcentaje de curación o RVS, parece oportuno disponer de factores predictivos de respuesta, que nos faciliten aumentar y optimizar al máximo los porcentajes de RVS.

Los marcadores farmacogenéticos –descritos a finales del año 2009– se han erigido como elementos fundamentales para predecir la respuesta al tratamiento en pacientes mono infectados con el VHC.

Esta tesis doctoral analiza la posible influencia de varios polimorfismos –o SNPs– genéticos descritos recientemente –situados en el cromosoma 19 y en el cromosoma 20– en la respuesta y la toxicidad al tratamiento del VHC en pacientes coinfectados por el VIH.

B. INTRODUCCIÓN

Esta introducción pretende reflejar cual es el estado actual del tema a tratar. En primer lugar describiremos algunos aspectos relevantes del VHC y del VIH. También analizaremos la repercusión conjunta de estos dos virus en los pacientes coinfectados. Definiremos el estado actual acerca de las opciones terapéuticas del VHC en pacientes VIH, y resumiremos cuales son los factores predictivos de respuesta al tratamiento, que nos son de más utilidad.

Posteriormente nos adentramos en cuestiones relacionadas con los marcadores farmacogenéticos. Tras una actualización básica en genética para clínicos, se analiza con detalle cuales son los conocimientos actuales de los dos marcadores farmacogenéticos que son el fundamento de esta tesis doctoral.

B.1. VHC

El VHC afecta a humanos y ha sido clasificado dentro del género *Hepacivirus*, de la familia de los *Flaviviridae* (Farci, 2000).

Fue identificado en el año 1989, (Choo, 1989; Kuo, 1989) como el principal causante de las hepatitis, mayormente transmitidas a través de transfusiones, que hasta la fecha eran identificadas como no-A no-B.

B.1.1. Estructura del virus

Se trata de un virus esférico, con un diámetro de 55 nm y una envoltura glicoproteica. Su genoma está constituido por una molécula de ARN de cadena simple y polaridad positiva, formada por 9.600 nucleótidos (Figura B.1).

Su genoma codifica una única poliproteína de unos 3.010 aminoácidos, que posteriormente es modificada para generar proteínas estructurales y no estructurales. Un 25% de la poliproteína da lugar a las proteínas estructurales que son la nucleocápside y la

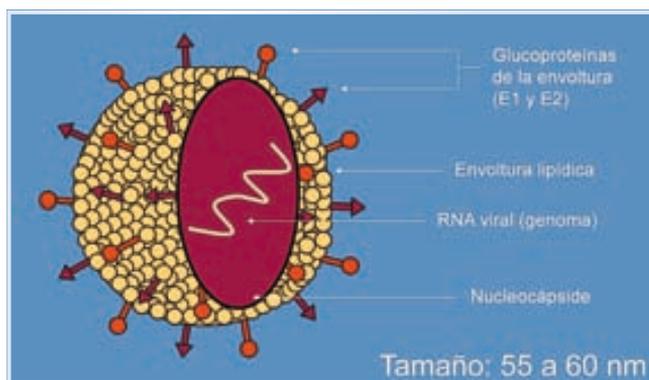


Figura B.1. Estructura del VHC.

Tabla B.1. ARN del VHC. Genes; proteínas codificadas y función de las mismas.

CORE	Proteína estructural (nucleocápside). Encapsidación del ARN viral
E1	Proteína estructural (glicoproteína envuelta). Entrada celular
E2	Proteína estructural (glicoproteína envuelta). Entrada celular
p7	Proteína estructural (canal de iones). Ensamblaje y liberación viral
NS2	Proteína no estructural. Procesamiento poliproteína viral. Ensamblaje viral. Forma parte del complejo de replicación
NS3	Proteína no estructural. Actividad serin-proteasa en procesamiento poliproteína viral. Actividad ATPasa helicasa en replicación ARN viral
NS4A	Proteína no estructural. Co-factor serin-proteasa NS3
NS4B	Proteína no estructural. Modifica las membranas del retículo endoplasmático para formar el complejo de replicación
NS5A	Proteína no estructural. Modifica la sensibilidad al IFN. Forma parte del complejo de replicación
NS5B	Proteína no estructural. ARN polimerasa ARN-dependiente responsable de la replicación del ARN viral

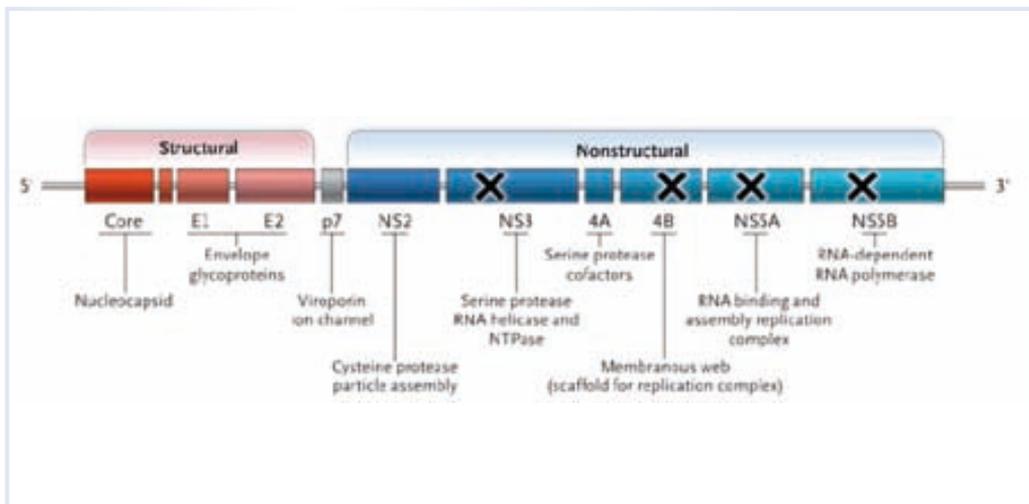


Figura B.2. Estructura genómica del VHC. La marca "X" identifica los puntos en el genoma del VHC que son las nuevas las dianas terapéuticas (adaptado de Rosen, 2011).

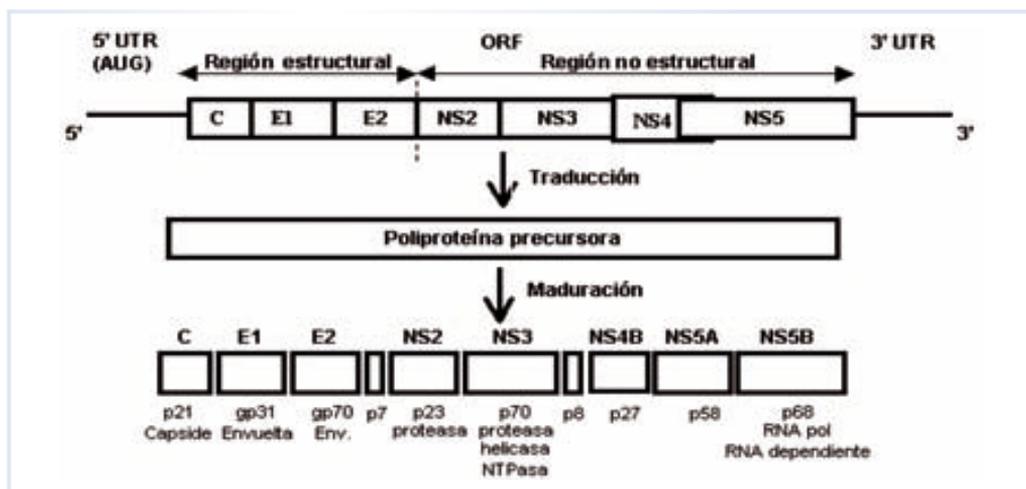


Figura B.3. Proceso desde el genoma-ARN a las diversas proteínas, pasando a través de la poliproteína de 3.010 aminoácidos.

envoltura, y el resto conforma seis proteínas no estructurales. El orden de los genes codificantes es: 5'-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-3'. (Tabla B.1 y figuras B.2, B.3).

El producto del gen C (Core) está formado una proteína de 190 aminoácidos. Constituye la subunidad básica que forma la nucleocápside. Los siguientes genes, que son el E1 y el E2, codifican las dos glicoproteínas de la envoltura del virus: gp35 y gp70. Estas dos glicoproteínas tienen un papel fundamental en la unión a los receptores celulares y su posterior fusión, condicionando la entrada del virus dentro de las células del huésped.

Los genes no estructurales, NS2 y NS3, codifican a su vez dos proteasas que intervienen en el procesamiento de toda la región no estructural del precursor poliproteico. El producto de NS3 es una helicasa que actúa desenrollando el molde de ARN durante la replicación del genoma. El producto de NS4A actúa como cofactor de NS3. El producto de NS5B contiene el dominio ARN polimerasa ARN-dependiente esencial para la replicación viral. La NS5 modula la respuesta antiviral del huésped mediada por el interferón. La zona codificante termina en un único codón de parada, al que sigue una región 3' no traducida (3'UTR) (Prince, 1992).

B.1.2. Variabilidad genómica del VHC. Cuasiespecies y genotipos

La respuesta inmune del huésped, tanto celular como humoral, durante la fase aguda y crónica de la infección por VHC suele ser muy potente. La variabilidad viral juega un papel fundamental en la cronificación de la infección por el VHC (Kobayashi, 1997).

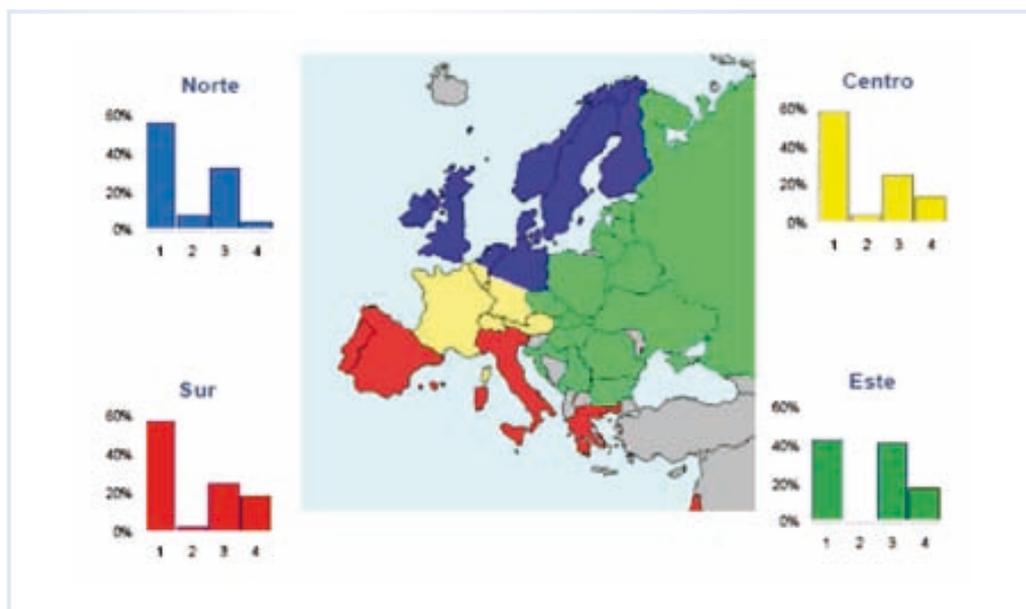


Figura B.4. Presencia de genotipos VHC, en pacientes coinfectados VIH-VHC, en Europa. Diversas zonas europeas son definidas por colores (adaptado de Soriano, 2008).

El VHC, como la mayoría de virus ARN, posee un alto grado de heterogeneidad en su genoma. Ello es debido a la falta de capacidad del ARN polimerasa de corregir errores durante la replicación vírica. La tasa global de mutaciones del VHC es superior a 1.500 cambios de nucleótido por posición genómica y año.

Debido a la baja fidelidad de replicación viral, el VHC se manifiesta como una mezcla de genomas divergentes, aunque próximamente relacionados, que muestran un modelo distributivo que denominamos cuasiespecies. Como consecuencia de esta heterogeneidad aparecen grupos virales genéticamente distintos o genotipos.

Las mutaciones de nucleótidos en prácticamente todas las regiones genómicas del VHC, con unas secuencias que difieren globalmente entre sí un 35-38%, permite una clasificación en diversos genotipos del VHC. Las diferencias de nucleótidos que definen los subtipos VHC son del 14-17% (Bhattacharjee, 1995). Se han descrito 6 genotipos divididos, a su vez, en más de 84 subtipos. Los genotipos se denominan mediante un número (del 1 al 6), y los subtipos mediante una letra minúscula (Bukh, 1995).

Existen diferencias en cuanto a la distribución geográfica de los diversos genotipos. En los países occidentales destaca la mayor prevalencia del genotipo 3a entre los jóvenes, especialmente entre aquellos que son usuarios de drogas por vía parenteral (García-Retortillo 2002).

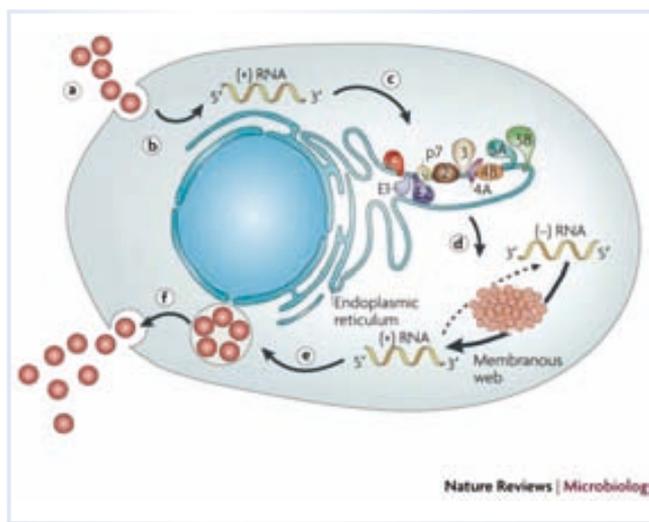


Figura B.5. Ciclo replicación viral VHC. Ver explicación en el texto.

Sabemos que el genotipo no tiene influencia en la historia natural de la enfermedad, aunque sí es el factor más influyente en la respuesta al tratamiento anti-VHC. En genotipos 2 y 3 se objetiva una respuesta más rápida y con tasas de RVS de hasta tres veces más que en los genotipos 1 y 4 (Alonso, 1998).

Desafortunadamente la mayor parte –un 55-60%– de los pacientes coinfectados por el VIH y el VHC en España están infectados por el VHC genotipo 1 (León, 1999). Aproximadamente un 30% están infectados por los genotipos con mejor respuesta al tratamiento 2 y 3. La distribución de genotipos en pacientes coinfectados no difiere de la que se presenta en pacientes mono infectados (Pérez-Olmeda, 2002). (Figura B.4).

B.1.3. Ciclo de replicación viral

El VHC se replica fundamentalmente en los hepatocitos (Sugano, 1995). También se ha detectado genoma viral en las células de Kupffer y en las células endoteliales hepáticas (Blight, 1993). Se ha objetivado que el virus puede replicarse en células mononucleadas en sangre periférica, como son linfocitos T y B, y también en células polimorfonucleadas (monocitos). Otras localizaciones son los nódulos linfáticos y las células epiteliales del tracto gastrointestinal y de cerebro (Deforges, 2004; Forton, 2004).

La replicación del VHC comprende varias fases, que se esquematizan en la figura B.5. Inicialmente se produce la entrada viral con la posterior liberación del ARN viral al citoplasma (a). Posteriormente se produce la traducción del ARN viral (b) y el procesamiento de la poliproteína mediante la acción tanto de las proteasas celulares como de las proteasas del virus (c). La replicación se produce mediante los complejos poliproteicos asociados a la cara citoplasmática de la membrana del retículo endoplásmico.

Para la replicación del ARN viral, la cadena positiva de ARN del VHC será el molde utilizado en la síntesis de la cadena negativa (d), que a su vez hará la función de nuevo molde para la replicación de nuevas cadenas positivas de ARN. Posteriormente se produce el ensamblaje y la encapsidación (e). Las cadenas positivas de ARN-VHC interactúan con las proteínas del core ensamblando la nucleocápside. Tras la maduración del virión se produce la liberación del mismo (f).

Lo más destacado de este proceso es que el genoma del VHC no se integra en el núcleo celular. Todo este proceso se realiza en el citoplasma de la célula hepática. Por lo tanto podemos afirmar que el VHC no presenta formas de reservorio estable de infección, a diferencia de los virus del VIH y VHB. De ello se deriva que la vida media del ARN-VHC en la célula es muy corta (1,5 h). Para mantener la infección es precisa una gran capacidad de replicación viral (Guo, 2001). La ausencia de reservorios estables del VHC facilita la erradicación total del VHC, si utilizamos una potencia antiviral adecuada. Esto no puede darse en la infección por el VIH y el VHB.

Esta peculiar circunstancia –el VHC no se integra en el núcleo celular– en la replicación del VHC confiere una de sus principales características: es la única infección viral crónica que podemos erradicar con el tratamiento (Maylin, 2009).

B.1.4. Diagnóstico del VHC

TÉCNICAS SEROLÓGICAS

La determinación de IgG específica contra el VHC mediante enzimoimmunoensayos (EIA) es el sistema más habitual de diagnóstico de la infección por este virus. Su sensibilidad es muy alta llegando hasta el 98-100%. En pacientes inmunodeprimidos la sensibilidad de los EIA se reduce hasta el 50-95% según el grado de inmunodeficiencia.

TÉCNICAS MOLECULARES

Podemos detectar el genoma viral mediante técnicas de PCR. En el período ventana de una infección aguda y en pacientes inmunodeficientes humorales es eficaz la detección viral directa del RNA del VHC. El ARN viral, debe amplificarse para su detección. La técnica más empleada es la amplificación por PCR del ADN complementario (ADNc) a un fragmento del extremo 5'UTR, obtenido por retrotranscripción (RT-PCR).

Para evitar diferentes unidades de medida de la carga viral, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció un patrón internacional de referencia de los resultados de las técnicas cuantitativas en Unidades Internacionales por ml (UI/mL) (Lee, 2000).

B.1.5. Epidemiología y transmisión del VHC

El virus es transmitido por vía parenteral y percutánea. Se ha identificado la presencia de un factor de riesgo en un 90% de los casos, quedando un 10% de los pacientes en

los que no se ha podido identificar la fuente de infección. La exposición al VHC ocurre en el contexto de uso de drogas por vía parenteral, el transplante de órganos sólidos de donantes infectados, prácticas médicas no seguras, exposición ocupacional a sangre infectada. La transmisión materno-fetal y las relaciones sexuales con una persona con VHC también son vías de transmisión de la enfermedad.

No hay datos recientes acerca de la prevalencia de la infección por el VHC en nuestro país. En España la estimación de la prevalencia de la infección VHC en la población general fue del 2-2,5% en el año 1997 (Suarez, 1997).

RECEPTORES DE SANGRE Y DERIVADOS

Antes de 1986 la incidencia de hepatitis No A-No B post-transfusional llegaba hasta porcentajes del 5 al 13%. Al comenzar a realizarse el estudio de marcadores serológicos de VHC en el año 1990, la incidencia de hepatitis post-transfusional disminuyó a porcentajes menores del 1% (Memon, 2002). La trasfusión de factores de coagulación en pacientes con hemodiálisis alcanzó en España incidencias de contagio del VHC de hasta el 19,5% (Cruz, 2003).

RIESGO EN PERSONAL SANITARIO

El personal sanitario tiene una prevalencia similar de infección por VHC que la población general. El riesgo de adquirir la infección por VHC tras un pinchazo accidental se sitúa en torno a un 2% (National Institutes of health, 2002).

TRANSMISIÓN INTRAFAMILIAR

Parece existir una mayor prevalencia de infección por VHC (vía no sexual) en familiares de un paciente con VHC, aunque no se sabe bien cual es la causa de este fenómeno.

TRANSMISIÓN SEXUAL EN GRUPOS DE BAJO RIESGO

Los porcentajes de transmisión sexual son bajos (Recommendations, 1998). Se estima una seroprevalencia de VHC del 2 al 3% entre parejas monogamas con uno de los dos miembros que esté infectado. Entre personas con múltiples parejas sexuales el porcentaje de transmisión del VHC aumenta hasta el 4 al 6 %. La transmisión perinatal del VHC de niños nacidos de madres positivas se produce en un 2% de los casos. El riesgo se incrementa hasta un 4-7% ante una mujer embarazada con carga viral RNA elevada.

USUARIOS DE DROGAS VÍA PARENTERAL

Las personas con abuso de drogas vía parenteral no sólo tienen la mayor prevalencia de infección por VHC, sino que constituyen un potencial reservorio de VHC en la comunidad. La prevalencia puede llegar hasta el 98%, según la localización geográfica mundial. La prevalencia de la infección aumenta de forma proporcional a la duración del periodo en el que se produce el abuso de drogas.

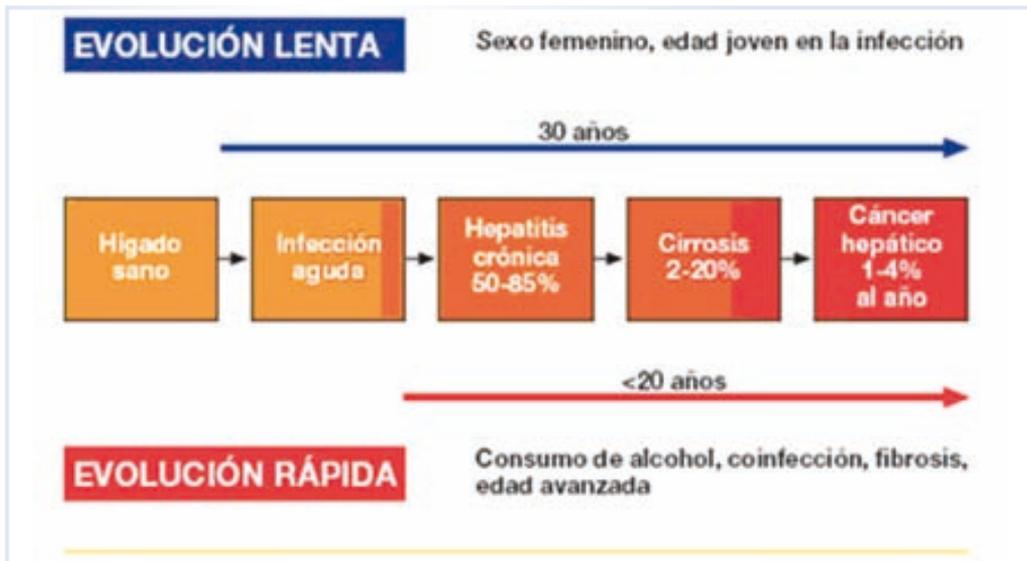


Figura B.6. Historia natural de la infección por el virus de la hepatitis C.

B.1.6. Historia natural de la infección por el VHC

La importancia de la infección crónica por el VHC viene dado más por su elevada prevalencia (aproximadamente un 2% de la población presenta anticuerpos del VHC, 75% de ellos con ARN VHC+) que por la agresividad del virus propiamente dicha. Afortunadamente la gran mayoría de los pacientes con infección por VHC presentan una buena evolución y su calidad de vida o supervivencia se ven escasamente afectadas (Seeff, 2001).

Entre un 15-50% de los pacientes con infección aguda lograrán aclarar el virus de manera espontánea, a través del sistema inmune. El resto, un 50-85%, desarrollan una infección crónica por VHC, pero en la mayor parte de los casos permanecen asintomáticos durante años incluso décadas, aún presentando transaminasas elevadas. La progresión a fibrosis es altamente variable (Figura B.6).

La curación espontánea se ha asociado con menor edad, sexo femenino, genotipo 3, raza blanca, hepatitis aguda sintomática y con la presencia de determinados polimorfismos genéticos en los genes que codifican para el antígeno HLA, y también para citoquinas como el gen *IL28B* y diversas proteínas activadas por el IFN- α (Rauch, 2009).

En los pacientes con VIH, la tasa de curación espontánea es mucho menor y la cronicación se produce hasta en un 80% de los pacientes (Tuma, 2010).

Un porcentaje importante de pacientes con VHC (probablemente < 20%) pueden evolucionar hasta una enfermedad hepática avanzada (cirrosis o hepatocarcinoma), sin

embargo la mayor parte de los infectados por VHC no sufrirán el desarrollo de una enfermedad hepática terminal y morirán por otras causas (Ghany, 2003).

Cuando la cirrosis está establecida, la progresión a fracaso hepático o hepatocarcinoma se produce entre un 2-4% y un 1-3% al año, respectivamente (Alberti, 2002).

Los pacientes coinfectados VIH/VHC presentan cirrosis en edades más tempranas, desarrollan la progresión a cirrosis más rápidamente, tienen un peor pronóstico una vez establecida la cirrosis y un mayor riesgo de muerte y desarrollo de hepatocarcinoma (Soriano, 2010).

Aproximadamente un 20-30% de los pacientes con infección crónica por VHC/VIH presentan transaminasas normales y la mayor parte presentan signos histológicos de hepatitis leve. Se ha demostrado que este tipo de pacientes presentan menores grados de fibrosis en comparación con los pacientes con transaminasas elevadas. La progresión de la enfermedad hepática en estos pacientes con transaminasas normales es infrecuente (Martín-Carbonero, 2009).

La evolución de la enfermedad por VHC en pacientes coinfectados VIH/VHC viene determinada por: factores relacionados con ambos virus que analizaremos en capítulos posteriores, con el huésped y con el tratamiento antirretroviral.

Entre los factores dependientes del huésped o paciente, se encuentran como predictivos de mala evolución el presentar transaminasas elevadas y un bajo recuento de linfocitos CD4+. Asimismo, el consumo de alcohol, la edad más avanzada y sexo masculino también condicionan una peor evolución. Es fundamental evaluar la coinfección con otras hepatitis virales (particularmente el VHB), la esteatosis hepática, la obesidad, y la presencia de diabetes (Martín-Carbonero, 2004; Jonsson, 2008).

Ni el genotipo ni la carga viral influyen en la velocidad de progresión a fibrosis. Se ha objetivado que el genotipo 3 se relaciona con una mayor frecuencia de esteatosis hepática y también de transaminasas elevadas, favoreciendo una mayor velocidad en la progresión del daño a nivel hepático (Barreiro, et al. 2006).

Desafortunadamente no tenemos marcadores de progresión de la enfermedad hepática por VHC.

B.2. VIH

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un lentivirus, de la familia *Retroviridae* (Cita web 3).

Fue descubierto y considerado como el causante del sida por el equipo de Luc Montagnier (Francia) en 1983 (Barré-Sinoussi, 1983). El virión es esférico, dotado de una envoltura y con una cápside proteica. Su genoma está constituido por una cadena de ARN monocatenario que debe copiarse a ADN para luego poder integrarse y replicarse en el genoma de la célula infectada.

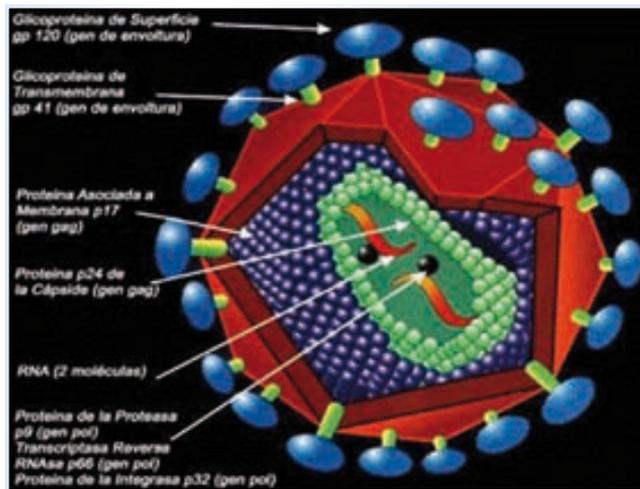


Figura B.7. Estructura básica del VIH. Explicación en el texto.

Los antígenos proteicos situados en la envoltura exterior se acoplan específicamente con las proteínas de membrana de las células que serán infectadas, fundamentalmente en los linfocitos T4 (Smith, 2006).

El proceso de transcripción del ARN en ADN define a los retrovirus y se realiza gracias a una enzima denominada transcriptasa inversa. Tras infectar la célula receptora los lentivirus pueden seguir dos procesos: que el virus entre en latencia sin interferir las funciones celulares, o bien, que se inicie un intenso proceso replicativo con la posterior liberación de viriones capaces de infectar otras células.

B.2.1. Estructura viral

El VIH tiene una forma aproximadamente esférica con un diámetro de 80-100 nm. Está constituido por tres capas. La cubierta exterior es una bicapa lipídica. Se trata de una membrana que inicialmente procede de la célula de donde el virus emergió. Esta cubierta exterior posee 72 prolongaciones formadas por las denominadas glicoproteínas gp120 y gp41, que interactúan facilitando la unión del virus a la célula huésped. La capa del medio está formada por una matriz proteica.

La capa más interior consiste en la nucleocápside icosaédrica, que contiene el núcleo. El genoma del VIH –situado en el núcleo celular– está compuesto por un ARN de cadena simple compuesto por dos filamentos idénticos. La figura B.7 muestra la estructura viral.

El genoma del VIH tiene una longitud de 9.800 pares de bases y está formado por 9 genes: 3 genes estructurales y 6 genes reguladores. Las proteínas estructurales están codificadas por los genes *gag*, *pol* y *env*. La secuencia de estos genes forma la

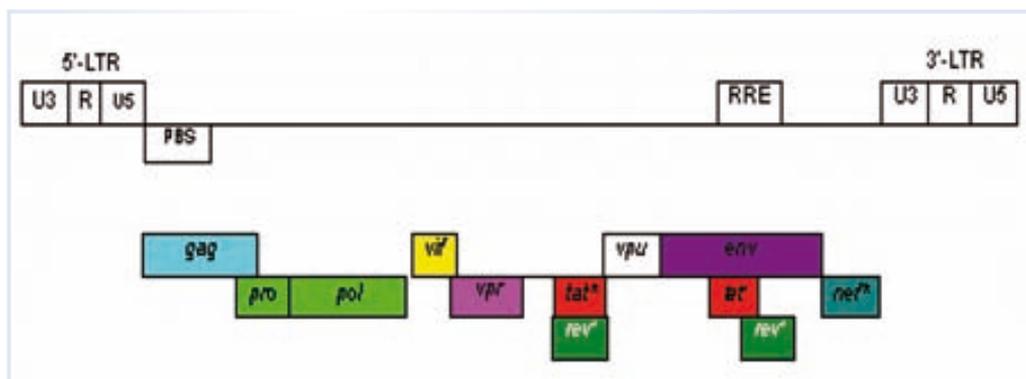


Figura B.8. Distribución del genoma ARN del VIH.

mayor parte del genoma viral. Los seis genes reguladores en el genoma del VIH son el *tat*, *rev*, *vpu*, *vif*, *vpr* y *nef*.

El gen *gag* codifica una proteína precursora: la p55. En el proceso de maduración del virión, una proteasa, (que a su vez es fruto del gen *pol*), segmenta la p55 en cuatro proteínas propias de la estructura del virus: la proteína p24 forma la cápside, la proteína p17 constituye la matriz y las proteínas p6 y p7-p9 forman la nucleocápside.

El interior de la cápside, junto a las dos copias exactas de ARN viral, contiene tres enzimas -producidos a partir del gen *Pol*- fundamentales para la división y replicación viral: la transcriptasa inversa, una integrasa y una proteasa.

La figura B.8 esquematiza la distribución del genoma del VHC. La tabla B.2 resume las características de los genes del VIH y las proteínas codificadas.

B.2.2. Ciclo de replicación

El VIH infecta principalmente los linfocitos T CD4+, pero también los monocitos/macrófagos, las células dendríticas, las células de Langerhans y las células de la microglía a nivel cerebral. La replicación viral se produce en tejidos diversos (ganglios linfáticos, intestino, cerebro, timo,...). Los órganos linfoides, sobre todo los ganglios linfáticos, son el lugar principal donde se realiza su replicación.

La transcriptasa inversa sintetiza el ADN de doble cadena del provirus utilizando como patrón la cadena simple de ARN viral. Se trata de un ADN-polimerasa que funciona dependiente tanto del ADN como del ARN. Tras formarse la primera cadena de ADN, complementaria del ARN viral, es separado por la ARNasa, lo que facilita a la transcriptasa inversa la síntesis de la segunda cadena de ADN, utilizando como molde la primera que formó.

Por lo tanto, para la síntesis de la primera cadena de ADN, la actividad de la transcriptasa inversa es ARN-dependiente, pero para la de la segunda es ADN-dependiente.

Tabla B.2. Relación de los genes del VIH; proteínas codificadas y funciones

Genes	Nombre	Producto (precursor)	Proteína vírica	Función	
Estructurales	<i>Gag</i>	p55	p17	Proteína de la matriz vírica	
			p24	Proteína principal de la cápside vírica	
			p7	Proteína de la nucleocápside. Empaquetamiento del ARN vírico	
			p6	Proteína de la nucleocápside. Unión a Vpr. Encapsidación vírica	
	<i>Pol</i>	p160	p10	Proteasa: procesamiento postraduccional de las poliproteínas Gag y Gag-Pol	
			p50	Transcriptasa inversa: transformación del ARN vírico en ADN provírico	
			p15	RNasa H: eliminación del molde de ARN una vez transcurrida la transcripción inversa	
			p31	Integrasa: inserción del ADN provírico en el cromosoma de la célula infectada	
				<i>Env</i>	gp160
gp41	Glucoproteína de envoltura (transmembrana). Anclaje de gp120 y fusión de membranas vírica y celular				
Reguladores	<i>tat</i>		Tat (p14)	Activador de la transcripción: síntesis de ARNm	
	<i>rev</i>		Rev (p19)	Exportación (transporte) de ARN vírico del núcleo al citoplasma	
Accesorios	<i>nef</i>		Nef (p27)	Regulación negativa de la presencia de CD4 y MHC-I en la membrana celular. Interferencia en la activación de linfocitos T. Estimulación de la infectividad de viriones	
			<i>vpr</i>	Vpr (p15)	Transporte del Complejo de Preintegración al núcleo. Bloqueo del ciclo celular
			<i>vpu</i> (en VIH-1)	Vpu (p16)	Bloqueo del CD4 en el retículo endoplásmico celular, evitando la intepacción con gp120 de nuevas síntesis. Incrementa la liberación de viriones de la célula infectada
			<i>vif</i>	Vif (p23)	Infeciosidad de viriones extracelulares

Posteriormente la integrasa realiza la inserción del ADN proviral en el genoma de la célula huésped.

La replicación del virus se desarrolla en diversas etapas. La fijación es la primera fase en la invasión de una célula. Se produce un acoplamiento entre las proteínas a nivel de la envoltura del virión (las gp120 y gp41) y los receptores a nivel de los linfocitos CD4 (1). Este reconocimiento es posible gracias a los correceptores propios de las células susceptibles de ser invadidas: los CCR5 en el caso de los macrófagos y los CXCR4 en el caso de los LT4. Tras la fijación del virus en la célula a infectar, se produce la penetración. Tras ser reconocido el virión por los receptores de superficie, éste se sitúa dentro de la célula. Este es el momento en el que la envoltura lipídica del virión se fusiona con la membrana plasmática de la célula. Con la protección de la cápside y las nucleocápsides, los dos ARN mensajeros del genoma viral y también sus proteínas asociadas se sitúan en el citoplasma. Con la posterior eliminación de las cubiertas proteicas, cápside y nucleocápsides, el ARN viral permanece libre en el citoplasma listo para ser procesado. Seguidamente se produce la transcripción inversa del ARN vírico formando el ADNc (ADN complementario, monocatenario) (2).

Cada una de las dos moléculas de ARN procedentes del virión lleva asociada una molécula de transcriptasa inversa, que es la responsable de este proceso. Posteriormente las dos moléculas de ADNc se unirán para formar una molécula de ADN. El paso siguiente comprende la integración del genoma vírico recién formado en el genoma de la célula huésped. Este proceso se realiza en el núcleo. Mediante la acción de la integrasa, que procede del virión infectante, se inserta –mejor dicho se integra– el genoma vírico en el ADN celular (3).

El VIH integrado en el genoma de la célula infectada, puede seguir diversos procesos: permanecer en forma latente, replicarse de forma controlada o experimentar una replicación masiva con el consiguiente efecto citopático en la célula infectada.

En este momento se produce la transcripción del ADN vírico con el resultado de un ARNm (ARN mensajero), que alcanza el citoplasma a través de los poros nucleares (4). A este nivel el ARNm facilita la información necesaria para la traducción, produciéndose la síntesis de proteínas a nivel ribosomal. Por acción de proteasas del VIH, las poliproteínas fruto de la traducción son procesadas y de esta manera capacitadas para formar las proteínas constitutivas del virus (5).

En las fases finales, las proteínas víricas fabricadas son ensambladas junto con los ARN provirales, formando los componentes internos de la estructura del nuevo virión, elaborando la cápside y su contenido (6). El último paso es la gemación: los nucleoides víricos se envuelven con la membrana plasmática y terminan por desprenderse. El nuevo virión o partícula infectante ya está formado (7)(Alcami, 2008). La figura B.9 esquematiza el proceso descrito, con los pasos 1-7 descritos.

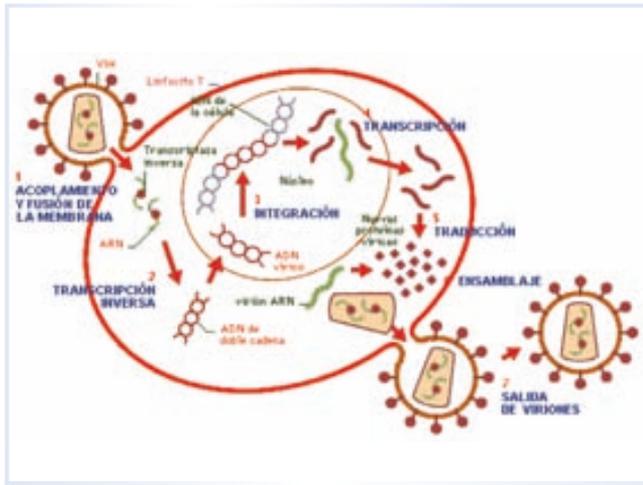


Figura B.9. Ciclo replicativo del VIH.

B.2.3. Detección del VIH

La prueba más habitual para detectar la presencia de VIH es la prueba de inmunodetección denominada ELISA. Con esta técnica se detectan los anticuerpos específicos que el organismo produce como respuesta a la presencia del virus. Ante un resultado positivo mediante ELISA, se debe confirmar la presencia de VIH mediante la prueba denominada *western blot*. La prueba diagnóstica dirigida al VIH tiene una especificidad del 99% y una sensibilidad del 99% (Phair, 1989).

La cuantificación de la carga viral, es una prueba esencial aplicada al seguimiento de los pacientes más que al diagnóstico de los mismos. Esta técnica permite medir el nivel de replicación del virus y evaluar la eficacia del tratamiento antirretroviral. Por lo tanto la PCR es el método de elección para realizar el seguimiento de los niveles de replicación viral VIH (Giachetti, 2002).

B.2.4. Transmisión del VIH

El VIH se transmite a través del contacto entre fluidos corporales que poseen una alta concentración viral. Las tres principales formas de transmisión son: por vía sexual, parenteral o transmisión vertical. La transmisión por vía sexual se produce por el contacto de secreciones infectadas con la mucosa genital, rectal u oral de la otra persona.

La vía parental es una forma de transmisión a través de jeringuillas contaminadas que se da por la utilización de drogas intravenosas o a través de los servicios sanitarios.

La transmisión vertical de madre a hijo puede ocurrir durante las últimas semanas del embarazo, durante el parto, o al amamantar al bebé. De estas situaciones, en el mo-

mento del parto es cuando puede producirse la mayor tasa de contagio. De todas maneras en los países desarrollados la transmisión vertical del VIH prácticamente es del 0% si se toman las medidas oportunas para evitar el contagio.

B.3. Coinfección VIH-VHC

Aproximadamente 60 millones de personas en el mundo han sido infectadas por el VIH. El VHC infecta a alrededor del 3% de la población mundial y representa una auténtica pandemia viral, siendo de 3 a 4 veces más prevalente que la infección por VIH.

La infección por VHC y la infección por el VIH comparten vía de transmisión. Hasta un 65% del total de los pacientes VIH pueden mostrar serologías positivas para el VHC. Un 55% de todos los pacientes VIH tienen carga viral VHC positiva, o lo que es lo mismo, replicación viral activa de la hepatitis C (Eyster, 1991). En Europa y EE.UU., entre un 40-60% de las personas infectadas por VIH también están infectadas por VHC (Monga, 2001).

La prevalencia de coinfección varía de manera determinante, según la ruta de infección del VIH. La ruta más frecuente de adquisición de la coinfección VIH/VHC es la exposición parenteral a sangre: los dos grupos con el mayor riesgo de infección por VHC son los que recibieron transfusiones de sangre y los usuarios de drogas intravenosas. La prevalencia de coinfección es mucho mayor entre usuarios de drogas endovenosas y hemofílicos (hasta un 96%), en comparación con hombres homosexuales (Zhang, 2003; Strasfeld 2003).

Consecuentemente la hepatopatía crónica por el VHC es la patología asociada más importante que presentan los sujetos infectados por el VIH en nuestro país.

Pese a compartir vía de contagio la capacidad de transmisión de los virus no es la misma. Por exposición percutánea a pequeños volúmenes de sangre, el VHC es aproximadamente 10 veces más infeccioso que el VIH. El contagio se produce entre 15 y 30 de cada 1.000 traumatismos o pinchazos por aguja. En el caso del VIH la transmisión por esta vía se da en tan solo 3 de cada 1.000 casos. Por contra, el VIH se transmite más fácilmente que el VHC mediante relaciones sexuales y también en el caso de la transmisión materno-fetal (Soto, 1994).

Como muestra de lo expuesto, al analizar las frecuencias de anticuerpos anti-VHC en función de la vía de transmisión en pacientes coinfectados con el VIH, objetivamos que en ADVP, los porcentajes de VHC llegan hasta un 97%. En pacientes VIH heterosexuales, los porcentajes de VHC son de un 14%, y en homosexuales son de un 5%.

Desde la introducción del TARGA la supervivencia de los pacientes infectados por el VIH se ha prolongado, siendo cada vez más frecuente la frecuencia y la importancia de la comorbilidad por hepatopatía crónica secundaria a infección por el VHC y por el virus de la VHB (Palella, 1998; Iribarren, 2002).

Desde el año 1996, año de inicio del TARGA, se ha podido objetivar un aumento de las muertes por causa hepática en la población de pacientes VIH, tanto por cirrosis como

por carcinoma hepatocelular entre la población de coinfectados con VHB y VHC. Al cronificar y estabilizar la infección por el VIH, cobra mayor relieve y gravedad la infección por VHC (Puoti, 2000; Macias, 2002; Bonnet 2002).

B.3.1. Interacción recíproca entre VIH-VHC

La coexistencia de la infección crónica por VIH y VHC en un mismo individuo conlleva interacciones complejas, modificando la historia natural de las dos infecciones. Además, en los pacientes con TARGA, podemos objetivar un enlentecimiento en la progresión de la hepatitis crónica en comparación con aquellos pacientes sin tratamiento y que presentan alta replicación del VIH.

B.3.1.1. IMPACTO DEL VIH SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN POR VHC

La infección por VIH conlleva un aumento importante en la replicación del VHC, acelerando la progresión de la enfermedad hepática y aumentando el riesgo de mortalidad de causa hepática.

Tras la infección aguda, la seroconversión para VHC en pacientes VIH positivos es más frecuente que en pacientes sin infección por VIH. Así mismo, la infección por VIH también se asocia con una disminución en la presencia de anticuerpos anti-VHC, en pacientes muy inmunodeprimidos. En ocasiones el diagnóstico de la infección por el VHC debe realizarse por técnicas de PCR- ARN-VHC.

La coinfección empeora el curso histológico de la infección por VHC al incrementar y acelerar el riesgo de evolución a cirrosis (Di Martino, 2001). La mayor tasa de evolución a cirrosis en un plazo menor de tiempo puede ser explicado por un incremento en la progresión anual de la fibrosis. El tiempo estimado para la evolución hasta la presencia de cirrosis en los pacientes mono infectados por el VHC, es significativamente mayor, 23 años, que en aquellos pacientes coinfectados con el VIH, que algunos han estimado en 7 años (Soto, 1997; Di Martino 2001).

Un estudio (Benhamou, 1999) observacional longitudinal, objetiva una tasa de cirrosis a 20 años del 37% en pacientes VHC coinfectados por el VIH, y tan solo del 10% en pacientes mono infectados por el VHC.

Los mecanismos que explican la progresión acelerada de la hepatitis C en pacientes VIH no son bien comprendidos. La disminución de la inmunidad mediada por células asociada a la infección por VIH facilita una mayor replicación del VHC. El incremento de la viremia por VHC podría explicar la mayor frecuencia de cirrosis entre pacientes infectados por VIH.

Los mecanismos que forman parte del proceso de la afectación tisular pueden estar modificados en pacientes inmunocomprometidos. Algunos de ellos son la alteración del patrón local de producción de citoquinas, la expresión de moléculas de adhesión o la liberación de factores fibrogénicos (Mastroianni, 2002).

La coinfección por VIH altera la respuesta de las citoquinas, facilitando una mayor producción de las del tipo 1 proinflamatorio (Woitas, 1999). Es importante destacar que la infección por VIH puede por sí misma tener efecto citopático directo en las células hepáticas. El VIH infecta no sólo las células CD4 de la sangre periférica, sino también a las células inmunes a nivel intrahepático, como son las células de Kupffer, los hepatocitos y las células hepáticas mono nucleadas (Bach, 1992; Housset, 1993).

La hepatitis aguda por el VHC cronifica con más frecuencia en los pacientes infectados por el VIH. Cuanto más avanzada es la inmunosupresión los porcentajes de cronicidad son más elevados. En la infección crónica VHC, los niveles de ARN-VHC son más elevados en los pacientes coinfectados con VIH/VHC que en los pacientes mono infectados, tanto a nivel hepático como a nivel plasmático. Este fenómeno se atribuye a una menor respuesta de las células CD8 específicas anti-VHC. Esta mayor replicación justifica una disminución en la respuesta al tratamiento del VHC. Cuando la inmunosupresión es grave se acelera la progresión a fibrosis hepática en los pacientes coinfectados VIH/VHC (Thomas, 2000; Beld, 1998; Bonacini, 1999; Soriano, 1996; Mauss, 1998; Benhamou, 1999; Puoti 2001; Martínez-Sierra, 2003; Rockstroh, 1996).

Los principales factores asociados con el incremento en el riesgo de progresión a cirrosis en pacientes mono infectados VHC son el sexo masculino, una mayor edad en el momento de la infección por el VHC, y el consumo de alcohol. La carga viral y el genotipo no influyen en la evolución a cirrosis, aunque sí en la respuesta al tratamiento (Marcellin, 2002).

Los factores asociados a una mayor progresión de la fibrosis y posteriormente a cirrosis en pacientes coinfectados no están completamente definidos. La mayor edad al momento de la infección por el VHC, el consumo de alcohol, la presencia de genotipo 1 se asocian con una mayor progresión a fibrosis. La influencia del sexo no parece tener relación con la progresión a fibrosis (García-Samaniego, 1997; Martín-Carbonero, 2004).

Al valorar las variables relacionadas con el VIH, el estado de inmunosupresión, expresado por el bajo recuento de linfocitos T CD4, se asocia sistemáticamente a fibrosis grave (Di Martino, 2001; Martínez-Sierra, 2003; Mohsen, 2003).

Un estudio español (Martín-Carbonero, 2004) examinó el resultado de la biopsia hepática en 914 pacientes con coinfección VIH/VHC. El grado de fibrosis hepática (según la escala METAVIR) fue F0 en el 10% de los pacientes, F1 en el 33%, F2 en el 22%, F3 en el 22% y F4 en el 13%. Por encima de los 40 años de edad, cerca de un 50% de los pacientes tenían grados de fibrosis hepática avanzada (F3-F4). La evolución a enfermedad hepática terminal (EHT) se produjo antes en la población de coinfectados por VIH/VHC. El desarrollo de hepatocarcinoma se presenta a edades más jóvenes. Hasta un 25% de los pacientes coinfectados desarrollan cirrosis hepática a los 15 años tras la exposición al VHC. En los pacientes mono infectados por el VHC este proceso se

produce entre un 5%-8%. Podemos afirmar que la mortalidad asociada a EHT se adelanta unos 10 años aproximadamente en los pacientes coinfectados con VIH/VHC respecto a los mono infectados por el VHC.

También se ha publicado (Benhamou, 2001) que el uso de una de terapia antirretroviral, preferentemente con IP's, junto con la reducción del consumo de alcohol y el mantenimiento de un recuento alto de linfocitos CD4 tiene un impacto positivo en los pacientes coinfectados, disminuyendo la progresión a fibrosis.

B.3.1.2. IMPACTO DEL HCV SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN POR HIV

La hepatitis C puede afectar en forma negativa la evolución de la infección por VIH, acelerando la historia natural de la enfermedad, o interfiriendo en la respuesta y la tolerancia al TARGA (Puoti, 2004; Soto, 1997).

La infección crónica por VHC favorece una activación inmune persistente y parece facilitar la transcripción del VIH en los linfocitos T, lo que conlleva una destrucción más rápida de los mismos. El VHC tiene capacidad infectante a nivel de los linfocitos T, pudiendo acelerar su muerte (Laskus, 2000).

Antes de que estuviera disponible el TARGA, algunos estudios habían demostrado que la coinfección por VHC confería un riesgo incrementado de progresión a sida en pacientes VHC positivos. Otros estudios no confirman este supuesto (Piroth, 1998; Lesens, 1999; Dorrucci, 1995; Wright, 1994).

Un estudio Suizo (Greub, 2000) objetivó que en personas con tratamiento antirretroviral la posibilidad de progresión a sida estaba asociada de manera independiente a la presencia del VHC. Ser portador VHC se asociaba con una disminución media de un 21% en la posibilidad de incrementar el recuento de CD4 en al menos 50 células/ml.

La presencia de carga viral VHC se asoció (Daar, 2001), en pacientes VIH, con un riesgo relativo de progresión clínica hasta sida del 1.66 y con un riesgo relativo de mortalidad relacionada a sida del 1.54. Sin embargo, otros estudios no han evidenciado que la infección por VHC modificara el riesgo de progresión a sida, fallecimiento, o una disminución en la respuesta inmunológica al TARGA (Sulkowski, 2002).

Mientras que algunos autores (Klein, 2003) afirman que el VHC puede impedir la reconstitución inmune tras la terapia anti-VIH, otros (Rancinan, 2002) afirman que la coinfección por VHC no dificulta el incremento de los CD4 tras la administración del TARGA.

Si bien el VHC puede no afectar directamente la historia natural del VIH, sí que puede alterar el manejo de esta infección en los individuos coinfectados, por varias circunstancias derivadas de la coinfección. Por ejemplo, la mayor proporción de pacientes ADVP en el grupo de coinfectados puede ser la causa de un menor cumplimiento del TARGA, y con ello un peor control de la enfermedad (Sulkowski, 2002).

B.3.2. TARGA en VHC

El VHC puede condicionar una influencia negativa ante la infección por VIH, proporcionando una mayor frecuencia de abandonos del TARGA y aumentando además su toxicidad a nivel hepático. Hasta un 15%-20% de los pacientes con la coinfección VIH/VHC deben suspender TARGA por causa de toxicidad hepática. Se ha descrito que este riesgo se ve incrementado en pacientes con genotipo 3 del VHC, debido a una mayor producción de esteatosis hepática (Reisler, 2003; Mocroft, 2005; Den Brinker, 2000).

B.3.2.1. EFECTO BENEFICIOSO DEL TARGA EN VHC

Los tratamientos TARGA se asocian a una mayor supervivencia global, debido al control del VIH. También pueden ser uno de los motivos de la disminución de las causas hepáticas de muerte. El mejor pronóstico en los pacientes coinfectados con VIH/VHC con TARGA, se debe a una menor progresión a la fibrosis hepática. Se ha demostrado una reducción significativa de la fibrosis en pacientes VIH tratados con IP (Qurishi 2004; Bonacini, 2006; Benhamou, 2001).

El efecto del TARGA sobre la carga viral de VHC puede ser variable, aunque la mayoría de los estudios no muestran cambios en los títulos de ARN de VHC, en los pacientes con TARGA (García-Samaniego, 1998; Torre, 2001).

Sin embargo, se ha demostrado que el TARGA reduce la carga intrahepática de VHC. Tras seis meses de uso de IP se objetiva (tras realización de biopsia hepática) una carga viral VHC intrahepática 3 a 4 veces inferior que en las personas que no recibieron los IP. No se encontraron diferencias en la carga viral plasmática del VHC (Neau, 2001).

B.3.2.2. TOXICIDAD HEPÁTICA DEL TARGA

En la actualidad los fármacos utilizados en el TARGA no consiguen la erradicación del VIH-1. Su objetivo es inhibir la replicación del retrovirus para que el paciente pueda tener una respuesta inmune efectiva.

Todos los fármacos ARV se han asociado con hepatotoxicidad, aunque no con igual frecuencia (Bonacini, 2004). La toxicidad hepática por fármacos constituye uno de los efectos adversos agudos más frecuentes del TARGA, con porcentajes entre el 5 y el 10, y es uno de los motivos más importantes que pueden causar la suspensión del TARGA.

El espectro clínico es muy variado y abarca desde elevaciones banales de las enzimas hepáticas, que transcurre de manera asintomática y transitoria, hasta complicaciones poco frecuentes, pero muy graves, como puede ser la hepatitis aguda fulminante.

La patogenia de la toxicidad hepática está mediada por mecanismos diversos: toxicidad directa del fármaco, reacción inmuno alérgica, daño mitocondrial, reconstitución inmunológica, esteatohepatitis, etc. La coinfección por los virus de las VHB y VHC, con la presencia del genotipo 3 del VHC, y una ingesta elevada de alcohol

favorecen también el desarrollo de toxicidad hepática por los fármacos ARV (Soriano, 2008; Domingo, 2011).

Actualmente disponemos de seis familias de agentes antirretrovirales, que pueden causar toxicidad hepática utilizados individualmente o en combinación. Son los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos (ITIAN), inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleósidos (NN), inhibidores de la proteasa (IP), inhibidores de la fusión (IF), e inhibidores de la integrasa (IG) e inhibidores del receptor CCR5 (ICR5). La hepatotoxicidad por ITIAN puede estar causada por la toxicidad mitocondrial mediante la inhibición de las ADN polimerasas (Lenzo, 1997).

El principal mecanismo de toxicidad hepática atribuido a los NN son las reacciones de hipersensibilidad, mediadas por citoquinas. Se desconoce el mecanismo exacto por el que se induce la hepatotoxicidad (Kontorinis, 2003; Lebray, 2002).

La hepatotoxicidad de los IP se debe a que son metabolizados en el hígado por enzimas del sistema citocromo P450. El deterioro hepático causado por el VHC afecta al metabolismo del citocromo P450. Los IP pueden actuar como inhibidores del P450 o como inductores de enzimas hepáticos, y de esta manera favorecer una mayor hepatotoxicidad por aumento de las concentraciones plasmáticas de otras drogas (Flexner, 1998).

La posible influencia del tratamiento TARGA sobre los resultados de RVS en pacientes coinfectados tratados con PEG-IFN y RBV ha sido recientemente descrita por el grupo de GESIDA. Tras analizar 1.700 pacientes, el seguimiento o no de un tratamiento TARGA no se asoció con la RVS. Sólo los pacientes con AZT presentan un significativo descenso en los porcentajes de RVS.

B.4. Tratamiento del VHC en pacientes con infección por VIH

Desde el inicio de los TARGA, en el año 1996, se ha podido controlar la inmunodeficiencia en la mayoría de los individuos infectados por el VIH que cumplen bien el tratamiento, y consecuentemente ha disminuido drásticamente la incidencia de enfermedades oportunistas. De la perspectiva de una muerte muy probable, los pacientes pasaron a tener una perspectiva vital radicalmente opuesta (Palella, 1998).

Sin embargo, enfermedades hasta entonces poco relevantes, como las hepatitis crónicas virales, cobraron una relevancia muy significativa. Es por ello que el tratamiento de la hepatitis crónica C en los pacientes VIH debe plantearse como una prioridad, fundamentalmente por dos razones: primero, por la más rápida progresión a cirrosis y segundo, por la peor tolerancia y el mayor riesgo de hepatotoxicidad de los antirretrovirales en presencia de hepatitis crónica C (Soriano, 2004).

B.4.1. Tratamiento del VHC

El tratamiento de la hepatitis crónica por virus de VHC se basa en la combinación de PEG-INF y RBV. Recientemente se han aprobado nuevos fármacos que se utilizarán –en

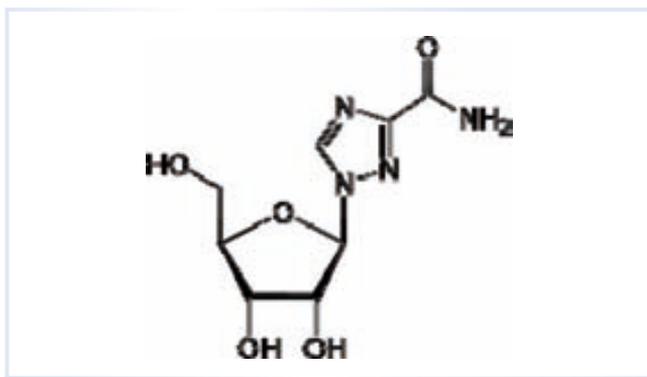


Figura B.10. Estructura molecular de la RBV.

combinación con PEG-INF y RBV- en un futuro muy próximo: el boceprevir (aprobado por la EMEA el 22 de julio 2011) y el telaprevir (aprobado por la EMEA el 22 de setiembre 2011).

B.4.1.1. INTERFERÓN

El INF es una proteína que tiene una actividad antivírica e inmunomoduladora. La acción antivírica consiste en su capacidad para inhibir la síntesis de ADN y de las proteínas vírales; la inmunomodulación es debida al incremento de la respuesta inmunitaria celular.

El PEG-INF está compuesto de una molécula de interferón con una de polietilenglicol que están unidos mediante un enlace covalente. La pegilación aumenta la semivida plasmática reduciendo el aclaramiento renal, consiguiendo una acción más sostenida. En la actualidad existen dos tipos de interferones pegilados: el PEG-INF α 2a, que se conjuga con un polietilenglicol de 40 kD y el PEG-INF α 2b que lo hace con uno de 12 kD. Se administran por vía subcutánea, una vez por semana.

B.4.1.2. RBV

La RBV (1-beta-D-ribofuranosil-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamida) (Figura B.10) tiene una mínima o nula actividad antiviral frente al VHC en monoterapia. No obstante, es fundamental su acción cuando se combina con el IFN- α para obtener una RVS (McHutchison, 1998; Poynard, 1998; Fried, 2002).

La RBV es un análogo de la guanosina, que se ha demostrado activo frente a diferentes virus ARN y ADN. Su mecanismo de acción no es bien conocido. Es un inhibidor de la ARN polimerasa ARN dependiente, que inhibe la inosin-monofosfato-deshidrogenasa (IMP-DH) y produce depleción intracelular de ATP.

No se sabe cómo la RBV aumenta la respuesta del IFN- α . Se han propuesto varios mecanismos de acción: inhibición de la IMP-DH, inhibición directa de la ARN polimerasa

del VHC, hipermutagénesis, inducción de los ISGs y un efecto inmunomodulador (Feld, 2005; Thomas 2011).

La RBV es una molécula polar (ácido débil) y por lo tanto, necesita una proteína transportadora para atravesar las membranas celulares. En el interior de los hepatocitos, la RBV es fosforilada a sus formas mono, bi y tri -fosfato (RBV-TP).

La forma RBV monofosfato inhibe a la IMP-DH por competición con la inosina monofosfato, lo que lleva a una depleción de GTP, necesaria para la síntesis del ARN viral.

La forma RBV-TP se incorpora en la cadena naciente del ARN viral, lo que podría llevar a la terminación temprana de la síntesis de la cadena y a una inhibición de la replicación viral. Por otro lado, la forma RBV-TP puede actuar como un agente mutagénico facilitando la producción de partículas virales defectivas. También se ha propuesto una acción inmunomoduladora de la RBV.

La RBV, no se une a proteínas plasmáticas y tiene un volumen aparente de distribución muy elevado debido a su extensiva acumulación en glóbulos rojos (cociente sangre total: plasma = 60:1).

La RBV tiene un tiempo de semivida de eliminación muy largo, lo que podría reflejar su extensiva acumulación en compartimentos no plasmáticos como los glóbulos rojos y su lento aclaramiento de los mismos. Por esta razón, el estado de equilibrio estacionario de la RBV no se alcanza hasta la semana 4 de tratamiento.

La RBV produce anemia hemolítica por acumulación de su forma trifosfato el interior de los glóbulos rojos (Tanaka, 2005). El aspecto clave de este proceso radica en que la fosforilación de la RBV en los glóbulos rojos es irreversible ya que los hematíes no tienen fosfatasas. Ello conlleva una depleción del ATP intracelular.

El interferón produce supresión de la médula ósea. Estos dos mecanismos de acción son la causa de una caída media de los niveles de Hb de 2-3 g/dL durante las 12 primeras semanas de terapia. Alrededor de un 10% de los pacientes experimentan una caída de Hb por debajo de 10 g/dL y requieren reducciones de dosis de RBV, con el riesgo de no conseguir RVS (Hung, 2006). Entre los factores asociados con mayor riesgo de desarrollar anemia, se encuentran la edad avanzada, sexo femenino, bajo peso corporal, bajo número de plaquetas, nivel de Hb basal bajo y una disminución en el aclaramiento de creatinina (Van Vlierbergh, 2001).

B.4.2. Objetivos del tratamiento de la infección crónica por VHC

El objetivo fundamental del tratamiento es la erradicación de la infección viral, consiguiendo con ello la normalización analítica de las transaminasas y de la carga viral VHC, y una estabilización e incluso una regresión del daño histológico hepático (Manns, 2001; Fried, 2002).

La RVS se define como la negativización de la viremia, medido mediante técnicas de PCR, que se mantiene al menos 24 semanas tras la finalización del tratamiento. Si se

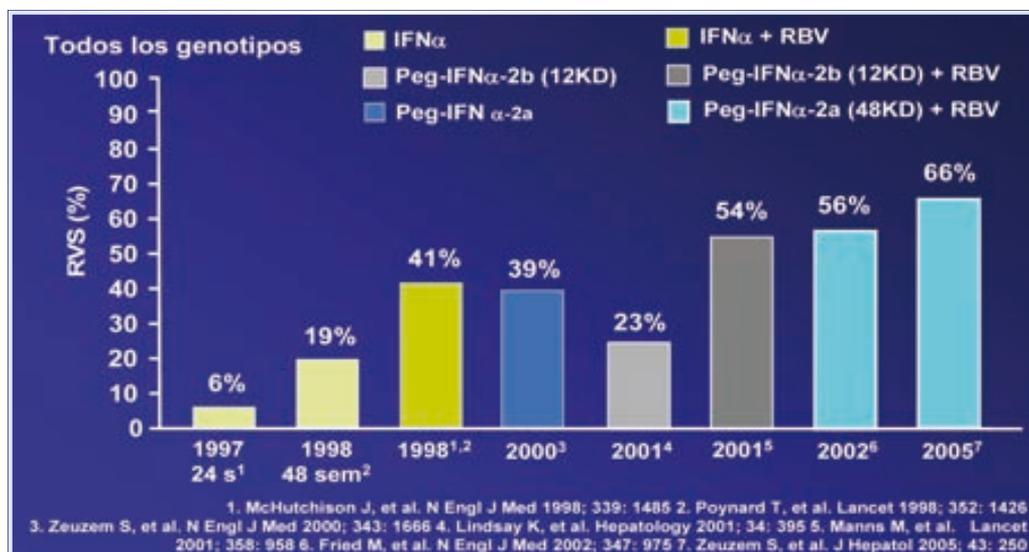


Figura B.11. Evolución de los porcentajes de RVS desde 1997 a 2005, con diversas opciones de tratamiento del VHC en pacientes monoinfectados (adaptado de Garcia-Samaniego J. Seminario VHC. Febrero 2010. Barcelona).

cumple este requisito podemos asegurar que el paciente se ha curado de la infección crónica por el VHC. Hemos erradicado la presencia del virus del organismo.

Los porcentajes de RVS han mejorado sustancialmente desde mediados de la década de los 90, en la que se alcanzaba un modestísimo 6% de RVS con 24 semanas de tratamiento con IFN en monoterapia. En la figura B.11 se expone de manera esquemática la evolución de las tasas de respuesta, con varias opciones terapéuticas, en pacientes monoinfectados.

En la actualidad, la tasa global de RVS tras un tratamiento combinado con PEG-IFN más RBV en pacientes monoinfectados con el VHC se encuentra en torno al 55-63%. En los pacientes con genotipos 2 y 3 el porcentaje de RVS se consigue en el 74-80%. En el genotipo 1 se han obtenido tasas de RVS en torno al 41-56% (Manns, 2001; Fried, 2002; Hadziyannis, 2004).

De manera resumida podemos afirmar que el tratamiento del VHC tiene las dos caras de una misma moneda: la cara es que es la única infección vírica crónica que podemos erradicar. La cruz es que solo lo conseguimos en un 50-63% de los pacientes. Estos resultados son peores en pacientes coinfectados.

Recientemente se han aprobado dos nuevos inhibidores de la proteasa del VHC: boceprevir y telaprevir. Los tratamientos triples con PEG-IFN, RBV y un IP-VHC (telaprevir

o boceprevir) consiguen porcentajes de RVS mucho mayores, llegando hasta el 75%. Los resultados son fruto de ensayos clínicos controlados. Todavía no están comercializados en nuestro país, aunque es de preveer que podremos utilizarlos a inicios del año 2012 (Poordad, 2011; Jacobson, 2011).

B.4.3. Recomendaciones en pacientes coinfectados

Las recomendaciones de GESIDA del año 2009 sugieren un tratamiento de 48 semanas de duración, con PEG-IFN y RBV, independientemente del genotipo VHC. Cuando la negativización de la carga viral VHC solo se obtiene a la semana 24, puede alargarse el tratamiento hasta la semana 72.

Las guías europeas del 2008 (Rockstroh, 2008), justifican un tratamiento de 24 semanas para los pacientes con genotipos 2-3, que hayan negativizado la carga viral en la semana 4 de tratamiento.

El tratamiento deberá suspenderse siempre que la carga viral VHC no haya descendido dos logaritmos respecto a la basal, en la semana 12 de tratamiento. La presencia de carga viral positiva a la semana 24 implica también la suspensión del tratamiento.

Los porcentajes de RVS en los pacientes coinfectados son desalentadores. La tasa de respuesta al tratamiento del VHC en los pacientes genotipo 1 es del 17 al 39%, subiendo hasta un 44-73% en los pacientes con genotipo 3.

Las razones de la peor respuesta del tratamiento del VHC en pacientes coinfectados no son bien conocidas, y son atribuidas a múltiples factores. El déficit inmunológico que provoca la infección por el VIH tiene un impacto negativo sobre la eficacia del tratamiento con PEG-IFN y RBV, incluso en pacientes con una cifra elevada de linfocitos CD4 y/o ARN-VIH indetectable. La tasa de abandonos del tratamiento anti-VHC es más alta en pacientes coinfectados. Ello es debido a la presencia de una mayor frecuencia de efectos adversos graves en estos pacientes en comparación con los pacientes VIH negativos, en los que habitualmente es menor del 15% (Manns, 2001; Fried 2002). También puede influir –en algunos casos- la menor experiencia en el manejo de los efectos adversos del tratamiento del VHC por parte de los especialistas que tratan habitualmente los pacientes con VIH.

B.4.4. Resumen de los estudios más importantes en pacientes coinfectados

En los últimos años se han publicado varios estudios con diversas estrategias terapéuticas. En la Tabla B.3 se resumen los datos más relevantes de los estudios prospectivos aleatorizados con interferón pegilado más RBV para el tratamiento de la hepatitis crónica por VHC en pacientes VIH.

El estudio APRICOT (Torriani, 2004) es el estudio más importante realizado en pacientes coinfectados con VIH/VHC. Se incluyeron 889 pacientes de 19 países. Se distribuyeron

en tres brazos que recibieron: interferón convencional (3 millones de UI 3 veces/sem) más RBV (800 mg/d), interferón pegilado α -2a (180 μ g/semana) en monoterapia e interferón pegilado α -2a (180 μ g/semana) más RBV 800 mg/d. Los porcentajes más elevados de RVS se observaron en el grupo de interferón pegilado α -2a y RBV (40%) frente a interferón convencional con RBV (12%) e interferón pegilado α -2a en monoterapia (20%). En 29% de los pacientes con G1 se obtuvo RVS. Se objetivó una mejor RVS en genotipos 2 y 3 (62%). La proporción de abandonos del tratamiento fue del 25%.

El estudio ACTG A5071 (Chung, 2004) incluyó 133 pacientes distribuidos en dos brazos que recibieron interferón pegilado α -2a más RBV e interferón convencional α -2a y RBV respectivamente. Se obtuvo una normalización de las transaminasas en un 54% de los pacientes que recibieron PEG-IFN y 44% de los pacientes que recibieron IFN. El grupo con interferón pegilado incluyó 66 pacientes. Los pacientes fueron tratados con dosis fijas semanales de 180 μ g de PEG-IFN α -2a más RBV. Todos los pacientes comenzaron con dosis bajas de 600 mg de RBV al día, que se incrementaron paulatinamente hasta 1.000 mg/día, según la tolerancia. El 77% de los pacientes presentaban genotipo 1. Un 41% de los pacientes alcanzó la respuesta al final del tratamiento, pero la RVS sólo se obtuvo en el 27% de los pacientes (14% en genotipo 1 y 73% en el resto de genotipos), con PEG-IFN. La RVS en los pacientes tratados con IFN fue del 12%.

El estudio RIBAVIC (Carrat, 2004), incluyó 412 pacientes distribuidos en dos brazos que recibieron interferón convencional 3 veces/semana con 800 mg de RBV e interferón pegilado α -2b 1,5 mg/kg/sem más 800 mg/24 h de RBV. La respuesta viral sostenida fue de 26% y 38% respectivamente. El porcentaje de abandonos fue elevado: un 38%, debido principalmente a efectos secundarios.

Un estudio español (Laguno, 2004) realizado en el Hospital Clínic de Barcelona, incluyó 95 pacientes distribuidos en dos brazos. Se compararon los regímenes interferón α -2b (3 mill UI 3 veces/sem) más RBV vs interferón pegilado α -2b (100-150 mg/sem) más RBV (800-1.200 mg/día). La respuesta viral sostenida fue de 21% y 44% respectivamente. Se obtuvo una mejor RVS en genotipos 2-3 con 53%, con un 38% en los genotipos 1-4.

Otro ensayo del mismo equipo (Laguno, 2009) incluyó un total de 182 pacientes. Se aleatorizó el tratamiento, comparando las dosis habituales de los dos PEG-INF disponibles en el mercado, más RBV (1.000 mg/24 h para pesos < 75 kg vs 1.200 mg /24 h con un peso > 75 mg). El 63% eran genotipo 1 o 4, el 30% tenían una biopsia hepática que mostraba un grado de fibrosis avanzada (puentes de fibrosis o cirrosis) y el 56% tenían una carga viral VHC basal mayor de 800.000 UI/ml. La respuesta viral sostenida global en los pacientes incluidos en el estudio fue del 44% sin diferencias estadísticamente significativas entre las 2 opciones.

El estudio PRESCO (Núñez, 2007) incluyó 389 pacientes. Se trata de un estudio prospectivo no comparativo en el que los pacientes recibieron interferón pegilado α -2a más RBV: 1.000 mg/24 h en los enfermos que pesaban menos de 75 Kg y 1.200 mg al día en

Tabla B.3. Resultado de los estudios prospectivos aleatorizados con interferón pegilado más ribavirina para el tratamiento de la hepatitis crónica por VHC en pacientes VIH

Autor, año	Tratamiento	Duración (semanas)	Número de casos	Respuesta virológica sostenida		
				global	Genotipos 1-4	Genotipos 2-3
Perrone, et al., 2004 Estudio Ribavic	IFN α -2b (3 MU, 3 x semana) Ribavirina (0,8 g/d)	48	207	18	NA	NA
	IFN α -2b PEG 12 kD (1,5 mcg/ mg/semana) Ribavirina (0,8 g/día)	48	205	26	NA	NA
Laguno et al., 2004	IFN α -2b (3 MU, 3 x semana) Ribavirina (0,8-1,2 g/día)	24* 48	43	21	7	47
	IFN α -2b PEG (100-150 mcg/ semana) Ribavirina (0,8-1,2 g/día)	24* 48	52	44	38	53
Chung, et al., 2004 ACTG A5071	IFN α -2b (6 MU 3 x semana, 12 semanas y 3 MU 3 x semanas, 36 semanas) Ribavirina (1-1,2 g/día)	48	67	12	6	33
	IFN α -2a PEG (180 mcg/ semana) Ribavirina (0,6-1 g/día)	48	66	27	14	73

Continúa

Tabla B.3. Resultado de los estudios prospectivos aleatorizados con interferón pegilado más ribavirina para el tratamiento de la hepatitis crónica por VHC en pacientes VIH (continuación)

Autor, año	Tratamiento	Duración (semanas)	Número de casos	Respuesta virológica sostenida		
				global	Genotipos 1-4	Genotipos 2-3
Torriani, et al., 2004 Estudio Apricot	IFN α -2a (3 MU, 3 x semana) Ribavirina (0,8 g/día)	48	289	12	7	20
	IFN α -2a PEG (180 mcg/ semana) Ribavirina (0,8 g/día)	48	290	40	29	62
Laguno, et al., 2009	IFN α -2a PEG (180 mcg/ semana) Placebo	48	289	20	14	36
	IFN α -2b PEG (100-150 mcg/ semana) Ribavirina (0,8-1,2 g/día)	48	86	42	27	32
	IFN α -2a PEG (180 mcg/ semana) Ribavirina (0,8-1,2 g/día)	48	96	46	61	70

*24 semanas de tratamiento si: genotipo 2 o 3 y ARN-VHC basal < 800.000 U/ml; IFN: interferón; MU: millones de unidades; NA: no disponible; PEG: pegilado; VHC: virus de la hepatitis C; HIV: virus de la inmunodeficiencia humana. (adaptado de Mallolas 2011).

los que pesaban más de 75 Kg. Un 61% de los pacientes presentaban un genotipo 1 o 4. El 67% tenía una carga viral basal VHC-ARN por encima de 500.000 IU/ml. La RVS fue del 49,6%, siendo más alta en G 2-3 que en G1-4 (72.4% vs 35%; $p < 0.0001$).

De manera resumida podemos concretar que en el mejor de los casos nuestros pacientes con G1 no llegan a un 50% de RVS. Las terapias triples están siendo ensayadas en la actualidad en pacientes coinfectados (Sulkowski, 2011).

B.4.5. Efectos del tratamiento del VHC en la evolución de la enfermedad por el VHC y por el VIH

A parte de la influencia del tratamiento del VHC en la progresión de la hepatopatía, es importante destacar la influencia que puede tener el tratamiento de la infección del VHC en la progresión de la enfermedad por el VIH.

La información más destacada sobre este aspecto procede de la cohorte de GESIDA de pacientes coinfectados. Esta cohorte está formada por pacientes que realizaron el tratamiento del VHC a partir de enero de 2000. Está integrada por 19 centros españoles, en los que se incluye el hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Esta cohorte ha demostrado que la erradicación del VHC modifica la historia natural de la hepatitis C en los pacientes VIH positivos. Ello conlleva una marcada reducción de las descompensaciones hepáticas, de la presencia de hepatocarcinoma y de la necesidad de trasplante hepático, así como de la muerte por hepatopatía (Berenguer, 2009).

Tras cuatro años de seguimiento de los 1400 pacientes de la cohorte, también se ha podido observar que la erradicación del VHC se asocia también con una menor progresión de la infección por VIH y con una menor mortalidad de causa no hepática. Se ha objetivado que la erradicación del VHC puede mejorar la recuperación de linfocitos T CD4. Incluso el seguimiento de la cohorte aporta datos en los que se evidencia una reducción de la morbilidad y mortalidad no relacionada ni con la hepatopatía ni con el VIH, como pueden ser las enfermedades cardiovasculares y las neoplasias no relacionadas con el sida; (Berenguer, 2010).

B.5. Factores predictivos de respuesta

El tratamiento de la infección por VHC no cumple, en general, ninguno de los criterios de comodidad y eficacia que buscamos al diseñar una estrategia terapéutica. Como se ha expuesto previamente, la eficacia global del tratamiento –RVS– es de un 60% en pacientes mono infectados y no llega al 50% en pacientes coinfectados. El tratamiento es largo, molesto, caro, con múltiples efectos secundarios, con una importante tasa de abandonos, y poco eficaz.

Hasta el momento actual no tenemos otra opción de tratamiento. Con los nuevos tratamientos recientemente aprobados los porcentajes de eficacia aumentarán, pero

Tabla B.4. Factores predictivos de una mejor respuesta al tratamiento anti-VHC

Virus	Paciente	Tratamiento
<ul style="list-style-type: none"> - Genotipo VHC 2 ó 3 - Carga viral basal baja - Variabilidad genética basal baja - Cinética viral inicial (alcanzar RVR) - Menor duración de la infección VHC 	<ul style="list-style-type: none"> - Edad joven - Sexo femenino - Raza no negra - Peso corporal bajo - Alelos HLA - Poliformismos en genes de citoquinas - Niveles de citoquinas - Expresión de ISGs - LDL elevada - Ausencia de resistencia a la insulina - ALT elevada - GGT baja - Ausencia de fibrosis hepática - Ausencia de esteatosis hepática - Cifra de CD4 elevada - No abuso de drogas - No enfermedad psiquiátrica 	<ul style="list-style-type: none"> - Dosis óptimas de pegIFN y RBV - Duración óptima - Buena adherencia - Interacciones con ARVs

RVR: respuesta virológica rápida; ISGs: genes estimulados por interferón; LDL: lipoproteína de baja densidad; ALT: alanina aminotransferasa; GGT: gamma glutamiltransferasa (adaptado de Yeh, 2002).

también aumentaran los efectos secundarios, ya que –lejos de simplificar tratamientos– estamos aumentando el número de fármacos, pasando de terapias dobles a terapias triples (Poordad, 2011; Jacobson 2011).

Por todo ello es preciso seleccionar correctamente a los pacientes que van a iniciar el tratamiento. El primer requisito es la voluntad y disponibilidad del paciente. Es un factor difícil de medir, pero sin duda es el principal factor a tener en cuenta. El paciente debe estar motivado, debe ser colaborador y debe estar informado de las posibles alteraciones que se generarán con la administración de interferón más RBV.

Además, el especialista debe conocer una serie de factores relacionados con el huésped, con el propio virus y con las estrategias de tratamiento, que deben ser evaluados y formar parte del algoritmo de decisiones (Tabla B.4). Los factores predictivos de respuesta condicionan las posibilidades de una respuesta favorable al tratamiento. Por ello debemos conocerlos y utilizarlos a nuestro favor, fundamentalmente aquellos que se pueden modificar, en los que los médicos podemos incidir (Yeh, 2002).

B.5.1. Factores predictivos de respuesta modificables

PESO CORPORAL

El peso corporal influye en el volumen de distribución y en los niveles de concentración del fármaco. Un IMC mayor a 25 kg/m² se asocia significativamente con progresión de la fibrosis. Un peso corporal por debajo de 80 Kg se asocia significativamente con mayores tasas de RVS (Ortiz, 2002).

RESISTENCIA INSULÍNICA

La hepatitis C facilita la resistencia a la insulina y con ello una menor respuesta al interferón. En pacientes con genotipo 1 la resistencia a la insulina disminuye la tasa de RVS, y aumenta el riesgo de desarrollar esteatosis y progresión a fibrosis, tanto en pacientes coinfectados como mono infectados. Tratar la resistencia a la insulina, disminuyendo la hiperinsulinemia, podría facilitar una mejor tasa de RVS.

El índice HOMA evalúa la resistencia insulínica (Matthews, 1985). Se calcula multiplicando la insulinemia en ayunas (uU/ml) por la glucemia en ayunas (mmol/l), dividiéndolo por 22,5. Un HOMA elevado (HOMA > 4) se ha relacionado con peor tasa de RVS (20%) en pacientes infectados por el genotipo 1 tratados con IFN pegilado más RBV. Sin embargo, pacientes con un índice HOMA normal (< 2) presentaron RVS en un 60.5 % (Romero-Gómez, 2005; Romero-Gómez, 2006).

FIBROSIS HEPÁTICA

Este es un factor modificable, en el sentido que podemos avanzarnos a una mayor progresión de la fibrosis. La fibrosis hepática asociada al VHC es un marcador pronóstico de la enfermedad y es útil en la toma de decisiones terapéuticas. Debe ser evaluada en todos los pacientes coinfectados por VHC/VIH (Recomendaciones GESIDA, 2009).

Se han descrito una serie de índices o biomarcadores séricos, que son medidas indirectas de la fibrosis hepática y resultan útiles para identificar a los pacientes con fibrosis incipiente y determinar la presencia o no de cirrosis (Nunes, 2005; Macias, 2006; Cacoub, 2008).

Su utilidad para discriminar diferentes estadios de fibrosis es limitada. Los índices de APRI, Forns y FIB-4 combinan datos bioquímicos habituales en la práctica clínica y son aplicables sin dificultad para la estimación de la fibrosis (ver tabla B.5) (Al-Mohri, 2005; Wai, 2003; Forns, 2002; Sterling, 2006).

El índice APRI se calcula utilizando la fórmula: [(AST/LSN)/Plaquetas (109/L)] x 100 ; la fórmula del FIB-4 es: edad (años) x AST (U/L)/Plaquetas (109/L) x raíz cuadrada de ALT (U/L) ; y el índice de FORNS utiliza una fórmula más compleja que incluye la edad, plaquetas, GGT y el colesterol.

Tabla B.5. Rendimiento diagnóstico de los biomarcadores séricos para el diagnóstico de fibrosis hepática y cirrosis asociada al VHC en pacientes coinfectados por VIH

Autor, Año, n	Índice	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor Predictivo Negativo (%)	Valor Predictivo Positivo (%)	AUC (IC 95%)
Fibrosis significativa						
Al-Mohri, 2005 (n = 46)	APRI < 0,5	82	46	50	79	0,71
	APRI > 1,5	52	100	45	100	
Nunes, 2005 (n = 40)	APRI 1,23					0,76 (0,60-0,91)
	FIB-4 < 1,45	70	74	90	42	
Sterling, 2006 (n = 272)	FIB-4 > 3,25	22	97	82	65	0,765
Macias, 2006, (n = 236)	APRI < 0,5					0,79 (0,75-0,84) 0,77 (0,65-0,83)
	APRI > 1,5					
	Forns < 4,2					
	Forns > 6,9					
Cacoub, 2008, (n = 272)	APRI					0,65 (0,59-0,71) 0,59 (0,53-0,65) 0,65 (0,59-0,71)
	Forns					
	Fib-4					
Cirrosis						
Nunes, 2006 (n = 40)	APRI > 1,23	85	84			0,76 (0,60-0,91)
Macias, 2006 (n = 263)	APRI < 1	78	57	93	24	0,79 (0,71-0,87)
	APRI > 2	53	89	91	46	
Cacoub, 2008, (n = 272)	APRI					0,70 (0,64-0,75) 0,79 (0,74-0,84) 0,72 (0,67-0,78)
	Forns					
	Fib-4					

UTILIDAD DEL FIBROSCAN

La elastografía hepática (FibroScan®) evalúa el grado de fibrosis a partir de la medida de la elasticidad hepática. Analiza un volumen hepático 400-500 veces superior que el de la biopsia hepática. Se trata de una técnica sencilla, con elevada reproducibilidad de las lecturas, aunque existe cierto componente subjetivo dependiendo de la experiencia de la persona que realiza la técnica.

El rendimiento es alto en el diagnóstico de cirrosis hepática. Valores superiores a 11,8 kPa ó 14,6 kPa se asocian con la presencia de cirrosis en más del 80% de los pacientes. En cambio, la capacidad de la elastografía para distinguir entre pacientes con y sin fibrosis es significativamente menor. Una elasticidad inferior a 6 kPa permite descartar la presencia de fibrosis significativa (por encima de F2) en el 90% de los pacientes (de Lédighen, 2006; Vergara, 2007) (ver tabla B.6).

El método principal de diagnóstico de la fibrosis hepática es la realización de una biopsia. Se reserva para aquellos pacientes en los que los métodos no cruentos no nos permitan definir la gravedad de la enfermedad y en los que, en estos casos, la decisión terapéutica puede depender de la información proporcionada por la biopsia. Cuando existe la posibilidad de una enfermedad concomitante la biopsia hepática es de obligatoria realización.

FACTORES RELACIONADOS CON LA CINÉTICA DE LA REPLICACIÓN VIRAL

La cinética de replicación del virus habitualmente se mantiene estable durante la etapa en que la infección crónica. Se mantiene cierto equilibrio entre la producción viral proveniente de los hepatocitos infectados y la destrucción periférica del virus fruto de la acción del sistema inmune. De esta manera las células que se infectan por primera vez guardan equilibrio con el proceso de destrucción y muerte de las células infectadas. La partícula viral libre tiene una vida media estimada de 3 horas, con una tasa de producción-aclaramiento diaria de 10^{12} partículas virales por día.

La administración del tratamiento con PEG-INF y RBV provoca un acusado descenso de la replicación viral. En una primera fase, en las primeras 24 horas, se objetiva una rápida disminución de la carga viral VHC, debida a una acción directa del IFN. En una segunda fase se aprecia un descenso más paulatino de la carga viral, debido a una respuesta inmune específica, en la que el IFN inhibe la producción viral, y provoca al aclaramiento viral en una gran proporción de pacientes.

RESPUESTA VIRAL RÁPIDA

La RVR se define como ARN-VHC indetectable a la semana 4 de tratamiento. Se considera como uno de los factores predictivos de RVS independientes más importantes (Fried, 2008; Davis, 2003). La importancia de la RVR radica en su alto valor predictivo positivo de RVS que oscila entre el 82 y el 94% (Zeuzem 1999; Buti, 2004; Nuñez, 2007).

Tabla B.6. Rendimiento diagnóstico de la elastografía (Fibroscan®) para el diagnóstico de la fibrosis hepática asociada al VHC en pacientes coinfectados por VIH

Autor, Año, n	Punto de corte (KPA)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor Predictivo Negativo (%)	Valor Predictivo Positivo (%)	AUC (IC 95%)
Cirrosis						
de Lédinghen, 2006 (n = 72)	> 11,8	100	92	100	81	0,97 (0,94-1)
Vergara, 2007 (n = 169)	> 14,6	91	88	94	83	0,95 (0,92-0,99)
Fibrosis significativa						
de Lédinghen, 2006 (n = 72)	> 4,5	93	18			0,72 (0,6-0,54)
Vergara, 2007 (n = 169)	> 7,2	88	66	75	88	0,87 (0,84-0,93)
Macías, 2008 (n = 197)	> 6	69	85	90	58	0,86 (0,78-0,93)

RESPUESTA VIROLÓGICA PRECOZ

La RVP se define cuando la carga viral del VHC es negativa o existe una disminución de 2 log o más de carga viral del VHC entre la basal y la semana 12 de tratamiento. La no obtención de RVP, tiene un alto valor predictivo negativo sobre la RVS (98-100%). Los pacientes que no consigan RVP deben abandonar el tratamiento al ser casi nulas posibilidades de curación.

Los pacientes infectados con el genotipo 1 del VHC con RVP parcial (descenso de la carga viral > 2 log, pero con ARN detectable en la semana 12) consiguen RVS en un 17-29 % tras 48 semanas de tratamiento. Para aumentar estos porcentajes se recomienda realizar 72 semanas de tratamiento a los pacientes que consiguen disminuir el ARN del VHC > 2 log a la semana 12 y que consiguen negativizar el ARN del VHC en la semana 24 (Berg, 2006; Sánchez-Tapias 2006).

Los pacientes que cumplen criterios de RVP, pero que mantienen ARN viral detectable en la semana 24, no alcanzan RVS en el 98-100 % de los casos, por lo que se recomienda la interrupción del tratamiento en esta situación.

Parece lógico buscar estrategias de tratamiento dirigidas a reducir la carga viral en fases iniciales de tratamiento. Un estudio realizado en pacientes coinfectados, y que todavía está en marcha, compara dos estrategias terapéuticas: la habitual vs la combinación de interferón pegilado más RVB a dosis de 2000 mg al día las cuatro primeras semanas (Labarga, 2011). Los primeros datos de eficacia no justifican este incremento inicial de las dosis de RBV.

FACTORES RELACIONADOS CON EL VIH

Parece oportuno sugerir que el tratamiento de la hepatitis C se inicie cuando los niveles de linfocitos CD4 estén por encima de 200 células/mm³, para evitar posibles eventos definitorios de sida. De todas maneras no se ha demostrado que se produzca una menor tasa de curación cuando el recuento de CD4 está por debajo de esta cifra (Opravil, 2008). La limitación del tratamiento viene condicionada fundamentalmente por el estado general del paciente, que suele asociarse al grado de inmunosupresión.

No existe relación directa entre la carga viral del VIH y la probabilidad de respuesta al tratamiento de la hepatitis C. De todas maneras, parece lógico controlar primero la carga viral en aquellos pacientes que presentan niveles elevados de viremia VIH.

Hay algunos fármacos ARV que –por diversos motivos- pueden comprometer la respuesta al tratamiento del VHC. Estos fármacos son la didanosina, la estavudina y la zidovudina. En la práctica habitual esto no es un problema pues estos fármacos prácticamente ya no se utilizan (Fleischer, 2004; Fuster, 2005; Berenguer, 2011).

ADHERENCIA AL TRATAMIENTO

El factor predictivo modificable más eficaz es que el paciente cumpla el tratamiento. Los pacientes con genotipo 1 del VHC que durante el tratamiento reciben más del 80% de la dosis total prescrita de interferón y de RBV, durante como mínimo un 80% del tiempo indicado, presentan una tasa de respuesta significativamente mayor que la observada en los pacientes que realizan una dosis total inferior o durante menor tiempo (McHutchison, 2002). Es la denominada “regla del 80”.

No obstante las tasas de discontinuación en los pacientes tratados con PEG-IFN más RBV pueden llegar hasta el 40%, fundamentalmente debido a la aparición de efectos adversos del tratamiento. Algunos comportamientos, tales como alcoholismo activo o uso de drogas intravenosas, se asocian con menores tasas de RVS (Schiff, 1999; Degos, 1999).

Es fundamental motivar bien al paciente. Para ello hay que informar, dedicar tiempo, estar disponibles... Hay que conseguir e implementar una actitud constructiva y proactiva cara al tratamiento, tanto por parte del paciente, del médico, y del entorno del paciente.

EDAD

La edad por debajo de 40-45 años se correlaciona significativamente con una mayor tasa de RVS. En ocasiones es difícil decidir el momento más apropiado en el que hay que tratar a un paciente. Hay que tener en cuenta varios factores y decidir en función de múltiples variables. La edad es uno de estos factores a tener en cuenta.

B.5.2. Factores no modificables

RAZA Y SEXO

El sexo masculino se ha asociado con una peor evolución de la infección por VHC y con peores porcentajes de RVS. La raza (Africano o Hispano frente Caucásico o Asiático) se ha asociado con peores tasas de RVS.

CARGA VIRAL RNA-VHC BASAL

El seguimiento de la evolución de la carga viral VHC antes, durante y tras finalizar el tratamiento es el parámetro más importante que evalúa la respuesta al mismo. Una carga viral basal baja, por debajo de 800.000 UI/mL, es un factor predictivo de RVS (Pawlotsky, 2003).

GENOTIPO VHC

El genotipo del VHC es el factor predictivo basal con mayor valor pronóstico en la predicción de la respuesta al tratamiento del VHC. El genotipo 1 es un factor de mal

pronóstico y se relaciona con una peor tasa de RVS (45%) para pacientes mono infectados tratados con terapia combinada durante 48 semanas. Los pacientes con genotipo 2 y 3 alcanzan tasas de RVS del 80 %. Poseer uno de estos genotipos es prácticamente sinónimo de curación, sino debe suspenderse el tratamiento por toxicidad (Martinot-Peignoux, 1995; Shiffman, 2007; Kobayashi, 1996).

CUASIESPECIES DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C

El VHC posee una gran capacidad mutagénica y una compleja composición en cuanto a cuasiespecies. Ello le capacita para evitar la inmunidad del huésped. La variabilidad genética del virus persiste durante la cronicación de la enfermedad hepática.

Esta presencia de variables o cuasiespecies es un importante factor predictivo de RVS. Cuanto mayor sea la carga viral basal y mayor sea el número de cuasiespecies, la respuesta al tratamiento disminuye.

La estructura de las cuasiespecies del VHC sufre cambios significativos durante el tratamiento con IFN: el IFN ejerce una presión selectiva en la evolución del virus y esto puede condicionar la presencia de nuevas mutaciones, facilitando la capacidad de replicación viral. Los cambios en el genoma del virus se producen con más intensidad al comienzo del tratamiento debido a que la resistencia al IFN se produce de manera precoz.

En pacientes respondedores se objetiva, tras dos semanas de comenzar el tratamiento, una disminución significativa de la complejidad y la diversidad de las cuasiespecies. Ello transcurre junto a una significativa reducción de la carga viral, sugiriendo que los cambios precoces de la viremia y de las cuasiespecies pueden predecir la RVS (Hayashi, 1997; Tang, 2002; Salmeron, 2006; Salmerón, 2008; Ghany, 2009).

Sin embargo, la presencia de cuasiespecies es un aspecto que no se analiza de manera rutinaria en la práctica clínica habitual.

B.6. Factores genéticos

La presente tesis doctoral evalúa la eficacia de los marcadores genéticos como factores predictivos de la RVS. Es por ello que esta introducción abundará de manera destacada en aspectos relacionados con la genética. La tesis está realizada en un entorno eminentemente clínico. Es por ello que parece conveniente recordar conceptos básicos en genética, para comprender con exactitud los términos en los que nos moveremos.

B.6.1. Conceptos básico de genética

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una macromolécula que forma parte de todas las células y que contiene la información genética usada para el desarrollo y el funcionamiento de los organismos vivos. El ADN es el portador del código genético y el responsable de la transmisión hereditaria.

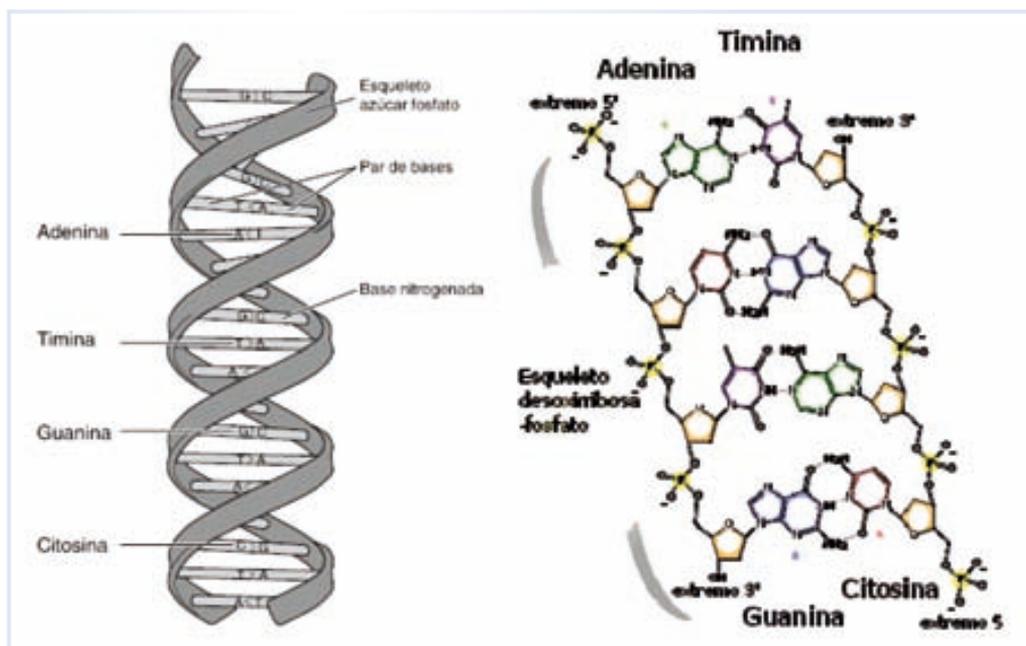


Figura B.12. Estructura y composición del ADN.

El ADN forma una doble hélice compuesta por dos cadenas de nucleótidos entrelazadas una sobre otra. Las dos hebras están unidas entre sí por puentes de hidrógeno. Cada cadena se compone de una sucesión de eslabones denominados nucleótidos y que están constituidos por tres elementos: una molécula de desoxirribosa, una molécula de ácido fosfórico y una base purínica o pirimidínica.

La pauta de lectura del ADN es 5' - 3'. El encadenamiento es repetitivo y los nucleótidos se distinguen unos de otros solamente por su base purínica (adenina, A; y guanina, G) o su base pirimidínica (citosina, C; y timina, T). (Figura B.12).

La timina es solo específica del ADN y no se encuentra en el ARN, en donde es reemplazada por la uridina, U. Estas bases tienen afinidades unas por otras: T-A, C-G, y U-A tan solo en el caso del ARN.

Por lo tanto el código genético es como un texto de 4 letras (A, C, T, G) organizadas en tripletes (codón). Con estos elementos, se pueden formar 64 codones (4^3), que se expresan formando los 20 aminoácidos que componen las proteínas. Hay que destacar que a un aminoácido le pueden corresponder varios tripletes y existen tripletes que no tienen ninguna traducción en aminoácidos.

La estructura de cada una de las dos cadenas es complementaria: la secuencia de las bases de una de las cadenas determina la secuencia de la otra. Esta complementariedad es la base de la genética molecular, ya que permite el proceso permanente de reparación del ADN.

El ADN debe copiarse en ARN. Las moléculas de ARN se copian exactamente del ADN mediante un proceso denominado transcripción. Tras ser procesadas en el núcleo celular, las moléculas de ARN salen al citoplasma.

La ARN polimerasa utiliza como molde la cadena complementaria del ADN para transcribir una molécula de ARNm (ARN mensajero), que se traduce como una secuencia de aminoácidos formando una proteína. La información contenida en el ARN codifica la secuencia de los aminoácidos de las proteínas.

El gen es un fragmento de la secuencia de ADN que sirve para elaborar una proteína. El gen es considerado como la unidad de almacenamiento de información genética y unidad de herencia al transmitir esa información a la descendencia: las secuencias de ADN que constituyen una unidad a nivel de la herencia se denominan genes. Cada gen contiene una parte que se transcribe a ARN y se traduce a proteína y otra que se encarga de definir cuándo y dónde deben expresarse. El conjunto de genes de una especie, y por tanto de los cromosomas que los componen, se denomina genoma.

Los organismos eucariotas almacenan la mayor parte de su ADN dentro del núcleo celular y una mínima parte a nivel mitocondrial. En un mismo individuo, todas las células sin excepción contienen el mismo ADN. El ADN nuclear se encuentra en unas estructuras visibles al microscopio, los cromosomas, y que contienen también toda una serie de proteínas necesarias para la transcripción.

Los cromosomas tienen forma de cruz. Los brazos se llaman telómeros (2 brazos largos "q" y 2 brazos cortos "p") y se dividen en sectores numerados.

El cariotipo está formado por 22 pares de cromosomas autosómicos y por un par de cromosomas sexuales XX en la mujer y XY en el hombre. Se numeran, por convención, por su tamaño, siendo el cromosoma 1 el de mayor tamaño.

Una parte del ADN no tiene propiedades de transmisión de la herencia –no génico-, y se encuentra disperso por todo el genoma. El ADN del genoma de un organismo puede dividirse conceptualmente en dos: el que codifica las proteínas (los genes) y el que no codifica. Solo un bajo porcentaje (10-15%) del genoma (20.000 a 25.000 genes) humano codifica proteínas, mientras que más del 90% consiste en ADN no codificante. Además una parte del ADN codifica para ARN que posteriormente no será traducido en forma de proteínas, como puede ser el ARN ribosomal y el ARN de transferencia.

Los genes se disponen, pues, a lo largo de ambas cromátidas de los cromosomas ocupando en el cromosoma una posición determinada llamada *locus*. Los genes se encuentran constituidos por regiones codificantes (exones) interrumpidas por regiones no codificantes (intrones) que son eliminados en el procesamiento del ARN. El intrón

es una región del ADN que debe ser eliminada en el proceso de elaboración del ARN, a diferencia de los exones que son regiones que codifican para una determinada proteína. No obstante, los intrones son esenciales en la función de corte y empalme (*splicing*) a nivel de la formación del ARN mensajero. El genoma humano consta de 25.000 genes, con 3.000 millones de pares de bases. Un kilobase (Kb) está compuesto de 1.000 bases.

Los cromosomas se estructuran en parejas: uno de ellos procede del padre y el otro de la madre. Por ello cada gen tiene dos alelos. Cada par de alelos se ubica en un mismo *locus*. Variaciones en la secuencia alélica es lo que se denomina variantes alélicas o polimorfismos.

B.6.2. Polimorfismos

El genoma de dos humanos se diferencia en una de cada mil bases, lo que significa entre 3-4 millones de variaciones entre dos individuos, un 0,1% del genoma humano.

Estas variaciones en la secuencia del ADN se definen como mutaciones o polimorfismos y suelen afectar uno (pueden consistir en la sustitución de una única base nitrogenada) o muy pocos nucleótidos. Se entiende como mutación el cambio en la secuencia de ADN que causa una alteración grave de la función del gen. Un polimorfismo es un cambio en la secuencia del ADN que se encuentra en más de un 1% de la población, y que generalmente no provoca alteraciones importantes en la función biológica (Fig. B.13). En inglés se definen como SNP: *single nucleotide polymorphism*, polimorfismo de nucleótido simple.

La presencia de SNPs puede afectar a la secuencia codificante o reguladora y de esta manera puede producir variaciones importantes en la estructura de las proteínas, o en el mecanismo de regulación de la expresión de diversos genes.

La presencia de los polimorfismos en los seres vivos viene condicionada en parte por causas genéticas y en parte por causas medioambientales. Esas modificaciones pueden ser neutras o beneficiosas, confiriéndole una ventaja selectiva a su portador: esto es lo que pretendemos analizar en esta tesis. La presencia de polimorfismos también puede ser la causa de enfermedades genéticas.

Los SNPs constituyen hasta el 90% de todas las variaciones en el genoma humano, apareciendo un SNP cada 1.300 bases de promedio. Dos tercios de los SNPs corresponden a la sustitución de una citosina (C) por una timina (T).

Los SNPs localizados dentro de una secuencia codificante o exón, pueden modificar o no la cadena de aminoácidos que codifican: se definen los SNP no-sinónimos los primeros y SNP sinónimo (o mutación silenciosa) a los segundos. Los SNPs que se encuentren en regiones no codificantes, intrones, pueden tener repercusión en el proceso de traducción, fundamentalmente en un paso como el *splicing*, en el proceso de unión de factores de transcripción y también modificando la secuencia de ARN no codificante.

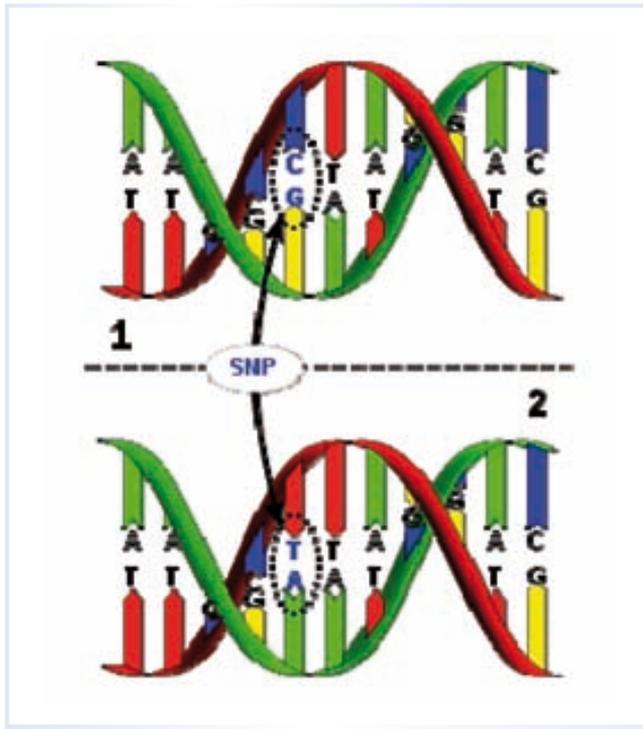


Figura B.13. Presencia de un SNP: La cadena de ADN en 1 difiere de la del ADN en 2 en una pareja de bases.

B.6.3. Haplotipo. Desequilibrio de ligamiento

Un haplotipo es una combinación de alelos ligados a múltiples *locus*—habitualmente cercanos— que se transmiten juntos. Un haplotipo está constituido por varios alelos cercanos. Esta definición también incluye al conjunto de polimorfismos de nucleótido simple —SNPs— que se encuentran estadísticamente asociados. Habitualmente los SNPs se heredan en grupos, que se encuentran estrechamente relacionados en un mismo lugar, en un gen determinado. A este grupo de SNPs que se heredan en bloque, es a lo que hemos denominado haplotipos. Hasta un 65-85 % del genoma humano está contenido en haplotipos.

Este fenómeno nos introduce un nuevo concepto: desequilibrio de unión, o desequilibrio de ligamiento (en inglés “*linkage disequilibrium*”, LD). Los pares de alelos que forman los SNP, se asocian en proximidad cromosómica de manera más frecuente entre ellos que lo que lo haría el azar. Esta asociación consiste en que, al comparar dos SNPs determinados, siempre que se produce una variante alélica que define un SNP concreto, en un SNP colindante o cercano, también se produce de manera constante una variación determinada. El LD entre variantes genéticas o SNPs, es debido a

que no existe una segregación independiente de estas variantes en diversos cromosomas. Ello ocasiona que dos o más variantes localizadas en posiciones físicas independientes y muy cercanas, se comporten como si fueran la misma, actuando de forma idéntica.

La identificación de los haplotipos, y de los SNP's en LD, facilita el estudio genético de un rasgo o característica concreta poblacional, ya que permite reducir y simplificar el número potencial de diferentes SNPs a analizar. Con solo detectar un SNP podemos identificar los rasgos heredables que comprenden múltiples variantes de SNP ya que ciertos polimorfismos son transmitidos juntos, inversamente a lo que haría el azar, y se encuentran en desequilibrio de ligamiento (LD).

Las fuentes consultadas para realizar este resumen de genética han sido: Bates, 2005; Gibson, 2004; Emery's, 2001; Griffiths, 2008; Horwitz, 2000; Klugs, 2006; Novo, 2008; Olivar, 2004; Read, 2008; Solari, 2004; Strachant, 2006.

B.7. Farmacogenética

El motivo principal de la tesis es definir si determinados polimorfismos, presentes en unos genes concretos, pueden tener influencia en el tratamiento de la hepatitis C en los pacientes coinfectados VIH/VHC. Se trata de verificar si determinados SNPs pueden ser identificados como factores predictivos tanto de respuesta como de toxicidad. En definitiva, pretendemos definir dos marcadores farmacogenéticos asociados a la RVS, en el tratamiento de la hepatitis C, en los pacientes coinfectados VIH/VHC.

La Farmacogenética es definida por la EMEA como "el estudio de las variaciones en la molécula de ADN que tiene relación con la respuesta a los fármacos" (Comitte, 2007).

En la actualidad se realizan estudios de asociación del genoma completo, GWAS (*genome-wide association studies*), que permiten identificar genes implicados en una determinada enfermedad. En estos estudios se compara el ADN completo de personas con la enfermedad frente al ADN de personas que no la padecen.

B.7.1. Estudios GWAS

Los SNPs forman hasta el 90% de todas las variaciones alélicas a nivel del genoma humano. Se han descrito más de 3-4 millones de SNPs, aunque se estima que el número global pueda ascender hasta más de 10 millones de polimorfismos con frecuencias alélicas superiores al 1% de la población (Kruglyak, 2008).

Existen dos tipos de estudios para el análisis de los genes y de las variantes genéticas:

1. Estudios de ligamiento o de correlación genética: se basan en el estudio de la presencia de marcadores genéticos y fenotípicos dentro de familias con individuos que presentan alguna alteración determinada. Esta práctica es la habitual en la

identificación de genes y variantes causantes de enfermedades monogénicas como pueden ser la fibrosis quística, la hemofilia y la mayoría de los errores innatos del metabolismo. En estas enfermedades, determinados factores genéticos condicionan la presencia de alteraciones biológicas severas que causan una enfermedad concreta.

2. Estudios de asociación genética o GWAS: analizan la presencia de diferencias en la frecuencia de variantes genéticas entre grupos de estudio, generalmente un grupo de casos (individuos enfermos) y uno de controles (individuos sanos), o en cohortes determinadas. El conocimiento de las variantes en estos grupos lleva a la identificación de factores genéticos asociados con riesgo o protección ante una situación determinada, en el contexto de una enfermedad.

Los GWAS (estudios de asociación) han sido la estrategia de elección en la búsqueda de los genes y de variantes relacionadas con el desarrollo de enfermedades complejas o multifactoriales que afectan a un porcentaje amplio de la población, como son la diabetes, el cáncer, enfermedades cardiovasculares, digestivas, hepáticas y respiratorias (Xu, 2009).

Los estudios GWAS comparan el genoma de un grupo de individuos con una característica común, con el genoma de la población general. Las comparaciones se realizan habitualmente fijándose únicamente en los SNPs, ya que estos constituyen la mayor fuente de variación genética en una población. Los SNPs son frecuentes y uniformes, y se ubican a lo largo de todo el genoma de un individuo. Suelen situarse en regiones no codificantes.

Los investigadores pueden escanear todos los SNPs deseados en el ADN extraído de una sencilla muestra biológica, dibujando el mapa genético de cada individuo. La comparación de un elevado número de individuos del grupo de estudio frente al grupo control, permite establecer si existen SNPs que se asocien con la característica de estudio.

Las bases genéticas que condicionan enfermedades complejas pueden ser estudiadas con los estudios de asociación genética o GWAS, ya que presentan un escenario más problemático que las enfermedades monogénicas (Pearson, 2008).

Es realmente complicada la caracterización de los factores genéticos relacionados con enfermedades complejas. La mayoría de enfermedades con prevalencia elevada en nuestra sociedad incluyen la participación simultánea de varios genes y variantes genéticas. Es habitual la existencia de patologías similares que presentan una expresión clínica distinta, y en la que la presencia de una sola variante genética concreta no es suficiente para que se exprese esa enfermedad (penetrancia incompleta). También hemos de contar con la interacción entre los diversos genotipos y el medio ambiente.

Es por ello que se han impulsado nuevos abordajes y herramientas para evaluar con más rigor las implicaciones genéticas en la presentación de diversas patologías. El

Proyecto del Genoma Humano se enmarca dentro de este nuevo ámbito para el estudio de la influencia de la genética en las enfermedades (Frazer, 2007).

Con la conclusión del proyecto Genoma Humano en 2003, se identificó la secuencia completa del ADN humano. Todo ello ha facilitado el estudio de numerosos SNP en grandes poblaciones.

Los GWAS han permitido el hallazgo de un amplio número de genes asociados al desarrollo de diversas enfermedades, desvelando su naturaleza poligénica así como nuevos aspectos de su patogénesis. Se han descrito genes y asociaciones con regiones genómicas desconocidas hasta este momento y también se han podido identificar la presencia de haplotipos de alto riesgo. Los GWAS interrogan desde cientos de miles hasta millones de SNPs a lo largo de todo el genoma.

El diseño más habitual de los estudios GWAS es el de casos y controles, donde es fundamental seleccionar el número adecuado de participantes en función de la prevalencia de la enfermedad a estudiar.

Al analizar los resultados de un estudio GWAS, habitualmente es muy difícil conocer cuál es el SNP o la variación genética realmente responsable de un efecto biológico concreto, ya que las asociaciones genéticas identificadas habitualmente no son las únicas causantes de un fenómeno determinado. Ello es debido en parte al fenómeno –descrito previamente- de LD. Sin embargo, este fenómeno minimiza el número de variantes alélicas que debemos evaluar en el estudio del genoma, reduciendo de esta manera tiempo y coste.

Los estudios de cohorte, más costosos y difíciles de realizar, permiten evaluar la capacidad predictora de los marcadores genéticos. Los participantes son seguidos a lo largo de períodos de tiempo, mediante ensayos de tipo longitudinal. Esto permite medir incidencias, hacer análisis de supervivencia, y valorar la respuesta al tratamiento.

A día de hoy un gran número de GWAS han sido publicados. Se han identificado múltiples asociaciones entre miles de SNPs y distintas enfermedades (Innocenti, 2011; Johansen, 2011; Aouizerat, 2011; Gershon, 2011; Barnes, 2010).

El fundamento de esta tesis se basa en la descripción de determinadas variantes alélicas a nivel del gen de la *IL28B*, situado en el cromosoma número 19, y del gen de la *ITPA*, situado en el cromosoma 20. La potencial utilidad de estos polimorfismos ha sido descrita mediante estudios GWAS, que seguidamente analizaremos.

B.8. Gen de la interleucina 28B (*IL28B*) y RVS

En septiembre del año 2009 se publicaron tres artículos (Ge, 2009; Tanaka, 2009; Thomas, 2009) en los que se describe la asociación entre varios SNPs y la RVS al tratamiento de la infección por el VHC, con PEG-INF y RBV. Estos SNPs se localizan en el cromosoma 19 (19q13), concretamente en el gen de la interleucina *IL28B*.

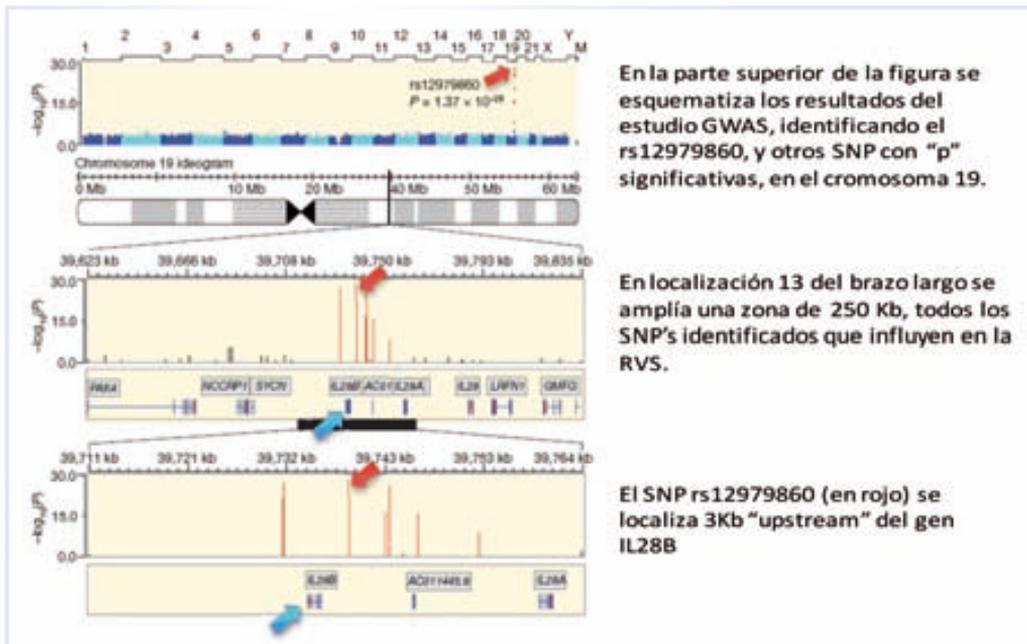


Figura B.14. Localización del SNP rs12979860-IL2B (adaptado de Ge, 2009).

Al estudiar el genoma -mediante un estudio GWAS- de un grupo de personas mono infectadas por VHC con diferentes tipos de respuestas al tratamiento, se descubrió que en la región del gen *IL28B*, y en otras zonas próximas, existían algunas diferencias genéticas entre los pacientes que habían logrado responder al tratamiento y los que no. También encontraron diferencias genéticas entre los infectados VHC que eliminaron de forma espontánea el virus y aquellos que desarrollaron infección crónica.

B.8.1. Localización y función del gen *IL28B*

El gen de la *IL28B* codifica la citocina interferón lambda-3 ($\lambda 3$). Esta citocina forma parte de los mecanismos intracelulares de respuesta inmunitaria frente a las infecciones virales. Los interferones son potentes citocinas antivirales endógenas que inhiben o controlan la replicación del virus de la VHC a través de la vía de la JAK/STAT.

El interferón $\lambda 3$ forma parte del complejo denominado interferón III (IFN III). El IFN-III incluye tres proteínas (IFN- $\lambda 1$, IFN- $\lambda 2$ e IFN- $\lambda 3$) codificadas por un grupo de genes localizados en el cromosoma humano 19q13 (*IL29*, *IL28A* e *IL28B*) (Fig B.14). La presencia de infecciones víricas favorece y estimula una mayor producción de IFN III, así como del IFN-I (IFN- α e IFN- β).

B.8.2. Sistema JAK-STAT

El sistema JAK-STAT se considera como el principal mecanismo de señalización de los receptores de interferón. La JAK-STAT es una vía de señales intracelulares, que utiliza como mecanismo de transmisión la fosforilización secuencial en residuos de tirosina de dos grupos de proteínas que denominamos JAK y STAT.

Las JAK surgen del acrónimo de *Just Another Kinase*. Se asocian con los receptores de las citocinas, y favorecen la transmisión de la señal de activación de estas citoquinas a las STAT.

Las STAT son proteínas intracelulares en estado latente, que se activan al ser fosforilizadas por las JAK. Posteriormente se incorporan al núcleo, donde se unen al ADN, activando la transcripción génica. De esta manera las STAT son proteínas que facilitan la transducción de señal y activan la transcripción. El particular modo de activación de la vía JAK-STAT (receptor-JAK-STAT-ADN) la convierte en la vía más importante de transmisión de señal de los receptores de las citocinas, a través de las cuales actúa el IFN (Wilks, 1989; Firmbach-Kraft, 1990; Shuai, 1993; Darnell, 1994). Determinadas variantes alélicas a nivel del *IL28B* podrían facilitar la acción trasmisora JAK-STAT, estimulando la actividad del IFN.

B.8.3. Mecanismo de acción *IL28B*

La asociación entre la variación de una base a nivel del SNP rs12979860 del gen *IL28B* y la respuesta inmunológica del huésped frente al VHC no es bien conocida. El alelo protector podría influir en diversos aspectos relacionados con la expresión de *IL28B*, el *splicing* (corte y empalme) del ARN mensajero, la vida media del ARN mensajero, la expresión de IFN- λ 3 y también en la afinidad o especificidad de éste último.

La asociación del gen *IL28B* con el aclaramiento vírico se relaciona con la función antiviral del IFN- λ 3 (*IL28B*) y su interacción con el IFN-I. Se produce de esta manera una sobreexpresión del gen *IL28B* en los hepatocitos y en las células mononucleares sanguíneas de pacientes infectados con VHC (Tillmann, 2010).

EFFECTO SOBRE LOS ISG

Los *interferon stimulated genes* o ISG juegan un papel fundamental en el proceso de respuesta al tratamiento del VHC. La sobre estimulación de este sistema de proteínas o genes ISG se ha relacionado con la falta de respuesta al tratamiento antiviral con IFN y RBV. Por el contrario la ausencia de activación de este sistema endógeno, se asocia a una buena respuesta al tratamiento antiviral (Urban, 2010).

Se ha demostrado que la expresión de los ISG está aumentada de forma significativa en el tejido hepático de individuos que son portadores de SNPs no protectores a nivel del gen de la *IL28B* (Honda, 2010).

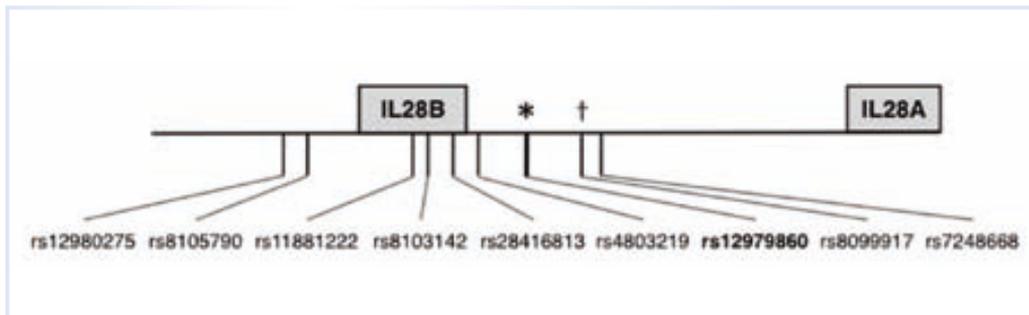


Figura B.15. Variantes identificadas en diversos estudios, asociadas a la RVS del tratamiento VHC. El rs12979860 (*) fue el primer SNP descrito por Ge (Ge, 2010). Tanaka (Tanaka, 2010) definió el rs8099917(?).

Hay más interrogantes que respuestas acerca del modo de acción del gen *IL28B*. Su acción estimuladora a nivel de la vía JAK-STAT y a nivel de los ISG, explican solo en parte el mecanismo de acción *IL28B*.

B.8.4. SNPs del gen *IL28B*. Análisis de los estudios más representativos

La presencia de diversos SNPs configura determinados haplotipos beneficiosos que facilitan la erradicación del VHC. Un haplotipo respondedor implica un aumento de la expresión del gen. Los SNPs con una asociación más fuerte son el rs12979860 (3 kb “upstream” del gen *IL28B*) y el rs8099917, que están separados tan solo por 4.378 bases y se presentan en fuerte LD (Figura B.15). (Thio, 2010; Ahlenstiel, 2010).

B.8.4.1. *RS12979860*

El estudio de GWAS realizado por Ge, et al (Ge, 2009) mostraba una asociación significativa entre el SNP rs12979860 y la RVS. La presencia del alelo C, que es mayoritario, se asocia con el doble de posibilidades de presentar una RVS, al compararlo con aquellos pacientes portadores del alelo T, que es el alelo minoritario.

El estudio (Ge, 2009) incluyó 1.137 pacientes con infección por VHC que fueron tratados con PEG-IFN y RBV durante 48 semanas, dentro del estudio IDEAL (McHutchison, 2009). El genotipo CC de este SNP se asocia de manera muy significativa con un alto porcentaje de RVS ($p = 1,37 \times 10^{-28}$). El beneficio de portar el alelo C, sobre los altos porcentajes de RVS se demostró en todos los grupos étnicos analizados: europeos, americanos, afro-americanos e hispanos. La distribución de los diversos genotipos (CC, CT, y TT) fue diferente en cada grupo, lo que explica en parte los distintos porcentajes de RVS obtenidos.

La magnitud de la asociación entre el genotipo CC y la RVS fue mayor que la de otros factores predictivos relacionados con la RVS, como puede ser la carga viral basal y el grado basal de fibrosis (rango de *odds ratio* [OR] : 5.6–7.3 para el genotipo CC, 2.4–5.1 para la carga viral basal, y entre 1.1–4.1 para el grado de fibrosis)(Ge, 2009).

La presencia del SNP rs12979860 también se ha relacionado con el aclaramiento espontáneo de la infección aguda por VHC. Thomas, et al. (Thomas, 2009) fueron los primeros en describir la influencia del SNP rs12979860 en la resolución espontánea del VHC en una cohorte de 1.008 pacientes infectados por el VHC. La frecuencia del alelo C se asoció de forma significativa con un alto porcentaje de aclaramiento viral del VHC. La presencia del genotipo CC del SNP rs12979860 se correlacionó con una probabilidad tres veces mayor de erradicación del VHC tras la infección aguda, al compararse con los pacientes con genotipo CT y TT.

Otro grupo (Tillman, 2010), evaluó la asociación del SNP rs12979860 con la evolución de la infección aguda por VHC en una población muy homogénea que incluyó 136 mujeres con infección aguda por VHC genotipo 1b, adquirida al recibir tratamiento con inmunoglobulinas contaminadas. Un 50% de las pacientes presentaron aclaramiento espontáneo del virus. Ello se dio en un 64% de las pacientes con genotipo rs12979860 CC. Las pacientes portadoras del alelo minoritario T y que además no presentaban ictericia durante la fase aguda, presentaron un aclaramiento espontáneo menor del 15%.

El estudio de Montes-Cano, et al (Montes-Cano, 2010) analiza una cohorte de 731 pacientes VHC. Los pacientes con genotipo rs12979860 CC presentan un porcentaje más elevado tanto en pacientes con resolución espontánea de la infección (72%), así como la posibilidad de RVS tras el tratamiento (60%). Alrededor de un 44% de la muestra de los pacientes control, sin infección viral, presentan el genotipo rs12979860 CC.

El rs12979860 del gen *IL28B* es un buen factor predictivo de respuesta al tratamiento. McCarthy, et al., (McCarthy, 2010) estudiaron una cohorte de 231 individuos infectados por diferentes genotipos del VHC demostrando que el genotipo respondedor rs12979860 CC confiere una *odds ratio* casi 6 veces mayor para alcanzar una RVS en comparación con los otros genotipos CT ó TT.

B.8.4.2. *RS8099917*

Un segundo SNP analizado es el rs8099917, situado en la región entre el gen *IL28A* y el *IL28B*. También se ha asociado con un significativo grado de respuesta al tratamiento del VHC ($p = 7,06 \times 10^{-8}$, OR: 3,36; 95% CI: 2,15–5,35). Se ha demostrado que existe una fuerte asociación entre la RVS y la presencia del alelo T de este SNP ($p = 9,25 \times 10^{-9}$; OR: 1,98; 95% CI: 1,57–2,52). Al comparar la RVS entre los portadores y no portadores del SNP, los heterocigotos TT y los homocigotos del alelo T del rs8099917 muestran una ORs del 1.64 y del 2.39 respectivamente (Suppiah, 2009).

El grupo de Tanaka, et al., (Tanaka, 2009) realizó un estudio GWAS en el que se incluyeron 154 pacientes VHC genotipo 1. En 82 no hubo respuesta al tratamiento. Los otros 72 pacientes sí presentaron RVS. En este estudio se describen hasta 7 SNPs, siendo el rs8099917 el que mostró una mayor correlación con la RVS.

Montes-Cano, et al., encuentran una fuerte asociación entre la respuesta viral al tratamiento y la presencia de 7 polimorfismos:– rs8105790, rs11881222, rs8103142, rs28416813, rs4803219, rs8099917 y rs7248668 – localizados en la región flanqueante “downstream”, del gen *IL28B*. Tras un estudio de regresión logística se definió al SNP rs8099917 como el de mayor factor predictivo (Montes-Cano, 2010).

En la tabla B.7 se resumen los principales estudios que asocian el genotipo *IL28B* y la RVS al tratamiento con PEG-IFN- α y RBV.

B.8.5. Infección aguda

El estudio de Rauch, et al. (Rauch, 2010), analiza el rs8099917 en la infección aguda por el VHC. Se incluyen 1.362 pacientes con infección aguda por VHC. De estos, 347 presentaron aclaramiento espontáneo y 1.015 progresaron a infección crónica. 914 pacientes fueron mono infectados por VHC y 448 coinfectados por VHC/VIH. En los pacientes con aclaramiento viral espontáneo, con o sin VIH asociado, se objetivó una mayor frecuencia el alelo T mayoritario rs8099917: 76% TT vs 22% GT vs 1% GG.

De manera simultánea, Suppiah, et al (Suppiah, 2010) publicaron resultados parecidos en un estudio inicial con 293 pacientes infectados con VHC genotipo 1. El SNP rs8099917 resultó ser un predictor independiente de respuesta al tratamiento del VHC.

B.8.6. Distribución de SNP *IL28B*

B.8.6.1. DIFERENCIAS ENTRE PACIENTES VHC vs VHC/VIH

Paradójicamente los pacientes coinfectados VIH/VHC tienen la “ventaja” de poseer porcentajes mas elevados del genotipo CC rs12979860, en el gen de la *IL28B*.

Un estudio realizado en nuestro centro (Guardiola, 2011) analizó la presencia de las variantes alélicas del rs12979860 en la población en general, y en dos grupos de pacientes. Se analizaron 427 individuos: 140 mono infectados VHC; 222 coinfectados VIH/VHC y 65 individuos sanos. La presencia de los genotipos 12979860 CC, CT y TT fue del 28, 8%, 54,3% y del 17,1% en pacientes VHC, del 45,5%, 44,1% y 10,4% en pacientes coinfectados VIH/VHC, y del 36,9%, 53,8%, y 9,2% en individuos sanos ($p = 0,01$).

Tras la infección aguda los pacientes mono infectados CC presentan un porcentaje de aclaramiento más elevado, y por lo tanto la presencia del genotipo CC del

Tabla B.7. Principales estudios donde se analiza la asociación entre variantes alélicas a nivel del rs12979860 y del rs8099917 con la RVS al tratamiento del VHC

SNP/Estudio	Raza	N	Genotipo VHC	RVS (%) Genotipo homocigoto favorable	RVS (%) Genotipo desfavorable
rs 12979860				(CC)	(TC/TT)
Ge, et al.	Caucásica Afroamericana Hispana	871 191 75	1	82 53 77	42/33 19/17 43/21
Montes -Cano, et al.	Caucásica	284	1/2/3/4	60	39 (total)
Mccarthy, et al.	Caucásica Afroamericana	178 53	1/2/3	60 12	23/21 3/20
Thompson, et al.	Caucásica Afroamericana Hispana	1.171 300 116	1	69 48 56	33/27 15/13 38/27
Mangia, et al.	Caucásica	268	2/3	82	75/58
Sarrazin, et al.	Caucásica	267	2/3	87	70/73
Rs 8099917				(TT)	(GT/GG)
Tanaka, et al.	Asiática	314	1	60	13/0
Rauch, et al.	Caucásica	465	1/2/3	68	29/3
Suppiah, et al.	Caucásica	848	1	56	36 (total)

RVS: respuesta viral sostenida; SNP: polimorfismo de nucleótido único; VHC: virus de la hepatitis C (adaptado de Lens, 2011).

rs12979860 en pacientes con infección crónica, es porcentualmente menor en los pacientes VHC mono infectados, que en los pacientes coinfectados con el VIH (28% vs 45%; $p = 0.01$).

B.8.6.2. DIFERENCIAS ÉTNICAS

Es conocida (Yan, 2008; Thomas 2000) la menor eficacia del tratamiento del VHC, en pacientes afro americanos e hispanos. Los pacientes caucásicos tienen hasta 5 veces más probabilidad de presentar aclaramiento espontáneo de la infección aguda por VHC que los pacientes afroamericanos. Ello se debe en parte a una distribución diferente de los genotipos de *IL28B* en función de la variabilidad geográfica.



Figura B.16. Presencia de los alelos C y T del rs12979860 en el gen de la *IL28B* en función de la región geográfica (Thomas, 2009).

Las diferentes prevalencias de los genotipos protectores podrían explicar parcialmente las discrepancias raciales en la RVS y también en la resolución espontánea de la infección.

Thomas, et al (Thomas, 2009) analizaron la presencia del SNP rs12979860 en más de 2.000 personas de 51 etnias diferentes. En el este asiático se encuentra la mayor prevalencia de alelos asociados al aclaramiento del virus. Los individuos de origen africano-subsahariano tienen una menor prevalencia del alelo C favorable o protector. La prevalencia es intermedia en la población europea (Figura B.16). Podemos afirmar que el alelo rs12979860 C es más frecuente en la población caucásica comparada con la afroamericana.

De todas maneras, hay que tener en cuenta que, en un modelo multivariado de inducción de respuesta o resolución espontánea de la infección, la posesión de un genotipo *IL28B* favorable sólo explica el 50-60% de las diferencias étnicas observadas. Ello conlleva que otros factores genéticos o virológicos pueden estar implicados. No obstante, es evidente que dentro de la misma raza la *IL28B* es un factor predictivo de respuesta fundamental.

B.8.7. Genotipos 2 y 3

La mayoría de estudios se han realizado en pacientes con genotipo 1. Para valorar la posible influencia de *IL28B* en genotipos 2 y 3, el estudio de Mangia, et al, (Mangia, 2010) incluyó 268 pacientes con estos genotipos. Se observó una asociación entre *IL28B* y la respuesta al tratamiento en aquellos pacientes que no obtenían una RVR al tratamiento con IFN y RBV. Entre los pacientes que no obtenían RVR los portadores del genotipo CC en rs12979860 tenían el doble de probabilidades de curarse que aquellos que no presentaban el genotipo CC.

Contrariamente otro estudio europeo (Sarrazin, 2011) en pacientes con genotipos 2-3, muestra que el genotipo protector rs12979860CC se asocia significativamente a la RVS independientemente de la RVR.

B.8.8. *IL28B* y respuesta al tratamiento en pacientes VIH

Los resultados obtenidos en pacientes mono infectados se han podido reproducir en pacientes coinfectados con el VIH.

El primer estudio en pacientes con la coinfección VIH-VHC, se publicó en AIDS, en marzo del año 2010, y fue llevado a cabo por el grupo del Dr. Soriano (Rallón, 2010).

Se analizó una cohorte de 164 pacientes, que habían completado correctamente el tratamiento con PEG-IFN y RBV. Todos los pacientes incluidos en el estudio eran europeos; un 75% eran hombres, y el promedio de edad era de 42 años. El recuento basal medio de CD4 fue de 483 células/mm³, y tres cuartas partes de los participantes que recibían medicación antirretroviral tenían la viremia indetectable.

Un 69% de los pacientes estaban infectados por los genotipos 1/4 del VHC. El 30% de los pacientes presentaban cirrosis compensada. El 44% de los participantes eran portadores del genotipo CC en el gen *IL28B*.

El 55% de los pacientes obtuvieron una respuesta virológica sostenida con el tratamiento con PEG-IFN y RBV; un 21% alcanzaron RVR con carga viral del VHC indetectable tras 4 semanas de tratamiento; un 80% lograron una RVP con una disminución igual o superior a 2 log o carga viral del VHC indetectable a la semana a la semana 12; y un 65% de los pacientes tuvieron una respuesta RFT: carga viral del VHC indetectable al final del tratamiento.

Los portadores del genotipo CC en el gen *IL28B* tuvieron tasas de respuesta al tratamiento más elevadas en todos los momentos del análisis que las personas que eran portadoras de los genotipos CT o TT: RVR= 51% frente a 17% ($p < 0,0001$); RVP = 100% frente a 62% ($p < 0,0001$); RFT= 87% frente a 48% ($p < 0,0001$); y RVS = 76% frente a 36% ($p < 0,0001$).

Las tasas más altas de respuesta al tratamiento se observaron en personas con el genotipo CC en los genotipos 1/4 ($p < 0,0001$ en todos los momentos de análisis de

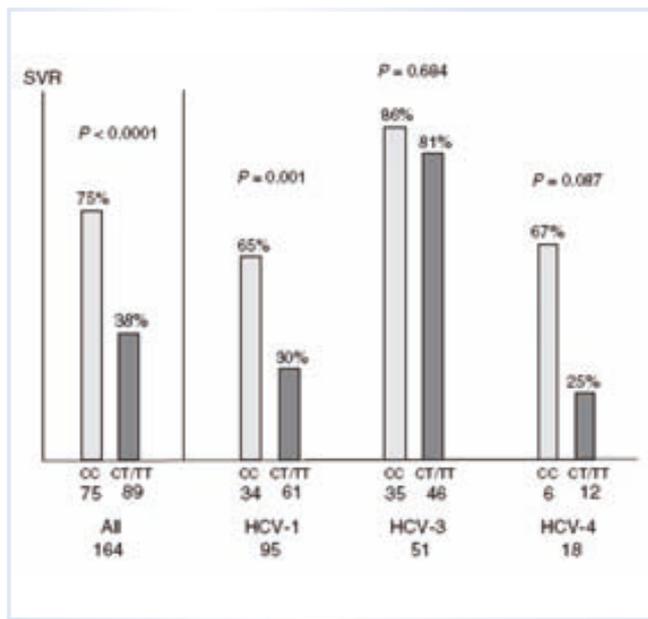


Figura B.17. RVS global y analizada en función del genotipo VHC. (Rallon, 2010).

respuesta). Las tasas de respuesta a la terapia para pacientes con genotipos 2/3 del VHC fueron similares independientemente de si eran portadores de los genotipos CC, TC o TT. (Figura B.17).

El efecto beneficioso del polimorfismo genético de *IL28B* en personas con genotipos 1/4 del VHC parece asociarse con una respuesta temprana al tratamiento. Los portadores del genotipo CC tuvieron de forma significativa mayores reducciones de la carga viral del VHC a las semanas 4 y 12 que los pacientes que eran portadores de los genotipos CT/TT ($p < 0,0001$).

El estudio concluye que el genotipo CC en el gen *IL28B* es un factor pronóstico importante de respuesta virológica al tratamiento en pacientes coinfectados. Su efecto es mediado por un aumento del aclaramiento viral durante las primeras 12 semanas de tratamiento y se aprecia, principalmente, en personas infectadas por los genotipos 1 y 4.

Pineda, et al. (Pineda, 2010) estudiaron la respuesta al tratamiento de 154 pacientes caucásicos VHC/VIH observando que el genotipo rs12979860CC se asocia con el doble de posibilidades de alcanzar una RVS independientemente del genotipo VHC.

La presencia del genotipo CC también se asocia con porcentajes más elevados de RVS en un grupo de 62 pacientes coinfectados que habían recibido un segundo tratamiento contra el VHC. Un 57% de los pacientes con el genotipo CC y únicamente un 24% de los que eran portadores de los genotipos CT/TT lograron RVS ($p = 0,006$). (Labarga, 2011).

Un grupo español (Barreiro, 2011) asoció la presencia de cirrosis con ser portador del genotipo CC de la *IL28B*, en pacientes coinfectados. Esto puede ser debido a que los portadores CC tienen un mayor componente inflamatorio. Esto favorece una mayor respuesta al tratamiento, pero también una mayor progresión a cirrosis que se ve incrementado en pacientes inmunodeprimidos.

B.8.9. Trasplante hepático

La recurrencia de la infección VHC en el hígado es universal si el ARN viral es detectable en el donante, en el momento del trasplante. Para evitar la recurrencia de la infección administramos tratamiento anti-VHC previo y posterior al TH. Tanto la eficacia como la tolerancia del tratamiento anti-VHC es significativamente inferior que en pacientes con tratamiento inmunosupresor.

Fukuhara, et al, (Fukuhara, 2010) han examinado la influencia de los polimorfismos *IL28B* en pacientes con TH por VHC. Se realizó la determinación de las variantes alélicas del SNP rs8099917 en el gen de la *IL28B* tanto a nivel del receptor como del donante. Se describe una respuesta significativamente inferior al tratamiento antiviral en los receptores heterocigotos u homocigotos para el alelo minoritario T/G o GG en rs8099917, siendo la RVS significativamente más elevada en los pacientes trasplantados con injertos que poseían el alelo TT mayoritario o protector. El porcentaje de RVS es más elevado cuando tanto donante y receptor, son homocigotos para el alelo favorable.

B.9. Gen de la *ITPA* (Inosina trifosfato pirofosfatasa)

El gen de la *ITPA* regula la anemia producida por la RBV. En primer lugar analizaremos en qué consiste la anemia asociada a la RBV, y la influencia que tiene sobre la RVS.

B.9.1. Riesgo de anemia hemolítica inducida por RBV

La anemia de los pacientes con hepatitis crónica C tratados con PEG-IFN y RBV es de causa multifactorial, aunque principalmente es debida a la hemólisis inducida por la RBV (Bronowicki, 2006).

Globalmente, hasta un 30-35% de los pacientes tratados con PEG-IFN y RBV pueden presentar una anemia moderada o severa, con una reducción mayor de 3 g/dl en los niveles de Hb, respecto a la Hb basal. La anemia por RBV motiva la disminución de las dosis de este fármaco en un 15-25% de los pacientes. Se han correlacionado con la anemia, la edad, el sexo femenino, los niveles basales de plaquetas y los niveles basales de Hb (McHutchison, 2009; Loustaud-Ratti, 2008).

La anemia hemolítica es dosis dependiente. Suele producirse entre la semana cuatro y la semana doce del tratamiento. El mecanismo de toxicidad de la RBV se debe al acúmulo de RVB-TP a nivel eritrocitario. La alteración de los mecanismos oxidativos a nivel de membrana favorecen la lisis celular (De Franceschi, 2006).

B.9.2. Control de la anemia por RBV

La modificación de la dosis de RBV, y el uso de EPO son los principales medios que tenemos para controlar la anemia secundaria al tratamiento del VHC.

Sin embargo, la administración de dosis menores a las previstas de RBV conllevan una menor respuesta terapéutica (McHutchison, 2002). La posibilidad de alcanzar una RVS disminuye significativamente cuando los pacientes reciben menos del 80% de la dosis total de PEG-IFN y de RBV, con una duración menor del 80% del tiempo previsto de tratamiento (Shiffman 2007, Reddy 2007).

DISMINUCIÓN DE LA DOSIS DE RBV

Se aconseja la reducción escalonada (reducción de 200 mg) de la dosis de RBV cuando los niveles de hemoglobina son ≤ 10 g/dl y la suspensión de este fármaco cuando los niveles de hemoglobina son $< 8,5$ g/dl (Del Río, 2006). A parte de las recomendaciones habituales de las diversas guías de manejo de los pacientes, el principal factor a tener en cuenta es la situación clínica individualizada de cada uno de nuestros pacientes. No todos los pacientes deberán reducir o suspender el tratamiento con los mismos niveles de Hb (Recomendaciones Gesida 2009).

USO DE EPO

Una disminución en la dosis de RBV, sobre todo en las primeras fases del tratamiento, puede disminuir considerablemente las tasas de respuesta. Con la finalidad de no reducir las dosis de RBV, la administración de una hormona como es la eritropoyetina recombinante –EPO– es una opción a tener en cuenta para evitar la anemia secundaria a RBV (Afdhal, 2004). Aunque existen pocas evidencias en pacientes coinfectados, el uso de EPO permite mantener las dosis adecuadas de PEG-IFN y RBV, y se confirma como una medida con un aceptable equilibrio coste-beneficio (Sulkowski, 2003). No obstante, el análisis del impacto del uso de EPO sobre la respuesta final del tratamiento ha ofrecido resultados discordantes (Younossi, 2008).

La administración de 40.000 UI semanales de EPO, favorece un aumento de la Hb, objetivándose incrementos de hasta 3 g/dl. De esta manera podemos mantener las dosis de RBV (Shiffman, 2007). Ningún estudio, sin embargo, ha establecido que el uso de EPO aumente las tasas de RVS relacionados con la terapia contra el VHC. Algunos autores han objetivado que en aquellos pacientes con anemia y con reducción de la dosis de RBV, se produce una mayor tasa de RVS; incluso cuando la RBV se redujo hasta en un 50% (Sulkowski, 2010).

La indicación de la administración de EPO para el tratamiento de la anemia inducida por RBV no está en ficha técnica y habitualmente se administra como “uso expandido”. La administración de EPO es por vía subcutánea. El precio de la misma encarece considerablemente un tratamiento muy costoso ya de base. Por lo tanto, parece

lógico buscar un equilibrio entre la disminución de las dosis de RBV y la administración de EPO.

No obstante, la disminución de Hb difiere marcadamente entre individuos, hecho que se verifica habitualmente en la práctica clínica habitual.

B.9.3. Descripción del gen de la ITPA. Primer estudio publicado en Nature

La variabilidad en la disminución de la Hb sugiere la existencia de factores genéticos como potenciales causantes de este hecho.

En febrero del año 2010, en la revista Nature, se publicó el primer estudio acerca de la presencia de SNPs beneficiosos en el gen de la *ITPA* (Fellay, 2010). En el estudio de Fellay, et al. se analizaron un total de 1.286 pacientes que habían participado en el estudio IDEAL.

El estudio IDEAL (McHutchison, 2009) comparó la eficacia y la seguridad de los dos interferones disponibles en el mercado, $\alpha 2a$ y $\alpha 2b$, junto a RBV para el tratamiento de la infección crónica del VHC. No se hallaron diferencias entre los dos tratamientos. Los resultados de este estudio fueron publicados en el año 2009.

En el estudio de Fellay, et al. los pacientes se clasificaron en tres grupos étnicos: 988 europeos-americanos, 198 afroamericanos y 100 hispanos. Quinientos cuarenta y dos (42%) pacientes desarrollaron anemia clínicamente significativa en la semana 4. Esta anemia se definió como una disminución de la hemoglobina mayor de 3 g/dl respecto a la Hb basal, o una disminución global de la Hb por debajo 10 g/dl, en la semana 4 de tratamiento.

Mediante estudios GWAS se correlacionaron 565.759 SNPs con la disminución de hemoglobina en la semana 4 inducida por el tratamiento con PEG-IFN y RBV. Los SNPs que mostraron una asociación significativa con una reducción cuantitativa de Hb se localizaron en una misma región del cromosoma 20 (20p13). Destacó el SNP rs6051702 que muestra una elevadísima significación estadística ($p = 1,1 \cdot 10^{-45}$) con la presencia de anemia asociada al tratamiento PEG-IFN/RBV, en la población de pacientes europeos-americanos y afroamericanos e hispanos.

El rs6051702 se localiza en la región intrónica de *C20orf194* (*chromosome 20 open reading frame 194*) y ocupa la posición cromosómica 3.191.925. Este SNP se incluye en una región que comprende unas 250 kilobases (kb), que contiene cinco genes codificadores de proteínas: *RP5*, *DDRGK1*, *ITPA*, *SLC4A11* y *UBOX5*. El estudio GWAS determinó la zona concreta donde localizar posibles SNPs asociados con la presencia de anemia.

B.9.4. Polimorfismos ITPA y niveles de Hb: rs1127354 y rs7270101

Previamente, en el año 2002, se habían descrito (Sumi, 2002) 2 variantes funcionales del gen *ITPA*, que se localizan en la región de 250 Kb y que son próximas al SNP rs6051702 descrito en el estudio GWAS.

En concreto nos referimos al SNP rs1127354 (94C>A, P32T; exón 2; posición cromosómica 3.141.842) y al SNP rs7270101 (IVS2 +21A>C; intrón 2; posición cromosómica 3.141.893). Estas variantes alélicas se han asociado con una disminución de la actividad enzimática de la ITPA (Stenmark, 2007; Von Ahsen 2008).

A partir de datos del Hapmap (www.hapmap.ncbi.nlm.nih.gov), el grupo de Fellay describió que estas dos variantes del gen *ITPA* (rs1127354 y rs7270101) estaban asociadas con el SNP rs6051702. Se objetivó que, los alelos minoritarios de los dos SNPs analizados -que presentan una baja actividad enzimática- se asociaban con el alelo protector de rs6051702.

Esta asociación sugirió la posibilidad de que las dos variantes funcionales del gen de la *ITPA* fueran las causantes de la protección contra la anemia. Para confirmar esta hipótesis se genotipó una muestra de 168 pacientes. Se encontró una fuerte asociación entre la presencia de anemia y determinadas variantes alélicas de los SNPs rs1127354 y rs7270101, confirmando de esta manera la sospecha inicial.

Estos datos eran indicativos de que las dos variantes funcionales del gen *ITPA* eran responsables tanto de la asociación observada con el rs6051702, así como de la protección frente a la anemia inducida por la RBV. Dichos hallazgos se muestran en las figuras B.18 y B.19.

B.9.5. Disminución de la actividad ITPasa

El gen *ITPA* codifica para la proteína ITPA, que es el enzima de la Inosina trifosfato pirifosfatasa.

Se define también como el enzima con actividad ITPasa, enzima inosina trifosfatasa o trifosfatasa de inosina (EC 3.6.1.19). La enzima ITPA cataliza el paso de ITP (inosín trifosfato) a IMP (inosín monofosfato). Se trata de una hidrolasa que se une a la molécula de ITP. Tras la hidrólisis del ITP se forma IMP más una molécula bisfosfato.

Las mutaciones en el gen *ITPA* determinan la codificación de una enzima menos activa, con una acusada reducción de la actividad ITPasa, y por lo tanto con una disminución del paso de ITP a IMP, con el consiguiente acúmulo de ITP intracelular.

Las variantes alélicas protectoras –o genotipos protectores- descritas en el gen *ITPA* codifican una enzima con menor actividad ITPasa: los homocigotos mutados (AA) para rs1127354 tienen una actividad nula de la enzima, mientras que los heterocigotos (CA) tienen un 22.5% de la actividad normal; los homocigotos mutados (CC) para rs7270101 tienen un 10% de la actividad; y los heterocigotos compuestos tienen sólo un 60% de actividad (Sumi, 2002). La tabla B.8 muestra las diversas combinaciones entre los genotipos de los dos SNPs implicados en la actividad de la enzima ITPA.

La detección de una mutación rs1127354 beneficiosa exige la presencia del alelo minoritario A, tanto en hetero como en homocigosis. Los porcentajes en los que esta mutación está presente varían en función del área geográfica estudiada. En la figura B.20 se

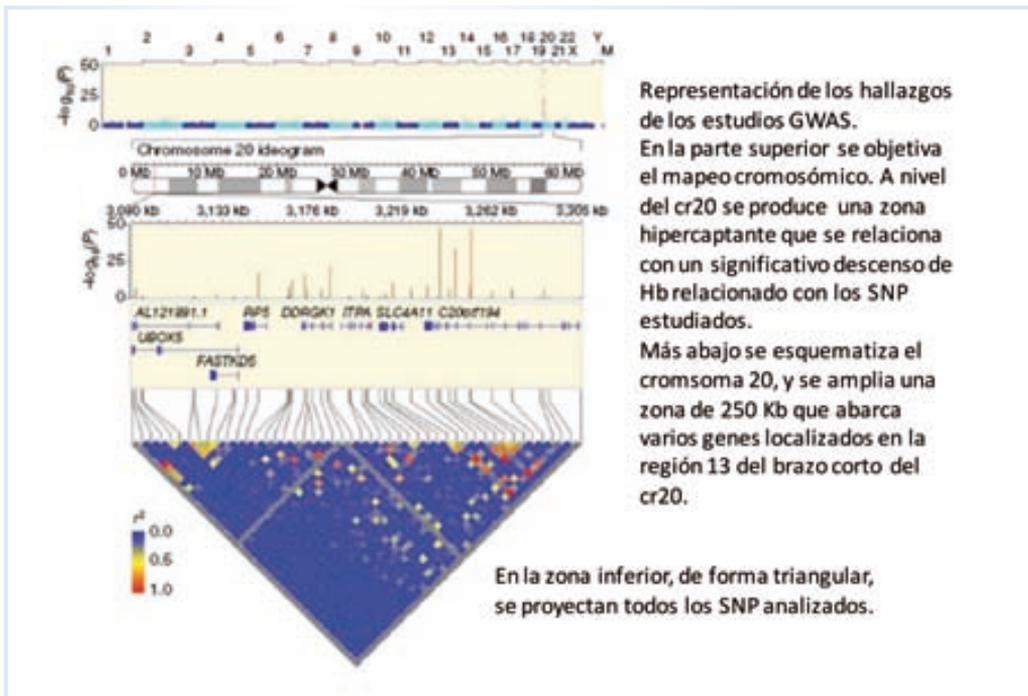


Figura B.18. Resultado del GWAS. Análisis del cromosoma 20. (Fellay, 2010).

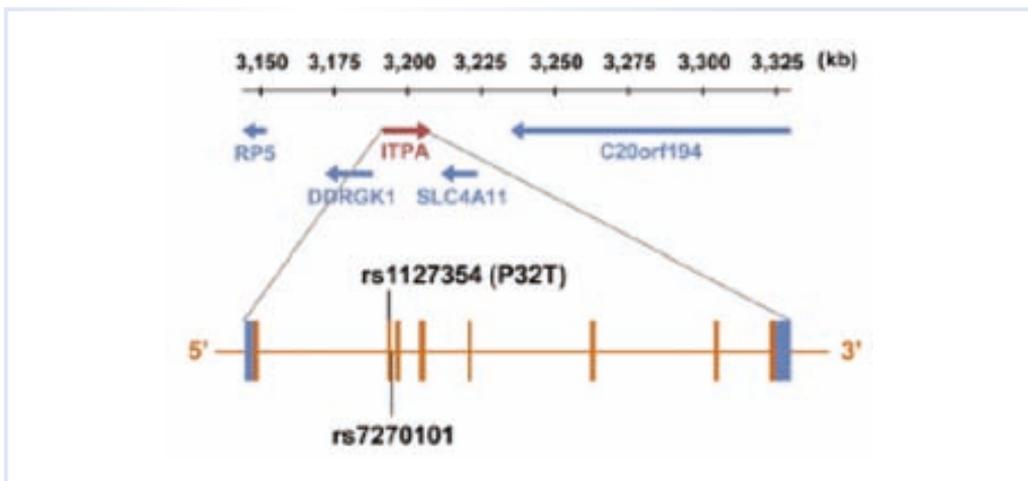


Figura B.19. Ampliación del área de 250 Kb. Esquematización del gen ITPA, compuesto de 8 exones y 7 intrones.

Tabla B.8. Actividad de la enzima ITPA. El porcentaje de actividad varía en función de la combinación entre los diversos genotipos rs1127354 y rs7270101.

rs1127354	rs7270101	Actividad ITPasa (%)	Deficiencia ITPasa
Wild-type CC	Wild-type AA	100	-
Wild-type CC	Heterocigoto AC	60	+
Heterocigoto CA	Wild-type AA	30	++
Wild-type CC	Homocigoto CC	30	++
Heterocigoto CA	Heterocigoto AC	10	+++
Homocigoto AA	Wild-type AA	< 5	+++

Adaptado de Thompson, 2010.

expone el porcentaje de pacientes portadores del alelo A (rs1127354; 94C>A). En nuestra población, fundamentalmente caucásica, los porcentajes llegan hasta un 20%.

B.9.6. Acción de la enzima ITPA

La enzima ITPA, compuesto de 194 aminoácidos, ejerce su acción a nivel del citosol intracelular, formando parte de un complejo mecanismo de equilibrio entre el anabolismo y catabolismo de bases púricas. La actividad ITPasa ejerce un papel fundamental en el metabolismo de las bases púricas.

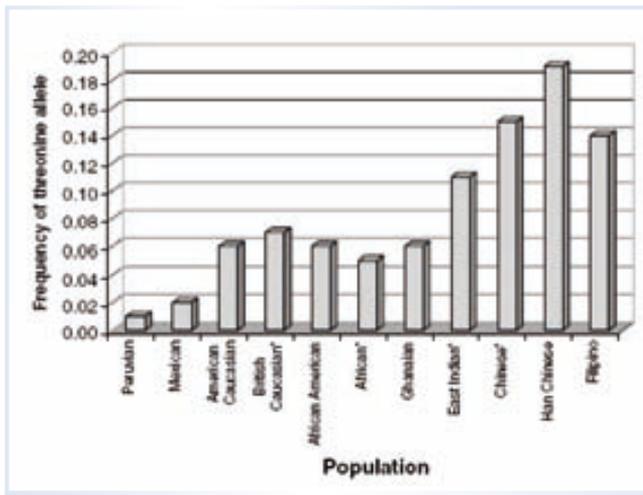


Figura B.20. Presencia del alelo A rs1127354 en diferentes grupos geográficos (adaptado de Marsh S. 2004).

B.9.6.1. BASES PÚRICAS. DEFINICIÓN E IMPORTANCIA

Las bases nitrogenadas son compuestos orgánicos cíclicos, que incluyen dos o más átomos de nitrógeno. Existen cinco bases nitrogenadas principales, que se clasifican en bases púricas o purínicas (derivadas de la estructura de la purina) y bases pirimidínicas (derivadas de la estructura de la pirimidina). La adenina (A) y la guanina (G) son bases púricas, y la timina (T), la citosina (C) y el uracilo (U) son pirimidínicas.

Las bases nitrogenadas A, T, G y C se encuentran en el ADN (ácido desoxirribonucleico). Una base nitrogenada (A, T, G y C), un azúcar (desoxirribosa) y un grupo fosfato forman un nucleótido. El ADN está formado por dos cadenas complementarias unidas por enlaces entre nucleótidos de manera siempre constante: la A se une con la T y la C se une con la G. El ARN, encargado principalmente de copiar y transmitir la información genética, está formado por las mismas bases, exceptuando que la complementaria de la A es el U en vez de la T.

Las bases púricas son sintetizadas fundamentalmente a nivel hepático. En su degradación el metabolito final es el ácido úrico.

B.9.6.2. SÍNTESIS DE LAS BASES PÚRICAS

Las bases nitrogenadas no son requeridas en la dieta ya que el organismo tiene la capacidad de sintetizar y recuperar nucleótidos. La síntesis de los nucleótidos de purina comienza partir de un azúcar activado, el 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP). Tras varias reacciones se forma el primer nucleótido, la inosina-5'-monofosfato (IMP). La figura B.21 muestra el proceso desde PRPP a IMP.

El IMP representa un punto de partida para la biosíntesis de las bases púricas, ya que puede ser convertido en adenilato (AMP) o en guanilato (GMP) a través de dos vías distintas (Burgis, 2003). La vía que conduce a AMP requiere energía en forma de GTP y la que conduce a GMP requiere energía en forma de ATP (Figura B.22).

B.9.6.3. CATABOLISMO DE LAS PURINAS

El catabolismo de los nucleótidos de purina conduce en última instancia a la producción de ácido úrico que es insoluble y es excretado en la orina. Tanto AMP, IMP, GMP y XMP se metabolizan a través de la vía de la xantina en ácido úrico (Figura B.23).

B.9.6.4. PRESENCIA DE OTRAS BASES PÚRICAS: INOSINA Y XANTINAS

Existen múltiples bases púricas que provienen de los ácidos nucleicos originales. Es el caso de la inosina y las xantinas.

Las xantinas son sustancias que también pertenecen al grupo químico de las bases púricas. En este grupo se incluyen la xantina, la hipoxantina y el ácido úrico. Todas ellas forman parte del metabolismo intermediario de las bases púricas (Zheng J. 2005).

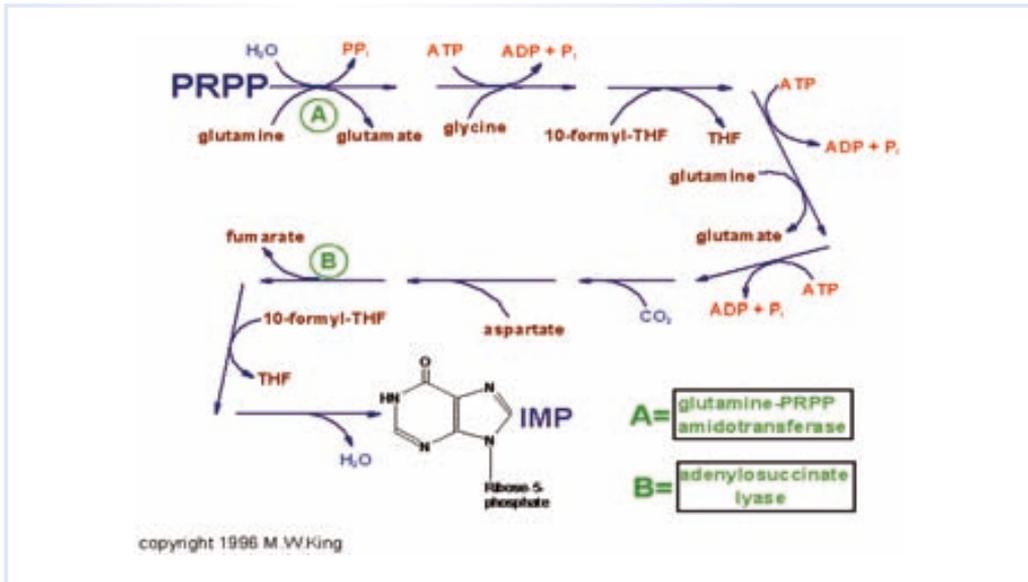


Figura B.21. Proceso de elaboración del IMP, a partir del 5-fosforibosil-1-pirofosfato. (PRPP)

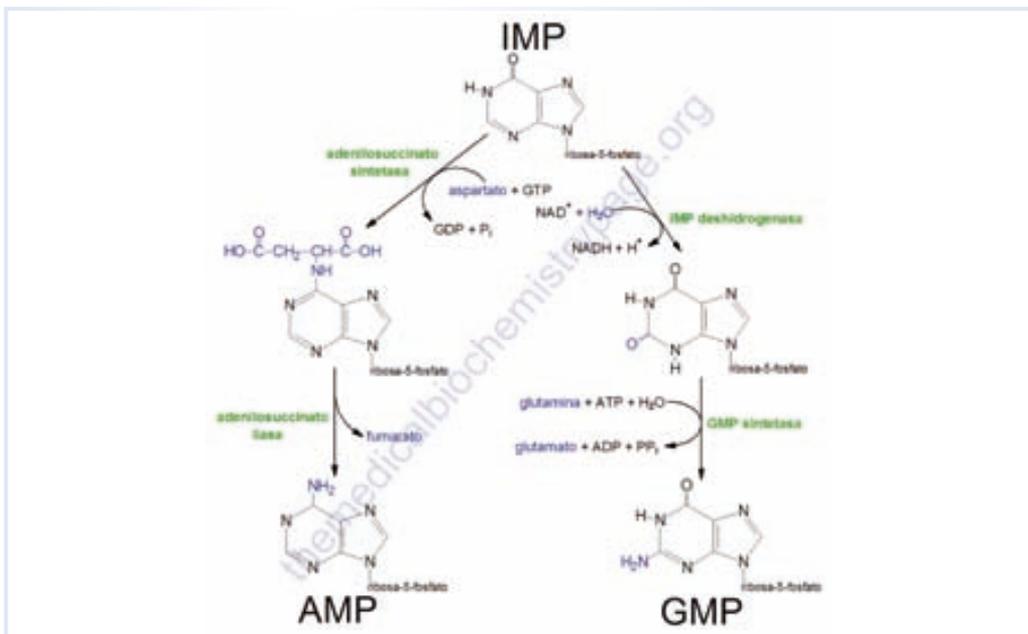


Figura B.22. Proceso de obtención del AMP y del GMP, a partir del IMP. AMP: adenosina-mono-fosfato, GMP: guanosina-mono-fosfato, IMP: inosina-mono-fosfato.

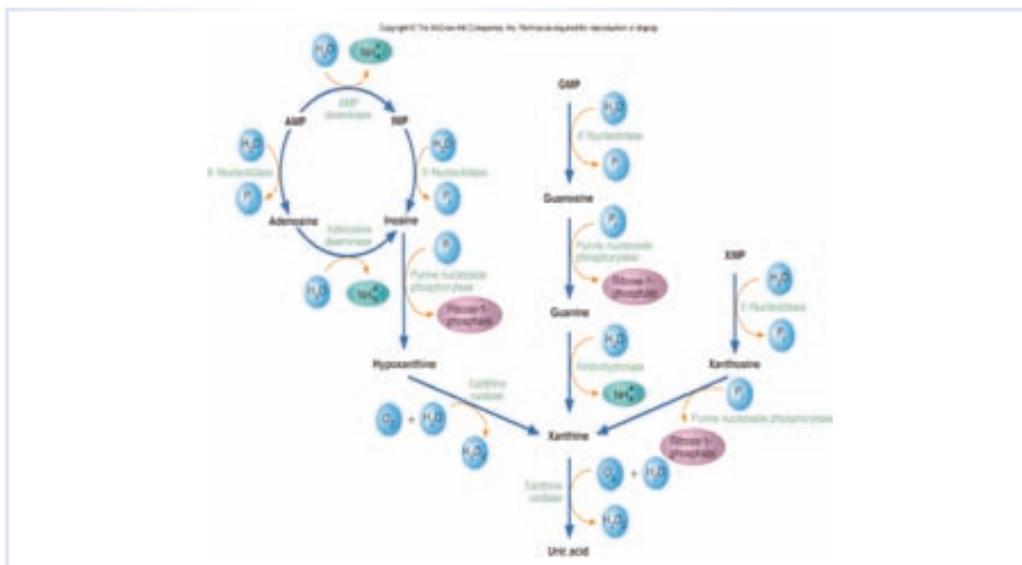


Figura B.23. Metabolismo del AMP, GMP, IMP, XMP. AMP: adenosina-mono-fosfato, GMP: guanosina-mono-fosfato, IMP: inosina-mono-fosfato. XMP: xantina-mono-fosfato.

La inosina es un nucleósido con un papel intermediario y fundamental en la síntesis de ácidos nucleicos. La inosina se forma cuando la hipoxantina se une a un anillo de ribosa a través de un enlace glucosídico en posición N9 (Figura B.24). Por lo tanto la inosina es un eslabón intermedio en la síntesis de nucleótidos purínicos.

La inosina es un metabolito del IMP, formando parte del proceso de degradación de las purinas. También se metaboliza a ITP. El papel mediador de la ITP no queda claro. A este nivel actúa la enzima ITPA, una hidrolasa, que cataliza el paso de ITP a IMP.

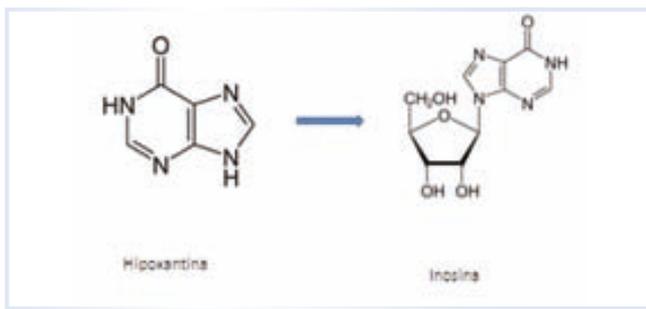


Figura B.24. Formación de la inosina tras la unión de una ribosa en posición 9 de la hipoxantina.

B.9.7. Papel de la ITPA

Estos complejos procesos a nivel intracelular precisan de mecanismos reguladores que eliminen las moléculas innecesarias, que ya han cumplido su cometido en el proceso de replicación celular. El papel fundamental de la enzima ITPA consiste en regular los niveles de IMP y de ITP para que se mantenga en equilibrio el proceso catabólico descrito anteriormente.

La ITPA es la principal enzima que mantiene a salvo el ADN, protegiéndolo del *pool* de bases purínicas acumuladas a nivel intracelular y que pueden ser dañinas, ya que pueden alterar la correcta replicación celular.

La enzima ITPA o ITPasa actúa a nivel de determinadas purinas que están en forma trifosfato, catalizando la hidrólisis de las moléculas trifosfato a las formas monofosfato. Así protege a las células -incluyendo a los eritrocitos- del acúmulo de nucleótidos, como ITP, dITP o xantosina trifosfato (XTP), que pueden ser incorporados de manera inapropiada a las moléculas de ARN y de ADN.

De este modo, el déficit de la ITPA se caracteriza por el acúmulo de trifosfato de inosina o ITP en los eritrocitos. Este aumento de ITP intracelular no condiciona ninguna patología (Sakumi K, 2010).

La presencia del alelo A protector del polimorfismo rs1127354 *ITPA* es la variable más relevante que determina la baja actividad enzimática de la ITPA y la consiguiente acumulación de ITP en los glóbulos rojos. La presencia de este polimorfismo también favorece el aumento de toxicidad de determinados fármacos análogos de las purinas, que no son metabolizados correctamente, como es el caso de la azatioprina (Stepchenkova, 2009).

B.9.8. Aumento de ITP y reducción de la anemia.

Posibles mecanismos

La RBV es fosforilada a nivel intracelular, dando lugar a la forma activa del fármaco, RBV-TP. La RBV-TP se incorpora al ARN del VHC, mimetizando a la uridina y a la citosina, deteniendo de esta manera la elongación del ARN vírico.

El mecanismo por el cual la deficiencia de la ITPA tiene efectos protectores frente a la anemia hemolítica inducida por la RBV aún no se ha entendido claramente, aunque existen varias hipótesis.

El primer mecanismo propuesto se basa en que el acúmulo de ITP intraeritrocitario, causado por la deficiencia de la ITPA, compite con la forma activa de la RBV-TP en determinados procesos celulares no bien conocidos. De esta manera el ITP protegería a las células contra los efectos líticos de la RBV-TP y disminuiría la lisis celular eritrocitaria, y por lo tanto disminuiría la anemia (Fellay, 2010).

Parece más consistente el mecanismo definido por Hitomi, et al., (Hitomi, 2011). El metabolismo oxidativo a nivel de la membrana del eritrocito es ATP dependiente. Se trata

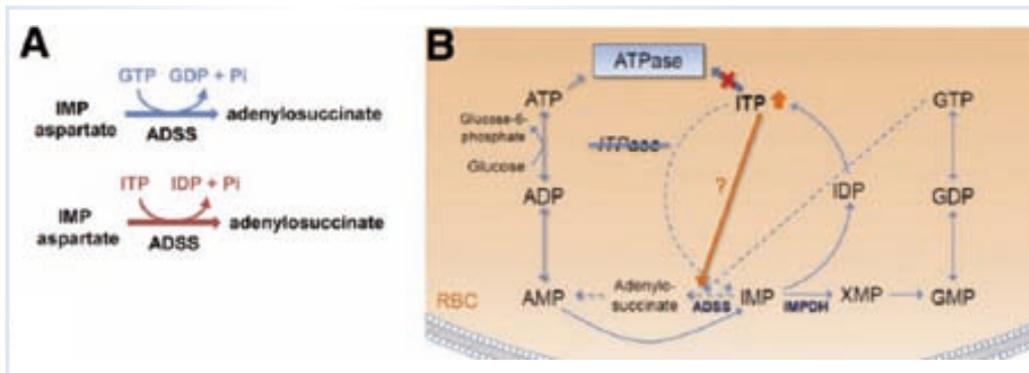


Figura B.25. A. La vía habitual de metabolismo del IMP hasta AMP utiliza el GTP como sustrato. En caso de déficit de GTP, el sustrato utilizado será el ITP. **B.** Ante el déficit de ITPasa se acumula ITP. Este ITP es fundamental, ya que ejerce de sustrato de la enzima ADSS. El sustrato habitual es el GTP; pero que en este caso está disminuido por la acción directa de la RBV (adaptado de Hitomi, 2011).

de un mecanismo de defensa celular que facilita la viabilidad del hematíe. La RBV causa una reducción de GTP y ATP. El mecanismo por el cual se produce la anemia va íntimamente ligado a la reducción del GTP y del ATP originados por la administración de RBV.

Los pacientes con menor actividad ITPasa acumulan niveles elevados de ITP intraeritrocitario. Tal como se ha comentado previamente, el IMP representa un punto de ramificación para la biosíntesis de purinas, ya que puede ser convertido en AMP o GMP a través de dos vías de reacción distintas (Figura B.22). La vía que conduce a AMP requiere energía en forma de GTP: este es el punto crítico donde tiene capacidad de actuar el ITP, sustituyendo al GTP cuando existe una depleción del mismo.

La enzima adenilo succinato sintetasa (ADSS) cataliza el paso de IMP a adenil succinato mediante el consumo de GTP más aspartato. Esta enzima ejerce un efecto limitante en el paso de IMP a AMP y posteriormente a ATP. Para evitar la pérdida de ATP, el ITP puede actuar también como cofactor en lugar del GTP en la vía de síntesis de AMP y ATP (Figura B.25).

Ante la depleción de GTP, provocada por la RBV, el acúmulo de ITP en el interior de los eritrocitos, debido a una disminución de la actividad ITPasa, activa la vía del adenilato succinasa. De esta manera, se compensa la depleción de ATP y GTP secundaria a la RBV.

Por lo tanto, el ITP tiene la capacidad de reemplazar al GTP en el proceso de síntesis de AMP y ATP. Los efectos de la disminución del ATP y GTP, por efecto de la RBV, son claramente mitigados por el ITP, protegiendo a los eritrocitos de la anemia. De esta

manera evitamos una lisis de la membrana del eritrocito, que dispone de la ATP necesario para mantener vivo y eficaz su metabolismo oxidativo.

Por lo tanto, la deficiencia de ITPA parece ser una condición benigna. Las terapias que se dirigen al bloqueo de esta enzima podrían ayudar a proteger contra la anemia inducida por RBV. La detección de esta deficiencia podría ayudar a identificar los grupos de riesgo. La modulación farmacológica de la actividad ITPA podría ser eficaz para prevenir la anemia severa. La terapia anti VHC administrada junto con un antagonista de la ITPA podría contribuir a aumentar las tasas de respuesta virológica sostenida secundaria a un mejor cumplimiento del tratamiento.

B.9.9. Estudios publicados acerca de la interacción ITPA-Anemia

Desde finales del 2010 a mediados del 2011 se han publicado varios estudios que analizan la influencia de los SNPs del gen de la *ITPA* en pacientes mono infectados. No hay ningún estudio realizado en pacientes coinfectados VIH-VHC.

En todos los estudios realizados el genotipo *ITPA* es un potente predictor de la toxicidad de la RBV. Sin embargo tan solo un estudio concluye que los genotipos *CA/AA* del gen de la *ITPA* se asocian con la RVS (Azakami, 2011).

También se presentan dos estudios en pacientes con tratamiento VHC triple: PEG-IFN, RBV y telaprevir (TPV). TPV es un inhibidor de la proteasa viral de reciente aprobación en USA y Europa. Su eficacia permite alcanzar tasas de RVS superiores al 70%. A pesar de presentar una RVS muy elevada, los marcadores farmacogenéticos, polimorfismos de *IL28B*, mantienen su poder predictor. El gen de la *ITPA* se asocia con la presencia de anemia, aunque no se asocia con la RVS. (Chayama, 2011; Suzuky 2011).

Las siguientes tablas (Tablas B.9-B.14) resumen los resultados de los 6 estudios más significativos.

B.10. Nuevos polimorfismos

En junio del 2011 se ha publicado (Tanaka, 2011) un estudio realizado en población japonesa. Este estudio describe la detección de un nuevo SNP mediante GWAS en el gen *DDRGK1*, rs11697186. El gen *DDRGK1* se localiza en el cromosoma 20 de manera contigua al gen *ITPA*. El SNP rs11697186 mostró una fuerte asociación con el descenso de los recuentos de plaquetas asociados al tratamiento del VHC con PEG-IFN/RBV ($p = 8.17 \times 10^{-9}$; OR = 4.6). Un análisis más detallado con 22 SNPs localizados en una región de 44,7 kb, que incluye a los genes *DDRGK1* e *ITPA*, mostró que los SNPs rs11697186 (*DDRGK1*) y rs1127354 (*ITPA*) se encuentran en desequilibrio de ligamiento. Los genotipos *AA/CA* rs1127354 *ITPA* se asociaron de manera independiente con una mayor reducción de plaquetas a la semana 4 ($p < 0.0001$) que el genotipo *CC*, junto con una menor reducción de Hb.

Tabla B.9. Thompson AJ, Fellay J, Patel K, et al. Variants in the *ITPA* gene protect against ribavirin-induced hemolytic anemia and decrease the need for ribavirin dose reduction. *Gastroenterology*. 2010 Oct;139(4):1181-9.

<p>Objetivo</p> <ul style="list-style-type: none"> - Evaluar los pacientes de la cohorte independiente ViraHep-C. - Investigar los efectos de las variantes a nivel del <i>IL28B</i> e <i>ITPA</i> entre la semana 1 y la semana 4. <p>Población</p> <ul style="list-style-type: none"> - Protocolo ViraHep-C n = 304 (167 raza blanca y 137 raza negra) <p>Tratamiento</p> <ul style="list-style-type: none"> - pegIFN-α2a (180 μg/semana) más RBV (1200/1000 mg/día en función del peso > 75Kg/< 75 Kg). - Duración de 48 semanas mas 24 semanas de seguimiento <p>VHC genotipo</p> <ul style="list-style-type: none"> - G1 	<p>Genotipado:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>ITPA</i>: rs1127354; rs7270101 - Se define el déficit de ITPasa en función de los genotipos rs1127354/ rs7270101 - <i>IL28B</i>: rs12979860 <p>Datos clínicos evaluados:</p> <p>Semana 4 de tratamiento</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) \downarrow Hb absoluto \downarrow [Hb] > 3g/dl <p>Semana 48 de tratamiento</p> <ol style="list-style-type: none"> 2) \downarrow Hb absoluto \downarrow [Hb] > 3g/dl 3) \downarrow dosis RBV 4) RVS 	<p>Resultados:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) <ul style="list-style-type: none"> - Frecuencia del alelo menor (A) de rs1127354 fue de 0.07 - Frecuencia del alelo menor (C) rs7270101 fue de 0.09 - 70% de los pacientes tienen actividad normal del la ITPasa 30% presentan déficit moderado severo de la ITPasa 2) <ul style="list-style-type: none"> - rs1127354/ rs7270101: El \downarrow [Hb] en la S4 fue menor ante la presencia del alelo protector en cada caso. - La deficiencia de ITPase se asocia con un menor descenso cuantitativo y cualitativo de Hb tanto al valorar: <ul style="list-style-type: none"> \downarrow [Hb] \downarrow [Hb] > 3g/dl 3) <ul style="list-style-type: none"> - El deficit de ITPase protege del desarrollo de anemia durante todo el transcurso del tratamiento. 4) <ul style="list-style-type: none"> - El deficit de ITPase se asocia con una menor reducción en las dosis de RBV 5) <ul style="list-style-type: none"> - No se asocian las variantes del <i>ITPA</i> con la RVS 6) <ul style="list-style-type: none"> - <i>E/IL28B</i> se asocia fuertemente con la RVS 	<p>Discusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> - A pesar de los beneficios objetivados no hay repercusión en la RVS. - Pacientes con deficit de ITPase pueden ser candidatos a recibir dosis mayores de RBV. - No hay asociación con la RVS y el <i>ITPA</i>. <p>Conclusiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Fuerte asociación entre los dos SNPs <i>ITPA</i> y la menor anemia, con menores dosis de reducción de RBV.
--	---	--	--

Tabla B.10. Ochi H, Maekawa T, Abe H, et al. *ITPA polymorphism affects ribavirin-induced anemia and outcomes of therapy--a genome-wide study of Japanese HCV virus patients. Gastroenterology. 2010 Oct;139(4):1190-7.*

<p>Objetivo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - La disminución de las dosis de RBV condiciona la respuesta al tratamiento. Se analizan factores predictivos de respuesta, en el que se incluyen marcadores genéticos. <p>Población:</p> <ul style="list-style-type: none"> - n = 923 japoneses. <p>TTO:</p> <p>PEG-ING más RBV 48 S.</p> <p>HCV genotipo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1b 	<p>Métodos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Estudio GWAS. - Análisis RNA y expresión ITPA. <p>Objetivos clínicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1) Presencia de anemia - 2) RVS 	<p>Resultados:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) GWAS: Inicialmente solo el SNP, rs6051639, localizado en el gen <i>DDRGK1</i> en el cromosoma 20 (20p13 región), fue claramente asociado con la menor disminución de Hb asociada al tratamiento. 2) Con la reselección mediante mapeo más detallado del gen <i>ITPA</i> y <i>DDRGK1</i>: <ul style="list-style-type: none"> • Cuatro SNPs, incluyendo rs1127354, se asociaron significativamente con la anemia inducida por RBV. • Una mayor proporción de pacientes con el alelo A rs1127354 completaron el tratamiento sin precisar reducciones de las dosis de RBV. (P <.01). 3) Los factores pronósticos de anemia severa (Hb <10 g/dL) fueron: edad, Hb y plaquetas basales, presencia del rs1127354. 4) La variante rs7270101 fue monoalélica en la población japonesa (no se evidencia alelo protector) 5) La edad, el sexo, el IMC, la Hb y las plaquetas basales, el grado de fibrosis, la carga viral VHC basal, y el genotipo rs8099917-IL28B, son factores predictivos independientes de RVS. El rs1127354-ITPA no es un factor predictivo de respuesta. 	<p>Conclusiones</p> <ul style="list-style-type: none"> - Las variantes alélicas del gen <i>ITPA</i> se asocian con una menor presencia de anemia, con una menor reducción de las dosis de RBV, pero no se asocian con una mayor RVS.
--	---	---	--

Tabla B.11. Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, et al. Influence of ITPA polymorphisms on decreases of hemoglobin during treatment with pegylated interferon, ribavirin, and telaprevir. *Hepatology.* 2011 Feb;53(2):415-21.

<p>Objetivo: – Valorar los efectos de los SNP del ITPA en pacientes con triple terapia.</p> <p>Población: – 61 pacientes japoneses</p> <p>Tratamiento: – Triple terapia con PEG-IFN, RBV y telaprevir durante 12 semanas, Seguido de un tratamiento de 12 semanas con PEG-IFN y RBV</p> <p>HCV genotipo: G1</p>	<p>Genotipado: – ITPA (rs1127354) – IL28B (rs8099917 y rs12979860)</p> <p>Datos clínicos analizados: 1) ↓ [Hb] 2) ↓ RBV dosis 3) RVS</p>	<p>Resultados: 1) Durante las 12 primeras semanas con telaprevir la dosis de RBV fue menor en los pacientes con genotipo CC, que en los pacientes con genotipo CA/AA (P = 0.039). 2) La dosis total de RBV durante las 24 semanas de tratamiento fue comparable entre los 12 pacientes CA/AA y los 49 CC. 3) Los descensos de Hb fueron mayores en pacientes CC que en CA/AA, en la semana 2, la semana 4 y al final del tratamiento 4) La RVS se obtuvo en un 70% de los pacientes CC y en un 64% de los pacientes CA/AA respectivamente (p = 0,07) 5) Los genotipos CC y CT/TT rs12979860 IL28 presentaron un 96% vs. Un 41%, de RVS (p < 0.001)</p>	<p>Conclusión: – Los SNPs del gen de la ITPA tienen influencia en los niveles de Hb, durante la triple terapia, particularmente durante las 12 primeras semanas, precisamente cuando es administrado telaprevir. – El gen ITPA no tiene influencia sobre la RVS. El gen IL28B tiene una marcada influencia sobre la RVS</p>
---	--	---	--

Tabla B.12. Chayama K, Hayes CN, Abe H, et al. IL28B but not ITPA polymorphism is predictive of response to pegylated interferon, ribavirin, and telaprevir triple therapy in patients with genotype 1 hepatitis C. *J Infect Dis.* 2011 Jul;204(1):84-93.

<p>Objetivo</p> <ul style="list-style-type: none"> – Evaluar factores predictivos de RVS en pacientes con terapia triple. <p>Población</p> <ul style="list-style-type: none"> – 93 pacientes japoneses. <p>Tratamiento</p> <ul style="list-style-type: none"> – PEG-IFN-α-2b (1.5 μg/kg semanal sc), RBV (600 mg \leq 60 kg; 800 mg > 60 a \leq 80 kg; y > 80 kg 1.000 mg). Telaprevir (750/8 h) <p>HCV genotipo</p> <p>1a/1b</p>	<p>Métodos</p> <ul style="list-style-type: none"> – 2 SNPs: rs8099917-IL28B y rs1127354-ITPA <p>Análisis de datos clínicos</p> <ul style="list-style-type: none"> – RVS – Disminución de dosis de RBV 	<p>Resultados</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) RVS: 69/94 (73%). 20/25 (80%) en pacientes naive. 49/69 (71%) en pacientes con tratamiento previo para el VHC. 2) Los pacientes con genotipo TT rs8099917 alcanzan porcentajes significativamente mayores de RVS (94% vs 50%; P<.0001). 3) No se relaciona el genotipo rs1127354 con la RVS (73% para CC y no-CC). La RBV fue más precoz en pacientes C: 18 vs 29 días respectivamente. 4) Los factores predictivos de RVS fueron: no respuesta a tratamientos previos (pacientes relapsers), genotipo TT rs8099917 y una RVR (respuesta viral rápida, con negativización a la cuarta semana de tratamiento). 	<p>Conclusiones</p> <ul style="list-style-type: none"> – La triple terapia alcanza elevados porcentajes de RVS, comparándola con la terapia doble. Sobretodo en pacientes naive y pacientes relapsers. – Los SNPs ITPA predicen anemia pero no RVS. – SNPs en el IL28B y una RVR son los factores predictivos más potentes DE RVS.
---	--	---	--

Tabla B.13. Azakami T, Hayes CN, Sezaki H, et al. Common genetic polymorphism of *ITPA* gene affects ribavirin-induced anemia and effect of peg-interferon plus ribavirin therapy. *J Med Virol.* 2011 Jun;83(6):1048-57.

<p>Objetivo</p> <ul style="list-style-type: none"> - Evaluar el efecto de los diversos polimorfismos en el gen de la <i>ITPA</i> en la reducción de los niveles de Hb asociada al tratamiento del VHC <p>Población</p> <ul style="list-style-type: none"> - n = 1002 (Japoneses) → 803 con G1 <p>Tratamiento</p> <ul style="list-style-type: none"> - PEG-IFN-α2b y RBV durante 48 semanas <p>HCV genotipo</p> <ul style="list-style-type: none"> - G1 	<p>Genotipado</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>ITPA</i> rs1127354 - <i>IL28B</i> rs12979860 y rs8099917 <p>Datos clínicos a analizar</p> <ol style="list-style-type: none"> ↓ [Hb] hasta la semana 72 ↓ RBV dosis RVS 	<p>Resultados</p> <ol style="list-style-type: none"> En pacientes con genotipo CC rs1127354 se objetiva un mayor descenso de Hb. La reducción acumulada en la dosis de RBV fue significativamente mayor en pacientes con genotipo CC (OR 1.92). La frecuencia de pacientes que recibieron al menos un 80% de las dosis de RBV fue significativamente más baja en los que tienen el genotipo CC. Esta reducción fue significativamente mayor en los pacientes con Hb basal menor de 15 g/dl ($P < 0.03$). La RVS fue significativamente menor en pacientes con genotipo CC. Los factores predictivos independientes de RVS fueron el SNP <i>IL28B</i>, la edad, el estado de fibrosis, <i>ITPA</i> - rs1127354- así como la Hb basal. 	<p>Conclusiones</p> <ul style="list-style-type: none"> - En pacientes con cifras basales de Hb por debajo de 13,5; y en pacientes con cifras basales de Hb entre 13,5-15,00 g/dl y genotipo CC rs1127354, se objetiva un mayor descenso de Hb, junto un porcentaje mayor de reducción de dosis de RBV, y una menor RVS.
--	---	--	---

Tabla B. 14. Thompson AJ, Santoro R, Piazzolla V, et al. Inosine triphosphatase genetic variants are protective against anemia during antiviral therapy for HCV2/3 but do not decrease dose reductions of RBV or increase SVR. *Hepatology*. 2011 Feb;53(2):389-9

Objetivo - Evaluación de la asociación entre variantes del gen de la ITPA la anemia secundaria al tratamiento en una cohorte de pacientes con genotipo VHC G2-G3.	Genotipado ITPA: - rs1127354 - rs7270101 Datos clínicos evaluados - ↓ Hb absoluta - ↓ [Hb] > 3g/dl - ↓ [Hb] _{t=12-24set} - ↓ RBV RVS	Resultados 1) - Frecuencia del alelo menor: 0.05 para rs1127354 (A) 0.11 para rs7270101 (C) - Disminución de la actividad ITPase en un 29% 2) - rs1127354 (A) /rs7270101 (C) Asociación significativa con un menor descenso de Hb a la Semana 4. 3) - El descenso de Hb entre la S 12 y la 24 también fue menor en aquellos pacientes con disminución de la actividad ITPasa 4) - No asociación significativa con los niveles de reducción de dosis de RBV 5) - rs1127354, rs7270101, no se asocian con una mayor RVS.	Conclusión - Variantes ITPA fuertemente relacionadas con una menor anemia en pacientes con VHC G2/3 - No hay asociación con la disminución de las dosis de RBV ni con la RVS.
Población - n = 238 Caucasicos 185 (78%) con G2 y 53 (22%) con G3 Tratamiento - PEG-IFN-a2b + RBV (1000/1200 mg) ajustada a peso (<75 Kg/> 75 Kg) durante 12 (n = 109) o 24 semanas (n = 129). VHC genotipo - G 2/3.			

C. OBJETIVO DE LA TESIS

El objetivo principal de la tesis es valorar si la presencia de determinadas variantes alélicas a nivel del gen de la *IL28B*, y de del gen de la *ITPA*, se asocian con una mejor respuesta al tratamiento VHC, y con una menor toxicidad al mismo, en pacientes coinfectados con el VIH.

Hay datos acerca de la asociación entre las variantes alélicas del rs12979860 *IL28B* y la RVS al tratamiento del VHC, en pacientes coinfectados (Rallon, 2010; Pineda, 2010).

No obstante no hay datos publicados acerca de la asociación entre toxicidad por RBV y las variantes alélicas rs1127354 a nivel del gen de la *ITPA*, en pacientes coinfectados con el VIH. Tampoco hay estudios que evalúen de manera combinada el efecto de los dos SNPs (rs12979860- rs1127354) sobre la RVS al tratamiento del VHC, en este tipo de pacientes VHC-VIH.

La determinación de estos marcadores farmacogenéticos, y su posible efecto predictor de la RVS al tratamiento del VHC en pacientes coinfectados por el VIH, constituye el objetivo principal de esta tesis.

Es prioritario poder trasladar los resultados obtenidos en este trabajo, a la práctica clínica habitual. A la luz de nuestros hallazgos, se propone una aplicación práctica en el manejo de esos marcadores farmacogenéticos.

En el momento actual, con la aprobación de los nuevos fármacos para el tratamiento del VHC, las terapias triples formarán parte de las nuevas opciones terapéuticas a escoger para nuestros pacientes.

La inclusión de los marcadores farmacogenéticos en los algoritmos de decisión de tratamiento, puede ser de gran ayuda para definir la mejor terapia para cada paciente.

Se trata de intentar poner en marcha una “medicina personalizada”, en que la predisposición genética de cada individuo, cuente a la hora de decidir las mejores opciones terapéuticas.

El primer paso es demostrar si realmente hay una asociación entre marcadores farmacogenéticos y RVS al tratamiento del VHC. Posteriormente en la discusión se comentan los resultados, y se propone su inclusión de los marcadores farmacogenéticos en los algoritmos de decisión del tratamiento.

D. PACIENTES Y MÉTODOS

D.1. Pacientes

Los pacientes incluidos en el estudio se seleccionaron de forma retrospectiva de la base de datos de pacientes coinfectados VIH/VHC del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona. El periodo de análisis evaluó todos los pacientes desde el año 2003 hasta el año 2010.

Criterios de selección de los pacientes:

D.1.1. Criterios de inclusión

Todos los pacientes son portadores de la infección crónica por el VIH y el VHC. La detección del VHC viene determinada por la presencia de anticuerpos anti-VHC, y la presencia de carga viral ARN-VHC, detectable al menos en dos determinaciones, separadas por seis meses. La presencia del VIH se constata por la presencia de anticuerpos anti-VIH.

Se acepta la inclusión de pacientes con cualquier genotipo VHC.

Solo se incluyeron en el estudio pacientes adultos *naïves* al tratamiento VHC, es decir, que nunca hubieran realizado tratamiento previo de su hepatitis C.

Todos los pacientes tienen al menos una determinación previa del grado de fibrosis hepática, mediante la realización de un fibroscan previa al tratamiento.

Los pacientes iniciaron tratamiento del VHC con interferón pegilado α -2a ó interferón pegilado α -2b en dosis estándar (180 μ g/semana o 1.5 μ g/kg/semana respectivamente, por vía subcutánea) más RBV en dosis ajustada al peso (1000 mg/día si peso < 75 kg y 1200 mg/día si peso \geq 75 kg).

La duración inicialmente prevista del tratamiento fue de 48 semanas. Los pacientes con una reducción de la carga viral expresada en log del ARN-VHC, menor a 2 log en semana 12 respecto la basal, o una carga viral ARN-VHC detectable en semana 24, interrumpieron el tratamiento de forma prematura y fueron considerados como no respondedores. Los pacientes con G3 y RVR cumplieron tan solo 24 semanas de tratamiento. Los pacientes con G1/4 sin RVR cumplieron 72 semanas de tratamiento.

Se exigió una buena adherencia al tratamiento, evaluada mediante la anamnesis en la historia clínica de los pacientes. Se exigió como mínimo haber cumplido 12 semanas de tratamiento.

Todos los pacientes debían tener muestras de ADN para el genotipado de los polimorfismos a nivel del gen de la *IL28B* y del gen de la *ITPA*, y debían haber firmado el consentimiento para uso de muestras de ADN y de plasma, de acuerdo con las normas del Comité Ético de nuestro Hospital.

D.1.2. Criterios de exclusión

No se han incluido los pacientes con un seguimiento menor de 12 semanas. Tampoco se han incluido pacientes con cualquier comorbilidad hepática asociada. Los pacientes con tratamiento TARGA no podían seguir tratamiento

con AZT y/o didanosina. No se incluyeron pacientes con Hb basal por debajo de 11 g/dl, con plaquetas basales inferiores a $90.000 \text{ } 10^4/\text{mm}^3$ y leucocitos basales inferiores a $2.500 \text{ } 10^3/\text{mm}^3$. El mínimo recuento basal de linfocitos CD4 exigido fue de $100 \text{ cel}/\text{mm}^3$.

Los pacientes fueron seguidos por sus respectivos médicos según la pauta habitual de control: analítica de control con carga viral ARN/VHC a la semana 4, y a la semana 12, con control cada 12 semanas hasta el final del tratamiento.

Las dosis de RBV se han modificado en función de los niveles de Hb. Las pautas habituales de reducción de las dosis de Hb son: se ha disminuido 200 mg de RBV (1 comprimido), cuando la Hb desciende por debajo de 12 g/dl. Cuando el descenso es por debajo de 10 g/dl se disminuye en 200 mg más la dosis de RBV. Cuando la Hb se sitúa por debajo de 8 g/dl el tratamiento debe suspenderse.

Tras la primera reducción de RBV, si los controles de Hb no se controlan de manera adecuada se recomienda habitualmente la administración de EPO, a dosis de 40.000 U/semanales por vía subcutánea.

D.2. Medida de parámetros analíticos fundamentales

D.2.1. Genotipo VHC

El genotipo del VHC se efectuó con una muestra de suero utilizando una técnica de amplificación seguida de un método comercial de hibridación inversa (Versant HCV Genotype 2.0 LiPA assay, Siemens, Barcelona, España). Este ensayo emplea la técnica de RT-PCR (retrotranscripción y amplificación) para la formación de un número elevado de copias de un fragmento de las regiones 5'UTR y core del ARN del VHC. A continuación, los amplicones resultantes se hibridan a sondas de oligonucleótidos inmovilizadas en una tira de nitrocelulosa, específicas de las regiones antes citadas. La detección del híbrido o híbridos resultantes se efectúa por colorimetría. El patrón de bandas resultantes se compara con una plantilla con el fin de saber de que genotipo o subtipo se trata.

D.2.2. Carga viral VHC

La carga viral del VHC se determinó por cuantificación del ARN viral (específicamente la región 5'UTR del ARN del VHC, que está altamente conservada) en plasma utilizando una técnica comercial de PCR a tiempo real (COBAS TaqMan 48, Roche, Barcelona, España), con un límite de detección de 10 UI/mL.

La carga viral se cuantificó en el momento basal y en las semanas 4, 12, 24 y 48, así como a las 24 semanas después de haber terminado el tratamiento. La presencia de carga viral VHC negativa en la semana 24 tras la finalización del tratamiento define la RVS.

Tabla D.1. *Equivalencias entre fibrosis hepática (Metavir) y Fibroscan.*

Fibrosis	Metavir	Fibroscan (kPa)
Ausente	F0	< 7,0
Mínima	F1	< 7,0
Moderada	F2	7,1-9,4
Severa	F3	9,5-13,9
Cirrosis	F4	≥ 14,0

Adaptado de Castera, 2005.

D.2.3. Carga viral del VIH

La carga viral del VIH se determinó en el momento basal, y durante el seguimiento del tratamiento del VHC. El método realizado fue por cuantificación del ARN viral en plasma utilizando una técnica comercial de bDNA (branched DNA assay; Versant VIH-1 RNA v3.0 Siemens, Barcelona, España) con un límite de detección de 20 copias de ARN-VIH/mL.

D.2.4. Recuento de linfocitos T CD4+

Se determinó el porcentaje de linfocitos T CD4+ con respecto al total de linfocitos con el anticuerpo CD45-FITC-CD4-RD1-CD8-ECD-CD3-PC5 (CYTO-STAT tetraCHROME, de Beckman Coulter) mediante citometría de flujo (Cytomics FC 500, Beckman Coulter, Miami, FL). El resultado se expresó en forma de cifra absoluta de células/ μ L de sangre y como porcentaje respecto al total de linfocitos.

D.3. Estudio de la fibrosis hepática

Fibrosis hepática

No se exigió la realización de la biopsia hepática, pero si la realización de fibroscan.

El grado de fibrosis hepática se estimó mediante elastometría de transición (FibroScan® Echosens, Paris, Francia). Se trata de un método de imagen que utiliza la vibración de baja frecuencia y ultrasonidos para medir la elasticidad hepática.

Se trata de un método incruento, sencillo de realizar. Precisa un personal formado y con experiencia.

La elastometría de transición ha sido validada y aprobada para estimar la fibrosis hepática en pacientes con infección VHC y también en pacientes con coinfección VIH/VHC (de Ledinghen, 2006; Macias, 2008).

La tabla D.1 describe la correlación entre la medida de la elasticidad hepática medida con FibroScan y los distintos estadios de fibrosis obtenidos con biopsia según la escala

METAVIR. La cirrosis se definió como rigidez del hígado ≥ 14.0 Kilopascales, kPa, que corresponde con un estadio $\geq F4$ en la escala Metavir (Castera, 2005).

D.4. Estudio genético

D.4.1. Extracción de ADN a partir de sangre periférica

La extracción de ADN de linfocitos a partir de sangre periférica se realiza por el método de precipitación salina (*salting out procedure*) de Miller (Miller, 1988).

El método de precipitación salina es uno de los métodos de extracción de ADN más utilizados por su fácil implementación, por la baja toxicidad de los reactivos y por qué permite la visualización del ADN. El ADN obtenido es de elevada pureza con ratios de absorbancia 260/280 de 1.8-2.0, que son indicativos de muy baja contaminación proteica.

D.4.2. Análisis molecular de SNPs con sondas TaqMan®

El genotipado de SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) se realiza mediante la técnica de discriminación alélica con sondas TaqMan®.

La técnica de discriminación alélica con sondas TaqMan® discrimina entre las dos variantes génicas (alelos) de un SNP. Utiliza la actividad 5' nucleasa de la ADN polimerasa, dos primers específicos para amplificar la secuencia que contiene al SNP de estudio, y dos sondas de hidrólisis TaqMan® específicas de alelo. Cada una de las sondas tiene un *quencher* (aceptor de fluorescencia) en su extremo 3' y un fluorocromo (emisor de fluorescencia) en el 5', que es VIC para la sonda que identifica al alelo 1 y FAM para la sonda que identifica al alelo 2 (Figura D.1).

La amplificación del fragmento de ADN se realiza mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) a tiempo real con el ABIPrism 7000 *Sequence Detection System*. Durante la fase de hibridación-extensión cada sonda se hibrida de forma específica al fragmento de ADN, la ADN polimerasa sintetiza la cadena complementaria y al llegar al punto en el que la sonda se ha hibridado la degrada, lo que provoca una emisión de fluorescencia debido a que el *quencher* ya no se encuentra en las proximidades del fluorocromo. La fluorescencia emitida se detecta mediante una cámara CCD.

Esta técnica es útil para estudios que requieren el genotipado de pocos SNPs en muchas muestras.

En la interpretación de los resultados obtenidos (Figura D.2) es útil disponer de controles internos. Éstos son:

- 3 ADNs de los cuales se conoce su genotipo por secuenciación automática. El genotipo de los ADNs ha de ser: normal, heterocigoto y homocigoto mutado para el SNP de estudio
- Un control negativo para descartar posibles contaminaciones. Éste consiste en utilizar agua estéril como muestra

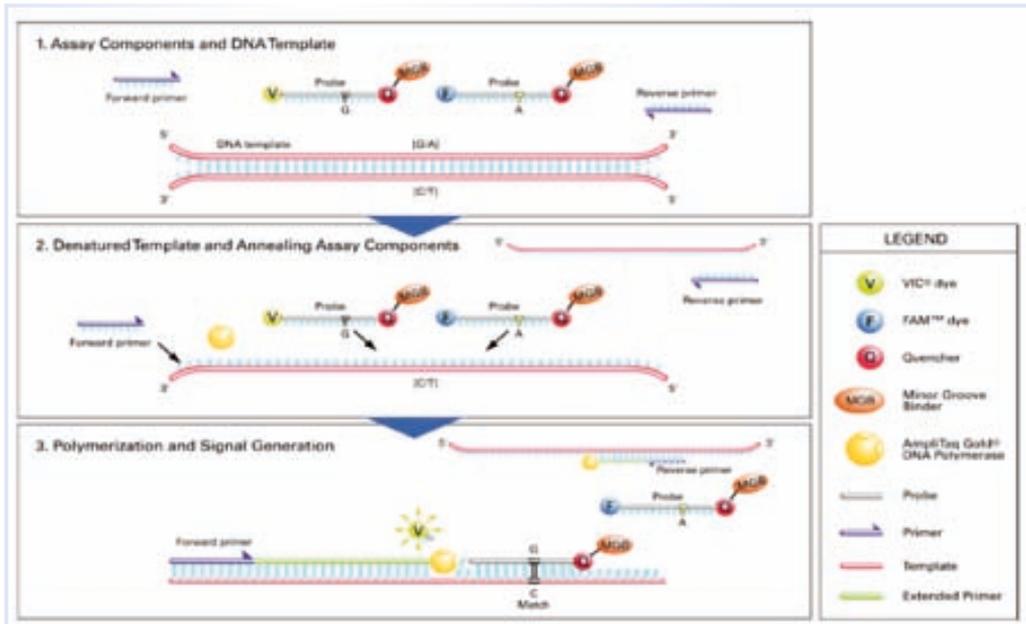


Figura D.1. Esquema de la reacción (Applied Biosystem)

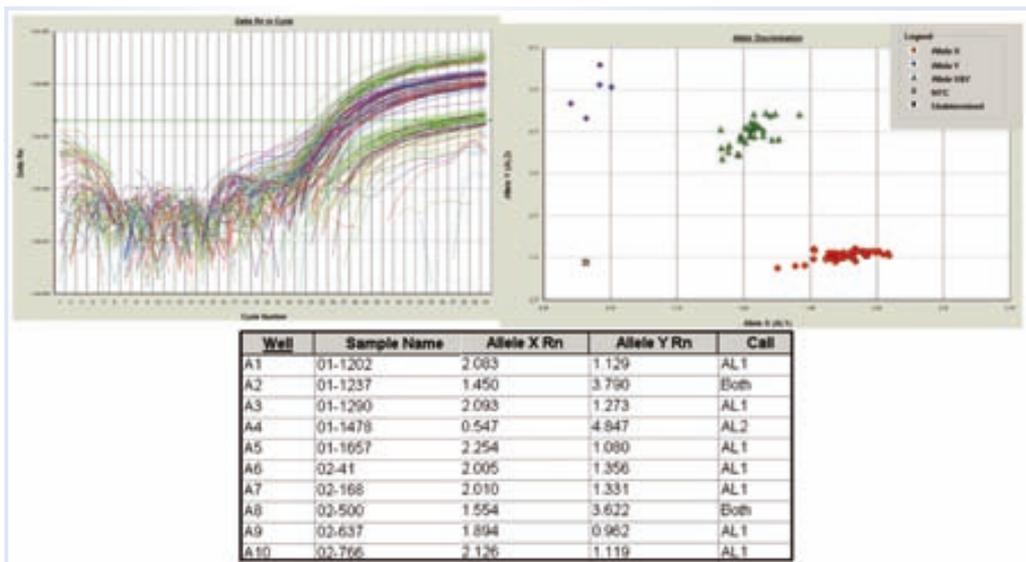


Figura D.2. Ejemplo de resultado obtenido mediante discriminación alélica en el ABIPrism 7000 Sequence Detection System. **A:** Curvas de PCR a tiempo real. **B:** Diagrama en el que se representa el resultado en un eje cartesiano. **C:** Tabla de resultados en la que se indica la fluorescencia.

Tabla D.2. Secuencia de los primers y tamaños de los fragmentos de PCR (F: forward; R: reverse; pb: pares de bases).

Gen/dbSNP	Primer	Secuencia primers 5' – 3'	Tamaño fragmento PCR (pb)
ITPA rs1127354	F	ATGAGAAAGGCGGATGACAG	236
	R	CGGCACTTATCAGGGAAACA	
ITPA rs7270101	F	AGGTCGTTTCAGATTCTAGGAG	206
	R	GCCTCCTGACATTTCTGTATG	
IL28B rs12979860	F	TGGATGGGTTACTGGCAGCGC	247
	R	AGGCGCCTCTCCTATGTCAGC	

D.4.3. Secuenciación de controles positivos para los SNPs de estudio

La técnica de discriminación alélica con sondas TaqMan[®] requiere de unos controles positivos validados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior secuenciación automática.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación selectiva de regiones específicas del ADN *in vitro*. A partir de un molde de cadena sencilla la ADN polimerasa sintetiza la cadena de ADN complementaria. La ADN polimerasa requiere de unos iniciadores (*primers*), que son una pareja de oligonucleótidos sintéticos complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de ADN a amplificar.

En el diseño de los *primers* se utiliza la información publicada de los SNPs de estudio en la base de datos dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). En la tabla D.2 se detallan las secuencias de los *primers* utilizados.

La PCR consiste en la repetición de un ciclo formado por tres etapas: 1) desnaturación del ADN de doble cadena; 2) hibridación de los *primers* al extremo 3' específico; 3) elongación de la cadena a partir del *primer* por acción de la ADN polimerasa. Las condiciones utilizadas han sido: un ciclo de 94°C 4 minutos, 30 ciclos de 94°C 30 segundos, 60°C 30 segundos, 72°C 30 segundos y una extensión final de 72°C 3 minutos. En la tabla D.2 se especifica el tamaño de los fragmentos amplificados.

A partir del producto de PCR se realiza la reacción de secuenciación. Para ello se utiliza una mezcla de desoxinucleótidos y didesoxinucleótidos marcados con fluorocromos. Los didesoxinucleótidos se incorporan en lugar de los correspondientes desoxinucleótidos en cada posición de la cadena que está siendo sintetizada. La incorporación de un

didesoxinucleótido bloquea la elongación de la cadena, así se obtienen una serie de fragmentos de ADN truncados de diferente longitud. La separación de los diferentes fragmentos se realiza mediante electroforesis por capilaridad, que se lleva a cabo en un *ABI Prism 3100 genetic analyzer* (Applied Biosystems). La utilización del marcaje fluorescente permite la detección del ADN durante la electroforesis.

D.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se ha realizado con el programa SPSS (V 19.0). (IBM SPSS Inc., Chicaco, IL, EEUU). Todos los valores de p fueron bilaterales y se consideraron estadísticamente significativos cuando eran inferiores a 0,05.

A través de la inspección visual de las tablas de distribución de frecuencias, se evaluó la existencia de clara anormalidad, tomando logaritmo en las variables más sesgadas, permitiendo así la aproximación paramétrica para dichas variables.

Las principales características de la población de estudio y los diferentes parámetros evaluados se expresaron en valores absolutos y porcentajes en el caso de variables categóricas y en las cuantitativas, se facilitó el valor medio con su desviación típica.

ANÁLISIS UNIVARIADO

Las variables categóricas se compararon entre si con el test chi-cuadrado o test exacto de Fischer según correspondiera, en función de la existencia de celdas con baja frecuencia. Las variables cuantitativas relacionadas con la RVS, se compararon con el test de "t".

Las variables categóricas se compararon con un análisis de la varianza o test de "t" según el número de grupos a comparar. Las variables cuantitativas se compararon entre si, mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

ANÁLISIS MULTIVARIADO

Para analizar la influencia de distintas variables sobre la disminución de Hb, se realizaron análisis de regresión lineal múltiple.

Para analizar la influencia de distintas variables sobre la RVS se realizaron análisis de regresión logística.

Todas aquellas variables que en los análisis bivariantes quedaron con valor significativo ($p < 0.05$) fueron incluidas en el análisis multivariante. Se empleó el método forward para la elección de las variables, empleando el test de Hosmer-Lemeshow para la bondad de ajuste y el AUC de la curva ROC como índice de discriminación.

E. RESULTADOS

E.1. Población global

En la actualidad en nuestro hospital seguimos a 451 pacientes con la coinfección VIH/VHC. Hasta julio del año 2011, disponemos de muestra de ADN de 316 pacientes (70% de la población global) a los que se les ha determinado el genotipo de los genes *ITPA* e *IL28B*.

De un total de 451 pacientes coinfectados, 121 pacientes han sido tratados del VHC (26% de nuestra población). Definimos como pacientes tratados aquellos que han realizado como mínimo 12 semanas de tratamiento. Hasta el momento disponemos de muestra de ADN en 73 de los 121 (60%) pacientes tratados (Figura E.1).

Los datos que se presentan en el apartado de resultados de esta tesis se corresponden a los 73 pacientes coinfectados por VIH-VHC, que han sido tratados por el VHC y de los que se dispone de datos clínicos y genéticos.

E.2. Cumplimiento del tratamiento

En este estudio se han incluido 73 pacientes, con una media de duración del tratamiento PEF.IFN/RBV de $9,6 \pm 3,7$ (rango: 3-18) meses. De ellos, 56 (76,7%) completaron al menos un 80% de la duración prevista del tratamiento con PEG-IFN/RBV. El 23,3% de pacientes que no completaron el tratamiento lo mantuvieron una media de $5,8 \pm 1,1$ (rango: 3-8) meses.

El cumplimiento del tratamiento fue significativamente mayor en los pacientes con genotipo 3 del VHC. De los 17 pacientes (23.3%) que no completaron el tratamiento, todos son portadores del G1/4 del VHC (OR 1,44; IC95%: 1,21-1,75; P = 0,008). Tabla E.1.

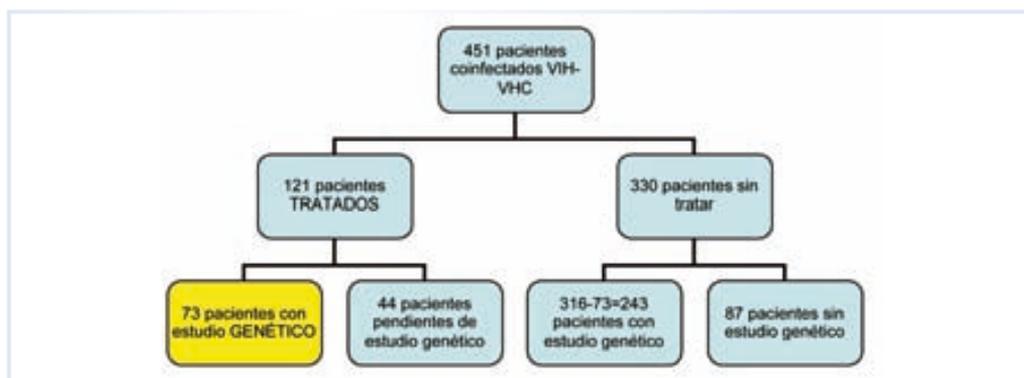


Figura E.1. *Pacientes incluidos en la muestra.*

Tabla E.1. *Cumplimiento del tratamiento completo y genotipo VHC*

			Duración Completa del tratamiento		Total
			No	Si	
GEN VHC	Gen 1/4	Recuento %	17 30,9%	38 69,1%	55 100,0%
	Gen 3	Recuento %	0 ,0%	18 100,0%	18 100,0%
Total		Recuento %	17 23,3%	56 76,7%	73 100,0%

Tabla E.2. *Tratamiento completo y RVS*

			RVS		Total
			No	Si	
Trata.Comp	No	Recuento %	16 94,1%	1 5,9%	17 100,0%
	Si	Recuento %	18 32,1%	38 67,9%	56 100,0%
Total		Recuento %	34 46,6%	39 53,4%	73 100,0%

E.2.1. Cumplimiento correcto del tratamiento y RVS

De los 56 pacientes que completaron el tratamiento, 38 (67.9%) consiguieron RVS. Tan solo un paciente que no completó el tratamiento alcanzó RVS (OR 33,778; IC95%: 4,150-274,920; p = 0.001).Tabla E.2.

E.3. estudio bivariado de la respuesta vírica sostenida (RVS)

En este apartado analizamos los resultados obtenidos de RVS en función de:

1. el polimorfismo rs12979860 (C>T) del gen *IL28B*
2. el polimorfismo rs1127354 del gen *ITPA*
3. el genotipo del VHC
4. la carga viral basal VHC
5. la presencia de cirrosis

Tabla E.3. Comparación de los genotipos rs12979860 IL28B en la población global VHC/VIH vs la muestra estudiada

		IL28B rs12979860			Total
		C/C	C/T	T/T	
	No tratados	113	105	25	243
	%	46,7%	43,4%	9,9%	100,0%
	Tratados	30	36	7	73
	%	41,1%	47,9%	11%	100,0%
Total	Recuento	143	141	32	316
	%	45,7%	44,4%	9,8%	100,0%

6. el sexo, la edad y el IMC

7. la respuesta viral rápida (RVR): aquellos pacientes que presentan carga viral VHC indetectable tras solo 4 semanas de tratamiento

8. la modificación de las dosis de RBV secundarias a la presencia de anemia

E.3.1. Genotipo rs12979860 IL28B y RVS

E.3.1.1. CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA EN FUNCIÓN DEL GENOTIPO

RS12979860 IL28B

La distribución de las variantes alélicas rs12979860/IL28B de los 73 pacientes que definen la población analizada en este trabajo es exactamente igual que la de la población total de pacientes coinfectados. Por lo tanto no existe un sesgo de selección de la muestra ($p = 0,7$). Tabla E.3.

Como se ha citado previamente, el genotipo para rs12979860 IL28B puede ser: homocigoto normal CC, heterocigoto CT y homocigoto mutado TT. El análisis estadístico se realizará comparando a los pacientes con genotipo CC, considerado como genotipo protector (favorece la RVS), frente a los pacientes portadores del alelo T, heterocigoto CT y homocigoto mutado TT, de manera conjunta.

Los datos basales de los 73 pacientes estudiados se incluyen en la tabla E.4. Se compara las dos poblaciones analizadas: genotipo CC vs genotipo CT/TT, mostrando la existencia de diferencias significativas entre las dos poblaciones.

Un análisis pormenorizado de los datos basales nos muestra que las dos poblaciones comparadas no presentan diferencias significativas en cuanto a los múltiples datos analizados. Solo hay una excepción: la variante alélica CC se asocia con la presencia del G3 VHC (66,7% en G3 vs 32,7% en G1/4; OR 4,1; IC95%:1,32-12,73; $p = 0,014$). Tabla E.5.

Tabla E.4. Datos basales de la población en función del genotipo CC vs CT/TT del rs12979860 IL28B

	Población total	CC	CT/TT	P
N	73	30 (41,1%)	43 (58,9%)	
Edad (años)	46,82	46,90	46,77	0,92
Varones n(%)	43(58%)	22 (73,8%)	21 (48,8%)	0,53
IMC (kg/m ²)	22,86	22,61	23,02	0,69
Años evolución VIH	15,89	15,00	16., 4	0,30
Transmisión VIH				0,54
MsM (%)	11 (15,16)	3(10,00)	8(18,65)	
HTSX (%)	20 (27,47)	8(26,00)	12(27,98)	
ADVP (%)	42 (57,57)	19(63,36)	23(53,55)	
Nadir CD4 (cells/mm ³)	223,95	235,19	214,47	0,63
CD4 Actuales (cel/mm ³)	513,73	497,17	526,70	0,64
Zenit CV VIH (log ₁₀ copias/ml)	5,24	5,10	5,60	0,09
CV VIH Actual (log ₁₀ copias/ml)	4,35	4,67	3,34	0,30
Tratamiento TARGA (%)	86,7	93,3	81,4	0,18
Tratamiento VHC completo (%)	76,7	86,7	69,8	0,15
Cirrosis (%)	30,1	30,0	30,2	1
Fibroscan (kPa)	10,78	11,25	10,46	0,78
Genotipo VHC (1&4/3) (%)	55/18 (75,3/24,7)	18/12(60/40)	37/6(86/14)	0,01
Carga viral Basal VHC (log IU/ml)	6,13	6,01	6,21	0,22
ALT basal (IU/l)	63,62	74,37	55,13	0,08
Plaquetas basales(x 10 ⁴ /mm ³)	162,84	163,67	162,54	0,87
Leucocitos basales(x 10 ⁴ /mm ³)	5,41	5,33	5,47	0,67
Bilirrubina actual (μmol/L)	10,77	10,39	11,09	0,72
Albumina (g/L)	43,45	43,72	43,22	0,67
Genotipos rs54 ITPA				0,37
CC, n(%)	59 (80,89)	26(86,71)	33(76,70)	
CA + AA,n(%)	14(19,28)	4(13,31)	10(23,34)	

Tabla E.5. Presencia de los genotipos CC/CT/TT en función del genotipo VHC

			rs12979860 IL28B		Total
			CT/TT	CC	
GEN VHC	Gen 1/4	Recuento %	37 67,3%	18 32,7%	55 100,0%
	Gen 3	Recuento %	6 33,3%	12 66,7%	18 100,0%
Total		Recuento %	43 58,9%	30 41,1%	73 100,0%

Tabla E.6. RVS en función de los genotipos CC/CT/TT del rs12979860 IL28B

			RVS		Total
			No	Si	
rs12979860 IL28B	CT/TT	Recuento %	25 58,1%	18 41,9%	43 100,0%
	CC	Recuento %	9 30,0%	21 70,0%	30 100,0%
Total		Recuento %	34 46,6%	39 53,4%	73 100,0%

E.3.1.2. INFLUENCIA DE LAS VARIANTES ALÉLICAS DE RS12979860 IL28B (CC vs CT/TT) EN LA RVS

El estudio bivariado muestra asociación entre la presencia del genotipo CC del rs12979860 y la RVS. Los resultados globales de RVS en nuestra población son del 53,4% (39/73). En pacientes con genotipo CC la RVS incrementa hasta el 70%. En los pacientes con genotipo rs12979860 TT/CT la RVS, tan solo es del 41.9%. (OR 3.24; IC95% 1,20-8,70; $p = 0.031$). Tabla E.6.

E.3.2. Influencia del genotipo rs1127354 ITPA (CC vs CA/AA) en la RVS

La RVS se asocia con la presencia del genotipo CA/AA del gen de la ITPA. El genotipo para rs1127354 ITPA puede ser: homocigoto normal CC, heterocigoto CA y homocigoto mutado AA. El análisis estadístico se realizará comparando a los pacientes con

Tabla E.7. RVS en función de los genotipos CC/CA-AA del rs1127354 ITPA

			RVS		Total
			No	Si	
rs1127354	CC	Recuento %	31 52,5%	28 47,5%	59 100,0%
	CA/AA	Recuento %	3 21,4%	11 78,6%	14 100,0%
Total		Recuento %	34 46,6%	39 53,4%	73 100,0%

genotipo CC frente a los pacientes portadores del alelo A minoritario (heterocigoto CA y homocigoto mutado AA).

En los portadores del alelo A el porcentaje de RVS es del 78,6% (11/14). En los pacientes con genotipo CC la RVS es del 47,5% (28/59) (OR: 4,060; IC95% 1,026-16,057; $p = 0,042$).Tabla E.7.

E.3.3. Influencia del genotipo VHC en la RVS

En los pacientes con genotipo 3, se consiguió un 88,9% de RVS (16/18). En los pacientes con genotipo 1 y 4 la RVS es del 41,8% (23/55) (OR: 11,130; IC95% 2,328-53,210; $p = 0.001$). (Tabla E.8).

Sobre el total de la población la presencia de G3 es del 24,7%. Del global de pacientes con RVS (39/73): 23/39 (59%) son G1/4, y 16/39 (41%) son G3.

Tabla E.8. GEN VHC y RVS

			RVS		Total
			No	Si	
genotipo VHC	Gen 1/4	Recuento %	32 58,2%	23 41,8%	55 100,0%
	Gen 3	Recuento %	2 11,1%	16 88,9%	18 100,0%
Total		Recuento %	34 46,6%	39 53,4%	73 100,0%

Tabla E.9. Carga viral ARN-VHC basal y RVS

			RVS		Total
			No	Si	
CV VHC	Carga viral alta	Recuento %	25 51,0%	24 49,0%	49 100,0%
	Carga viral baja	Recuento %	9 37,5%	15 62,5%	24 100,0%
Total		Recuento %	34 46,6%	39 53,4%	73 100,0%

E.3.4. Influencia de la carga viral basal ARN-VHC en la RVS

Los pacientes con RVS presentaban una carga viral ARN-VHC basal significativamente más baja que los pacientes sin RVS: la CV VHC basal media en pacientes con RVS fue de $5,9 \pm 0,59$ log vs $6,3 \pm 0,67$ log en los pacientes sin RVS ($p = 0,038$).

Para poder realizar un estudio cualitativo hemos dividido la carga viral ARN-VHC basal en dos grupos:

1. definimos a los pacientes con una carga viral basal baja a aquellos con valores por debajo de 800.000 UI/mL ($\leq 5,9$ log).
2. los pacientes con carga viral basal alta se sitúan con valores RNA-VHC por encima de 800.000 UI/mL (> 6 log).

Al comparar la RVS en estas dos muestras no encontramos diferencias estadísticamente significativas, a pesar de que la diferencia porcentual de RVS entre ambos grupos es del 23,5% (OR 1,736; IC95%: 0,640-4,711; $p = 0,32$). Tabla E.9.

E.3.5. Influencia de la presencia de cirrosis en la RVS

La RVS se da en un 53,4% de los pacientes. La RVS se da en un porcentaje mayor de pacientes sin cirrosis hepática (CH): 54,9 % sin CH vs 50% con CH, aunque sin diferencias estadísticamente significativas (OR 0,82; IC95% 0,30-2,23; $p = 0,8$). Tabla E.10.

E.3.6. Influencia del sexo, la edad y el IMC en la RVS

Al comparar la presencia de RVS en función del sexo no se han hallado diferencias estadísticamente significativas. (OR: 0,8; IC95% 0,31-2,36; $p = 0,81$). Tabla E.11.

La edad media de los pacientes con RVS es de $46,77 \pm 4,08$ años vs $46,99 \pm 6,7$ años de los pacientes que no consiguen RVS ($p = 0,9$). El IMC es de $22,80 + 4,98$ para pacientes con RVS, y de $22,93 + 3,14$ para los pacientes que no consiguen RVS ($p = 0,9$).

Tabla E.10. RVS en función de la presencia de cirrosis

			RVS		Total
			No	Si	
Cirrosis	No	Recuento %	23 45,1%	28 54,9%	51 100,0%
	Si	Recuento %	11 50,0%	11 50,0%	22 100,0%
Total		Recuento %	34 46,6%	39 53,4%	73 100,0%

Tabla E.11. Influencia del sexo en la RVS.

			RVS		Total
			No	Si	
Sexo	Mujer	Recuento %	13 43,3%	17 56,7%	30 100,0%
	Hombre	Recuento %	21 48,8%	22 51,2%	43 100,0%
Total		Recuento %	34 46,6%	39 53,4%	73 100,0%

E.3.7. Influencia de la RVR en la RVS

22/73 (30,1%) pacientes consiguen negativizar la carga viral VHC tras las primeras 4 semanas de tratamiento, lo que denominamos RVR. De los 22 pacientes con CV negativa a la semana 4, 20 (90%), presentan RVS (OR: 16,84; IC95% 3,53-80,18; $p < 0,0001$). Tabla E.12.

Al analizar la RVR en función de los genotipos rs12979860 *IL28B*, detectamos una asociación significativa entre la RVR y la variante alélica CC (OR: 2,88, IC95% 1,03-8,09; $p = 0,037$). Tabla E.13. No se objetiva asociación entre la RVR y las variantes alélicas rs1127354 en el gen de la *ITPA*.

La RVR también se asocia de manera significativa con la presencia del G3 vs G1/4 (55,6 vs 21,8%; OR 4,47; IC95% 1,44-13,84; $p = 0,01$). No existe asociación entre la carga viral basal VHC, la edad y sexo, la presencia de cirrosis, el IMC con la adquisición de la RVR.

Tabla E12. Relación entre la RVR y la RVS

			RVS		Total
			No	Si	
RVR	No	Recuento %	32 62,7%	19 37,3%	51 100,0%
	Si	Recuento %	2 9,1%	20 90,9%	22 100,0%
Total		Recuento % dentro de RVR	34 46,6%	39 53,4%	73 100,0%

Tabla E.13. Asociación entre la RVR y los genotipos rs12979860 *IL28B*

			rs12979860 <i>IL28B</i>		Total
			CT/TT	CC	
RVR	No	Recuento %	34 66,7%	17 33,3%	51 100,0%
	Si	Recuento %	9 40,9%	13 59,1%	22 100,0%
Total		Recuento % dentro de RVR	43 58,9%	30 41,1%	73 100,0%

E.3.8. Modificación de la dosis de RBV y RVS

Los pacientes que precisan reducir las dosis de RBV debido a la anemia presentan un menor porcentaje de RVS (OR: 3,87; IC95% 1,38-10,86; p = 0,008). Tabla E.14.

E.4. Análisis Multivariado

Se ha realizado el análisis multivariado con aquellas variables que han mostrado significación estadística en el análisis bivariado: el polimorfismo rs1127354 *ITPA* (CC vs AC/AA), el polimorfismo rs12979860 *IL28B* (CC vs CT/TT), el genotipo viral VHC (G3 vs G1/4), la carga viral basal VHC expresada en escala logarítmica, la RVR, y la modificación de las dosis de RBV.

No se ha incluido en el estudio multivariante la presencia de cirrosis, la edad, el sexo, ni el IMC, ya que no muestran asociación estadísticamente significativa en el estudio univariado.

Tabla E14. Relación entre la RVS y la disminución de las dosis de RBV

			RVS		Total
			No	Si	
Ajuste RBV	No	Recuento %	17 35,4%	31 64,6%	48 100,0%
	Si	Recuento %	17 68,0%	8 32,0%	25 100,0%
Total		Recuento % dentro de ajuste RBV	34 46,6%	39 53,4%	73 100,0%

La bondad de ajuste del modelo final se ha evaluado mediante el test de Hosmer-Le-meshow. El poder discriminador de las variables analizadas se ha evaluado calculando el AUC de la curva ROC.

E.4.1. Estudio multivariado de la RVS incluyendo seis variables

En este análisis multivariado se estudian 66 de los 73 pacientes, ya que se han perdido siete pacientes de los cuales no tenemos la carga viral VHC basal.

En el análisis entre las seis variables seleccionadas, la modificación de la dosis de RBV (OR: 3,99; IC95%: 1,08-14,75; $p = 0,038$), el genotipo VHC (OR: 7,14; IC95% 1,14-40,00; $p = 0,035$) y la presencia de RVR (OR: 10,41; IC95%: 1,96-55,55; $p = 0,006$), se muestran como factores predictivos independientes asociados a la RVS.

E.4.2. Estudio multivariado de la RVS incluyendo cinco variables

Para incluir los 73 pacientes se ha realizado un estudio multivariado en el que se ha eliminado la variable carga viral VHC basal. Por lo tanto se consideran las tres variables relacionadas con la variabilidad genómica (dos del en el genoma del paciente, y una en el genoma del virus): el polimorfismo rs1127354 *ITPA* (CC vs CA/AA), el polimorfismo rs12979860 *IL28B* (CC vs CT/TT) y el genotipo viral VHC (G3 vs G1/4). Las otras dos variables son la RVR y la modificación de las dosis de RBV.

Nuevamente, la RVR (OR: 13,33; IC95%: 2,56-71,42; $p = 0,002$) es el dato analítico con mayor peso en el análisis multivariado. La influencia del genotipo viral VHC (OR: 8,33; IC95% 1,40-43,78; $p = 0,019$) y la modificación en las dosis de RBV (OR: 3,62; IC95%: 1,02-12,84; $p = 0,046$) son factores independientes asociados a la RVS. Las variantes alélicas analizadas, tanto en el gen de la *ITPA* como en el gen de la *IL28B*, no alcanzan significación estadística en el análisis multivariado.

Las tres variables independientes relacionadas con la RVS obtenidas en el estudio multivariado tienen un peso indiscutible. No obstante, para analizar el peso de las variables farmacogenéticas prescindiremos de estas tres variables en los análisis sucesivos. Prescindiremos de la RVR ya que se trata de un factor predictivo relacionado con el tratamiento, mientras este se administra. Es decir, no se trata de un factor predictivo basal. Lo mismo sucede con la modificación de las dosis de RBV. De la misma manera que no hemos incluido en el análisis multivariado la variable “buen cumplimiento”, a partir de ahora prescindiremos de la variable RVR y de la variable “modificación de las dosis de RBV”.

Por otro lado, dada la significativa asociación entre los pacientes con G3 del VHC y la presencia de la variante alélica CC del rs12979860 *IL28B*, parece oportuno analizar solo uno de estos dos parámetros.

E.4.3. Estudio multivariado de la RVS incluyendo dos variables farmacogenéticas

El estudio multivariado con 66 pacientes, en el que se incluyen las dos variables farmacogenéticas y la carga viral basal VHC, no acepta la carga viral basal como factor independiente asociado a la RVS.

Se ha realizado el análisis multivariado en toda la población (73 pacientes) considerando únicamente las dos variables farmacogenéticas, el polimorfismo rs1127354 *ITPA* (CC vs AC/AA) y el polimorfismo rs12979860 *IL28B* (CC vs CT/TT). Los resultados muestran que la combinación de los dos polimorfismos se asocia de manera significativa con la RVS. La OR para el genotipo protector CC, de rs12979860 *IL28B* es de 4,17 (IC95% 4,14-4,20; $p = 0,008$). Y para el genotipo protector CA/AA de rs1127354 *ITPA* la OR es del 5,71 (IC95% 5,66-5,76; $p = 0,019$).

E.4.4. Estudio multivariado de la RVS incluyendo dos variables farmacogenéticas en los pacientes con genotipo viral VHC 1/4

Para evitar la influencia del genotipo viral del VHC, se han analizado únicamente los pacientes con genotipo 1/4. Es decir, hemos eliminado los pacientes con G3, que presentan una respuesta viral sostenida mayor del 80% y que además se asocian de manera significativa con la variante alélica CC rs12979860 *IL28B*. La “n” muestral resultante es de 55 pacientes.

Un primer estudio bivariado analiza la influencia de las variantes alélicas del polimorfismo rs12979860 *IL28B* sobre la RVS. Un porcentaje significativamente mayor de pacientes con genotipo CC presenta RVS (OR 3.27; IC95% 1.05-110.56; $p = 0,04$). El genotipo CC es un factor pronóstico de buena respuesta. Tabla E.15.

Un segundo análisis bivariado evalúa la influencia de las variantes rs1127354 *ITPA* sobre la RVS, solo en la población con G1/4. En pacientes con el alelo protector del

Tabla E15. RVS en función de los genotipos CC/CT-TT del rs12979860 IL28B, en pacientes con genotipo 1/4 del VHC

			RVS		Total
			No	Si	
rs12979860	CT/TT	Recuento %	25 67,6%	12 32,4%	37 100,0%
	CC	Recuento %	7 38,9%	11 61,1%	18 100,0%
Total		Recuento %	32 58,2%	23 41,8	55 100,0

polimorfismo rs1127354 *ITPA* (CA/AA) la RVS llega hasta el 66%. Los resultados muestran una tendencia clara, con una diferencia porcentual de RVS del 28,6%, a favor de los genotipos portadores del alelo “A”, aunque no se alcanza significación estadística (OR: 3,41 IC 95%: 0,75-15,43; p = 0,1), probablemente debido al tamaño de muestra. Tabla E.16.

El análisis multivariado de los 55 pacientes con G1/4, incluye la presencia del genotipo CA/AA a nivel del gen de la *ITPA*, y también el gen de la *IL28B*. Ser portador de la variante CC del rs12979860 en el gen de la *IL28B* es un factor independiente de buena respuesta (OR: 3,27; IC 95% 1,01-10,56; p = 0.047), por encima del gen de la *ITPA*, que -sin lograr una significación estadística- si muestra una clara tendencia respecto a la RVS. (p = 0.052).

Tabla E16. RVS en función de los genotipos CC/CA-AA del rs1127354 *ITPA* (Población de pacientes con G1/4)

			RVS		Total
			No	Si	
ITPA rs 1127354	C/C	Recuento %	29 63,0%	17 37,0%	46 100,0%
	C/A	Recuento %	3 33,3%	6 66,7%	9 100,0%
Total		Recuento %	32 58,2%	23 41,8%	55 100,0%

E.4.5. Análisis final sobre los factores que afectan a la RVS

La bondad de ajuste del modelo final se ha evaluado mediante el test de Hosmer-Le-meshow. La $p = 0,80$ en este análisis confirma como óptimo el modelo final.

Como resumen de estos datos podemos concluir que tanto el *IL28B* como el *ITPA* están relacionados con la RVS. El índice de discriminación de las dos variables farmacogenéticas aceptadas en este modelo ha sido de 0,70 (0,58-0,82) (área bajo la curva de la curva ROC) siendo claramente significativo ($p = 0,003$).

Es importante aclarar que el gen de la *IL28B* tiene un mayor peso como factor predictor de la RVS, situándose por encima del gen de la *ITPA*. Ello se deduce al calcular el índice de discriminación, tras realizar la curva ROC, aportando tan solo los datos del gen de la *ITPA*: es de 0,58 (IC95%: 0,42-0,74) sin mostrar significación estadística ($p = 0,2$). El índice de discriminación tras realizar la curva ROC, aportando tan solo los datos del gen de la *IL28B* es de 0,63 (IC95% 0.50-0,76; $p = 0,02$).

Tras los múltiples análisis realizados podemos concluir que el factor que más se asocia con la RVS es la presencia de una RVR y del G3 VHC. También se asocian de manera significativa con la RVS las variantes alélicas protectoras del gen de la *ITPA* y del gen de la *IL28B*, con los matices ya comentados y que se detallan en la discusión.

E.5. Estudio de la anemia asociada al tratamiento del VHC

E.5.1. Caracterización de la muestra en función del polimorfismo rs1127354 ITPA

Las características basales de la población, así como los datos agrupados según el genotipo de rs1127354 *ITPA*, se muestran en la siguiente tabla (E.17).

Al comparar las dos poblaciones no se encuentran diferencias estadísticamente significativas, exceptuando la diferencia objetivada a nivel de las plaquetas basales. La diferencia en las plaquetas basales se halla en cualquier caso en rangos que caen en su mayoría dentro de la normalidad.

Los porcentajes de los genotipos CC y CA/AA para rs1127354/*ITPA* fueron del 80,8% y del 19,2%, respectivamente. Las frecuencias del polimorfismo en los pacientes analizados en este estudio no difieren de las frecuencias objetivados en la población completa de todos los pacientes co-infectados VIH/VHC analizados en nuestro hospital. (OR 1,5; IC95% 0.8-2.9; $p = 0.18$). Por lo tanto, no existe sesgo en la elección de la cohorte analizada. Tabla E.18.

E.5.2. Caracterización de la muestra en función del polimorfismo rs7270101 ITPA

Las características basales de la población global, comparándola con los genotipos para rs7270101 *ITPA*, se muestran en la siguiente tabla (E.19).

Tabla E.17. *Pacientes incluidos en el estudio. Comparación entre las características basales y los genotipos CC y CA/AA a nivel del rs1127354 ITPA*

	Total	CC	CA/AA	P
N(%)	73 (100)	59 (80,8)	14 (19,2)	
Edad (años)	46,82	46,75	47,14	0,80
Varones n(%)	43 (58,9)	35 (59,3)	8 (57,1)	1,00
IMC (kg/m ²)	22,86	22,60	23,88	0,31
Años evolución VIH	15,89	15,98	15,50	0,81
Transmisión VIH				0,40
MsM (%)	11 (15,1)	8 (13,6)	3 (21,4)	
HTSX (%)	20 (27,4)	18 (30,5)	2 (14,3)	
ADVP (%)	42 (57,5)	33 (55,9)	9 (64,3)	
Nadir CD4 (células/mm ³)	223,95	211,45	271,37	0,26
CD4 Actuales (cel/mm ³)	513,73	515,75	505,24	0,89
Zenit CV VIH (log ₁₀ copias/ml)	5,24	5,13	5,48	0,16
CV VIH Actual (log ₁₀ copias/ml)	4,35	4,45	1,27	0,60
Carga viral VIH <19(%)	58 (79,4)	46 (77,9)	12 (85,7)	0,77
Tratamiento TARGA (%)	86,7	84,7	92,9	0,67
Años evolución VHC	15,26	15,98	15,50	0,86
Genotipo VHC (1&4/3) (%)	55/18 (75,3/24,7)	46/13 (78,0/22,3)	9/5 (64,3/35,7)	0,31
Cirrosis (%)	30,1	32,2	21,4	0,32
Fibroscan (Kpa)	10,78	10,08	13,76	0,29
Tratamiento VHC completo (%)	76,7	72,99	92,9	0,16
ALT basal (IU/l)	63,62	62,39	68,36	0,28
Hb basal (g/dl)	14,4	14,6	13,9	0,15
Hb basal <13 g/dl (%)	12(16,4)	8(13,6)	4(28,6)	0,44
Plaquetas basales(x 10 ⁴ /mm ³)	162,84	157,93	183,93	0,048
Leucocitos basales(x 10 ⁴ /mm ³)	5.416	5.380	5.568	0,65
Bilirrubina actual (μmol/L)	10,77	10,71	11,00	0,90
Albumina (g/L)	43,45	44,00	41,19	0,05
Carga Viral Basal VHC (log IU/ml)	6,13	6,17	5,97	0,31
Genotipos rs60 IL28B				0,52
CC, n(%)	30 (41,4)	26 (44,1)	4 (28,6)	
CT + TT,n(%)	43 (58,9)	33 (55,9)	10 (58,9)	

Tabla E18. Comparación entre los porcentajes de los genotipos de rs1127354 ITPA entre el total de la población y la población estudiada.

			rs1127354		Total
			CC	CA/AA	
	Pacientes del estudio	n	59	14	73
		%	80,8%	19,2%	100,0%
	Pacientes del estudio	n	178	65	243
		%	73,1%	26,9%	100,0%
Número total de pacientes		Recuento	273	79	316
		%	74,6%	25,4%	100,0%

Las frecuencias de los genotipos AA y AC/CC fueron del 75,3% y del 24,7%, respectivamente. Las frecuencias son similares a las de la población con todos los pacientes coinfectados VIH/VHC: OR = 1.1; 95% IC: 0.6-2.02, p = 0.7. Tabla E.20.

Los datos acerca de la RVS ya se han analizado en el apartado previo, donde se hace especial mención a las variantes genéticas. En resumen podemos confirmar que el análisis univariado y multivariado confirman la presencia de variantes alélicas que se asocian con la respuesta viral sostenida, tanto a nivel del gen de la *ITPA* como a nivel del gen de la *IL28B*.

E.5.3. Influencia del polimorfismo rs1127354 ITPA en el descenso de los niveles de Hemoglobina (Hb) durante el tratamiento con PEG-IFN más RBV

El descenso global de Hb se ha calculado restando del valor de la Hb basal, el valor de la Hb más baja durante todo el tratamiento, para cada paciente. La media del descenso máximo de Hb para el genotipo CC rs1127354 se produce en la semana 27, y es de $4,03 \pm 1,83$ g/dl ; para los genotipos CA/AA, el descenso medio máximo de Hb se produce en la semana 30, siendo de $2,66 \pm 1,09$ g/dl (p = 0,009).

Al analizar el descenso de la Hb global en porcentaje, las diferencias todavía son mayores: el descenso porcentual de Hb es de un $11,91 \pm 5,25$ % en los pacientes con genotipo CA/AA vs un $23,38 \pm 10,82$ % en los pacientes portadores del genotipo CC (p < 0,001). (Figura E.2).

Al analizar el descenso de Hb en la semana 12 de tratamiento, también objetivamos diferencias significativas entre las variantes alélicas analizadas. Los datos analizados se resumen en la tabla E.21.

Tabla E.19. *Pacientes incluidos en el estudio. Comparación entre las características basales y los genotipos AA y AC/AA a nivel del rs7270101 ITPA*

	Población total	AA	AC/CC	p
N (%)	73	55 (75,3)	18 (24,7)	
Edad (años)	46,82	46,91	46,56	0,81
Varones n (%)	43(58,9)	34(61,8)	9(50,0)	0,41
IMC (kg/m ²)	22,86	23,50	20,90	0,02
Años evol VIH	15,89	15,75	16,24	0,78
Transmisión VIH				0,1
MsM (%)	11 (15,1)	18,2	5,6	
HTSX (%)	20 (27,4)	30,9	16,7	
ADVP (%)	42 (57,5)	50,9	77,8	
Nadir CD4 (células/mm ³)	223,95	232,86	200,00	0,49
Tratamiento TARGA (%)	86,7	83,6	94,4	0,43
CD4 Actuales (cel/mm ³)	513,73	500,94	547,83	0,51
Zenit CV VIH (log ₁₀ copias/ml)	5,24	5,30	5,04	0,42
CV VIH Actual (log ₁₀ copias/ml)	4,35	4,49	1,49	0,50
Años evolución VHC	15,26	14,93	16,13	0,48
Tratamiento VHC completo (%)	76,7	74,5	83,3	0,53
Genotipo VHC (1&4/3) (%)	55/18 (75,3/24,7)	43/12 (78,3/21,8)	12/6 (66,7/33,3)	0,35
Cirrosis (%)	30,1	27,3	38,9	0,38
Fibroscan (Kpa)	10,78	10,88	10,49	0,90
ALT basal (IU/l)	63,62	64,78	60,39	0,73
Plaquetas basales(x 10 ⁴ /mm ³)	162,84	165,05	149,18	0,52
Leucocitos basales(x 10 ⁴ /mm ³)	5.416	5.426	5.383	0,91
Bilirrubina actual (μmol/L)	10,77	10,89	10,47	0,85
Albumina (g/L)	43,45	43,18	44,15	0,46
Carga Viral Basal VHC (log IU/ml)	6,13	6,12	6,16	0,83
Genotipos rs60 IL28B				0,78
CC, n(%)	30 (41,4)	22(40,0)	8(44,4)	
CT + TT,n(%)	43(58,9)	33(60,0)	10(55,6)	

Tabla E.20. Comparación entre las frecuencias de los genotipos para el polimorfismo rs7270101 ITPA entre el total de la población y la población estudiada

			rs7270101		Total
			AA	AC/CC	
	Pacientes del estudio	N	55	18	73
		%	75,3%	24,7%	100,0%
	Resto de pacientes	Recuento	178	65	243
		%	73,1%	26,9%	100,0%
Número total de pacientes		Recuento	233	83	316
		%	73,5%	26,5%	100,0%

La figura E.3 muestra el descenso de la hemoglobina expresada en porcentaje a lo largo del tratamiento en los 59 pacientes con genotipo CC, comparado con los 14 pacientes con genotipo CA/AA. En la semana 4, el descenso de Hb en los pacientes con genotipo CC fue del -18,1% (95% IC: -25,0 a -9,7%) y del -4,2% (95% IC: -8,8 a -2,2%) en los pacientes con genotipo CA/AA ($p = 0,0003$).

En la semana 12, el descenso de Hb fue del -23,2% (95% IC: -29,6 a -16,4%) en pacientes con genotipo CC y del -11,9% (95% IC: -16,7% a -5,6%) en aquellos pacientes con genotipo CA/AA ($p < 0,0001$). En la semana 36, los descensos de Hb fueron del -20,0% (95% IC: -28,7 a -8,8%) en pacientes con genotipo CC y del -6,9% (95% IC: -17,0% a -0,7%) en aquellos con genotipo CA/AA ($p = 0,0102$). En la semana 48, los descensos fueron del -16,6% (95% IC: -25,9 a -3,2%) y del -15,3% (95% IC: -20,7 a -2,5%) ($p = 0,6421$), para los portadores de los genotipos CC y CA/AA respectivamente.

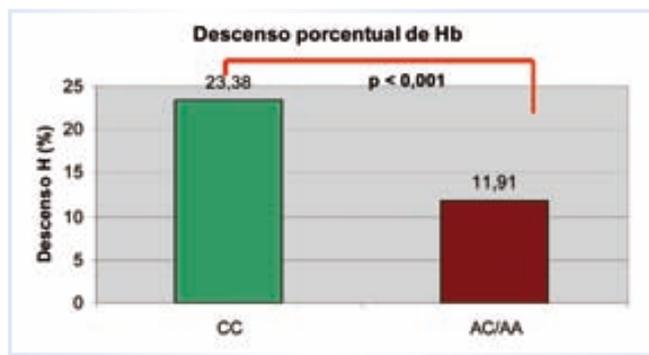


Figura E.2. Descenso porcentual máximo de Hb, durante todo el tratamiento. Comparación entre genotipos CC vs CA/AA. Se calcula restando el descenso máximo de Hb de la Hb basal. El resultado se multiplica por 100 y se divide por la Hb basal.

Tabla E.21. Variación de la Hb en función de las variantes alélicas del polimorfismo rs1127354 ITPA.

	rs1127354	N	Media	Desviación típica	p
1. Descenso máximo (g/dl)	CA/AA	14	2,66	1,09	0,009
	CC	59	4,03	1,83	
2. Semana descenso máximo	CA/AA	14	30,00	9,11	0,50
	CC	59	27,24	14,59	
3. Descenso máximo %	CA/AA	14	11,91	5,25	< 0,001
	CC	59	23,38	10,82	
4. Hb semana 12 (g/dl)	CA/AA	14	12,25	1,46	0,036
	CC	59	11,24	1,72	
5. Descenso Hb S.12 (g/dl)	AC/AA	14	1,65	,75	< 0,001
	CC	59	3,49	1,77	
6. Descenso % Hb en la S.12	CA/AA	14	11,91	5,26	< 0,001
	CC	59	23,29	11,07	

Descenso máximo. Se calcula la Hb más baja objetivada durante todo el seguimiento. Se resta respecto de la Hb basal. 2. Semana en la que se ha determinado el descenso mayor de Hb. 3. Descenso máximo x 100/Hb basal. 4. Hb objetivada a la semana 12. 5. Hb basal menos la Hb en la semana 12. 6. Descenso en la S12x100/Hb basal.

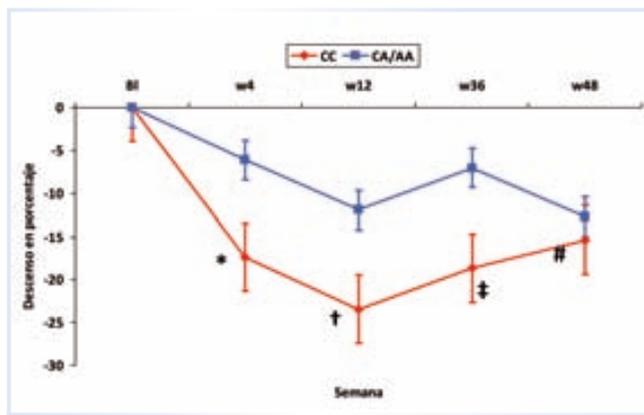
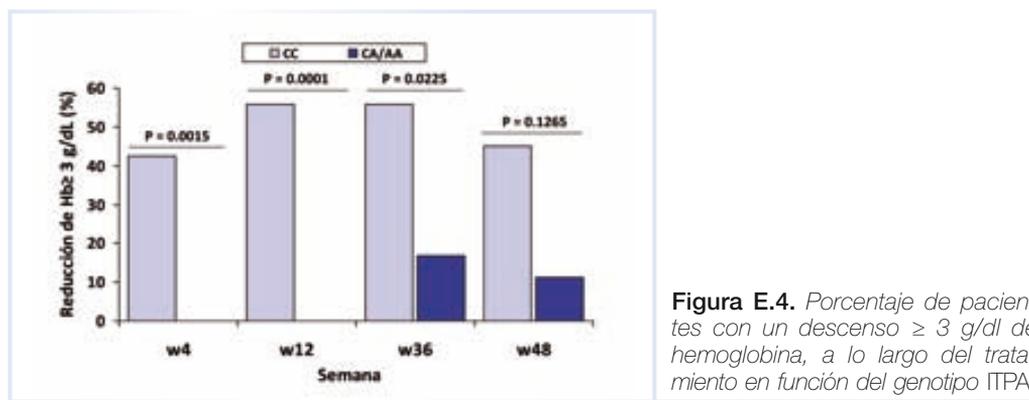


Figura E.3. Disminución de la Hb en porcentaje, en función de las variantes alélicas del gen de la ITPA* p = 0.0003, †p < 0.0001, ‡p = 0.0102, #p = ns.



Si comparamos el porcentaje de pacientes con un descenso de Hb ≥ 3 g/dl en función de las variantes alélicas, en el transcurso del tratamiento, encontramos diferencias estadísticamente significativas en todos los puntos de corte analizados, excepto en la semana 48. (Figura E.4).

E.5.4. Influencia del polimorfismo rs7270101 ITPA en el descenso de los niveles de Hemoglobina (Hb) durante el tratamiento con PEG-IFN más RBV

Al analizar la influencia de las variantes alélicas del polimorfismo rs7270101 del gen ITPA en los niveles de Hemoglobina, no encontramos ningún tipo de asociación significativa. Es por ello que no se han analizado más aspectos relacionados con este polimorfismo. Tabla E.22.

E.5.5. Influencia del genotipo rs1127354 ITPA en la modificación de las dosis de RBV durante el tratamiento con PEG-IFN más RBV

En el transcurso del tratamiento 25 pacientes (34,2%) han tenido que reducir la dosis de RBV en ≥ 200 mg debido al descenso de los niveles de Hb por debajo de 12 g/dl.

La proporción de los pacientes que recibieron dosis completas de RBV fue diferente entre los genotipos CA/AA y CC. (100% vs 57,6%, OR = 11.81; 95%CI: 1.45-256.17, $p = 0.0039$). Ninguno de los portadores del genotipo CA/AA tuvo que modificar las dosis de RBV. Tabla E.23.

Para evaluar si el genotipo CA/AA tiene influencia en la RVS, independientemente de las dosis de RBV, se ha realizado un análisis en los 48 pacientes que no han precisado reducción de la dosis de RBV. Globalmente la RVS es del 64%. Los porcentajes de RVS de los dos genotipos (CC y CA/AA) de rs1127354 es similar, aunque hay un porcentaje

Tabla E.22. Variaciones de Hb y variantes alélicas del rs7270101 del gen de la ITPA

	ITPA rs7270101	N	Media	Desviación típ.	p
1. Descenso máximo (g/dl)	AC/CC	18	4,15	1,84	0.28
	AA	55	3,62	1,77	
2. Semana descenso máximo	AC/CC	18	32,22	14,43	0.11
	AA	55	26,24	13,14	
3. Descenso máximo %	AC/CC	18	20,34	12,31	0.73
	AA	55	21,38	10,56	
4. Hb semana 12 (g/dl)	AC/CC	18	11,76	1,95	0.37
	AA	55	11,33	1,62	
5. Dscenso Hb S.12 (g/dl)	AC/CC	18	3,07	2,04	0.87
	AA	55	3,15	1,70	
6. descenso % Hb en la S.12	AC/CC	18	20,38	12,28	0.76
	AA	55	21,29	10,82	

1. Descenso máximo. Se calcula la Hb más baja objetivada durante todo el seguimiento. Se resta respecto de la Hb basal. 2. Semana en la que se ha determinado el descenso mayor de Hb. 3. Descenso máximo x 100/Hb basal. 4. Hb objetivada a la semana 12. 5. Hb basal menos la Hb en la semana 12. 6. Descenso en la S12x100/Hb basal.

Tabla E.23. Ajuste de las dosis de RBV en función de las variantes alélicas del polimorfismo rs1127354 de la ITPA ($p = 0.0039$)

			Ajuste RBV		Total
			No	Si	
rs1127354	CC	Recuento %	34 57,6%	25 42,4%	59 100,0%
	CA/AA	Recuento %	14 100,0%	0 ,0%	14 100,0%
Total		Recuento %	48 65,8%	25 34,2%	73 100,0%

Tabla E.24. Análisis de la RVS en los pacientes que no han precisado modificar las dosis de RBV

			RVS		Total
			No	Si	
rs1127354	CC	Recuento %	14 41,2%	20 58,8%	34 100,0%
	CA/AA	Recuento %	3 21,4%	11 78,6%	14 100,0%
Total		Recuento %	17 35,4%	31 64,6%	48 100,0%

más alto con genotipo CA/AA que responden (OR 2,5; IC95% 0,603-10,91; $p = 0,32$)
Tabla E.24.

E.5.6. Influencia del genotipo rs1127354 ITPA en la administración de Eritropoyetina (EPO) durante el tratamiento con PEG-IFN más RBV

Veintitrés (39%) pacientes necesitaron la administración de EPO debido a la presencia de anemia. La Hb basal entre estos pacientes no presenta diferencias: $15,01 \pm 1,7$ g/dl de pacientes que requirieron tratamiento con EPO vs $14,34 \pm 1,4$ g/dl de pacientes que no requirieron tratamiento con EPO ($p = 0,1$).

Como ya se ha indicado, un 39% de los pacientes con genotipo CC necesitó EPO, mientras que ninguno de los pacientes con genotipo CA/AA necesitó EPO (OR 8,28, 95% IC: 1,04-371,12, $p = 0,0057$). Tabla E.25.

La RVS no presenta variaciones significativas entre los pacientes que reciben EPO y los que no la reciben, aunque existe una clara tendencia hacia una mayor RVS en pacientes que no precisan EPO. (OR: 0,4; IC95% 0,1-1,17; $p = 0,08$). Tabla E.26.

Por otro lado, se ha comparado la RVS en los 50 pacientes que no han recibido EPO en función de la presencia del genotipo CC vs el genotipo CA/AA. La presencia del genotipo CA/AA muestra un mayor porcentaje de RVS, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. (OR: 3,28; IC95% 0,78-13,71; $p = 0,08$). Tabla E.27.

E.5.7. Análisis Bivariado

Para realizar estudios comparativos hemos escogido el descenso porcentual de la Hb a la semana 12 (BPMS12), como uno de los parámetros más robustos para expresar los beneficios de la variante alélica CA/AA del polimorfismo rs1127354 ITPA.

Tabla E.25. Administración de EPO en función del genotipo de la ITPA

			EPO		Total
			No	Si	
ITPA54	CC	Recuento %	36 61,0%	23 39,0%	59 100,0%
	CA/AA	Recuento %	14 100,0%	0 ,0%	14 100,0%
Total		Recuento %	50 68,5%	23 31,5%	73 100,0%

Tabla E.26. EPO y RVS

			RVS		Total
			No	Si	
EPO	No	Recuento % dentro de EPO1	20 40,0%	30 60,0%	50 100,0%
	Si	Recuento % dentro de EPO1	14 60,9%	9 39,1%	23 100,0%
Total		Recuento % dentro de EPO1	34 46,6%	39 53,4%	73 100,0%

Tabla E.27. RVS en los 50 pacientes que no han recibido EPO.

			RVS		Total
			No	Si	
ITPA54	CC	N %	17 47,2%	19 52,8%	36 100,0%
	CA/AA	N %	3 21,4%	11 78,6%	14 100,0%
Total		N %	20 40,0%	30 60,0%	50 100,0%

E.5.7.1. ANÁLISIS COMPARATIVOS DE LA BPMS12. VARIABLES CATEGÓRICAS

La BPMS12 es similar tanto en hombres como mujeres. La presencia del polimorfismo rs12979860 *IL28B* no influye en la BPMS12 de Hb. La BPMS12 es significativamente mayor en aquellos pacientes que no han completado el tratamiento ($p = 0,02$) (Tabla E.28).

Tabla E.28. *BPMS12 y realización completa del tratamiento*

BPMS12		N	Media%	Desviación típ.	p
Tratamiento completo	Sí	55	19,41	10,13	0,02
	No	16	26,73	12,81	

Tabla E.29. *BPMS12 y RVS*

BPMS12		N	Media	Desviación típ.	p
RVS	Sí	39	18,24	9,85	0,01
	No	32	24,50	11,75	

Tabla E.30. *RVS y BPMS12 en pacientes con G1/4*

BPMS12		N	Media	Desviación típ.	p
RVS	Sí	25	19,40	9,63	0,08
	No	30	24,83	12,01	

Tabla E.31. *Comparación de la BPS12 y genotipo VHC*

BPMS12		N	Descenso	Desviación típ.	p
Genotipo VHC	Gen 1/4	54	22,37	11,23	0,08
	Gen 3	19	17,21	10,14	

Al comparar BPMS12 y la RVS hallamos diferencias significativas. El descenso medio de Hb a la semana 12 es del 18% en pacientes con RVS vs del 24% en aquellos sin RVS ($p = 0,01$). (Tabla E.29).

En pacientes con genotipo VHC 1/4 (excluyendo aquellos pacientes con genotipo 3) los descensos de Hb no muestran diferencias significativas al comparar la presencia de RVS vs no RVS ($p = 0,08$). (Tabla E.30).

Al comparar la BPMS12 entre los diversos genotipos del VHC, se objetiva una tendencia sin significación estadística, siendo mayor el descenso de Hb en pacientes con G1/4. (Tabla E.31).

E.5.7.2. ANÁLISIS COMPARATIVOS DE LA BPMS12. VARIABLES CUANTITATIVAS

No existe correlación entre la BPMS12 y las siguientes variables: ALT y AST basales, carga viral basal VHC, resultados del fibroscan, el IMC y la edad de los pacientes. Si existe correlación con la Hb basal ($p = 0,005$) y con la bajada máxima de Hb a lo largo de todo el tratamiento ($p = 0,005$).

E.5.7.3 ANÁLISIS MULTIVARIADO RESPECTO LA BAJADA DE Hb

Para evaluar los factores asociados a la disminución Hb relacionados con el tratamiento con PEGIFN y RBV, se ha realizado un análisis de regresión logística tomando como variable dependiente la presencia de un descenso de 4 o más g/dl de Hb respecto al basal, en las primeras 12 semanas de tratamiento. Esta bajada se produce en 25/73 (34%) de los pacientes y equivale a una reducción media de un 30% de los niveles de Hb respecto a la basal. Los 25 pacientes del estudio que han precisado disminuir las dosis de RBV presentan una BPMS12 de Hb de un 29,74%.

Las variables independientes incluidas en el análisis fueron: Hb basal, variantes alélicas ITPA, IMC, carga basal VHC, leucocitos basales, plaquetas basales, edad y sexo.

El modelo estadístico define dos predictores independientes del descenso de Hb: variables alélicas del gen de la ITPA (OR 7,98; IC95%: 0,90-70,79; $p = 0,062$) y la Hb basal (OR 1,97; IC95%: 1,30-2,99; $p = 0,001$).

F. DISCUSIÓN

El objetivo principal de la tesis es identificar marcadores farmacogenéticos que nos ayuden a predecir las posibilidades de una menor toxicidad asociada a la RBV, y que también sean predictores de una mayor RVS en nuestros pacientes.

Este es el primer estudio que analiza de manera combinada las variantes alélicas del gen de la *IL28B* y de la *ITPA* en una población de pacientes con infección crónica por el VHC y que además están coinfectados con el VIH.

Antes de comentar con detalle los resultados del presente trabajo analizaremos algunos aspectos sobre la “cantidad” y la “calidad” de la muestra analizada.

F.1. Sobre *cantidad* de la muestra

Nuestro estudio tiene las ventajas y los inconvenientes de analizar una población “de la vida real”.

Se han incluido 73 pacientes. No son todos los pacientes coinfectados tratados en nuestro hospital, ni son todos los pacientes genotipados en nuestro centro. Si son todos los pacientes VIH/VHC tratados y genotipados en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

La técnica de genotipado de las variantes alélicas a nivel del gen de la *IL28B* se realiza en nuestro hospital desde enero del año 2010, por iniciativa del autor de la tesis y del Servicio de Genética.

A partir del mes de marzo 2010 añadimos también el genotipado de las variantes alélicas del gen de la *ITPA*. Hasta el momento en que se cerró la base de datos para analizar los resultados de la tesis, un 70% del total de los pacientes VIH/VHC han sido genotipados.

Sin embargo, solo un 26% de los pacientes de nuestra población han sido tratados. Este porcentaje es bajo, pero suele ser el habitual en este tipo de pacientes, por diversos motivos.

El motivo principal es que hay muchos pacientes que rechazan el tratamiento, por los efectos secundarios derivados del mismo. Por otro lado hay pacientes candidatos al tratamiento anti-VHC, que no lo han recibido por falta de idoneidad: para seguir el tratamiento hace falta una actitud pro-activa que facilite el cumplimiento del mismo. La falta de actitud descarta a la mayoría de pacientes con adicciones activas, ya que dificultan un cumplimiento correcto del tratamiento. Asimismo la presencia concomitante de un trastorno psiquiátrico u otras comorbilidades impide en muchas ocasiones la administración del tratamiento anti-VHC.

Otro motivo que descarta a un buen número de pacientes para seguir el tratamiento, es la presencia de cirrosis no compensada. La enfermedad hepática avanzada descarta la posibilidad de administrar el tratamiento.

F.2. Sobre la *calidad* de la muestra

Nuestro trabajo es el primero que incluye de manera combinada pacientes con un cumplimiento irregular del tratamiento, y pacientes con G1, G3 y G4.

Inclusión de pacientes que no han completado el tratamiento

El análisis de resultados –excepto algunos que se justifican debidamente– se ha realizado incluyendo toda la población estudiada. Hemos identificado correcto cumplimiento del tratamiento con la finalización del mismo (tratamiento completo o un cumplimiento superior al 80%), según el tiempo en semanas previsto inicialmente, en función del genotipo. Por lo tanto todos los resultados que estamos discutiendo tienen el “sesgo” de que un 23% de los pacientes no han realizado un tratamiento completo.

No hemos prescindido de estos pacientes, de manera intencionada, ya que al ser un estudio de una población real, no podemos obviar un hecho habitual: entre un 20-25% de los pacientes abandonan el tratamiento por diversos motivos. Omitir este hecho es falsear los datos.

El correcto cumplimiento del tratamiento es el factor que, con gran diferencia, más se asocia con la RVS (OR 33,77; IC95%: 4,15-274,92; $p = 0,001$). Ante esta disyuntiva determinados estudios optan por incluir solamente pacientes que han cumplido correctamente el tratamiento (Rallon, 2010; Chayama, 2011; Suzuki, 2011).

En esta tesis hemos incluido todos los pacientes de nuestra muestra. El paciente con el tratamiento de menor duración siguió tres meses la combinación PEG-INF más RBV. No obstante, debido a la distorsión que nos puede causar, no hemos incluido este dato (correcto cumplimiento) en el análisis multivariado al analizar los factores pronósticos independientes asociados a la RVS.

La mayoría de autores tampoco incluyen este factor en el análisis multivariado (Ochi, 2010; Thompson, 2010; Azakami, 2011).

Aunque no se trata de un estudio prospectivo, podemos deducir que nuestros datos son “por intención de tratar” (*intention to treat*), aunque algunos de los análisis se realizan “por tratamiento” (*on treatment*).

El objetivo de la tesis es evaluar determinados marcadores farmacogenéticos como factores predictivos de respuesta y de toxicidad. Estos marcadores se posicionan como predictores de respuesta basales, es decir previos al inicio del tratamiento. Es por ello que en algunos análisis multivariados hemos prescindido del valor predictor de factores asociados al mismo tratamiento, como pueden ser la RVR, o la adherencia (correcto cumplimiento) al tratamiento. La mayoría de autores tampoco incluyen la RVR en el análisis multivariado de la RVS (Azakami, 2011; Suzuki, 2011).

Inclusión de los pacientes con genotipo VHC 1/4 y 3

Todos los estudios publicados (Azakami, 2011; Chayama, 2011, Suzuki, 2011; Ochi, 2010; Thompson, 2010), analizan la influencia del *IL28B* y del *ITPA* solo en poblaciones con pacientes con genotipo 1 del VHC. Otro estudio solo incluye pacientes con G2 y G3 (Thompson, 2011).

En el presente estudio no hemos eliminado ningún paciente en función de genotipo, y por lo tanto son los primeros datos disponibles en una población “normal”, que incluye pacientes con G1, G3, y G4. El motivo es –como ya se ha expuesto- no descartar ningún paciente. Cuando ha sido preciso, se han realizado análisis puntuales discriminando por genotipos.

Incluir solo pacientes con el G1 puede tener sentido al analizar variables relacionadas con el gen de la *IL28B*, ya que el genotipo CC del rs12979860 se asocia claramente al G3 del VHC. Sin embargo, las variables alélicas del gen de la *ITPA* no se relacionan con ningún genotipo VHC.

La inclusión de pacientes con G3 puede añadir otro sesgo, ya que el cumplimiento del tratamiento es significativamente mayor en estos pacientes, al compararlos con los pacientes con G1 y G4 (OR 1,44: IC95%: 1,21-1,75; p = 0,008).

La explicación de este hecho radica en parte, en que la mayor parte los pacientes con G3 han realizado un tratamiento tan solo de 6 meses. También es debido a que la expectativa de curación es mucho mayor en pacientes con el G3.

F.3. Discusión acerca de los datos de la toxicidad (anemia) por RBV

La disminución de Hb secundaria a la RBV -en pacientes mono infectados VHC- se asocia con variables alélicas a nivel del rs1127354 en el gen de la *ITPA*, tal como publicó Fellay, et al., (Fellay, 2010) por primera vez en febrero 2010. En febrero del año 2011 nuestro grupo fue el primero en comunicar esta asociación en pacientes coinfectados (Guardiola, 2011), mediante una comunicación oral en el principal congreso internacional de SIDA.

Casi una quinta parte de la población estudiada (19,2%) es portadora del alelo “A”, o de los genotipos protectores CA/AA del rs1127354/*ITPA*. En el global de nuestra población de 316 pacientes coinfectados el porcentaje de portadores CA/AA sube hasta el 26,9% (NS).

Ni la definición de anemia, ni el momento de su detección, están unificados en todos los trabajos que han evaluado la asociación de la *ITPA* y el descenso de Hb (Fellay, 2010; Thompson, 2010; Suzuki, 2011; Chayama, 2011; Thompson, 2011; Ochi 2010; Akazami, 2011). La falta de consenso se debe a que la respuesta clínica ante un descenso de Hb es variable entre los pacientes. Hay pacientes que ante una Hb de 10 g/dl presentarán una astenia muy intensa, y en cambio, otros pacientes con Hb de 9,0 g/dl, se mantienen completamente asintomáticos.

Desde un punto de vista descriptivo tiene sentido determinar el descenso máximo de Hb durante todo el tratamiento. Nuestros resultados muestran un descenso máximo de Hb de 4,03 g/dl para el genotipo CC (descenso del 24% sobre el basal), en la semana 27 de tratamiento y de 2,66 g/dl (descenso del 12% sobre la basal) para los genotipos CA/AA ($p = 0,009$), en la semana 30 de tratamiento. Es decir, el descenso global de de Hb es significativamente más importante (casi el doble), y se produce antes en los portadores del genotipo CC del rs1127354.

Si analizamos la presencia de un descenso de Hb mayor de 3 g/dl en la semana 4, 12 y 36, hallamos un porcentaje significativamente mayor de pacientes con genotipo CC que con genotipo CA/AA.

Desde un punto de vista práctico, para poder tomar decisiones de mejora, es más recomendable evaluar el descenso de los niveles de Hb, a la semana 4 y 12 del tratamiento. En nuestra serie, la bajada porcentual media de Hb a la semana 12 (BPMS12), es significativamente diferente al comparar los genotipos CA/AA vs CC del rs1127354 (11,91% vs 23,29 %, $p < 0,001$). También hallamos diferencias al compara los descensos de Hb a la semana 4 y a la semana 36.

F.3.1. Factores con influencia sobre el descenso de Hb

La BPMS12 es significativamente menor en los pacientes que han completado el tratamiento ($p = 0,02$), y en aquellos pacientes que consiguen una RVS ($p = 0,01$). Estos resultados son más efecto que causa: es lógico que completen el tratamiento, y que consigan RVS, aquellos pacientes que no han presentado anemia, ya que no han tenido que reducir las dosis de RBV.

En los pacientes con genotipo 3, la BPMS12 es menor que en los pacientes con G1/4 (17,21% vs 22,37%, NS). No hay diferencias en cuanto al sexo.

La BPMS12 se correlaciona significativamente con la Hb basal ($p = 0,005$). Es decir, cuanto más elevada es la Hb basal, mayor es el margen de descenso, y por lo tanto mayor es la disminución porcentual e Hb. No hay asociación entre la edad, sexo, IMC y el descenso de Hb.

Finalmente, el análisis multivariado únicamente asocia al descenso de Hb, como variables independientes, las variantes alélicas rs1127354 *ITPA* (OR 7,98; IC95%: 0,90-70,79; $p = 0,062$) y la Hb basal (OR 1,97; IC95%: 1,30-2,99; $p = 0,001$). Se ha escogido como variable cualitativa la presencia o no de un descenso de 4 o más g/dl de Hb en las primeras 12 semanas del tratamiento. Esta bajada se produce en un 34% de los pacientes y equivale a una reducción media de un 30% de los niveles de Hb respecto a la basal. Este punto de corte tiene implicaciones terapéuticas, ya que los 25 pacientes del estudio que han precisado disminuir las dosis de RBV presentan una BPMS12 de Hb de un 29,74%.

Nuestros resultados son comparables con los datos disponibles en la actualidad, y superponibles a la información disponible en pacientes mono infectados. Todos los estudios en pacientes mono infectados han mostrado la asociación entre las variables alélicas del gen de la *ITPA* y la reducción de la anemia causada por RBV (Fellay, 2010; Thompson 2010, Suzuki 2011; Chayama 2011, Thompson, 2011; Chayama, 2011; Azakami, 2011).

Thompson, et al., (Thompson, 2010) evalúan el descenso de Hb en 304 pacientes con G1, encontrando una asociación significativa con el rs1127354 y el rs7270101, en la semana 4 de tratamiento. Según Ochi, et al, los factores pronósticos de anemia severa (Hb < 10 g/dL) fueron: edad, Hb y plaquetas basales, y la presencia de variantes alélicas del rs1127354. En nuestra serie el análisis multivariado solo asocia la presencia de anemia con variantes alélicas del rs1127354 y la Hb basal.

Azakami, et al., (Azakami, 2011) evalúa la presencia de anemia en 803 pacientes japoneses con G1. En pacientes con cifras basales de Hb por debajo de 13,5 g/dL; y en pacientes con cifras basales de Hb entre 13,5-15,00 g/dL junto al ser portadores del genotipo CC rs1127354, se objetiva un mayor descenso de Hb.

Suzuki, et al. (Suzuki, 2011) evalúan la influencia del gen de la *ITPA* en 61 pacientes con triple terapia (PEG-IFN, RBV, y telaprevir). Los SNPs del gen de la *ITPA* tienen influencia en los niveles de Hb, particularmente durante las 12 primeras semanas, precisamente cuando es administrado telaprevir. Esta asociación es particularmente importante ya que la anemia es uno de los efectos secundarios limitantes del tratamiento con este nuevo inhibidor de la proteasa del VHC.

En nuestro estudio, las variantes alélicas del rs7270101 a nivel de la *ITPA* no se asocian con el descenso de Hb en ninguno de los parámetros analizados. Este SNP si ha mostrado asociación con los niveles de Hb en otros estudios (Thompson, 2010; Thompson, 2011), aunque la mayoría de estudios solo analizan el rs1127354 (Suzuki, 2011; Chayama, 2011; Azakami, 2011). No queda clara cual es la causa de la falta de asociación entre la anemia y el rs7270101 en nuestra cohorte de pacientes.

F.3.2. Variantes alélicas y administración de EPO

La EPO se utiliza para corregir la disminución de Hb, habitualmente cuando desciende por debajo de 10 g/dl. En nuestra serie ningún paciente con genotipo CA/AA ha precisado la administración de EPO (OR 8.28, 95% IC: 1,04-371,12, p = 0,0057). Estas cifras constituyen un argumento de peso acerca de la protección, o privilegios que confiere el ser portador de las variantes alélicas que contienen el alelo "A".

El uso de EPO significa un gasto adicional al ya de por si costoso tratamiento del VHC. Además se trata de un tratamiento incómodo, cuya posología consiste habitualmente en la administración de una inyección semanal por vía subcutánea. La RVS de los pacientes que han precisado el uso de EPO es un 20% menor que la RVS de los pacientes que no han recibido EPO, aunque estas diferencias no muestran significación estadística.

Ninguno de los trabajos publicados hasta la actualidad evalúa la administración de EPO (Fellay, 2010; Thompson 2010, Suzuki 2011; Chayama 2011, Thompson, 2011; Chayama, 2011; Azakami, 2011).

F.4. Discusión de los resultados sobre factores predictivos de RVS

F.4.1. Análisis univariado

IL28B

Los 73 pacientes analizados tienen la misma proporción de variantes alélicas a nivel del rs12979860/*IL28B* que el total de la población de 316 pacientes coinfectados de nuestro hospital; por lo tanto no tenemos un sesgo de selección, en cuanto a variables alélicas se refiere.

Es importante destacar que, según nuestros resultados y los resultados de la literatura (Ge, 2009; Tanaka, 2009; Thomas, 2009), la presencia del alelo mayor “C” a nivel del rs12979860 *IL28B* es el que confiere el carácter beneficioso a los genotipos CC y CT. El hecho de que más de un 40% de los pacientes sean portadores del genotipo CC rs12979860 *IL28B* es un dato remarcable y muy favorable para poder incluir a este genotipo como posible marcador farmacogenético de predicción de RVS.

El análisis comparativo entre los datos basales (clínicos y analíticos) de las poblaciones con los genotipos CC vs CT/TT del rs12979860 *IL28B*, no muestra diferencias. Solo hay una diferencia en el análisis basal: la presencia del G3 del VHC es significativamente mas elevada en la población con genotipo CC (OR 4,1; IC95%:1,32-12,73; p = 0,01).

La asociación de estos dos factores (CC y G3) no ha sido analizada a fondo en la literatura. Queda por determinar si se trata de una asociación casual o si la variante alélica CC del rs12979860 *IL28B* juega un papel destacado en la codificación del G3.

Uno de los principales aspectos de nuestro trabajo es la asociación del genotipo CC del rs12979860 *IL28B*, con la RVS (OR 3.24; IC95% 1,20-8,70; p = 0.031). Esta asociación ha sido descrita previamente en otros estudios en pacientes coinfectados (Rallon, 2010; Pineda, 2010). Todos los estudios publicados, acerca del gen de la *ITPA*, y que analizan la RVS han mostrado la influencia del *IL28B* y la RVS (Thompson, 2010; Suzuki, 2011; Thompson, 2011; Chayama, 2011; Azakami, 2011).

ITPA

La RVS también se asocia con la presencia del alelo “A” (CA/AA) del rs1127354 en el gen de la *ITPA* (OR: 4,06; IC95% 1,02-16,05; p = 0,042). Este resultado es completamente novedoso. No hay ningún estudio publicado que evalúe la influencia del gen de la *ITPA* en pacientes coinfectados. Incluso en pacientes mono infectados no hay evidencia de la asociación del *ITPA* con la RVS (Thompson, 2010; Suzuki, 2011; Chayama, 2011; Thompson, 2011; Chayama, 2011). Solo el estudio de Azakami,

et al, (Azakami, 2011), relaciona el gen de la *ITPA* con la RVS en un subgrupo reducido de pacientes.

GENOTIPO 3

Como es de esperar la presencia de un G3 se asocia con la RVS (OR: 11,130; IC95% 2,328-53,210; $p = 0.001$). En la población estudiada, el porcentaje de pacientes con G3 es del 24,7%. Esta cifra es la habitual en la población europea, y la mayoría de estudios muestran proporciones similares, oscilando entre el 20-30% de pacientes con G3.

CARGA VIRAL BASAL ARN-VHC

Una menor carga viral basal ARN-VHC es un factor predictor de RVS. Al comparar la carga viral basal entre los pacientes con y sin RVS hallamos diferencias con significación estadística ($p = 0,03$).

Al fijar un punto de corte de carga viral RNA-VHC basal predeterminado en 800.000 UI/mL, no encontramos diferencias significativas entre los pacientes con y sin RVS. Sin embargo, al analizar con detalle este resultado podemos objetivar que la diferencia porcentual de RVS es del 23,5% a favor de los pacientes con carga viral basal baja (OR 1,736; IC95%: 0,640-4,711; $p = 0,32$). Ello confirma algo que es ampliamente conocido: una menor carga viral basal es un factor predictivo de respuesta.

OTROS FACTORES: SEXO, PRESENCIA DE FIBROSIS, IMC, EDAD

En nuestra serie ni el sexo (OR: 0,81; IC95% 0,31-2,36; $p = 0,81$), ni la presencia de cirrosis son factores predictivos de respuesta al tratamiento VHC (OR 0,82; IC95% 0,30-2,23; $p = 0,83$). Tampoco se asocian con la RVS el IMC y la edad.

RVR

Hemos evaluado la RVR, aunque se no se trata de un parámetro predictor basal “previo” al tratamiento, sino “durante” el tratamiento. Presentar una carga viral negativa a las cuatro semanas de tratamiento se asocia de manera significativa con la RVS (OR: 16,84; IC95% 3,53-80,18; $p < 0,0001$).

DISMINUCIÓN DE LA DOSIS DE RBV

La disminución de la dosis de RBV debido a la anemia, en los pacientes con variables alélicas CC del rs1127354, se asocia con una menor RVS (OR: 3,87; IC95% 1,38-10,86; $p = 0,008$).

F.4.2. Discusión acerca del estudio multivariado

Por lo tanto hemos definido 6 factores predictivos de RVS, con significación estadística ($p < 0,05$) en el análisis bivariado: variantes alélicas en el gen de la *IL28B* y de la *ITPA*, genotipo VHC, RVR, carga viral basal VHC, y modificación de las dosis de RBV.

En el estudio multivariado se han incluido estos seis factores. Por separado ejercen una clara influencia sobre la RVS. Se trata de interrelacionar estas variables para saber cual de ellas se asocia de manera independiente a la RVS.

Para realizar este estudio hemos incluido 66 de los 73 pacientes. Faltan 7 pacientes en los que no disponemos de la carga viral basal VHC. Los resultados de este estudio multivariado muestran que la modificación de las dosis de RBV (OR: 3,99; IC95%: 1,08-14,75; $p = 0,038$), el genotipo VHC (OR: 7,14; IC95% 1,14-40,00; $p = 0,035$) y la presencia de RVR (OR: 10,41; IC95%: 1,96-55,55; $p = 0,006$), se asocian de manera independiente con la RVS, descartando todas las demás.

Estos datos son muy interesantes: en primer lugar, es indiscutible el papel del genotipo viral. La bondad del G3 es conocida. A fecha de hoy no se sabe el motivo por el cual el G3 responde de manera tan satisfactoria al tratamiento.

Los datos acerca de la cinética viral son de gran importancia. Veinte de los 22 pacientes que consiguen RVR consiguen RVS. Sin embargo, estrategias encaminadas a intensificar la terapia durante las primeras fases del tratamiento para obtener mayores porcentajes de RVS, no han conseguido porcentajes mayores de RVR (Labarga 2011). Como muestran nuestros datos, tanto el G3 del VHC como el ser portador de la variante alélica CC del rs12979860 *IL28B* se asocian con una mayor RVR. No obstante todavía no son conocidos con claridad los factores que facilitan una RVR en algunos pacientes y la falta de la misma en un 70% de los pacientes, como se da en nuestra población.

La disminución de los niveles de RBV se asocia con fracaso terapéutico, en el tratamiento del VHC (Hadziyannis, 2004).

En este primer estudio multivariado no aparecen como factores independientes asociados a la RVS las variantes a nivel del gen de la *IL28B*. Probablemente su influencia queda enmascarada por la potencia de asociación que conlleva ser portador del G3. Hemos demostrado previamente como las variantes alélicas CC del gen de la *IL28B* se asocian con la presencia del G3.

Un segundo análisis multivariado elimina la variable carga viral basal. Con este proceder, podemos incluir los 73 pacientes disponibles para el análisis. Los datos obtenidos son similares a los obtenidos previamente: asociación independiente entre la RVS y el G3, la RVR y la administración de la dosis completa de RBV.

F.4.3. Marcadores farmacogenéticos y RVS

Para obviar el positivo –y probablemente enmascarador- efecto del G3, hemos realizado un estudio multivariado en los 73 pacientes incluidos en la muestra, incluyendo tan solo las variantes alélicas de los dos genes estudiados. Por lo tanto prescindimos del genotipo VHC en este análisis.

También prescindimos de dos variables más: la RVR y la modificación de las dosis de RBV. Estas dos variables no son variables basales. Son factores predictivos de respuesta que

se dan durante el tratamiento, pero no son previos al mismo, y por lo tanto no pueden considerarse factores predictivos basales.

Por lo tanto, estamos obviando las tres variables independientes aceptadas en el estudio multivariado. Es por ello que los resultados obtenidos deben ser analizados con cautela, en el marco adecuado que estamos exponiendo.

Los datos obtenidos en el estudio multivariado que incluye el gen *IL28B*, el gen de la *ITPA*, y la carga viral VHC basal posicionan de manera muy favorable las variantes alélicas analizadas, descartando la carga viral basal VHC.

La OR para el genotipo protector CC del rs12979860 *IL28B* es de 4,17 (IC95% 4,14-4,20; $p = 0,008$). Para el genotipo protector CA/AA de rs1127354 *ITPA* la OR es del 5,71 (IC95% 5,66-5,76; $p = 0,019$). Estos datos confirman la importante asociación entre la RVS y la combinación de las variables alélicas del gen de la *ITPA* y del gen de la *IL28B* como factores predictivos independientes de RVS.

Al analizar solo la población con G1 (55 pacientes), el ser portador de la variante CC del rs12979860 en el gen de la *IL28B* es un factor pronóstico de buena respuesta (OR: 3,27; IC 95% 1,01-10,56; $p = 0,047$). Las variables alélicas CA/AA del gen de la *ITPA*, muestra una clara tendencia a la asociación con la RVS ($p = 0,052$).

Como resumen de estos datos podemos concluir que tanto el *IL28B* y *ITPA* tienen influencia en la RVS, de manera independiente. El poder discriminador de las dos variables farmacogenéticas aceptadas en este modelo multivariado es, a partir del AUC (área bajo la curva de la curva ROC), del 70% ($p = 0,003$).

Es importante aclarar que el gen de la *IL28B* tiene un mayor peso como factor predictor de la RVS, situándose por encima del gen de la *ITPA*. Ello puede afirmarse tras realizar la curva ROC aportando tan solo los datos del gen de la *ITPA*: el poder discriminante del *ITPA* es de 0,58, sin mostrar significación estadística ($p = 0,2$).

La posible asociación del gen de la *ITPA* con la RVS ha sido analizada en diversos estudios con pacientes mono infectados. Tan solo el estudio de Azakami (Azakami, 2011) muestra una asociación entre el genotipo *ITPA* y la RVS. La RVS fue significativamente menor en los portadores de las variantes alélicas CC del rs1127354 en el subgrupo de pacientes con Hb basal entre 13,5 y 15,0 g/dl. Los portadores del genotipo CA/AA obtienen una RVS del 53,6% vs el 40,8% de los pacientes portadores del genotipo CC ($p = 0,039$). El motivo atribuido fue que la disminución de las dosis de RBV se asoció con una menor RVS ($p < 0,009$).

En el estudio de Ochi (Ochi, 2010) inicialmente 9 factores mostraron asociación con la RVS en el análisis univariado: la edad, el sexo, el IMC, los niveles basales de Hb y plaquetas, la fibrosis y la carga viral, y los genotipos a nivel del *ITPA* y del *IL28B*. Al realizar el estudio multivariado todas estas variables se mantienen, exceptuando la Hb basal, y las variantes alélicas del gen de la *ITPA*.

En otros estudios no se ha hallado relación entre el gen de la *ITPA* y la RVS (Fellay, 2010; Thompson, 2010, Suzuki, 2011; Chayama, 2011, Thompson, 2011).

Suzuki (Suzuki, 2011) compara la RVS obtenida con terapias triples, en una población de 61 pacientes con G1. La RVS en el grupo CC y el CA/AA fue del 71% vs 67%, respectivamente ($p = 0.736$). El estudio de Chayama (Chayama, 2011) también analiza la RVS con terapias triples: el gen de la *ITPA* no influyó en la RVS (73% para CC y 73% para CA/AA). En pacientes con G2 y G3 (Thompson 2011), tampoco se objetiva la asociación entre el *ITPA* y la RVS.

El motivo por el cual las variantes alélicas CA/AA del rs1127354 en gen de la *ITPA* se asocian con una RVS no es conocido con exactitud. La explicación más lógica es que las variables alélicas CA/AA condicionan una menor anemia, y con ello se favorece un mejor cumplimiento del tratamiento con RBV. Un mayor cumplimiento del tratamiento condiciona una mayor RVS.

F.5. Administración de dosis de RBV

La presencia del alelo A a nivel del rs1127354, implica que ningún paciente ha precisado reducir las dosis de RBV (OR = 11.81; 95%CI: 1.45-256.17, $p = 0.0039$). Por tanto, los pacientes portadores del genotipo CA/AA reciben el 100% de la dosis de RBV.

Teniendo en cuenta este dato, y para profundizar más en el efecto favorable gen de la *ITPA*, hemos comparado la RVS en la población de todos los pacientes que han recibido el 100% del tratamiento.

Al eliminar 25 pacientes "CC" que han precisado reducir las dosis de RBV, no se objetivan diferencias significativas al comparar la RVS (OR 2,5; IC95% 0,603-10.91; $p = 0,32$) entre los pacientes CC y CA/AA. No obstante, vale la pena destacar que los porcentajes de RVS en el grupo CA/AA superan casi en 20 puntos los porcentajes de RVS en el grupo de pacientes portadores del genotipo CC. Estos resultados son inesperados, y difíciles de justificar con los conocimientos que tenemos en la actualidad. Es como si el genotipo CA/AA de la *ITPA* tuviera una favorable influencia para conseguir RVS, independientemente de su principal rasgo como prevención de la anemia.

La reducción de las dosis de RBV se ha mostrado en diversos trabajos. La disminución de las dosis de RBV fue común (140; 46%) en la cohorte de 304 pacientes del estudio ViraHep-C. En 74/140 la anemia fue la causa de la disminución de las dosis de RBV (52%): hubo diferencias al comparar los genotipos CC y CA/AA (Thompson, 2010). Un estudio (Azakami, 2011) realizado en 830 pacientes con G1 muestra una rápida disminución de la Hb que se asocia a una reducción significativa de RBV en los pacientes portadores del genotipo CC, más drástica que la objetivada en pacientes no-CC, sobre todo en cuando la Hb basal es menor de 13.5 g/dL. Además la disminución de las dosis de RBV se asocia con la RVS ($p < 0,009$).

No todos los trabajos objetivan esta disminución de RBV. La dosis de RBV durante las 24 semanas de tratamiento fue comparable entre el grupo de pacientes CC y el CA/AA, sin objetivarse diferencias, en el estudio de Suzuki (Suzuki, 2011). En un estudio con pacientes con genotipo 2 y 3, la administración de las dosis globales de RBV, entre las variables CC y CA/AA, no muestra diferencias significativas. Los autores (Thompson, 2011) explican este hecho por la buena tolerancia por parte de los pacientes a niveles muy bajos de Hb, de hasta 9.5 g/dl.

F.6. Posicionamiento del gen de la *ITPA* y la RVS

Se ha postulado que en los pacientes con una correcta predisposición genética (portadores de las variantes CA/AA del rs1127354) podrían aumentarse la dosis de RBV, sin temor a la producción de anemia, para obtener una mayor RVS.

En pacientes ancianos, cardiópatas, o con otra comorbilidad asociada, la presencia de un descenso de Hb puede ser más perjudicial que en la población normal. El genotipo CA/AA del rs1127354 del gen de la *ITPA* confiere un carácter protector delante de esta posibilidad. Este marcador farmacogenético puede ser de esencial importancia para tomar decisiones acerca del tratamiento del VHC en este tipo de pacientes.

Creemos que una de las principales aportaciones de esta tesis es haber demostrado que determinadas variantes alélicas del *ITPA* se asocian con una mayor RVS. Ya no se trata tan solo de predecir una menor anemia. Se trata de que, con los resultados presentados, el gen de la *ITPA* alcanza un rol todavía más relevante, al poder predecir la RVS.

F.7. Validez práctica de estos resultados

Realizar el genotipado de la *IL28B-ITPA* será obligado antes de decidir el esquema terapéutico a seguir en el tratamiento del VHC en pacientes infectados por el VIH. No existen guías actualizadas que recomienden el genotipado *IL28B-ITPA* como rutina habitual previa a la elección del tratamiento en pacientes *naïves* al mismo. Hay varios argumentos a favor de esta práctica clínica:

- Cerca de un 50% de la población es portadora del genotipo CC rs12979860 *IL28B*, y hasta un 25% de la población es portadora del genotipo CA/AA rs1127354 en el gen de la *ITPA*; que se asocian con altos porcentajes de RVS al tratamiento doble con PEGIFN/RBV en pacientes coinfectados.
- Los tratamientos triples, recientemente aprobados, alcanzan porcentajes de RVS por encima del 70%. Desafortunadamente, los tratamientos triples tienen un precio elevadísimo, y una toxicidad incrementada respecto los tratamientos dobles.
- ¿Trataremos a todos los pacientes con terapias triples? La respuesta no es clara, aunque no parece prudente reconvertir todos los tratamientos dobles en tratamientos triples. El motivo fundamental es el económico, y también el aumento de efectos secundarios asociado a las terapias triples.

- La RVS de los pacientes portadores del genotipo CC rs12979860 *IL28B* con un tratamiento doble (PEG-INF + RBV), llega hasta el 70% en nuestra población. El genotipo CC del rs12979860 *IL28B* es un factor predictivo -previo al tratamiento- independiente asociado a la RVS, tanto en pacientes con G1.
- La RVS en pacientes con el genotipo CA/AA rs1127354 en el gen de la *ITPA*, es del 78% en nuestra población. El genotipo CA/AA del rs1127354 *ITPA* es un factor predictivo -previo al tratamiento- con tendencia a asociarse a la RVS
- El poder discriminador conjunto de los dos genes sobre la presencia de RVS es del 70%, aunque el mayor peso de esta asociación es debido al gen de la *IL28B*.
- En pacientes con G3 VHC, con altos porcentajes de RVS, no es necesario conocer el genotipado *IL28B-ITPA*, para predecir la RVS. El genotipado *ITPA*, si nos será de ayuda para predecir las posibilidades de anemia.
- Pacientes con G1. Los pacientes CC rs12979860 *IL28B* y CA/AA rs1127354 *ITPA* deberán iniciar un tratamiento doble. Parece recomendable iniciar un tratamiento triple a los pacientes portadores de los genotipos TT/CT rs12979860 y CC rs1127354. En caso de datos enfrentados (por ejemplo, un paciente portador CC rs12979860/*IL28B*, y CC rs1127354/*ITPA*), parece prudente seguir las directrices que marcan los genotipos *IL28B*.
- Las variantes alélicas CA/AA rs1127354 del gen de la *ITPA*, son factores predictivos independientes de anemia en pacientes VIH/VHC con tratamiento con PEGIFN/RBV, independientemente del genotipo VHC. Por lo tanto, el genotipado de la *ITPA*, será de utilidad en todos los pacientes en los que sea importante predecir la presencia de una posible anemia. Por ejemplo: pacientes con Hb basal por debajo de 13, pacientes con cardiopatías asociadas, pacientes con otras comorbilidades asociadas y pacientes ancianos.

G. CONCLUSIONES

1. El genotipo CC del SNP rs12979860 en el gen de la *IL28B* se asocia con una mayor RVS al tratamiento del VHC en pacientes coinfectados con el VIH.
2. Los genotipos CA/AA del SNP rs1127354 a nivel del gen de la *ITPA*, se asocian significativamente con una menor presencia de anemia. Los pacientes portadores de estas variables no precisan reducir las dosis de RBV y no requieren administración de EPO durante el tratamiento con PEGIFN/RBV. Todo ello se asocia con una mayor RVS al tratamiento del VHC.
3. Las dos marcadores farmacogenéticos (*IL28B-ITPA*) se comportan como factores independientes de RVS en el estudio multivariado.
4. Los marcadores farmacogenéticos tiene un valor predictor de RVS y de la toxicidad asociada a RBV. Es por ello que su determinación debe formar parte del algoritmo de decisión para optimizar la elección del tratamiento anti-VHC.

H. BIBLIOGRAFÍA

- Afdhal N, Dieterich D, Pockros P, et al.: Epoetin α maintains ribavirin dose in HCV-infected patients: A prospective, double-blind, randomized controlled study. *Gastroenterology* 2004; 126:1302–1311.
- Ahlenstiel G, Booth D, George J. IL28B in hepatitis C virus infection: translating pharmacogenomics into clinical practice. *J Gastroenterol.* 2010; 45:903-10.
- Al-Mohri H, Cooper C, Murphy T, Klein MB. Validation of a simple model for predicting liver fibrosis in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *HIV Med.* 2005; 6: 375-378.
- Alberti A, Noventa A, Benvegnù L, Boccato S, Gatta A. Prevalence of liver disease in a population of asymptomatic persons with hepatitis c virus infection. *Ann Intern Med* 2002; 137: 961-964.
- Alcamí J. Ciclo replicativo del VIH. Dianas terapéuticas consolidadas y dianas potenciales. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008; 26 Supl 12:3-10.
- Alonso P, Orduna A, San Miguel A, et al. Genotypes of hepatitis C virus: their relationship with risk factors, the severity of liver disease, and the serologic response. *Med Clin (Barc).* 1998; 110:681-6.
- Aouizerat B, Pearce C, Miaskowski C. The search for host genetic factors of HIV/AIDS pathogenesis in the post-genome era: progress to date and new avenues for discovery. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2011 Mar;8(1):38-44.
- Azakami T, Hayes C, Sezaki H, et al. Common genetic polymorphism of ITPA gene affects ribavirin-induced anemia and effect of peg-interferon plus ribavirin therapy. *J Med Virol.* 2011 Jun;83(6):1048-57.
- Bach N, Theise N, Schaffner F. Hepatic histopathology in the acquired immunodeficiency syndrome. *Seminars in Liver Disease* 1992; 12, 205–12.
- Barnes K. Genome wide association studies in allergy and the influence of ethnicity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2010 Oct;10(5):427-33.
- Barré-Sinoussi F, Chermann J, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220 (4599); 868–71.
- Barreiro P, Martín-Carbonero L, Núñez 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. *Clin Infect Dis.* 2006 1;42(7):1032-9.
- Barreiro P, Pineda JA, Rallón N, et al. Influence of interleukin-28B single-nucleotide polymorphisms on progression to liver cirrhosis in human immunodeficiency virus-hepatitis C virus-coinfected patients receiving antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2011 Jun 1; 203(11):1629-36.
- 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. *J Gen Virol* 1995; 76:1737-48
- Beld M, Penning M, Lukashov V, et al. Evidence that both HIV and HIV-induced immunodeficiency enhance HCV replication among HCV seroconverters. *Virology.* 1998; 244:504-12.
- Berenguer J, Alvarez-Pellicer J, Miralles P, et al. Sustained Virological Response to Interferon Plus Ribavirin Reduces Liver-Related Complications and Mortality in Patients Coinfected with Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus. *Hepatology.* 2009 Aug; 50(2):407-13.
- Berenguer J, Crespo M, Galindo M, et al. Sustained Virological Response to Interferon plus Ribavirin Reduces HIV Progression and Non-liver-related Mortality in Patients Co-infected with HIV and HCV. Abstract 167. Congreso: 18th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections (CROI). San Francisco Feb 2010.
- Berenguer J, von Wichmann M, Quereda C, et al. Effect of accompanying antiretroviral drugs on virological response to pegylated interferon and ribavirin in patients co-infected with HIV and hepatitis C virus. *J Antimicrob Chemother.* 2011; doi:10.1093/jac/dkr362
- Berg T, von Wagner M, Nasser S, et al. Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1: comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon- α -2a plus ribavirin. *Gastroenterology* 2006; 130: 1086-97.
- Benhamou Y, Bochet M, Di Martino V, et al. Liver fibrosis progression in HIV and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multivirc Group. *Hepatology.* 1999;30:1054-8.
- Benhamou Y, Di Martino V, Bochet M. et al. Factors affecting liver fibrosis in human immunodeficiency virus- and hepatitis C virus-coinfected patients: impact of protease inhibitor therapy. *Hepatology* 2001; 34, 283–7.
- Blight K, Rowland R, Hall P, et al. Immunohistochemical detection of the NS4 antigen of hepatitis C virus and its relation to histopathology. *Am J Pathol.* 1993 Dec;143(6):1568-73.
- Bonacini M, Govindarajan S, Blatt L, et al. Patients co-infected with HIV and hepatitis C virus demonstrate higher levels of hepatic HCV-RNA. *J Viral Hepat.* 1999;6:203-8.
- Bonacini M, Bzowej N, Louie S, Wohl A. Survival in patients with HIV infection and viral hepatitis B or C. *AIDS.* 2004; 18:2039-45.

- Bonacini M. Liver injury during highly active antiretroviral therapy: The effects of hepatitis C coinfection. *Clin Infect Dis* 2004; 38: S104-S108.
- Bonnet F, Morlat P, Chene G, et al. Causes of death among HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy, Bordeaux, France, 1998-1999. *HIV Med.* 2002;3:195-9.
- Burgis N, Brucker J, Cunningham R. Repair system for noncanonical purines in *Escherichia Coli*. *J Bacteriol* 2003; 185:3101-10.
- Bronowicki J, Ouzan D, Asselah T, et al. Effect of ribavirin in genotype 1 patients with hepatitis C responding to pegylated interferon α -2a plus ribavirin. *Gastroenterology* 2006; 131:1040-1048.
- Bukh J, Miller R, Purcell R. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995; 15: 41-54.
- Buti M. Implicaciones actuales y futuras de la cinética de aclaramiento viral en el tratamiento de la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol.* 2004; 27 (Supl 1): 24-9.
- Cacoub P, Carrat F, Bedossa P, et al. Comparison of non-invasive liver fibrosis biomarkers in HIV/HCV co-infected patients: the fibroic study--ANRS HC02. *J Hepatol* 2008; 48: 765-773.
- Castera L. Transient elastography and other noninvasive tests to assess hepatic fibrosis in patients with viral hepatitis. *J Viral Hepat.* 2009 May;16(5):300-14.
- Carrat F, Bani-Sadr F, Pol S, et al. Pegylated interferon α -2b vs standard interferon α -2b, plus ribavirin, for chronic hepatitis C in HIV-infected patients. *JAMA.* 2004; 292: 2839-48.
- Chayama K, Hayes CN, Abe H, et al. IL28B but not ITPA polymorphism is predictive of response to pegylated interferon, ribavirin, and telaprevir triple therapy in patients with genotype 1 hepatitis C. *J Infect Dis.* 2011 Jul;204(1):84-93.
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 1989 Apr 21; 244:359-62.
- Chung R, Andersen J, Volberding P, et al. Peginterferon α -2a plus ribavirin versus interferon α -2a plus ribavirin for chronic hepatitis C in HIV-coinfected persons. *N Engl J Med.* 2004; 351:451-9.
- Cita web 1 <http://www.unaids.org/es/resources/presscentre/featurestories/2011/>
- Cita web 2. <http://www.nacionesunidas.org.co/index.shtml?apc=BB--1--&x=64476>
- Cita web 3: International Committee on Taxonomy of Viruses. «61.0.6. Lentivirus». National Institutes of Health.
- Committee for medicinal products for human use European Medicines Agency (CHMP). Reflection paper on the use of pharmacogenetics in the pharmacokinetic evaluation of Medicinal Products. European Medicines Agency (EMA) 2007.
- Cruz J, Piera L, Bragg-Gresham J, et al. Resultados del estudio internacional de hemodiálisis DOPPS en Europa y España. *Nefrología* 2003; 23: 437-443.
- Daar E, Lynn H, Donfield S, et al. Hepatitis C virus load is associated with human immunodeficiency virus type 1 disease progression in hemophiliacs. *Journal of Infectious Diseases;* 2001: 183, 589-95.
- Darnell J, Kerr I, Stark G. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994; 264: 1.415-1.421.
- Davis G, Wong J, McHutchinson J, et al. Early virologic response to treatment with peginterferon α -2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 645-652.
- De Franceschi L, Fattovich G, Turrini F, et al. Hemolytic anemia induced by ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection: Role of membrane oxidative damage. *Hepatology* 2006; 31: 997-1004.
- de Lédinghen V, Douvin C, Kettaneh A, et al. Diagnosis of hepatic fibrosis and cirrhosis by transient elastography in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 41: 175-179.
- Deforges S, Evlashev A, Perret M, et al. Expression of hepatitis C virus proteins in epithelial intestinal cells in vivo. *J Gen Virol.* 2004 Sep;85:2515-23.
- Degos F. Hepatitis C and alcohol. *J Hepatol.* 1999; 31 (Suppl. 1): 113-118.
- Del Rio R, Post A, Singer M. Cost-effectiveness of hematologic growth factors for anemia occurring during hepatitis C combination therapy. *Hepatology* 2006; 44: 1598-606.
- Den Brinker M, Wit F, Wertheim-van Dillen P, et al. Hepatitis B and C virus co-infection and the risk for hepatotoxicity of highly active antiretroviral therapy in HIV-1 infection. *AIDS.* 2000; 14: 2895-902.
- 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. *Hepatology;* 2001: 34, 1193-9.
- Domingo P, Lozano F. Manejo de la toxicidad por fármacos antirretrovirales. *Enferm Infecc Microbiol Clin;* 2011;29(7):535-44.

- Dorrucci M, Pezzotti P, Phillips A. et al. Coinfection of hepatitis C virus with human immunodeficiency virus and progression to AIDS. Italian Seroconversion Study. *Journal of Infectious Diseases*; 1995: 172, 1503–8.
- Emery S, Mueller R, Young I. *Genética médica*. Ed Marbán, 10ª ed, 2001.
- Eyster E, Alter J, Aledort, M. et al. Heterosexual co-transmission of hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV). *Annals of Internal Medicine* 1991: 115, 764–8.
- Farci P, Purcell R. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin Liver Dis* 2000; 20: 103-126.
- Feld J, Hoofnagle J. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*; 2005: 436:967-972.
- Fleischer R, Boxwell D, Sherman K. Nucleoside analogues and mitochondrial toxicity. *CID* 2004; 38: 79-80.
- Fellay J, Thompson A, Ge D, et al. ITPA gene variants protect against anemia in patients treated for chronic hepatitis C. *Nature* 2010;464:405-408.
- Firmbach-Kraft I, Byers M, Shows T, Dalla-Favera R, Krolewski JJ. Tyk2, prototype of a novel class of non-receptor tyrosine kinase genes. *Oncogene* 1990; 5: 1.329-1.336.
- Flexner, C. HIV-protease inhibitors. *New England Journal of Medicine*; 1998: 338, 1281–92.
- Forns X, Ampurdanes S, Llovet JM, et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002; 36: 986-992.
- Forton D, Thomas H, Taylor-Robinson S. Central nervous system involvement in hepatitis C virus infection. *Metab Brain Dis*. 2004 Dec;19(3-4):383-91.
- Frazer K, Ballinger D, Cox D, et al. International HapMap Consortium; A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 2007;449:851-861.
- Fried M, Shiffman M, Reddy K, et al. Peginterferon α -2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002;347:975-82.
- Fried M, Hadziyannis S, Shiffman M, et al. Rapid viral response is more important predictor of sustained virological response (SVR) than genotype in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2008; 48 (Suppl. 2): 5A.
- Fukuhara T, Taketomi A, Motomura T, et al. Variants in IL28B in liver recipients and donors correlate with response to peg-interferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C. *Gastroenterology*. 2010;139: 1577-85.
- Fuster D, Galeras J, Gómez G, et al. Baseline factors associated with haematological toxicity of pegylated interferon alpha 2 a and ribavirin for the treatment of HCV infection in HIV coinfecting patients. *J Hepatol* 2005; 42(Suppl2): 230-231.
- García-Samaniego J, Soriano V, Castilla J. et al. Influence of hepatitis C virus genotypes and HIV infection on histological severity of chronic hepatitis C. The Hepatitis/HIV Spanish Study Group. *American Journal of Gastroenterology*; 1997:30–4.
- García-Samaniego J, Bravo R, Castilla J et al. Lack of benefit of protease inhibitors on HCV viremia in HIV-infected patients. *Journal of Hepatology* 1998; 28, 526–7.
- García-Retortillo, Forns X. Variabilidad genómica e historia natural de la infección por el virus de la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol* 2002; 25: 514-520.
- Ge D, Fellay J, Thompson A, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment- induced viral clearance. *Nature*. 2009; 461:399-401.
- Gershon E, Alliey-Rodríguez N, Liu C. After GWAS: searching for genetic risk for schizophrenia and bipolar disorder. *Am J Psychiatry*. 2011 Mar;168(3):253-6.
- Ghany M, Kleiner D, Alter H, et al. Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003; 124: 97-104.
- Ghany M, Streader D, Thomas D, Seeff L. Diagnosis, management and Treatment of hepatitis C: An Update. *Hepatology* 2009. 49 (4): 1335-1374.
- Giachetti C, Linnen J, Kolk D, et al. Highly sensitive multiplex assay for detection of human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2408-19.
- Gibson & Muse. *A Primer of Genome Science*, 2nd Edition. Sinauer Associates. 2004. Andrew Bates. «DNA structure». DNA topology. Oxford University Press.
- Greub G, Ledergerber B, Battegay, M. et al. Clinical progression, survival, and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HIV-1 and hepatitis C virus coinfection: the Swiss HIV Cohort Study. *Lancet* 2000; 356, 1800–5.
- Griffiths A, Wessier S, Lewontin C, Carroll S. *Genética*. McGraw-Hill, 9ª ed, 2008.

- Guardiola J, Martin J, Lamarca K, et al. IL28B SNP (rs12979860) differences between HIV/HCV and HCV mono-infected patients. Abstract MoPe201. 6th IAS. Roma Jul 2011.
- Guardiola J, Pacho C, Martín J, et al. ITPA Polymorphism Gene Variants Protect against RBV-induced Anemia in HIV/HCV Patients Treated for Chronic Hepatitis C. 11th CROI. Sesión 100. Comunicación oral 480. Boston. Feb-2011.
- Guo J, Bichko V, Seeger C. Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon. *J Virol.* 2001 Sep; 75(18):8516-23.
- Hadziyannis S, Sette H, Morgan T, et al. Peginterferon alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004; 140: 346-355.
- Hayashi J, Kishihara Y, Yamaji K, et al. Hepatitis C viral quasispecies and liver damage in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1997; 25: 697-701.
- Hitomi Y, Cirulli E, Fellay J, et al. Inosine triphosphate protects against ribavirin-induced adenosine triphosphate loss by adenylosuccinate synthase function. *Gastroenterology.* 2011 Apr; 140 (4):1314-21.
- Honda M, Sakai A, Yamashita T, et al. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2010 Aug;139(2):499-509.
- Horwitz M. Basic concepts in Medical Genetics. McGrawHill Interamericana, 2000.
- Housset C, Lamas E, Cournaud V. et al. Presence of HIV-1 in human parenchymal and non-parenchymal liver cells in vivo. *Journal of Hepatology* 19, 252–8.
- Hung C, Lee C, Lu S, et al. Anemia associated with antiviral therapy in chronic hepatitis C: incidence, risk factors, and impact on treatment response. *Liver Int* 2006, 26:1079-86.
- Innocenti F, Cox N, Dolan M. The use of genomic information to optimize cancer chemotherapy. *Semin Oncol.* 2011 Apr;38 (2):186-95.
- Iribarren J, González-García J. Ingresos hospitalarios y mortalidad en pacientes con sida en la era TARGA: ¿hacia dónde vamos? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004; 22:129-32.
- Jacobson I, McHutchison J, Dusheiko G, et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2011; 364(25):2405-16.
- Johansen C, Kathiresan S, Hegele R. Genetic determinants of plasma triglycerides. *J Lipid Res.* 2011 Feb; 52(2):189-206.
- Jonsson J, Barrie H, O'Rourke P, Clouston A, Powell E. Obesity and steatosis influence serum and hepatic inflammatory markers in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2008 Jul;48(1):80-7.
- Klein M, Lalonde R, Suissa S. The impact of hepatitis C virus coinfection on HIV progression before and after highly active antiretroviral therapy. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes;* 2003: 33, 365–72.
- Klugs W, Cummings M, Spencer C. Genética. Pearson Prentice Hall, 8ª ed. 2006.
- Kobayashi M, Tanaka E, Sodeyama T, et al. The natural course of chronic hepatitis C: a comparison between patients with genotypes 1 and 2 hepatitis C viruses. *Hepatology* 1996; 23: 695-699.
- Kobayashi M, Tanaka E, Matsumoto A, et al. Antibody response to E2/NS1 hepatitis C virus protein in patients with acute hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12: 73-76.
- Kontorinis N, Dieterich D. Toxicity of non-nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors. *Seminars in Liver Disease;* 2003: 23, 173–81.
- Kruglyak L. The road to genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* 2008;9:314-318.
- Kuo G, Choo Q, Alter H, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science.* 1989 Apr 21;244:362-4.
- Labarga P, Barreiro P, Mira J, et al. Impact of IL28B polymorphisms on response to peginterferon plus ribavirin in HIV-HCV coinfecting patients with prior non-response or relapse. *AIDS.* 2011 May 15;25(8):1131-3.
- Labarga P, Barreiro P, Guardiola JM, et al. Induction with High-dose RBV Does Not Improve HCV RNA Kinetics in HIV/HCV Co-infected Patients Starting HCV Therapy. Abstract 962. 7th CROI Boston, 2011.
- Laguno M, Murillas J, Blanco JL, et al. Peginterferon α -2b plus ribavirin compared with interferon α -2b plus ribavirin for treatment of HIV/HCV co-infected patients. *AIDS.* 2004;18:F27-36.
- Laguno M, Cifuentes C, Murillas J, et al. Randomized trial comparing pegylated interferon alpha-2b versus pegylated interferon alpha-2a, both plus ribavirin, to treat chronic hepatitis C in human immunodeficiency virus patients. *Hepatology.* 2009;49:22-31.
- Laskus T, Radkowski M, Piasek A, et al. HCV in lymphoid cells of patients coinfecting with HIV-1: evidence of active replication in monocytes/macrophages and lymphocytes. *J Infect Dis.* 2000;181:442-8.
- Lebray P, Benhamou Y, Pol S. et al. NNRTI related or unrelated hepatotoxicity? *Hepatology;* 2002: 36, 512–3.

- Lee S, Antony A, Lee N, et al. Improved version 2.0 qualitative and quantitative AMPLICOR reverse transcription-PCR test for hepatitis C virus RNA: Calibration to international units, enhanced genotype reactivity, and performance characteristics. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4171-4179.
- Lens S, Coto-Llerena M, Pérez del Pulgar S, Fornis X. Genetics and hepatitis C treatment: towards a personalized treatment?. *Gastroenterol Hepatol*. 2011 May; 34(5):352-60.
- Lenzo N, Garas B, French M. Hepatic steatosis and lactic acidosis associated with stavudine treatment in an HIV patient: a case report. *AIDS* 1997; 11, 1294-6.
- León P, López J, Amela C, Elola C, Echevarría JM. Prevalencia de tipos del virus de la hepatitis C en donantes de sangre españoles: resultados de un estudio multicéntrico de ámbito estatal. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1999;17:448-54.
- Lesens O, Deschenes M, Steben M. et al. Hepatitis C virus is related to progressive liver disease in human immunodeficiency virus-positive hemophiliacs and should be treated as an opportunistic infection. *Journal of Infectious Diseases*; 1999:179, 1254-8.
- Loustaud-Ratti V, Alain S, Rousseau A, et al. Ribavirin exposure after the first dose is predictive of sustained virological response in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2008; 47; 5: 1453-61.
- Macías J, Melguizo I, Fernández-Rivera F, et al. Mortality due to liver failure and impact on survival of hepatitis virus infections in HIV-1-infected patients receiving potent antiretroviral therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002; 21:775-81.
- Macías J, Giron-Gonzalez JA, Gonzalez-Serrano M, et al. Prediction of liver fibrosis in human immunodeficiency virus/hepatitis C virus coinfecting patients by simple non-invasive indexes. *Gut* 2006; 55: 409-414.
- Macías J, Recio E, Vispo E, Rivero A. Application of transient elastometry to differentiate mild from moderate to severe liver fibrosis in HIV/HCV co-infected patients. *J Hepatol*. 2008 Dec;49(6):916-22.
- Mallolas J. Tratamiento de la hepatitis por virus C en pacientes coinfectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Gastroenterol Hepatol*. 2011. doi:10.1016/j.gastrohep.2011.01.005.
- Mangia A, Thompson A, 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. *Gastroenterology*. 2010;139:821-7.
- Manns M, McHutchison J, Gordon S, et al. Peginterferon α 2b plus ribavirin compared with interferon α 2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. *Lancet* 2001; 338: 958-965.
- Marcellin P, Asselah T, Boyer N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology*; 2002; 36, S47-56.
- Marsh S, King C, Ahluwalia R, McLeod HL. Distribution of ITPA P32T alleles in multiple world populations. *J Hum Genet* 2004; 49:579-81.
- 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. *Clin Infect Dis*. 2004 Jan 1;38(1):128-33.
- Martin-Carbonero L, de Ledinghen V, Moreno A, et al. Liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C and persistently normal liver enzymes: influence of HIV infection. *J Viral Hepat*. 2009 Nov;16(11):790-5.
- Martinez-Sierra C, Arizcorreta A, Diaz F et al. Progression of chronic hepatitis C to liver fibrosis and cirrhosis in patients coinfecting with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. *Clinical Infectious Diseases*; 2003; 36, 491-8.
- Martinot-Peignoux M, Marcellin P, Pouteau M, et al. Pretreatment serum HCV RNA levels and genotype are the main and independent prognostic of sustained response to alpha interferon therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1995;22:1050-1056.
- Mastroianni C, Liuzzi G, d'Ettore G. et al. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1 in plasma of patients co-infected with HCV and HIV. *HIV Clinical Trials*; 2002; 3, 310-5.
- Matthews D, Hosker J, Rudenski A, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and B-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-9.
- Mauss S, Klinker H, Ulmer A, et al. Response to treatment of chronic hepatitis C with interferon alpha in patients infected with HIV-1 is associated with higher CD4+ cell count. *Infection*. 1998; 26:16-9.
- Maylin S, Martinot-Peignoux M, Ripault M, et al. Sustained virological response is associated with clearance of hepatitis C virus RNA and a decrease in hepatitis C virus antibody. *Liver Int*. 2009 Apr; 29(4):511-7.
- Memon MI, Memon MA. Hepatitis C: an epidemiological review. *J Viral Hepat* 2002; 9: 84-100.
- Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988 Feb 11; 16(3):1215.
- McCarthy J, Li J, Thompson A, et al. Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. *Gastroenterology*. 2010;138:2307-14.

- McHutchison J, Gordon S, Schiff E, et al. Interferon α -2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998; 339:1485-92.
- McHutchison J, Manns M, Patel K, et al. Adherence to combination therapy enhances sustained response in genotype-1 infected patients with chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology* 2002; 123: 1061-1069.
- McHutchison J, Lawitz E, Shiffman M, et al. Peginterferon α -2b or α -2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. *N Engl J Med* 2009; 361:580-593.
- McCroft A, Phillips A, Soriano V, et al. Reasons for stopping antiretrovirals used in an initial highly active antiretroviral regimen: increased incidence of stopping due to toxicity or patient/physician choice in patients with hepatitis C coinfection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2005; 21:527-36.
- Mohsen A, Easterbrook P, Taylor C. et al. Impact of human immunodeficiency virus (HIV) infection on the progression of liver fibrosis in hepatitis C virus infected patients. *Gut*; 2003; 52, 1035-40.
- Monga H, Rodriguez-Barradas M., Breaux K. et al. Hepatitis C virus infection-related morbidity and mortality among patients with human immunodeficiency virus infection. *Clinical Infectious Diseases*; 2001; 33, 240-7.
- Montes-Cano M, García-Lozano J, Abad-Molina C, et al. Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *Hepatology*. 2010;52:33-7.
- Muller M, Briscoe J, Laxton C, et al. The protein tyrosine kinase JAK 1 complements defects in interferon- α/β and - γ signal transduction. *Nature (Lond)* 1993; 366: 129-136.
- National Institutes of health. Consensus development conference statement management of hepatitis C: 2002- June 10-12. *Hepatology* 2002; 36 (Suppl 1): 3S-20S.
- Neau D, Trimoulet P, Winnock M. et al. Impact of protease inhibitors on intrahepatic hepatitis C virus viral load. *AIDS*; 2001; 15, 1736-8.
- Novo F. Genética humana. Conceptos, mecanismos y aplicaciones de la Genética en el campo de la Biomedicina. Pearson Prentice Hall, 2007.
- Nunes D, Fleming C, Offner G, et al. HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 40: 538-544.
- Núñez M, Miralles E, Berdún MA, et al. Role of Weight-Based Ribavirin Dosing and Extended Duration of Therapy in Chronic Hepatitis C in HIV-Infected Patients: The PRESCO Trial. *Aids Research and Human Retroviruses*; 2007; 23 (8) 972-982.
- Ochi H, Maekawa T, Abe H, et al. ITPA polymorphism affects ribavirin-induced anemia and outcomes of therapy- a genome-wide study of Japanese HCV virus patients. *Gastroenterology*. 2010 Oct;139(4):1190-7.
- Oliver F, Ballesta F, Oriola J, Claria J. Genética médica. Universidad de Barcelona, 2004.
- Opravil M, Sasadeusz J, Cooper DA, et al. Effect of baseline CD4 cell count on the efficacy and safety of peginterferon α -2a (40KD) plus ribavirin in patients with HIV/hepatitis C virus coinfection. *J AcquirImmune Defic Syndr*. 2008; 47: 36-49.
- Ortiz V, Berenguer M, Rayon JM, et al. Contribution of obesity to hepatitis C-related fibrosis progression. *Am J Gastroenterol*. 2002; 97: 2408-2414.
- Palella J, Delaney KM, Moorman AC, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced HIV infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med*. 1998; 338: 853-60.
- Pawlotsky JM. Use and interpretation of hepatitis C virus diagnostic assays. *Clin Liver Dis* 2003;7:127-137.
- Pearson T, Manolio A. How to interpret a genome wide association study. *JAMA* 2008;299:1335-1344.
- Phair JP, Wonsky S. Diagnosis of infection with the human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis*. 1989; 159:320-323.
- Pineda JA, Cruz 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. *Clin Infect Dis*. 2010;51:788-95.
- Pérez-Olmeda M, Ríos P, Núñez M, et al. Virological characteristics of hepatitis C virus infection in HIV-infected individuals with chronic hepatitis C: implications for treatment. *AIDS*. 2002;16:493-5.
- Pirota L, Duong M, Quantin C, et al. Does hepatitis C virus co-infection accelerate clinical and immunological evolution of HIV-infected patients? *AIDS*; 1998; 12, 381-8.
- Poordad F, McCone J, Bacon B, et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med*. 2011; 364(13):1195-206.
- Poynard T, Marcellin P, Lee S, et al. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 1998, 352: 1426-32.
- Prince A, Brotman B, Huima T, et al. Immunity in hepatitis C infection. *J Infect Dis* 1992; 165: 438-443.

- Puoti M, Spinetti A, Ghezzi A, et al. Mortality for liver disease in patients with HIV-infection: a cohort study. *J Acquir Immun Defic Syndr*. 2000;24:211-7.
- Puoti M, Bonacini M, Spinetti A, et al. Liver fibrosis progression is related to CD4+ cell depletion in patients with hepatitis C and HIV coinfection. *J Infect Dis*. 2001;183:134-7.
- Puoti M, Bruno R, Soriano V, et al. Hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients: epidemiological features, clinical presentation and outcome. *AIDS*. 2004;18:2285-93.
- Qurishi N, Kreuzberg C, Luchters G, et al. Effect of antiretroviral therapy on liver-related mortality in patients with HIV and hepatitis C coinfection. *Lancet*. 2003;362: 1708-13.
- Rallon N, Naggie S, Benito JM, et al. Association of a single nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene with response to hepatitis C therapy in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *AIDS*. 2010;24:F23-9.
- 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. *Gastroenterology*. 2010;138:1338-45.
- Rancinan C, Neau D, Saves M. et al. Is hepatitis C virus co-infection associated with survival in HIV-infected patients treated by combination antiretroviral therapy? *AIDS*; 2002: 16, 1357-62.
- 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. *Gastroenterology* 2010, 138:1338-1345.
- Read A, Donnai D. Nueva Genética clínica. Omega ed, 2008.
- Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep* 1998; 47: 1-39.
- Recomendaciones de Gesida / PNS / AEEH Sobre Tratamiento y Manejo Del Paciente Adulto Coinfectado por VIH y virus de las hepatitis A, B y C Septiembre 2009. http://www.gesida.seimc.org/pcientifica/fuentes/DcyRc/gesidacyrc2009_coinfectadosvihvc.pdf
- Reddy K, Shiffman M, Morgan T, et al.: Impact of ribavirin dose reductions in hepatitis C virus genotype 1 patients completing peginterferon alpha-2a and ribavirin treatment. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5:124-129.
- Reisler R, Han C, Burman W, et al. Grade 4 events are as important as AIDS events in the era of HAART. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003;34:379-86.
- Rockstroh J, Spengler U, Sudhop T, et al. Inmunosupresión may lead to progression of hepatitis C virus associated liver disease in hemophiliacs coinfecting with HIV. *Am J Gastroenterol*. 1996;91:2563-8.
- Rockstroh J, Bhagani S, Benhamou Y, et al. European AIDS Clinical Society(EACS) guidelines for the clinical management and treatment of chronic hepatitis B and C coinfection in HIV-infected adults. *HIV Med* 2008, 9:82-8.
- Romero-Gómez M, Vilorio M, Andrade R, et al. Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 2005; 128: 636-641.
- Romero-Gómez M. Hepatitis C y resistencia a la insulina: esteatosis, fibrosis y no respuesta. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 2006; 98: 8-10.
- Rosen H. Chronic Hepatitis C Infection. *N Engl J Med* 2011; 364:2429-38.
- Sakumi K, Abolhassani N, Behmanesh M, et al. ITPA protein, an enzyme that eliminates deaminated purine nucleoside triphosphates in cells. *Mutat Res*. 2010 Nov 28;703(1):43-50.
- Salmerón J, Casado J, Muñoz De Rueda P, et al. Quasispecies as predictive factor of rapid, early and sustained virological responses in chronic hepatitis C, genotype 1, treated with peginterferon-ribavirin. *J Clin Virol*. 2008; 41 (4): 264-269.
- Sánchez-Tapias J, Diago M, Escartín P, et al. Peginterferon-alpha 2a plus ribavirin for 72 weeks in chronic hepatitis C patients without a response by week 4. *Gastroenterology* 2006; 131:451-460.
- Sarrazin C, Susser S, Doehring A, et al. Importance of IL28B gene polymorphisms in hepatitis C virus genotype 2 and 3 infected patients. *J Hepatol*. 2011;54:415-21.
- Seeff L, Hollinger F, Alter H, et al. Long-term mortality and morbidity of transfusion-associated non-A, non-B and type C hepatitis; a National Heart, Lung, and Blood Institute collaborative study. *Hepatology* 2001; 33: 455-463.
- Schiff ER. The alcoholic patient with hepatitis C virus infection. *Am J Med*. 1999; 107: 95S-99S.
- Shiffman M, Salvatore J, Hubbard S, et al. Treatment of chronic hepatitis C virus genotype 1 with peginterferon, ribavirin and epoetin alpha. *Hepatology* 2007; 46:371-379.
- Shiffman M, Ghany M, Morgan T, et al. Impact of reducing peginterferon α -2a and ribavirin dose during retreatment in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2007;132:103-112.
- Shiffman M, Suter F, Bacon B, et al. Peginterferon α -2a and ribavirin for 16 or 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med*. 2007; 357: 124-134.

- Shuai K, Stark GR, Kerr IM, Darnell JE. A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon. *Science* 1993; 261: 1.744-1.746.
- Smith JA, Daniel R. Following the path of the virus: the exploitation of host DNA repair mechanisms by retroviruses. *ACS Chem Biol* 1 2006 (4): pp. 217-26.
- Solari A. *Genética humana. Fundamentos y aplicaciones en Medicina*. Ed. Panamericana, 3ª ed, 2004.
- Soriano V, García-Samaniego J, Bravo R, et al. Interferon alpha for the treatment of chronic hepatitis C in patients infected with HIV. *Clin Infect Dis*. 1996;23:585-91.
- Soriano V, Puoti M, Sulkowski M, et al. Care of patients with hepatitis C and HIV co-infection. Updated recommendations from the HIV-HCV International Panel. *AIDS*. 2004;18:1-12.
- Soriano V, Puoti M, García-Gascó P, et al. Antiretroviral drugs and liver injury. *AIDS*. 2008; 22:1-13.
- Soriano V, Mocroft A, Rockstroh J, et al. Spontaneous viral clearance, viral load, and genotype distribution of hepatitis C virus (HCV) in HIV-infected patients with anti-HCV antibodies in Europe. *J Infect Dis* 2008, 198:1337-44.
- Soriano V, Vispo E, Labarga P, et al. Viral hepatitis and HIV co-infection. *Antiviral Res*. 2010 Jan;85(1):303-15.
- Soto B, Rodrigo L, García-Bengoechea M, et al. Heterosexual transmission of hepatitis C virus and the possible role of coexistent human immunodeficiency virus infection in the index case. A multicentre study of 423 pairings. *Journal of Internal Medicine* 1994: 236, 515-9.
- Soto B, Sanchez-Quijano A, Rodrigo, L. et al. Human immunodeficiency virus infection modifies the natural history of chronic parenterally-acquired hepatitis C with an unusually rapid progression to cirrhosis. *Journal of Hepatology*; 1997: 26, 1-5.
- Stepchenkova E, Tarakhovskaya E, Spitler K, et al. Functional study of the P32T ITPA variant associated with drug sensitivity in humans. *J Mol Biol*. 2009 Sep 25;392(3):602-13.
- Sterling R, Lissen E, Clumeck N, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* 2006; 43: 1317-1325.
- Strachant T, Read A. *Genética humana*. McGrawHill, 3ª ed, 2006.
- Strasfeld L, Yungtai L, Netski D, et al. The association of hepatitis C prevalence, activity, and genotype with HIV infection in a cohort of New York City drug users. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*; 2003: 33, 356-64.
- Stenmark P, Kursula P, Flodin S, et al. Crystal structure of human inosine triphosphatase. Substrate binding and implication of the inosine triphosphatase deficiency mutation P32T. *J Biol Chem* 2007;282:3182-7.
- Suarez A, Viejo G, Navascués C, et al. Prevención de marcadores frente a los virus A, B y C de la hepatitis en la población de Gijón entre 26 y 65 años de edad. *Gastroenterol Hepatol* 1997; 20: 347-352.
- Sugano M, Hayashi Y, Yoon S, et al. Quantitation of hepatitis C viral RNA in liver and serum samples using competitive polymerase chain reaction. *J Clin Pathol*. 1995 Sep;48(9):820-5.
- Sulkowski M, Moore D, Mehta S et al. Hepatitis C and progression of HIV disease. *Journal of the American Medical Association*; 2002: 288, 199-206.
- Sulkowski M. Anemia in the treatment of hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis*. 2003; 37 Suppl 4: S315-22.
- Sulkowski M, Shiffman M, Afdhal N, et al. Hepatitis C virus treatment-related anemia is associated with higher sustained virologic response rate. *Gastroenterology*. 2010;139(5):1602-11.
- Sulkowski M, Dieterich D, Sherman K, et al; Interim Analysis of a Phase 2a Double-blind Study of TVR in Combination with pegIFN-a2a and RBV in HIV/HCV Co-infected Patients. 18th CROI. 2011. Abstract 146LB.
- Sumi S, Marinaki AM, Arenas M, et al. Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency. *Hum Genet* 2002; 111:360-367.
- Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G et al.: IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- α and ribavirin therapy. *Nat. Genet*. 2009; 41(10), 1100-1104.
- Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, et al. Influence of ITPA polymorphisms on decreases of hemoglobin during treatment with pegylated interferon, ribavirin, and telaprevir. *Hepatology*. 2011 Feb;53(2):415-21.
- Tanaka H, Miyano M, Ueda H, et al. Changes in serum and red blood cell membrane lipids in patients treated with interferon ribavirin for chronic hepatitis C. *Clin Exp Med* 2005, 5:190-5.
- Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*. 2009;41:1105-9.
- Tanaka Y, Kurosaki M, Nishida N, et al. Genome-wide association study identified ITPA/DDRGK1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hum Mol Genet*. 2011 Sep 1;20(17):3507-16.
- Tang X, Quian K, Yuan X, et al. Relationship between diversity of hepatitis C virus quasispecies and viremia, activity of liver disease and response to interferon therapy. *Chi J Exp Clin Virol*. 2002; 16: 128-131.

- Thio CL, Thomas DL. Interleukin-28b: a key piece of the hepatitis C virus recovery puzzle. *Gastroenterology*. 2010;138: 1240-43.
- Thomas D, Thio C, Martin M, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*. 2009;461:798-801.
- Thomas DL, Astemborski J, Rai R, et al. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. *JAMA*. 2000;284:450-6.
- Thomas E, Feld JJ, Li Q, et al. Ribavirin potentiates interferon action by augmenting interferon-stimulated gene induction in hepatitis C virus cell culture models. *Hepatology*. 2011 Jan; 53(1):32-41.
- Thompson A, Muir A, 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. *Gastroenterology*. 2010;139:120-9.
- Thompson A, Fellay J, Patel K, et al. Variants in the ITPA gene protect against ribavirin-induced hemolytic anemia and decrease the need for ribavirin dose reduction. *Gastroenterology* 2010 Oct; 139(4):1181-9.
- Thompson A, Santoro R, Piazzolla V, et al. Inosine triphosphatase genetic variants are protective against anemia during antiviral therapy for HCV2/3 but do not decrease dose reductions of RBV or increase SVR. *Hepatology*. 2011 Feb;53(2):389-9.
- Tillmann H, Thompson A, Patel K, et al. A polymorphism near IL28B is associated with spontaneous clearance of acute hepatitis C virus and jaundice. *Gastroenterology*. 2010;139:1586-92.
- Torre D, Tambini R, Canario F, et al. Evolution of coinfection with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus in patients treated with highly active antiretroviral therapy. *Clinical Infectious Diseases*. 2001; 33, 1579-85.
- Torriani F, Rodríguez-Torres M, Rockstroh J, et al. Peginterferon A-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 2004; 351: 438-45.
- Tuma P, Medrano J, Resino S, et al. Incidence of liver cirrhosis in HIV-infected patients with chronic hepatitis B or C in the era of highly active antiretroviral therapy. *Antivir Ther*. 2010;15(6):881-6.
- Urban T, Thompson A, Bradrick S, et al. IL28B genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon-stimulated genes in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2010;52:1888- 1896.
- Van Vierbergh H, Delanghe JR, De Vos M, et al. Factors influencing ribavirin-induced hemolysis. *J Hepatol* 2001, 34:911-6.
- Vergara S, Macias J, Rivero A, et al. The use of transient elastometry for assessing liver fibrosis in patients with HIV and hepatitis C virus coinfection. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 969-974.
- Von Ahnen N, Oellerich M, Armstrong V, et al. Characterization of the inosine triphosphatase (ITPA) gene: haplotype structure, haplotype-phenotype correlation and promoter function. *Ther Drug Monit*. 2008 Feb;30(1):16-22.
- Wai C, Greenon J, Fontana R, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 518-526.
- Wilks AF. Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1.603-1.707.
- Woitars R, Rockstroh J, Beier I, et al. Antigen-specific cytokine response to hepatitis C virus core epitopes in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *AIDS*: 1999; 13, 1313-22.
- Wright T, Hollander H, Pu X. et al. Hepatitis C in HIV-infected patients with and without AIDS: prevalence and relationship to patient survival. *Hepatology*; 1994: 20, 1152-5.
- Xu Z, Taylor JA. SNPinfo: integrating GWAS and candidate gene information into functional SNP selection for genetic association studies. *Nucleic Acids Res* 2009;37:600-605.
- Yan K, Guirgis M, Dinh T, et al. Treatment responses in Asians and Caucasians with chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol*. 2008;14: 3416-20.
- Yeh B, Han K, Lee H, Sohn J, Ryu W, Yoon D, et al. Factors predictive of response to interferon-alpha therapy in hepatitis C virus type 1b infection. *J Med Virol*. 2002; 66: 481-487.
- Younossi Z, Nader F, Bai C, et al. A phase II dose finding study of darbepoetin alpha and filgrastim for the management of anaemia and neutropenia in chronic hepatitis C treatment. *J Viral Hep* 2008, 15, 370.378.
- Zeuzem S, Herrmann E, Lee J, et al. Hepatitis C virus kinetics in chronically infected patients treated with pegylated interferon- α . *Hepatology* 1999; 30: 309A.
- Zhang C, Yang R, Xia X. et al. High prevalence of HIV-1 and hepatitis C virus coinfection among injection drug users in the southeastern region of Yunnan, China. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*; 2002: 29, 191-6.
- Zheng J, Singh VK, Jia Z. Identification of an ITPase/XTPase in *Escherichia coli* by structural and biochemical analysis. *Structure* 2005;13:1511-20.

