

TESI DOCTORAL 2011

Factors Predictius de la Resposta
al Tractament contra el VHC,
amb Interferó- α i Ribavirina,
en Pacients Coinfectats amb el VHC i el VIH-1.

Ester Aparicio Prats

Departament de Biologia, de Fisiologia i d'Immunologia
Facultat de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

**Factors predictius de resposta
al tractament contra el VHC,
amb interferó- α i ribavirina,
en pacients coinfectats amb el VHC i el VIH-1**

Ester Aparicio Prats

IrsiCaixa, Institut de Recerca de la Sida
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

Memòria de la tesi presentada per obtenir el grau de Doctor
en Immunologia per la Universitat Autònoma de Barcelona

Bellaterra, 20 de setembre del 2011

Director: Dr. Miguel Ángel Martínez de la Sierra
Tutora: Dra. Paz Martínez Ramírez



El Dr. Miguel Ángel Martínez de la Sierra, investigador senior del grup d'investigació en variabilitat genètica del VIH, d'IrsiCaixa, institut de recerca de la sida, ubicat en l'Hospital Univeristari Germans Trias i Pujol de Badalona,

Certifica:

Que el treball experimental i la redacció de la memòria de la Tesi Doctoral titulada: **Factors predictius de la resposta al tractament contra el VHC, amb interferó- α i ribavirina, en pacients coinfectats amb el VHC i el VIH-1**, han estat realitzades per l'Ester Aparicio Prats sota la seva direcció i considera que és apta per ser presentada per obtar al grau de Doctor en Immunologia per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I per tal que quedi constància, signa aquest document a Badalona, el 20 de setembre de 2011.

Dr. Miguel Ángel Martínez de la Sierra



La doctora Paz Martínez Ramírez, coordinadora de Tercer cicle de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

Certifica:

Que el treball experimental i la redacció de la memòria de la Tesi Doctoral titulada: **Factors predictius de la resposta al tractament contra el VHC amb interferó- α i ribavirina, en pacients coinfectats amb el VHC i el VIH-1**, han estat realitzades per l'Ester Aparicio Prats sota la seva tutoria i considera que és apta per ser presentada per optar al grau de Doctor en Immunologia per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I per tal de que quedi constància, signa aquest document a Bellaterra, el 20 de setembre de 2011.

Dra. Paz Martínez Ramírez

Als meus pares i al meu germà,
les persones amb qui sempre puc comptar, passi el que passi.
Us estimo.

"Computer says No!"
Little Britain

ABREVIACIONS USADES

ADN: Àcid desoxiribonucleic

AIC: Akaike information criterion; en català : criteri d'informació Akaike

ARFP: Alternative reading frame protein

ARN: Àcid ribonucleic

Asp: Àcid aspàrtic

ATP: Trifosfat d'adenosina

cADN: Àcid desoxiribonucleic complementari

CARDIF: Caspase recruitment domain adaptor-inducing

CCR5: C-C quimiocina receptora de tipus 5

CLND1: Claudin1

CR: Complex replicatiu

CVVHC: Càrrega viral del virus de la hepatitis C

Cys: Aminoàcid Cisteïna

dN: Mutacions no sinònimes pel potencial lloc no sinònim

DO: Densitat òptica

Dr: Doctor

Dra: Doctora

dS: Mutacions sinònimes pel potencial lloc sinònim

dS/dN: Distàncies sinònimes/distàncies no sinònimes

E.coli: Escherichia coli

EFG: Epithelial growth factor

ES: Entropia de Shannon

FEL: Fixed-effects likelihood method

GOT: Transaminasa glutamicooxalacètica

GPT: Transaminasa glutamicopirúvica

GWA: Genetic wide association

HCC: Hepatocarcinoma

HCVcc: Hepatitis c virus cell culture

His: Histidina

HLA: Human leukocyte antigen

IC: Interval de confiança

IFN- λ : Interferó lambda

IFN- α : Interferon alfa

IFN- β : Interferon beta

IFN-λ: Interferon gamma
IFNR: Receptor d'interferó
IL-1β: Interleucina-1 beta
IL10: Interleucina 10
IL28B: Interleucina 28B
IL6: Interleucina 6
IL8: Interleucina 8
IP: Inhibidor de proteasa
IPS1: Interferó-b promotor stimulator 1
IPTG: Isopropyl-beta-D-thiogalactopyraniside
IRES: Internal ribosome entry site
IRF-3: Interferon-regulatory-factor 3
IRF-7: Interferon-regulatory-factor 7
ISDR: Interferon-sensitivity determining region
ISGF3: Interferon-stimulated gene factor 3
ISGs: IFN-stimulated genes

Kb: Kilobases
KPa: Kilopascals

LB: Luria Bertani
LDL-R: Low density lipoprotein receptor

MAVS: Mitochondrial antiviral signalling protein
md: Mediana
MgSO4: Sulfat de magnesi
mM: NanoMolar
mU/ml: mil·li Unitats per mil·lilitre
MW: xarxa membranosa

n: Número absolut
NANB: Non A non B
NANBH: Non A non B hepatitis
NC: Nucleòtids
NF-κB: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
nm: Nanometres
NR: No responedors
NTR: Non-translated regions

OMS: Organització mundial de la salut
OR: Oportunitat relativa
ORF: Open reading frame

PAMP: Pathogen-associated molecular pattern

PCR: Polymerase chain reaction

peg-INF: Interferó pegilat

RBV: Ribavirina

RE: Reticle endoplasmàtic

RI: Rang interquartil

RIG-1: Retinoic-acid-inducible gene I

RT-PCR: Retrotranscription plus polymerase chain reaction

RVS: Resposta viral sostinguda

Ser: Serina

SNP: Single nucleotide polymorphism

SRBI: Scavenger receptor Class B type I

STAT-C: Specific target anti-viral therapy

TARGA: Teràpia antiretroviral de gran activitat

TBK1: TANK-binding kinase 1

TC-PTP: T-cell protein tyrosin phosphatase

TIR: Toll-interleukin-1 receptor

TLR3: Toll-like receptor 3

TNF- α : Tumor necrosis factor alfa

TRAF-6: TNF receptor associated factor 6

TRIF: Toll/interleukin-1(IL-1) receptor domain-containing adaptor-inducing IFN

UDI: usuàris de drogues intravenoses

ufc: Unitats formadores de clapes de lisi

μ g: Micrograms

UI: Unitats internacionals

μ l: Microlitres

VHA: Virus de la hepatitis A

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

VIH-1: Virus de la immunodeficiència humana tipus 1

VISA: Virus-induced signalling adaptor

Zn²⁺: Ió Zinc

PRÒLEG

El virus de la hepatitis C (VHC) infecta a 170 milions de persones arreu del món, causant hepatitis crònica que, en la majoria dels casos, acaba desembocant en malalties hepàtiques molt greus com la cirrosi o l'hepatocarcinoma cel·lular. De moment, no es disposa de cap vacuna preventiva o profilàctica, i la teràpia que s'utilitza avui en dia, basada amb interferó- α pegilat més ribavirina (peg-IFN α /RBV), no és efectiva per a tots els pacients, és molt costosa, de llarga durada i provoca greus efectes secundaris. El tractament està basat en el mecanisme de defensa que efectua la cèl·lula un cop és infectada, ja que quan això passa, s'activen una sèrie de rutes de senyalització que tenen com a finalitat l'expressió de molècules d'interferó α/β , les quals són les encarregades d'activar la resposta immunitària innata i l'adaptativa, cabdals per eliminar la infecció. El VHC bloqueja aquest sistema antiviral cel·lular i de retruc, la teràpia basada en ell, gràcies a la gran variabilitat genòmica que presenta el virus intraindividu (quasiespècies) i també, gràcies a la inhibició d'aquestes rutes de senyalització cel·lulars que acaben provocant l'expressió d'interferons, per part de certes proteïnes virals, com per exemple la proteasa NS3. A més la resposta al tractament basat amb IFN també depèn de les característiques del pacient, ja siguin clíniques (per exemple: sexe, edat o pes) o genòmiques. Recentment s'han relacionat diferents polimorfismes trobats en la zona genètica que codifica per diferents interferons- λ , en el cromosoma 19, que podrien estar involucrats tant en la depuració espontània del virus, sense ajut del tractament, com també en la resposta a la teràpia basada amb IFN- α .

En els pacients coinfectats amb el virus de la immunodeficiència humana tipus-1 (VIH-1) i el VHC, els índex de resposta al tractament amb IFN α /RBV, són encara més baixos que en monoinfectats. La coexistència dels dos virus fa que la patologia provocada pel VHC sigui més ràpida i virulenta, i que els efectes secundaris siguin encara més greus, ja que es sumen els efectes secundaris provocats per les dues teràpies combinades (teràpia antiretroviral i peg-IFN/RBV). És obvi doncs, que són un grup de pacients difícil de tractar, i per tant és vital i necessari trobar factors predictius de resposta al tractament actual, per tal d'evitar-los més complicacions clíniques de les que ja tenen.

ÍNDEX

Introducció	25
1-El VHC	25
1.1- Origen	25
1.2- Classificació	25
1.3- Variabilitat	25
1.3.1- Genotips i Subtipus	26
1.3.2- Quasiespècies	28
1.4- Epidemiologia	30
1.4.1- Prevalença del VHC	30
1.4.2- Vies de Transmissió	30
1.5- Història Natural de la Infecció	32
1.5.1- Infecció Aguda	32
1.5.2- Infecció Crònica	34
1.5.3- Coinfecció amb VIH-1 i VHC	35
1.6- Genoma del VHC	37
1.7- Proteïnes Virals	38
1.7.1- Proteïnes Estructurals	38
1.7.2- El Polipèptid P7	38
1.7.3- Proteïnes no Estructurals	39
1.8- Cicle Biològic	40
1.8.1- Entrada	40
1.8.2- Replicació	40
1.8.3- Assemblatge i Sortida	41
2- El complex NS3/4A	42
2.1- NS3	42
2.2- NS4	42
2.3- Processament de la Poliproteïna Viral	43
2.4- Substrat del Complex NS3/4A	44
3- La Resposta Antiviral i el VHC	45
3.1- La Resposta Antiviral Innata	45
3.2- NS3/4A Bloqueja la Resposta Immunitària	46
3.2.1- CARDIF	48
3.2.2- TRIF	48
3.3.3- TC-PTP	48

4- Tractament contra el VHC	50
4.1- Teràpia Actual	50
4.1.1- Interferó	50
4.1.2- Interferó més Ribavirina	50
4.1.3- Interferó Pegilat amb i sense Ribavirina	51
4.2- Efectes Secundaris de la Teràpia peg-IFN/RBV	51
4.3- Factors Predictius de la Resposta a la Teràpia amb IFN	52
4.3.1- Factors Virals	
4.3.2- Factors de l'Hoste	53
4.3.2.1- La Implicació dels Polimorfismes del gen IL28B en la	
Resposta a la Teràpia	55
4.4- Noves Teràpies (STAT-C)	58
Hipòtesi	63
Objectius	67
Materials i mètodes	71
1- Material Biològic	71
2- Anàlisis Clíniques	71
3- Estudi 1: SNPs rs8099917 i rs12979860 (IL28B) i la Resposta al Tractament amb peg-IFN/RBV	72
3.1- Obtenció i Extracció de l'ADN	72
3.2- Genotipatge del SNP rs8099917 i del SNP rs12979860	73
3.3- Anàlisi de les Dades de l'Estudi 1	74
4- Estudi 2: Variabilitat Genètica i Eficiència catalítica	75
4.1- Obtenció i Extracció de l'ARN	75
4.2- Amplificació de la Proteasa NS3/4A del VHC	75
4.3- Clonació de la Proteasa NS3/4A del VHC	78
4.4- Anàlisi de la Variabilitat Genètica de la Proteasa NS3 del VHC	79
4.5- Amplificació i Clonació dels Punts de Tall: CARDIF i NS5A/5B	81
4.5.1- Punt de Tall CARDIF	81
4.5.2- Punt de Tall NS5A/5B	83
4.6- Assaig de l'Eficiència Catalítica de la Proteasa NS3/4A	83
4.7- Anàlisi de les Dades de l'Estudi 2	85

Resultats	89
1- Estudi 1: SNPs rs8099917 i rs12979860 (IL28B) i la Resposta al Tractament amb peg-IFN/RBV	89
1.1- Característiques de la Població d'Estudi	89
1.2- Característiques Clíniques de la Població i la seva Relació amb la Resposta a la Teràpia amb pegIFN α /RBV	89
1.3- Prevalença del SNP rs8099917 en la Població	91
1.4- La Resposta a peg-IFN α /RBV i el Genotip de rs8099917	92
1.5- Prevalença del SNP rs12979860 en la Població	94
1.6- La Resposta a peg-IFN/RBV i el Genotip rs 12979860	97
1.7- Anàlisi de l'Haplotip rs8099917 + rs12979860	99
1.8- Anàlisi Univariat	100
1.9- Anàlisi Multinomial	101
2- Estudi 2: Variabilitat Genètica i Eficiència catalítica	104
2.1- Població d'Estudi	104
2.2- Variabilitat Genètica	106
2.2.1- Diversitat Genètica de les Quasiespècies de la Proteasa NS3/4A del VHC	106
2.2.2- Complexitat de les Quasiespècies de la Proteasa NS3 del VHC	111
2.3- Eficiència Catalítica	113
2.3.1- L'Eficiència Catalítica de la Proteasa NS3/4A i la Resposta a la Teràpia amb peg-IFN/RBV	113
3- Nous Factors Predictius de Resposta al Tractament amb peg-IFN/RBV: Variabilitat Genètica i Eficiència Catalítica	120
3.1- Anàlisi Univariat	120
3.2- Anàlisi Multinomial	122
Discussió	125
Conclusions	137
Bibliografia	141
Publicacions	161
Agraïments	179



INTRODUCCIÓ



1- EL VHC

1.1- Origen

El camp de la investigació sobre virus hepàtics va iniciar-se entre els anys 1950 i 1960, amb el descobriment d'agents infecciosos en sèrums que causaven hepatitis (inflamació del fetge) post-transfusió, com ara el virus de la hepatitis A (VHA), identificat pel Dr. Stephen Feinstone i col·laboradors¹, i el virus de la hepatitis B, (VHB) identificat pel Dr. Baruch Blumberg i col·laboradors². Durant els anys 70 els tests serològics que s'havien desenvolupat per tal d'identificar aquets virus (VHA i VHB) en sèrums, eren incapaçs de detectar aquests patògens en casos on també, s'havia transmès hepatitis de manera parenteral. Així va néixer el terme "Non-A Non B hepatitis" (NANBH) per designar aquesta patologia que provocava un nou patogen designat primerament com "non A non B" (NANB)³. No va ser fins l'any 1989, que en una companyia biotecnològica de Califòrnia, *Chiron Corporation*, gràcies a la feina dels Drs. Kuo, Choo i Houghton⁴, es va poder aïllar un clon cADN procedent d'un ximpanzé, prèviament infectat amb un sèrum d'un pacient infectat post-transfusió amb l'agent NANB. Aquests investigadors van anomenar aquest nou patogen descobert, *Virus de la Hepatitis C (VHC)*, i més endavant, gràcies als grans avenços en tècniques moleculars, diferents grups van poder aïllar, clonar i seqüenciar diferents variants del VHC.

1.2- Classificació

El VHC va ser classificat com a membre del gènere *Hepacivirus* (del grec *hepar*, *heptos*, que vol dir fetge), dins la família *Flaviviridae* (del llatí *flavus*, que vol dir groc, ja que el membre més destacat d'aquesta família és el *Virus de la Febre Groga*)⁵. Aquesta família consta d'aproximadament 80 virus, els quals presenten embolcall, tenen una cadena senzilla i positiva d'ARN com a genoma, i són els causants d'un gran nombre de malalties, provocades tant en humans com en animals, importants a nivell mundial. Aquesta família inclou 3 gèneres, els *Flavivirus* (Ex: *Virus de la Febre Groga*, *Virus del Nil occidental* i *Virus de la Febre del Dengue*), els *Pestivirus* (del llatí *pestis* que vol dir plaga; Ex: el Virus de la Diarrea viral Bovina) i els ja esmentats *Hepacivirus* (Ex: el *Virus de la Hepatitis C* i el *Virus de la Hepatitis G*).

1.3- Variabilitat

El VHC, com a bon membre de la comunitat dels virus ARN, presenta una gran variabilitat, representada per els diferents genotips i subtipus que circulen pel planeta,



i en un subnivell més profund, per les quasiespècies que conviuen dins d'un pacient infectat. Les diferents variants del VHC es poden classificar, a partir d'un arbre filogenètic fet amb genomes sencers o fragments subgenòmics, en 6 grups molt ben diferenciats entre sí, així parlem de 6 genotips diferents (designats per números del 1-6), i dins d'aquests, es poden diferenciar variants de fins a 100 subtipus diferents⁶ (designats per lletres, per exemple: 1a o 1b), i en una subdivisió més profunda, a nivell de variabilitat dins de l'individu infectat, podem parlar de quasiespècies, ja que el VHC es dissemina per l'hoste en forma de milions de genomes diferents però altament relacionats entre si. Les variants de diferents genotips es diferencien des d'un 30% fins a un 50% en la seva seqüència en nucleòtids, mentre que dins dels subtipus les diferències entre les seqüències en nucleòtids són del 10% al 30% i entre quasiespècies del 5% al 10%⁷ (Figura 1).

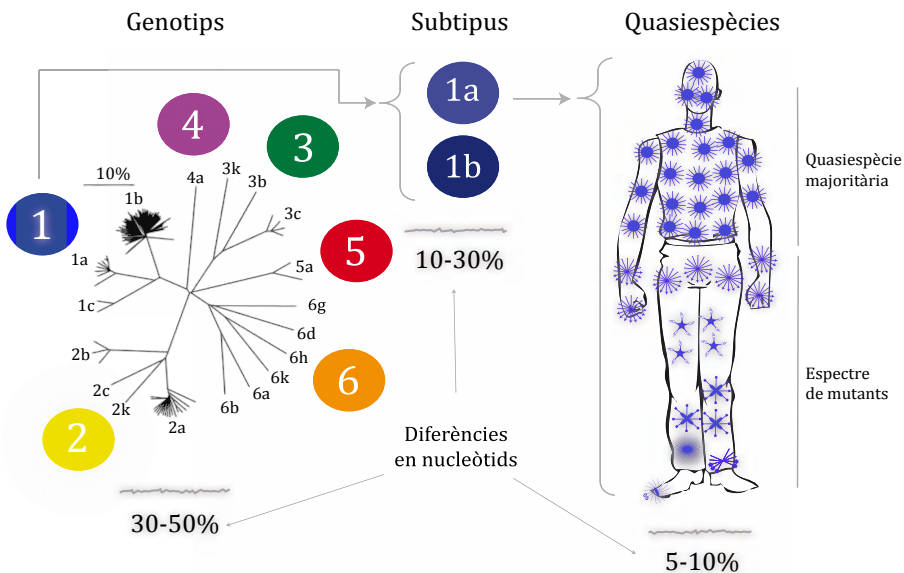


Figura 1. Variabilitat del VHC. Amb aquest esquema podem veure les diferències en % en nucleòtids, entre els diferents nivells de variabilitat que presenta el VHC.

1.3.1- Genotips i Subtipus

Els genotips i els subtipus del VHC estan distribuïts de manera desigual en diferents parts del planeta, així certs genotips predominen en certes àrees. Els genotips



1, 2 i 3 estan extensament escampats per tot el món, mentre que el 4, el 5 i el 6 es troben en alta proporció només en determinades zones. A l'Àfrica del Nord i Central sobresurt el genotip 4, a Sud Àfrica el genotip 5 i al Sud-Est Asiàtic el genotip 6⁸ (Figura 2). El genotip 1b és el més prevalent a l'Estat espanyol, però sembla que el número de noves infeccions amb aquest genotip va disminuint, mentre que els genotips 3 i 4 s'ha observat que la seva prevalença va en augment, sobretot entre persones coinfectades amb VIH-1 i VHC i persones usuàries de drogues intravenoses⁹.

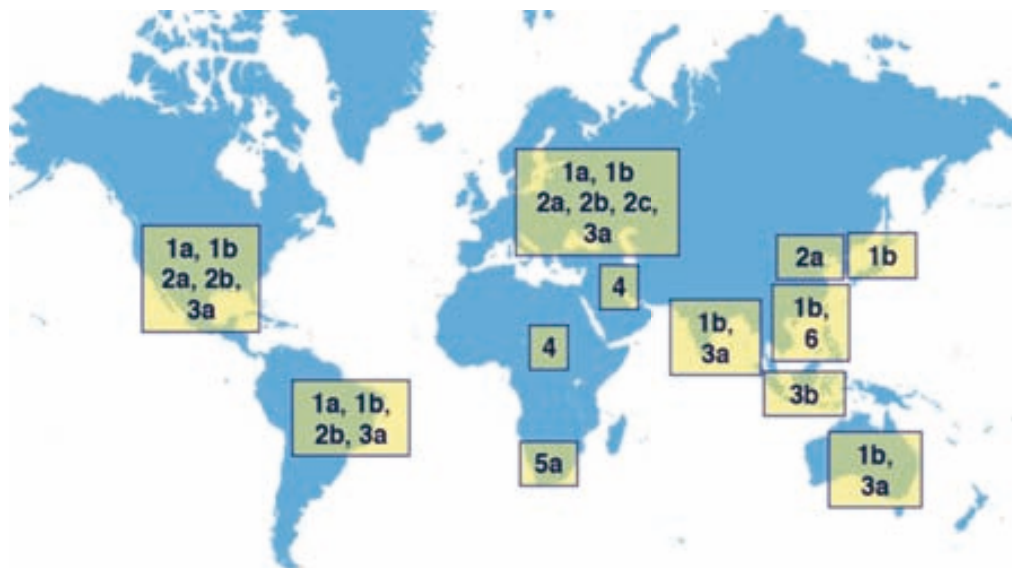


Figura 2. Distribució geogràfica dels diferents genotips del VHC¹⁰. Els genotips 1, 2 i 3 estan distribuïts per tot el planeta, mentre que els genotips 4, 5 i 6 només presenten prevalències importants en determinades zones de la Terra.

Un dels principals objectius dels estudis clínics ha estat relacionar els diferents genotips del VHC amb la resposta als diferents tractaments contra la infecció per VHC. Els genotips 1 i 4 han estat relacionats sempre, amb respostes més discretes als tractaments utilitzats, que no pas els genotips 2 i 3, tant en monoinfectats com en coinfectats (VIH-1 i VHC). Només un 40-50% dels pacients infectats amb VHC de genotip 1 o 4 arriben a obtenir la resposta viral sostinguda (RVS), és a dir l'ARN del virus indetectable en sang, 6 mesos després d'haver deixat el tractament. En canvi un 80% dels pacients infectats amb VHC de genotips 2 i 3, obtenen la RVS¹¹. Respecte els genotips 5 i 6, com que no són predominants ni als Estats Units ni a Europa, no ha estat estudiada a fons la relació entre aquests genotips i la resposta al tractament contra la



infecció. Tot i amb això existeixen alguns estudis que apunten que els genotips 5 i 6, tindrien més bon pronòstic de resposta que el genotip 1 o 4 però no arribarien als alts índex de RVS aconseguits pels genotips 2 i 3^{12,13}.

1.3.2- Quasiespècies

Els primers en parlar del terme quasiespècie, núvol de genomes molt relacionats entre sí, van ser el premi nobel, Dr. Manfred Eigen i el seu col·laborador el Dr. Peter Schuster, els quals van introduir aquest concepte per poder interpretar el procés evolutiu que segueixen les macromolècules autoreplicatives, com l'ARN i l'ADN o els organismes asexuals com les bactèries i els virus, com també per poder, inclús, interpretar l'origen de la vida¹⁴. Mitjançant els treballs del Dr. Domingo i col·laboradors¹⁵, els quals demostraven que la heterogeneïtat dels virus ARN era conseqüència d'errors en el procés de la replicació de l'ARN, molts estudis van postular que els virus ARN dins de l'hoste, segueixen el model de quasiespècie d'Eigen i Schuster, formant una mescla heterogènia de genomes íntimament relacionats entre ells, en cada ronda de replicació, i que dins d'aquest eixam de seqüències, n'existia una d'altament representada, majoritària o dominant, anomenada seqüència màster i tot un espectre de seqüències mutants o seqüències minoritàries^{16,17}(Figura1). El VHC, com a membre de la família dels virus ARN, tenia molts números de seguir aquest patró, i amb el treball de la Dra. Martell i col·laboradors¹⁸, els quals van poder seqüenciar fins a 20 clons de dues zones genètiques molt conservades del virus a partir del sèrum d'un pacient infectat va quedar ben clar, que aquest virus circulava com una població de genomes diferents però altament relacionats entre sí, és a dir, que tenia una distribució genòmica típica de quasiespècie. Aquest model s'ha vist que es manté gràcies a l'alta capacitat que té el VHC en reinventar-se ("*turnover*"), ja que s'estima que la seva vida mitja és de només 2-3 hores, que la producció de nous virus és d'aproximadament 10^{10} o 10^{12} virions per dia i que la seva ARN-polimerasa¹⁹, encarregada de fer còpies del genoma viral, no és gaire fidel al motlle i a més no té capacitat de correcció sobre la còpia que realitza del genoma. Totes aquestes característiques sumades a l'alta capacitat de replicació mostrada pel VHC, fa que un gran nombre de variants produïts durant la infecció tinguin una taxa de mutació de 10^{-3} a 10^{-5} substitucions per nucleòtid en cada ronda de replicació²⁰. Aquest model de quasiespècies confereix al VHC un important avantatge adaptatiu, ja que la simultània existència de múltiples variants genòmiques (i l'alta capacitat per generar-ne) permet la ràpida selecció d'un mutant eficient per qualsevol condició ambiental que



es pugui trobar el patogen. És per tant, un mecanisme perfecte per la persistència del VHC (en el 80% dels individus infectats, el virus cronifica), ja que li permet evadir-se del sistema immunitari o bé del tractament.

Són molts estudis que han encaminat els seus esforços en esbrinar quin és el paper de les quasiespècies del VHC en l'eliminació del virus de manera natural o en la cronicitat de la infecció, en l'evolució de la infecció cap a cirrosi o l'hepatocarcinoma cel·lular en el fetge, o en el tractament contra la infecció. En la majoria dels articles s'ha observat que una major variabilitat genètica intra-pacient (quasiespècies), en unes determinades zones genètiques del virus, com l'embolcall i la proteïna NS5A (de la qual encara no se sap exactament la seva funció), podria estar relacionada en la cronicitat de la infecció²¹, en el dany progressiu al fetge que acaba provocant cirrosi i/o hepatocarcinoma^{22,23,24}, o en la no resposta al tractament^{25,26,27,28,29}. L'embolcall del virus ha estat una de les zones genètiques més analitzades per trobar relacions entre variabilitat i patogènesi, perquè és la zona del virus més subjecte a canvis per pressió ambiental, en canvi pel cas de la proteïna NS5A, s'ha estudiat en profunditat perquè un grup d'investigació del Japó, amb el Dr. Enomoto al cap davant, va trobar que 40 aminoàcids en aquesta proteïna (entre el codó 2209 i 2248 en la seqüència de referència HCV-J; seqüència de referència genbank: D90208), estaven íntimament relacionats amb la resposta al tractament, anomenant aquesta zona, ISDR (*"Interferon-sensitivity determinin region"*). Ells van postular que mutacions en aquesta zona respecte la variant HCV-J, conferien sensibilitat a la teràpia contra la infecció³⁰. Tot i amb això, altres grups d'investigació, van trobar que aquesta relació entre mutacions en la proteïna NS5A i la sensibilitat al tractament no existia en variants d'altres zones geogràfiques fora del Japó^{31,32} o qüestionaven que una major variabilitat en termes de quasiespècies en aquestes dues zones genètiques (l'embolcall i la NS5A) pogués estar relacionada amb la progressió a la malaltia a dany hepàtic irreversible³³ o en el bon pronòstic de la teràpia^{34,35}. En canvi, pocs estudis s'han encaminat en associar la diversitat de les quasiespècies en una altra zona genètica del VHC fora del embolcall i la regió NS5A, i menys en pacients coinfectats. Recentment però, ha sortit un estudi amb pacients coinfectats que relaciona una major diversitat a nivell de quasiespècies de la proteasa NS3 del VHC entre els no responedors a la teràpia respecte a aquells pacients que van aconseguir la RVS³⁶.



1.4- Epidemiologia

1.4.1- Prevalença del VHC

La infecció pel VHC es un problema sanitari important a nivell mundial ja que s'estima que hi ha un total de 170 milions de persones infectades. La prevalença del VHC en la població mundial varia considerablement depenent de la regió, sent de l'1 al 2% en països industrialitzats, en canvi, a l'Àfrica i a països del Mediterrani la prevalença és molt més alta, arribant fins al 13 a Egipte³⁷ (Figur 3). Respecte a la mortalitat, estimacions realitzades per la Organització Mundial de la Salut (OMS) mostren que el VHC és responsable directe o indirecta, d'aproximadament un milió de morts a l'any³⁸.

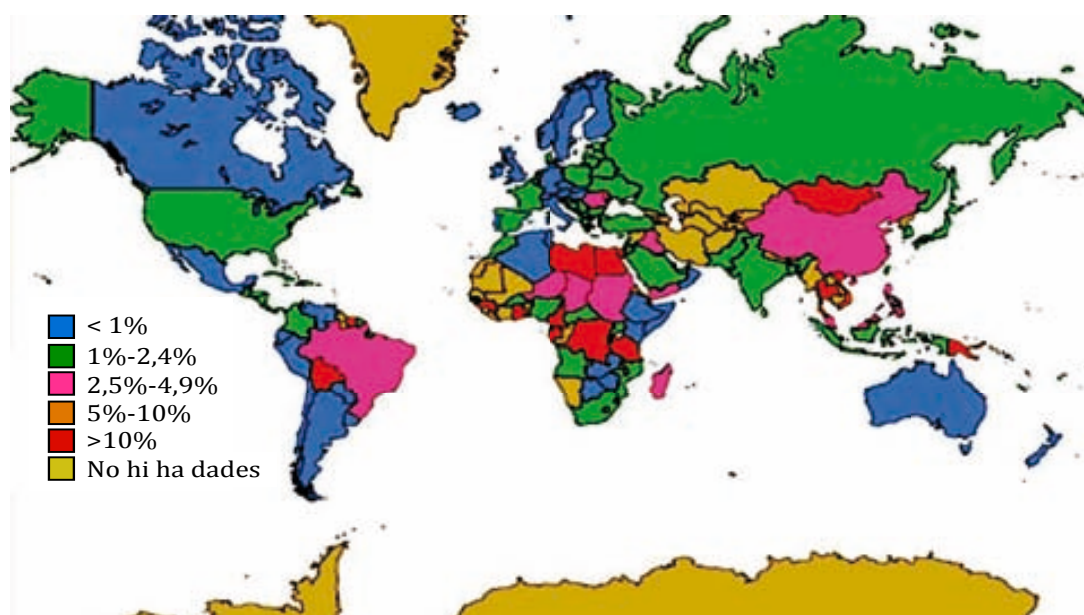


Figura 3. Prevalença del VHC a nivell mundial³⁹.

A Espanya, s'ha estimat que entre l'1 i el 2.6% de la població podria estar infectada amb VHC (Figura 3), això significaria unes 800 000 persones⁴⁰. A Catalunya la prevalença rondaria el 2.6% de la població, el que significaria més de 100 000 persones a les portes de desenvolupar una malaltia hepàtica greu⁴¹.

1.4.2- Vies de Transmissió

Via Parenteral

Només les persones i els ximpanzés són susceptibles a ser infectats



pel VHC. La via principal de transmissió del VHC és la parenteral, així el consum de drogues intravenoses i les transfusions de sang i derivats, han estat els principals factors de risc per contraure el VHC⁴². Estudis serològics han demostrat que el 40-95% dels usuaris de drogues intravenoses (UDI) han estat exposats al VHC, i per tant són el col·lectiu amb més alta incidència d'infecció per VHC⁴³. En compartir la via parenteral d'infecció, el 50% de pacients infectats amb el virus de la immunodeficiència tipus-1 (VIH-1), també ho estan amb el VHC⁴⁴. La prevalença de pacients coinfectats amb VIH-1 i VHC a Espanya però, sembla que va disminuint ja que, un estudi va demostrar que al 1997 la prevalença era del 73.8% i al 2006 s'havia reduït fins al 19.8%. Aquesta disminució s'ha suggerit que podria ser a causa de canvis en les rutes d'infecció pel VIH, ja que paral·lelament també s'ha detectat un descens en l'ús de drogues intravenoses per part dels pacients infectats amb VIH-1 en el mateix període de temps, passant a ser del 67.3% al 1997 al 14.5% al 2006⁴⁵.

Les transfusions de sang van ser, en el passat, el principal factor de risc d'infecció per VHC, però gràcies a la introducció obligatòria de la determinació d'anticossos anti-VHC en les bancs de sang a partir de 1991, es va reduir dràsticament el risc de transmissió del VHC a través d'aquesta via⁴⁶. L'hemodiàlisi i els transplants d'òrgans sòlids també han estat relacionats com a factors de risc per infecció de VHC, a través de la transmissió nosocomial, amb l'ús d'equips o materials contaminats i exposició entre pacients^{47,48}. Així, la infecció transmesa per procediments relacionats amb l'atenció sanitària, són pocs i estranys, però se'ls ha de tenir en compte, ja que un estudi recent ha detectat varis casos on l'únic factor documentat i relacionat amb pacients amb infecció d'hepatitis aguda, no seria res més, que l'admissió hospitalària (cirurgia, emergències mèdiques, procediments invasius terapèutics i de diagnosi)⁴⁹. Aquestes dades recalquen la necessitat d'una estricta adhesió a les mesures universals de precaució per part del món hospitalari.

Tot i el gran coneixement que tenim sobre els factors de risc de contraure la infecció pel VHC, existeix quasi un 50% de pacients infectats que no presenten una història que suggereixi una adquisició de la infecció per via parenteral. La principal explicació per aquests casos és la transmissió parenteral de manera no aparent, és a dir, per injeccions intramusculars no estèrils, tatuatges, pírcings, acupuntura, afaitats en barberies o neteges bucals al dentista, etcètera⁵⁰.

Via Sexual

Encara que el VHC es transmet majoritàriament per via parenteral, existeixen



altres vies com la transmissió sexual que posseeix una prevalença que oscil·la entre el 0 i el 2% i es considera probable, en el 20% dels casos en els quals no existeixen altres factors⁵¹. Aquesta transmissió no està clarament definida, s'ha vist que en fluids sexuals hi ha presència del VHC, però no s'han demostrat que aquests puguin ser infectius. S'ha establert per això, certs factors de risc principals per aquesta transmissió: un elevat nombre de parelles, relacions homosexuals home-home, pràctiques sexuals d'elevat risc, antecedents d'altres infeccions de transmissió sexual i estar infectat amb el VIH-1. Probablement la immunodeficiència causada pel VIH-1 és la responsable de la transmissió del VHC per via sexual en els pacients coinfectats^{52,53}.

Via Perinatal

La transmissió perinatal és la causa principal d'infecció en nens amb una prevalença a nivell mundial del 5% (del 19.4% en mares coinfectades amb VIH-1 i VHC)³⁷. Es limita quasi sempre en mares amb l'ARN del VHC detectable en sang perifèrica. No és gens recomanable practicar cesàries, en mares infectades amb VHC. La lactància, en mares VHC positives és segura, sempre i quant, els mugrons no estiguin danyats⁵⁴.

Via Familiar o Domèstica

La infecció per transmissió intra-familiar (conviure un llarg període de temps amb una persona infectada) és molt rara, quasi anecdòtica, però existeixen en la literatura alguns casos documentats⁵⁵.

1.5- Història Natural de la Infecció

L'hepatitis causada pel VHC, és una malaltia que es presenta en la clínica com una hepatitis aguda o bé crònica.

1.5.1- Infecció Aguda

L'hepatitis C aguda és poc sovint diagnosticada ja que la majoria dels individus, 75-80%, amb infecció aguda no presenten cap mena de símptoma⁵⁶. A 2-8 setmanes després de la infecció el nivell de les transaminases (glutamicooxalacètica; GOT i la transaminasa glutamicopirúvica; GPT) en sèrum, indicadores de mort cel·lular, augmenten quasi 10 vegades respecte els nivells de normalitat⁵⁷. L'ARN del VHC pot ser detectat en sèrum a 1 o 2 setmanes després de l'exposició, a partir d'aquí, es va replicant ràpidament i quan arriba a les magnituds entre 10^5 - 10^7 UI/ml, els nivells de les transaminases en sèrum també arriben al seu pic màxim i en aquest moment solen aparèixer símptomes com malestar general, debilitat, anorèxia i icterícia. Aquests



malestars poden durar diverses setmanes i disminueixen a mesura que els nivells d'ARN del VHC i els nivells de les transaminases també ho fan. La infecció aguda pel VHC pot ser greu, però la insuficiència hepàtica fulminant és rara⁵⁸.

Que la infecció passi de ser aguda a crònica, podria explicar-se en part, per la incapacitat de controlar la virèmia per part del sistema immunitari, és a dir per la impossibilitat de l'individu infectat, de generar una efectiva resposta immunitària adaptativa mitjançant les cèl·lules CD4+ i CD8+^{59,60,61}. Així la persistència del VHC podria ser, en part, a causa d'una transitòria o bé nul·la resposta cel·lular immunitària (Figura 4). Tot i que es controla la infecció, la resposta cel·lular sempre apareix amb un retràs

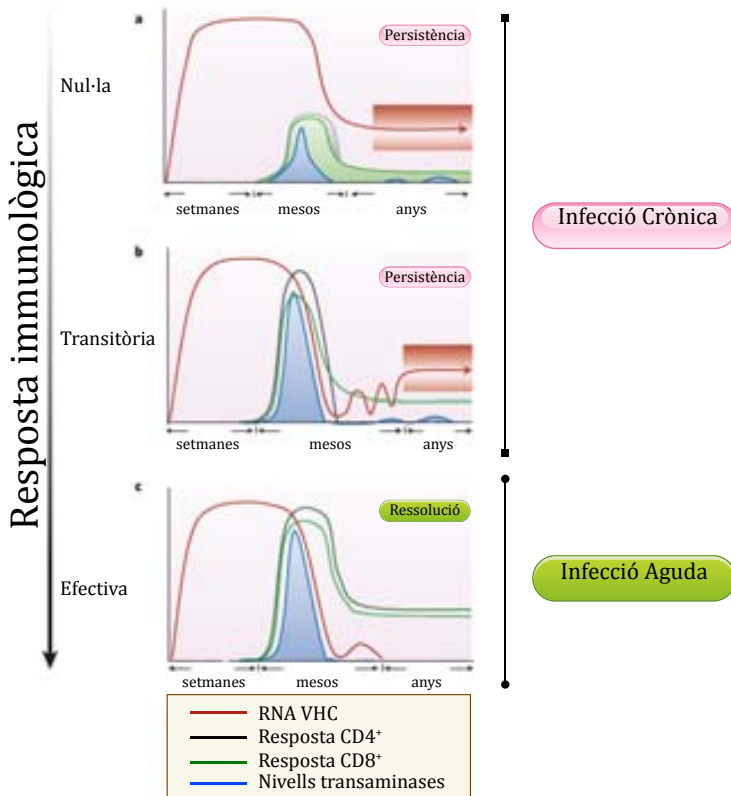


Figura 4. Representació esquemàtica de la resposta immunitària cel·lular durant una infecció pel VHC⁶². La persistència del VHC (infecció crònica) es portarà a terme si en el pacient es dona una nul·la o bé transitòria resposta immunitària cel·lular a través de les cèl·lules CD4+ i CD8+ (a i b). En canvi la infecció aguda acabarà resolent-se, si el pacient és capaç de generar una resposta immunològica a través de les cèl·lules CD4+ i CD8+ efectiva (c).



destacable (setmanes), respecte l'aparició de l'ARN del virus en escena. Aquest fenomen s'ha vist tant en humans com en ximpanzés i no està clar perquè succeeix d'aquesta manera^{59,60,61}.

1.5.2- Infecció Crònica

L'hepatitis C crònica es caracteritza per la permanència de molècules d'ARN del VHC en la sang del pacient durant almenys 6 mesos després de l'inici de la infecció aguda. Es pensa que només un 15-25% de les persones infectades poden superar la infecció, és a dir mantenir l'ARN del VHC indetectable i els nivells de les transaminases normals en sang després d'un episodi agut, de manera natural, mitjançant el sistema immunològic i sense tractament⁵⁷. Malauradament el 75% -85% dels pacients infectats no eliminen el virus i per tant desenvolupen una hepatitis crònica (Figura 5). Es creu que certs factors com l'edat o patir icterícia en el moment de la infecció, l'ètnia a la que es pertany o el gènere, podrien jugar un paper important en la persistència del VHC. Així, l'índex de cronicitat de la infecció amb VHC sembla ser menor en els individus joves⁶³, en dones⁶⁴, entre caucàsics i els blancs no hispans^{65,66} i en pacients que desenvolupen icterícia o símptomes d'aquesta durant l'inici agut de la infecció per VHC⁶⁵.

Cirrosi

El 20% de les persones amb infecció crònica pel VHC, desenvolupa cirrosi, una malaltia greu, que consisteix en la mort progressiva del teixit hepàtic normal, el qual és substituït per teixit fibrós. S'ha observat que hi ha factors externs i interns que podrien influir en el risc de progressió a cirrosi. Múltiples estudis han demostrat que, ser un gran consumidor d'alcohol és un important factor de risc extern per a la progressió de l'hepatitis C crònica, a cirrosi i hepatocarcinoma cel·lular⁶⁷ (Figura 5). I com a factors interns, és a dir de l'hoste, l'edat avançada en el moment de la infecció, el sexe masculí, el grau de la inflamació o de fibrosi del fetge⁶⁸, la coinfecció amb el virus de la immunodeficiència humana (VIH) o hepatitis B (VHB)⁶⁹, i les condicions co-mòrbides, com ara la immunosupressió, la resistència a insulina, l'esteatohepatitis no alcohòlica, l'hemocromatosi i l'esquistosomiasi, també podrien ser factors que influenciarien la progressió a malaltia hepàtica greu^{70,71}. La progressió a cirrosi molt sovint és clínicament silenciosa, i molts pacients coneixen que estan infectats amb VHC, a la vegada que se'n assabenten que estan en una etapa-terminal de malaltia hepàtica o que presenten un hepatocarcinoma cel·lular (HCC).

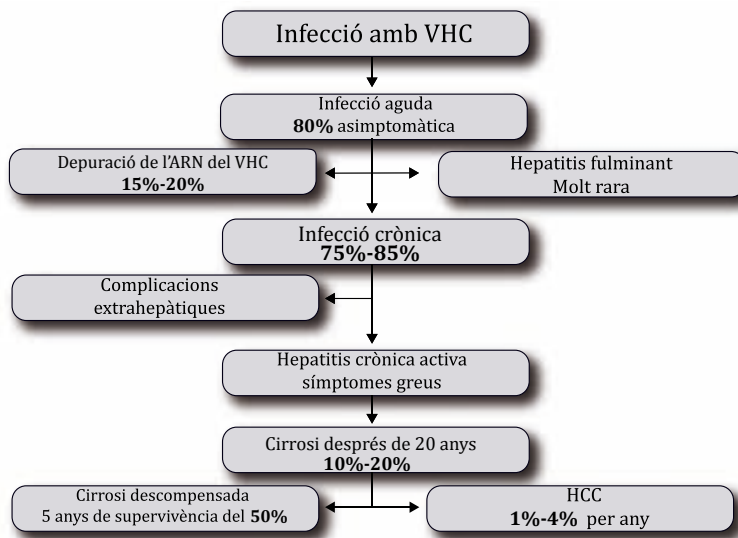


Figura 5. Història natural del VHC en monoinfectats⁷⁶. Des de la infecció aguda, a la infecció crònica acabant amb una malaltia hepàtica greu.

Hepatocarcinoma cel·lular

La mortalitat causada per la infecció crònica del VHC, és principalment per descompensació de la cirrosi que no pas per l'aparició del HCC. Així el HCC relacionat amb el VHC sorgeix normalment entre pacients que presenten un estat previ de cirrosi⁷². Un estudi dut a terme pel Dr. Castell, va determinar que els anys que passarien des de la infecció aguda amb VHC fins a desenvolupar cirrosi o HCC serien uns 24 i 27 anys respectivament⁷³. Un cop la cirrosi està establerta, el risc de patir HCC augmenta cada any en un 1-5%^{74,75}. Veient que la cirrosi i el HCC poden presentar-se en un rang de temps tant estret, és important en el moment que es detecti un estat cirròtic, efectuar proves per tal de descartar el HCC.

1.5.3- Coinfecció amb VIH-1 i VHC

Aproximadament, al món hi ha 40 milions de persones infectades amb el virus de la immunodeficiència tipus-1 (VIH-1), mentre que infectades amb el VHC n'hi ha quasi 4 o 5 vegades més, uns 170 milions. En els Estats Units d'Amèrica i a Europa s'estima que entre el 13-43% de les persones que es troben infectades amb el VIH-1, també ho estan amb el VHC, i el 85% d'aquests casos desenvolupen hepatitis crònica^{77,78}. La prevalença de la coinfecció varia marcadament depenent de la ruta de transmissió per la qual s'ha adquirit, sent molt més alta entre persones usuàries de drogues



intravenoses⁷⁷, hemofílics⁷⁹ i entre homes homosexuals⁸⁰. Tot i que els dos virus tenen la via de transmissió parenteral com a via preferida per infectar, presenten diferències en l'eficiència d'infecció per aquesta via. Així, el VHC és aproximadament 10 vegades més infeccions que el VIH-1 en exposicions de sang percutànies per volums de sang petits. Així el VHC pot infectar en 15-30 de cada 1000 casos⁸¹ on per accident hi ha hagut una punxada amb una agulla infectada, mentre que el VIH-1 infecta en 3 de cada 1000 casos com aquest⁸². En canvi el VIH-1 és molt més transmissible entre parelles heterosexuales i entre mares i fills^{83,84}.

La infecció amb VIH-1, s'ha vist que afecta en totes les etapes de la història natural del VHC. Alguns estudis han apuntat que la vida mitjana dels virions del VHC podria estar alterada per la presència del VIH, sent més llarga i fent més difícil l'eliminació del virus durant la infecció aguda⁸⁵. La coinfecció sembla estar associada, a una més elevada càrrega viral del VHC en sang i en fetge (ref). La teràpia antiretroviral de gran activitat (TARGA) en un principi hauria de fer baixar aquests alts nivells de virèmia del VHC en sèrum, ja que estimula el sistema immunològic, però no ha estat demostrat de manera contundent i ha esdevingut un gran tema de debat entre diferents grups de recerca. Mentre que uns apunten que no hi hauria canvis en la càrrega viral en sèrum del VHC pel fet de prendre TARGA^{86,87}, altres han apuntat que TARGA provocaria un augment de la virèmia en sang^{88,89} i d'altres que, en canvi, la faria disminuir o que inclús podria ajudar a l'eliminació del VHC^{90,91}. Estudis sobre fibrosi hepàtica amb pacients coinfectats, han mostrat que la presència del VIH-1, accelera la progressió a cirrosi^{92,93}. Després de 10 anys amb infecció per VHC, el 15% dels pacients coinfectats amb VIH-1 desenvolupen cirrosi, mentre que en monoïnfectats això passaria en el 3% dels casos⁹⁴. També s'ha vist que el temps entre infecció per VHC i cirrosi s'escurça en coinfectats respecte els monoïnfectats, essent de 26 i 38 anys respectivament⁶⁹. El VIH-1 també podria influir en el risc de contraure un hepatocarcinoma cel·lular (HCC) en un període més curt que en monoïnfectats, passant de 40 anys a 10-20 anys en coinfectats⁹⁵. El VIH debilita les cèl·lules encarregades de la resposta immunitària adaptativa, i això podria ajudar a que el VHC pugui desenvolupar la seva gran virulència i patogènesi. Encara que s'ha constatat que la coinfecció portaria a una càrrega viral de VHC en sang més alta, no s'ha pogut relacionar directament l'elevada càrrega viral del VHC amb les malalties greus hepàtiques⁹⁶. Així el VIH-1 podria contribuir al dany hepàtic mitjançant efectes immunitaris (producció de citocines, expressió de molècules d'adhesió, entre d'altres.)⁹⁷ o per efectes virals directament, ja que s'ha demostrat que a part d'infectar



les cèl·lules de sang perifèrica, els limfòcits CD4+, el VIH-1 també és capaç d'infectar cèl·lules intrahepàtiques immunitàries especialitzades com les cèl·lules de Kupffer, les cèl·lules intrahepàtiques mononucleades, i els hepatòcits⁹⁸.

1.6- Genoma del VHC

El VHC és una partícula viral d'aproximadament 50 nm de diàmetre⁹⁹, composta per una nucleocàpsida icosaèdrica, que envolta el genoma, confinada en un embolcall derivat de la membrana d'una cèl·lula hoste. El genoma del VHC és una cadena senzilla d'ARN de polaritat positiva, d'aproximadament 9,6 quilobases Kb, formada per dues zones no codificants, 5' i 3' ("*non-translated regions*"; NTRs), altament estructurades, essencials per la replicació i la maduració de l'ARN, separades per una llarga zona genètica amb marc de lectura obert ("*open reading frame*"; ORF), que codifica per una única poliproteïna precursora de quasi bé 3 000 aminoàcids^{20,100}. Aquesta poliproteïna conté les proteïnes funcionals del virus, en el seu extrem N-terminal presenta les proteïnes estructurals: core (C), embolcall 1 i 2 (E1 i E2) que formaran l'estructura del virus; i en el seu extrem C-terminal les no estructurals (NS): NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B, encarregades del cicle biològic del virus (Figura 6). Les proteïnes estructurals estan separades de les no estructurals per un pèptid de membrana anomenat p7, que s'ha suggerit que podria ser una viroporina, és a dir una proteïna hidrofòbica que fa de canal iònic¹⁰¹.

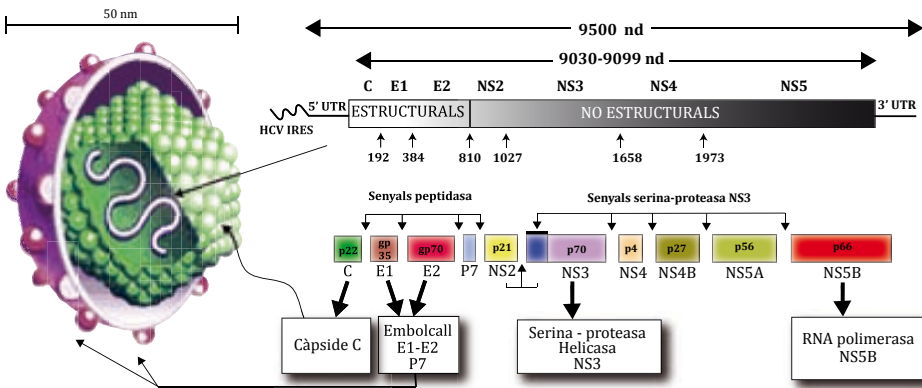


Figura 6. Organització del genoma del VHC¹⁰². El genoma del VHC és una cadena senzilla d'ARN de polaritat positiva, de 9,6 Kb, compost per dues zones no codificants, 5' i 3', separades per un ORF, que codifica per una única poliproteïna, la qual la podem dividir en proteïnes estructurals, que formaran l'estructura del virus, i en no estructurals que formaran el complex replicatiu. Les primeres seran alliberades de la poliproteïna per peptidases de l'hoste i les segones per la proteasa NS3 del virus.



1.7- Proteïnes Virals

L'expressió de les proteïnes funcionals del genoma monocistriònic del VHC, s'aconsegueix mitjançant una senyal d'entrada a ribosoma ("*internal ribosome entry site*"; IRES), localitzada en la regió 5'NTR, que provoca l'ingrés del genoma viral al ribosoma cel·lular, talment com si es tractés d'un ARN missatger propi de l'hoste. Un cop la poliproteïna és traduïda tota sencera d'un sol cop, es processa proteolíticament per proteases de l'hoste i per proteases virals, per alliberar-ne les diferents proteïnes funcionals del virus. Així, les proteïnes estructurals (core, E1 i E2) i el pèptid p7 són alliberades de la poliproteïna per peptidases cel·lulars, mentre que les no estructurals són alliberades per proteases virals¹⁰³.

1.7.1- Proteïnes Estructurals

Core

El Core és una proteïna enllaçadora d'ARN ("*RNA-binding protein*") que forma la nucleocàpsida que protegeix el genoma viral¹⁰⁴ (Figura 6). Està implicada en la regulació de la traducció de l'ARN, en el muntatge i generació del nou virió, en l'activació de senyals cel·lulars i en el metabolisme lipídic¹⁰⁵.

Una proteïna anomenada proteïna amb marc de lectura alternatiu ("*alternative reading frame protein*"; ARFP) o proteïna F ("*frameshift*") ha estat identificada per diferents grups dins el marc de lectura de la proteïna core¹⁰⁶. Aquest alternatiu marc de lectura obert ("*open reading frame*"; ORF) és present en tots els genotips del VHC¹⁰⁷, però la seva funció encara és un misteri.

Proteïnes de l'embolcall (E1 i E2)

Les proteïnes de l'embolcall E1 i E2, són proteïnes de membrana del tipus I, que un cop han estat alliberades de la poliproteïna viral, per proteases cel·lulars, passen per un procés de glicosilació¹⁰⁸. Aquests glycans en l'embolcall del VHC, s'ha vist que poden jugar un rol important en l'entrada del virus a la cèl·lula, i en la protecció contra anticossos neutralitzants^{109, 110, 111}. E1 i E2 interaccionen formant un heterodímer enllaçat de manera covalent que serà la unitat bàsica de l'embolcall del virus¹¹².

1.7.2- El Polipèptid P7

Entre les proteïnes estructurals i no estructurals es troba una regió que codifica pel polipèptid p7, que no s'ha pogut incloure ni en unes, ni en les altres perquè encara, no està clara la seva funció. És una proteïna hidrofòbica de 63 aminoàcids que forma un canal iònic. S'ha demostrat que aquesta proteïna és imprescindible per la infecció i



segregació de partícules virals en cultiu i que és susceptible (depenent del genotip) a molts inhibidors de manera *in vitro*^{113,101,114}.

1.7.3- Proteïnes no Estructurals

Les proteïnes no estructurals (NS) s'alliberen de la poliproteïna mitjançant dues proteases virals, la NS2 i la NS3/4A. La primera, efectua un processament autocatalític, per tal de que la segona, la NS3/4A, acabi de fer els tall proteolítics necessaris, per deslliurar totes les proteïnes no estructurals de la poliproteïna^{115,116}.

NS2

La proteïna NS2, és una de les proteases del virus, que s'autocatalitza fent un tall intramolecular en el punt anomenat 2/3, alliberant la NS2 de la proteïna NS3¹¹⁶. Sembla que no estigui íntimament implicada en la replicació del virus¹¹⁷, però que sí, tingui certa importància en el muntatge i l'alliberament dels virions¹¹⁸.

NS3

La NS3 és una proteïna bifuncional amb una serina-proteasa en el seu extrem N-terminal i una helicasa en el seu extrem C-terminal¹⁰⁴. El seu domini proteasa li permet proteolitzar la poliproteïna viral, i poder alliberar les proteïnes virals, que formaran el complex replicatiu, mentre que el domini helicasa li permet relaxar el dúplex ARN-ARN, pentinant les estructures secundaries de l'ARN, per tal de que les proteïnes enllaçadores d'ARN puguin actuar, i així ajudar en el procés replicatiu del genoma viral¹²³.

NS4A

La NS3 no té un domini intra-membrana, així que necessita de la proteïna NS4A perquè la fixi en la membrana intracel·lular i així, poder realitzar els processaments en la poliproteïna. No obstant, la funció de la NS4A no acaba aquí, ja que també l'ajuda en el plegament i en incrementar l'activitat proteolítica¹¹⁹⁻¹²² de la proteasa.

NS4B

La proteïna NS4B és una proteïna molt hidrofòbica, no es coneix exactament la seva funció però s'ha suggerit que podria mantenir el complex replicatiu a les membranes del reticle endoplasmàtic¹²⁴.

NS5A

La proteïna NS5A és una fosfoproteïna que s'ha observat que té una importància cabdal en la replicació del genoma del VHC i en el muntatge dels virions^{125,126}. S'ha trobat que aquesta proteïna pot trobar-se en dos estats diferents de fosforilació, en una forma basal i en una altra d'hiperfosforilada, i s'ha pogut demostrar que aquest canvi afectaria



directament a la replicació del VHC¹²⁷⁻¹²⁹. La regulació de la replicació via fosforilació de la NS5A, s'ha pogut observar, també, en altres virus dels gèneres hepacivirus, pestivirus i flavivirus¹³⁰.

NS5B

És una ARN dependent ARN polimerasa (RdRp) és a dir, la responsable de la síntesi del genoma del VHC. La NS5B és una proteïna molt conservada entre diferents variants del VHC, entre els diferents gèneres de la família flaviviridae (hepaci-, pesti-, i flavivirus) i fins i tot entre diferents virus ARN¹³¹.

1.8- Cicle Biològic

Del cicle biològic del VHC podem diferenciar 4 etapes, l'entrada del virus a la cèl·lula, la replicació del genoma, assemblatge de les proteïnes i la sortida dels virions a l'exterior (Figura 7).

1.8.1- Entrada

Mitjançant pseudovirus ("*HCV pseudotype particles*"; HCVpp) amb glicoproteïnes modificades s'ha pogut demostrar que els heterodímers E1-E2^{132,133} són les proteïnes virals implicades en l'enllaç amb els receptors cel·lulars, anomenats CD81 i el receptor Scavenger de classe B i tipus I ("*Scavenger receptor Class B type I*"; SRBI)^{134,135} que faciliten l'entrada del virus en la cèl·lula hoste. Molts estudis han encaminat els seus esforços en estudiar quina és la zona d'interacció important de la E2 amb aquests receptors per tal de dissenyar inhibidors d'aquesta unió i així evitar l'entrada del virus a la cèl·lula^{136,137}. Alguns estudis han apuntat que la proteïna viral E1 podria estar involucrada en el procés de fusió del virus a la cèl·lula¹³⁸⁻¹⁴⁰. A part dels receptors CD81 i SRBI, s'han trobat que moltes proteïnes de membrana com ara el receptor de lipoproteïna de baixa densitat ("*low density lipoprotein receptor*"; LDL-R)¹⁴¹ i els components d'unió cel·lular estreta Claudin-1 (CLND1)¹⁴² i occludin¹⁴³, podrien actuar de coreceptors d'entrada. També s'ha proposat que el virus podria entrar a la cèl·lula via endocitosis de manera dependent de clatrina¹⁴⁴.

1.8.2- Replicació

Una vegada el genoma viral és en el citoplasma de la cèl·lula infectada, aquesta el reconeix com si es tractés d'un ARN missatger propi, i per tant és portat fins al reticle endoplasmàtic (RE) on les proteïnes virals seran sintetitzades. Aquestes, restaran associades a la membrana del RE durant el procés de formació del complex replicatiu



(CR), compostat per proteïnes virals, l'ARN motlle i factors proteínics de l'hoste^{145,146}. Un cop el CR està format i ben fixat en la membrana del RE, comença la replicació del genoma viral dut a terme per la ARN polimerasa dependent d'ARN (RdRp), la NS5B. Amb l'ajuda i cooperació de les proteïnes NS3/4A i NS5A i de factors cel·lulars, la NS5B s'enganxarà a l'extrem 3' del genoma viral ARN de polaritat positiva (ARN+) i iniciarà la síntesi *de novo*, generant el genoma ARN de cadena negativa (ARN-)¹⁴⁷. La unió covalent de les dues molècules de cadenes de signes contraris servirà de motlle a la NS5B per generar múltiples còpies del genoma viral^{103,148}. Aquests nous genomes produïts seran usats per iniciar una altra ronda de replicació, per ser transcrits o bé per ser empaquetats per proteïnes virals per produir els nous virus infectius. La rèplica que realitza la NS5B és asimètrica i semiconservativa, produint un gran número de genomes diferents però altament relacionats entre si, les quasiespècies²⁰ (Figura 7).

1.8.3- Assemblatge i Sortida

L'empaquetament del genomes sintetitzats i l'alliberament dels nous virions són les últimes etapes del cicle biològic del virus (Figura 7). Gràcies al desenvolupament dels diferents sistemes de replicació del VHC generats en cultiu ("*HCV cell culture system*"; HCVcc), els quals han permès reproduir el cicle vital complet del virus, s'han pogut fer interessants descobertes al voltant d'aquestes últimes etapes^{149,150}. No obstant, aquests sistemes de replicació HCVcc tenen certes limitacions alhora de generar virions capaços d'infectar a noves cèl·lules, això ens dona la idea de la gran associació que tenen les últimes etapes del cicle biològic del VHC amb el seu entorn cel·lular.

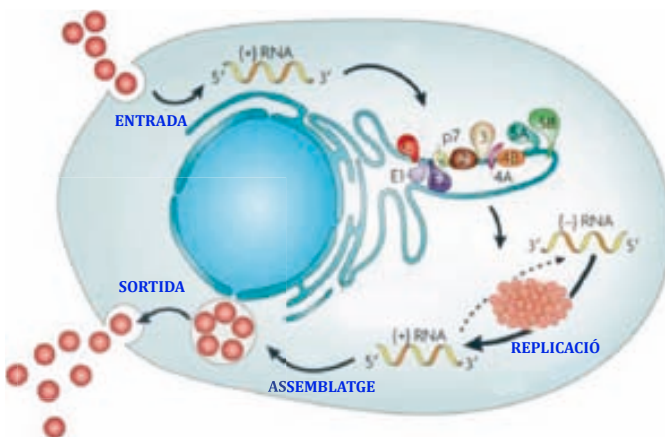


Figura 7. Cicle biològic del VHC¹⁵¹. 4 fases: entrada del virus, replicació, assemblatge dels virions i la sortida d'aquests.



2- EL COMPLEX NS3/4A

El complex NS3/4A és una unió no covalent entre dues proteïnes, la NS3 i la NS4A, i s'encarrega d'alliberar les proteïnes que formaran el complex replicatiu de la poliproteïna generada un cop el genoma viral ha estat traduït¹¹⁵.

2.1- NS3

La NS3 és una proteïna multifuncional de 70KDa, amb una serina-proteasa localitzada en l'extrem N terminal (aminoàcids 1-180) i una NTPasa/ARN helicasa que forma les dos terceres parts de la proteïna, en l'extrem C-terminal (aminoàcids 181-631)¹⁵² (Figura 8). Les activitats dels dos enzims han estat ben caracteritzades així com també s'ha pogut resoldre, amb gran resolució, l'estructura secundària de la proteïna multifuncional¹⁵³. Així sabem que el domini NS3 serina-proteasa adopta una estructura semblant a la quimotripsina amb dos pseudominis barrils beta¹⁵⁴. Aquesta estructura queda estabilitzada mitjançant un ió Zn^{2+} , que es coordina amb els residus Cis97, Cis99, Cis 145 i la His 149. Aquest ió Zn^{2+} , també s'ha vist que pot jugar un paper important en el processament autocatalític que realitza la proteasa NS2, en el punt NS2/NS3¹⁵⁵. El centre catalític del domini NS3 proteasa consta del la tríada de residus His57, Asp81 i Ser139 (Figura 8). El domini NS3 helicasa pertany a la superfamília de les helicases 2DExH/D-box. A expenses de la hidròlisi de molècules d'ATP, pot relaxar dobles cadenes d'ARN o cadenes simples d'ARN amb estructures secundàries molt complexes¹⁵⁶. Aquest domini helicasa, doncs, és essencial per la replicació viral del genoma del VHC i per l'assemblatge de les partícules virals¹⁵⁷.

2.2- NS4

La NS4, de 54 aminoàcids, té com a principal funció ser el cofactor de la proteasa NS3, però també realitza altres funcions (Figura 8). La zona central de la NS4A (21-32) és necessària pel plegament correcte de la proteasa NS3. La zona hidrofòbica de la NS4A en el seu extrem N-terminal (aminoàcids 1-21), forma l'estructura α -hèlix transmembrana, que permet mantenir a la membrana el complex NS3/4A¹⁶⁰. L'extrem C-terminal de la NS4A (aminoàcids 40-54) s'ha vist que interacciona amb altres components replicatius i contribueix a la replicació del genoma del VHC i a l'assemblatge de les partícules virals¹⁶¹. En un estudi dut a terme per la Dra. Tomei i col·laboradors¹²¹ van demostrar que un pèptid sintètic que contingués només els aminoàcids hidrofòbics de la proteïna NS4A (del 21 al 32), era suficient perquè la NS3, tingués la propietat proteolítica per



processar tots els talls intermoleculars (en trans).

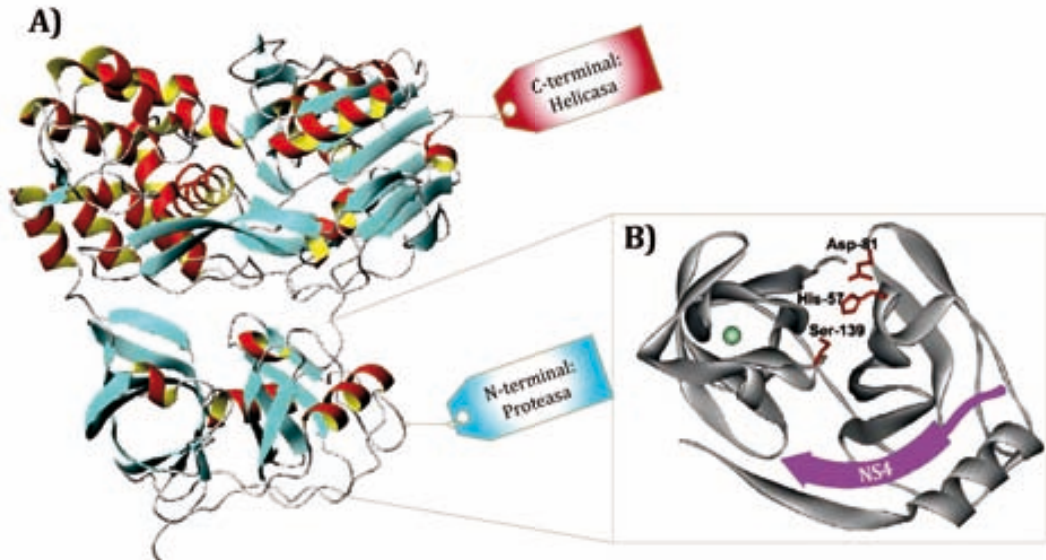


Figura 8. Estructura del complex NS3/4A^{158,159}. a) La proteïna NS3, consisteix en 631 aminoàcids, el domini C-terminal té funció helicasa mentre que el domini N-terminal té funció serina-proteasa. b) El domini proteasa enllaçada amb la proteïna NS4A (color morat). Les cadenes laterals dels residus que formen la tríada catalítica (His-57, Asp-81, i Ser-139) es mostren en vermell i l'ió de zinc unit està representat en verd.

2.3- Processament de la Poliproteïna Viral

Com ja hem dit anteriorment el genoma viral del VHC es tradueix d'un sol cop en forma de poliproteïna. Aquesta incorpora les proteïnes estructurals i el pèptid P7, que seran alliberades mitjançant proteases de l'hoste, i les proteïnes no estructurals, que seran alliberades per les proteases NS2 i NS3. El primer tall entre NS2 i NS3 es produeix gràcies a l'autocatalització de la proteïna NS2, mentre que els successius talls que alliberen les proteïnes que formaran el complex replicatiu, els efectua el complex NS3/4A. Sembla ser que el complex NS3/4A, per efectuar els processaments segueix un ordre específic¹⁶² (Figura 9). El primer tall s'efectua *en cis* entre les proteïnes NS3 i NS4A. Els talls subseqüents es realitzen *en trans*, començant pel punt de tall entre les proteïnes NS5A/NS5B, que alliberaria la proteïna NS5B, i deixaria l'intermediari NS4A-5A. El següent tall es dur a terme entre la NS4A i la NS4B, produint un intermediari mitjanament estable, NS4B-5A, que és processat finalment alliberant les proteïnes NS4B i NS5A.

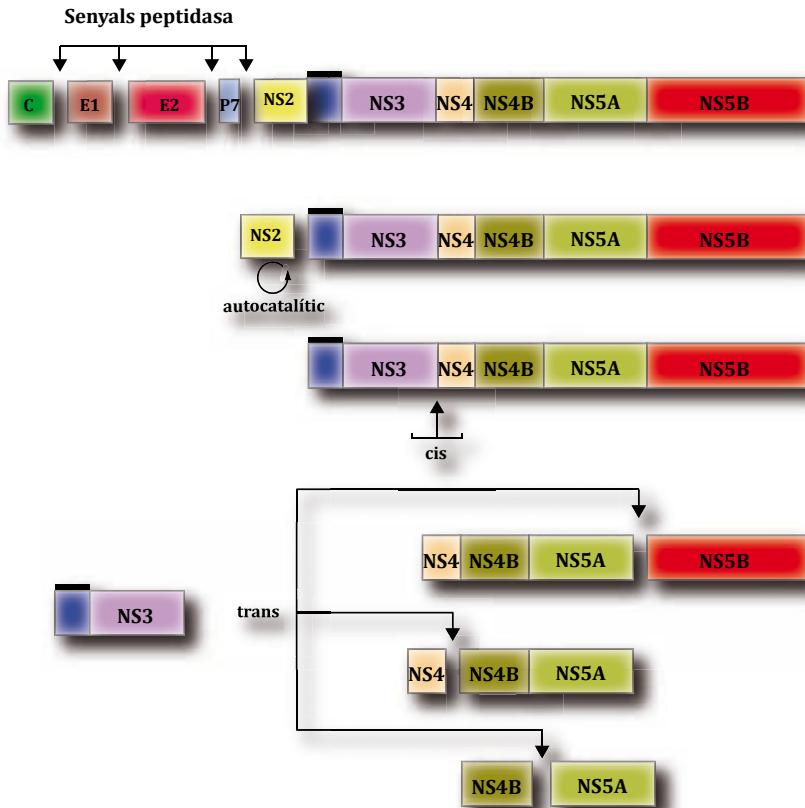


Figura 9. Ordre dels processaments de la poliproteïna. Les proteïnes estructurals (Core, E1, E2) i el pèptid p7 són separades de la poliproteïna viral mitjançant proteases de l'hoste. Les no estructurals són separades de la poliproteïna per les proteases virals (NS2 i NS3). El primer processament viral el realitza la proteasa NS2 autocatalíticament, els següents processaments els dur a terme la NS3. El primer és en cis entre la proteasa NS3 i el cofactor NS4, els següents seran en trans, primer entre les proteïnes NS5B i NS5A, el següent entre NS5B i NS4 i l'últim entre la NS5A i la NS5B.

2.4- Substrat del Complex NS3/4A

Abans de descobrir que el complex NS3/4A, a part de processar la poliproteïna viral, també podia processar factors cel·lulars com detallarem més endavant (secció 3.2), s'havia descrit el patró que seguien els substrats de la proteasa. Així, la seqüència que reconeixia el complex NS3/4A, havia de tenir un aminoàcid acídic en la posició 6 (P6), un residu cisteïna (en els llocs de processament dels tall fets en trans) o treonina (en el lloc de processament del tall fet *en cis* entre la NS3 i la NS4) en la posició 1 (P1), i un aminoàcid de cadena curta, com una alanina o una serina, en la posició 1' (P1')^{163,164} (Taula 1). Així la seqüència consens del tall que



podia processar el complex NS3/4A era la següent : D/E-X-X-X-X-C/T*S/A-X-X-X. Tot i amb això, recents estudis han demostrat que el complex NS3/4A, també es capaç de processar proteïnes cel·lulars, implicades en el sistema immunitari, i això ha complicat la descripció del seu substrat, ja que aquest factors cel·lulars no segueixen exactament aquest patró (veure secció 3.2) o al contrari, moltes proteïnes de l'hoste el segueixen però en canvi el complex no és capaç de processar-les. Així doncs l'especificitat de substrat sembla que pugui estar delimitada per un mecanisme addicional, lligat a la posició que adopta el centre actiu de la proteasa NS3/4A respecte a la membrana.

Taula 1. Punts de tall en la poliproteïna del VHC reconeguts per la proteasa NS3.

SEQÜÈNCIA DEL SUBSTRAT DE LA NS3

	P6	P5	P4	P3	P2	P1		P1'	P2'	P3'	P4'
NS3/NS4A	D	L	E	V	V	T	-	S	T	W	V
NS4A/NS4B	D	E	M	E	E	C	-	A	S	H	L
NS4B/NS5A	D	C	S	T	P	C	-	S	G	S	W
NS5A/NS5B	E	D	V	V	C	C	-	S	M	S	Y
Seqüència consens	D/E	X	X	X	X	C/T		S/A	X	X	X

3- LA RESPOSTA ANTIVIRAL I EL VHC

El VHC presenta diverses estratègies per contrarestar la resposta del sistema immunitari i així aconseguir una infecció persistent, i per tant, la cronicitat.

3.1- La Resposta Antiviral Innata

La resposta immunitària inicial de la cèl·lula hoste comença, quan un patró molecular associat a patògen ("*pathogen-associated molecular pattern*"; PAMP) és reconegut per un receptor cel·lular, la qual cosa farà que s'acciï una cascada de senyalització dintre la cèl·lula que tindrà com a finalitat expressar gens efectors antivirals capaços d'eliminar la infecció¹⁶⁵. El genoma viral del VHC forma part dels motius PAMP i per tant és suficient per accionar la resposta immunitària en l'hoste un cop aquest és introduït



en una cèl·lula naïf. En els hepatòcits (la cèl·lula diana del VHC), existeixen dues vies de senyalització independents encapçalades per dos receptors diferents, el “*toll-like receptor 3*” (TLR-3) i el “*retinoic-acid-inducible gene 1*” (RIG-I), capaços de donar resposta immunitària, un cop aquests receptors han interceptat una doble cadena d'ARN derivada del VHC^{166,167}. L'efecte immediat que provoquen aquest dos receptors un cop han estat activats, és una cascada de senyalització que recluta els factors de transcripció “*interferon-regulatory-factor 3*” (IRF-3) i el “*nuclear factor kappa -light-chain-enhancer activated B cells*” (NF-κB), perquè puguin ser fosforilats i per tant admesos al nucli¹⁶⁸. Un cop allà promocionaran l'expressió de l'Interferó β (IFN-β), la qual de manera paracrina o autocrina activarà al receptor d'Interferons α i β, el qual engregarà la ruta JAK-STAT, que acabarà formant el complex “*Interferon-stimulated gene factor 3*” (ISGF3), un factor de transcripció que entrarà a nucli i activarà l'expressió dels gens estimulats per interferó (“*IFN-stimulated genes*”; ISGs), els quals seran els efectors finals, que permetran a la cèl·lula acabar amb la infecció viral (Figura 10). En el genoma humà existeixen més de 100 ISGs, i tots els productes que generen, provoquen funcions reguladores, que afecten tant a la cèl·lula com al virus, encarades d'evitar la replicació viral¹⁶⁹. L'efecte paracrí que fa l'IFN-β d'induir l'expressió d'ISGs en cèl·lules veïnes, limita la difusió del virus per contacte cèl·lula a cèl·lula. Estudis *in vitro* han vist que aquesta cascada de senyalització que comença amb els PAMPs i acaba activant els ISGs podria autoalimentar-se mitjançant el factor de transcripció IRF-7 (*interferon-regulatory-factor 7*)¹⁷⁰. Aquest factor de transcripció és un producte que és codificat per un ISGs i s'expressa en molts teixits, inclòs el fetge, com a resposta a IFN-α/β. L'IRF-7 promou l'expressió de l'IFN-α, la qual també pot activar el receptor d'IFN-α/β, i per tant la ruta JAK-STAT i l'expressió d'ISGs tot incentivant i amplificant l'acció antiviral. És aquesta proteïna, l'IFN-α, important per l'activació en bucle de la resposta immunitària via IRF-7, la que és utilitzada en el tractament estàndard contra la infecció del VHC¹⁷¹. A més d'incentivar l'expressió dels ISGs, l'IFN-α, indueix a la maduració de cèl·lules efectives del sistema immunitari i promociona la producció de citocines pro-inflamatòries per modular indirectament la resposta adaptativa contra el VHC¹⁶⁵ (Figura 10).

3.2- NS3/4A Bloqueja la Resposta Immunitària

S'ha demostrat en diversos estudis que la proteasa NS3/4A actua com un antagonista de la ruta que activa l'expressió d'IFN-β activada independentment pels



immunitària adaptativa, en la persistència del virus i en la resposta a la teràpia basada amb interferó- α .

3.2.1- CARDIF

CARDIF també és coneguda com a MAVS “*mitochondrial antiviral signalling protein*”¹⁷⁶, IPS-1 “*interferon- α promotor stimulator 1*”¹⁷⁷, VISA “*virus-induced signalling adaptor*”¹⁷⁸. El tall proteolític que produeix la proteasa NS3/4A en CARDIF es realitza en la Cis508, situada en el domini transmembrana de l'extrem C terminal de la proteïna cel·lular, la qual cosa fa que la proteïna es deslocalitzi i que el receptor RIG-I no hi pugui interactuar (Figura 11). Aquesta proteïna s'ha trobat en les membranes de mitocondris, però també en peroxisomes, no obstant, encara no s'ha demostrat exactament en quin compartiment subcel·lular es porta a terme el processament¹⁷⁹. El processament de CARDIF s'ha pogut observar en biòpsies hepàtiques¹⁸⁰. Totes les proteases del VHC de diferents genotips són capaces de processar CARDIF, però les proteases del VHC de genotip 2 i 3 presenten més bones eficiències que les proteases del VHC de genotip 1 o 4. La ruta JAK-STAT induïda per IFN es troba menys activada en pacients que tenen CARDIF processat, però curiosament s'ha trobat que en aquests pacients hi ha una correlació inversa entre el processament de CARDIF i el nivell d'expressió d'alguns ISGs¹⁸¹. Aquest fet fa evident que la ruta de senyalització encapçalada per RIG-I i recolzada per CARDIF és important però no és la única que activa el sistema de l'IFN en el fetge d'un pacient amb hepatitis C crònica.

3.2.2- TRIF

NS3/4A també és capaç de catalitzar TRIF, una proteïna adaptadora del receptor TLR-3 involucrat en la resposta antiviral. El tall en TRIF es produeix en la Cis372, separant el domini TIR (“*Toll-interleukin-1 receptor*”) de TRAF-6 (“*tumour necrosis factor receptor associated factor-6*”), eliminant així, el lloc d'unió a TBK1 (“*TANK-binding kinase 1*”), imprescindible per la fosforilació del factor de transcripció IRF-3¹⁷³ (Figura 11). Malauradament, aquest processament no ha estat estudiat en gran detall i la validació de trobar el processament en biòpsia hepàtica encara està pendent.

3.3.3- TC-PTP

Recentment s'ha descobert una tercera diana de la proteasa NS3 identificada com a TC-PTP, “*T-cell protein tyrosin phosphatase*” (Figura 11). La NS3/4A processa la proteïna TC-PTP per dos punts, en el domini PTP (Cis 123 i Cis 216; Figura 11). La inactivació de TC-PTP per la NS3/4A resulta en una amplificació de la senyal induïda



per EGF (“*epithelial growth factor*”), factor cel·lular associat a càncer, aquesta associació suggereix la possible implicació del VHC amb el carcinoma hepatocel·lular, via proteasa NS3/4A¹⁷⁵.

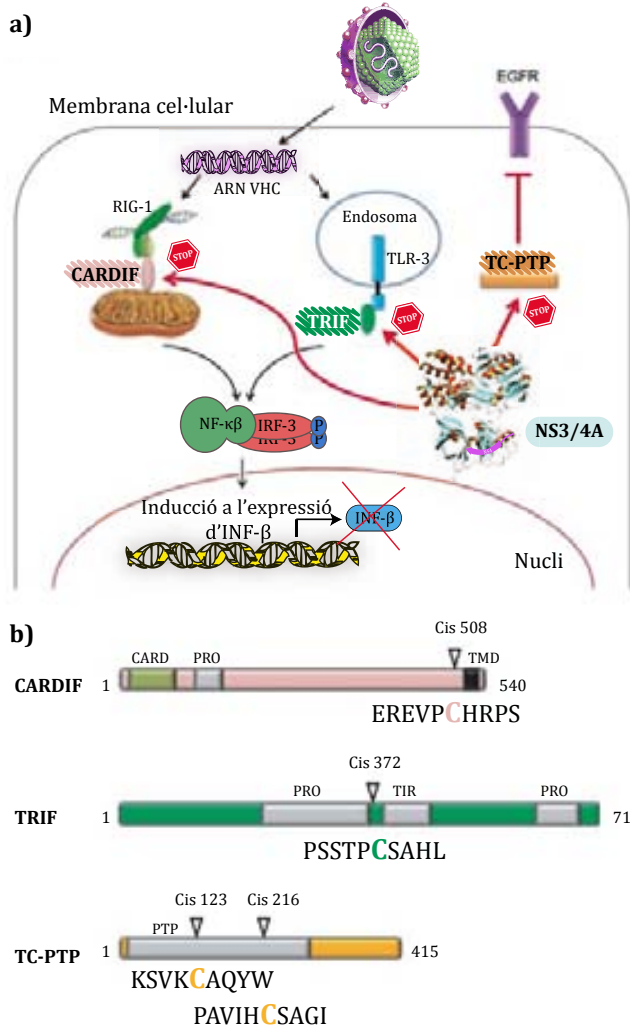


Figura 11. Dianes cel·lulars de la proteasa NS3/4A del VHC¹⁸². a) La proteasa del VHC NS3/4A processa proteolíticament les proteïnes cel·lulars CARDIF, TRIF i TC-PTP, inhibint així la ruta de senyalització que té com a objectiu l'expressió de l'Interferó β i el bloqueig del receptor EGF (“*Epithelial growth factor*”). b) Seqüència d'aminoàcids i situació d'aquests punts de tall, que efectua en les proteïnes CARDIF, TRIF i TC-PTP, reconeguts per la proteasa del VHC NS3/4A.



4- TRACTAMENT CONTRA EL VHC

4.1- Teràpia Actual

4.1.1- Interferó

Durant els anys 80, abans i tot d'haver aïllat l'agent causal que provocava l'hepatitis no-A no-B (el VHC), els pacients amb aquesta patologia es tractaven amb Interferó alfa (IFN- α), ja que s'havia vist, que aquesta proteïna estava implicada en la resposta antiviral cel·lular i que administrada en aquest tipus de pacients, normalitzava els nivells de les transaminases¹⁸³. No obstant, dos estudis duts a terme l'any 1989 per tal d'avaluar l'eficàcia del tractament amb IFN- α per curar l'hepatitis NANB, van mostrar que el 50% dels pacients que havien rebut entre 1-3 000 000 UI d'IFN alfa-2b tres vegades per setmana durant 6 mesos, els nivells de transaminases baixaven fins al rang de la normalitat, però després de deixar el tractament el 50% dels pacients que havien normalitzat les transaminases, tornaven a tenir els nivells previs al tractament^{184,185}. Així doncs l'IFN per si sol no aconseguia els resultats esperats i no va ser fins al 1998 que es va pensar de combinar-lo amb un anàleg de nucleòsid, la ribavirina, conegut per la seva gran activitat contra un ampli espectre de virus ADN i ARN.

4.1.2- Interferó més Ribavirina

L'administració de ribavirina (RBV) en monoteràpia va demostrar tenir poc efecte antiviral¹⁸⁶, però amb combinació amb IFN durant 6 mesos s'aconseguien elevats nivells de resposta virològica sostinguda (RVS), és a dir que el pacient tingués l'ARN del VHC indetectable en sang, 6 mesos després d'haver finalitzat el tractament. A principis dels 90, un meta-anàlisi sobre dades de pacients individuals de quatre centres europeus, va trobar que l'eficàcia d'IFN més RBV era de dues a tres vegades més gran que l'IFN en monoteràpia¹⁸⁷. A més, dos assajos publicats al 1998 van mostrar que la combinació d'IFN alfa-2b i RBV produïa millors índex de RVS i millors índex de restabliments dels nivells de les transaminases, tant en aquells pacients que se'ls havia administrat IFN/RBV com a tractament inicial, com per aquells pacients que havien experimentat una recaiguda virològica després d'un curs previ d'IFN amb monoteràpia^{188,189}. Els índex de RVS van ser del 31% al 38% quan la teràpia de combinació va ser administrada com a tractament inicial i del 49% entre els que havien recaigut. Aquests índex eren de tres a cinc vegades més alts que els aconseguits amb monoteràpia, però no eren suficients, calia ampliar-los. Estudiant la dinàmica de la resposta viral del VHC a IFN es va observar que, a 24 hores després d'haver rebut una única injecció d'IFN alfa-2b, la càrrega viral del



VHC en sang del pacient baixava substancialment, però 48 hores després de la injecció, la càrrega viral es començava a recuperar¹⁹. Aquest fet va fer pensar en la necessitat d'allargar el temps de vida mitja del medicament. Així, en l'any 2001 es va introduir l'IFN pegilat (peg-IFN) en la teràpia contra el VHC.

4.1.3- Interferó Pegilat amb i sense Ribavirina

La pegilació de la molècula d'interferó no només augmentava la biodisponibilitat en sang del fàrmac sinó que també baixava la necessitat d'injectar la medicació al pacient de tres vegades la setmana a una sola vegada, la qual cosa també millorava la qualitat de vida d'aquest.

Els resultats de tres estudis amb pacients amb infecció crònica pel VHC que havien rebut peg-IFN alfa-2a i alfa-2b van assenyalar la seva superioritat sobre els convencionals IFN alfa¹⁹⁰⁻¹⁹². La RVS es va aconseguir en el 25% i el 39% dels pacients que van ser tractats amb peg-IFN (alfa-2a o alfa-2b, respectivament) en monoteràpia (sense ribavirina), en comparació amb només el 7% al 19% dels que van rebre IFN estàndard. De la mateixa manera, estudis amb peg-IFN amb ribavirina van mostrar uns índex de RVS molts més elevats, d'entre el 48% i 56%, comparats amb els índex obtinguts en pacients que havien rebut la combinació però sense l'IFN pegilat, que van ser del 29% al 47%^{11,193}. Així el tractament estàndard que es recomana seguir avui en dia, contra la infecció pel VHC, és una injecció subcutània setmanal d'interferó pegilat (peg-IFN) més una dosi oral diària de RBV durant 48 setmanes o 24 setmanes segons el genotip del VHC amb que està infectat el pacient, és a dir, 48 setmanes en cas d'estar infectat amb VHC de genotip 1 o 4 i 24 setmanes si està infectat amb VHC dels genotips 2 o 3¹⁹⁴. No obstant els bons índex de RVS que s'han aconseguit amb aquesta teràpia pegilada i de combinació, encara els resultats són modestos, sobretot en pacients que es troben coinfectats amb el VIH-1 i el VHC (RVS del 26%) i segueixen provocant molts efectes secundaris greus.

4.2- Efectes Secundaris de la Teràpia peg-IFN/RBV

Els efectes secundaris greus que provoca la teràpia peg-IFN/RBV poden arribar a reduir l'adherència al tractament, a modificar la dosi dels fàrmacs, fent disminuir la resposta al tractament. Tant l'IFN com la RBV, produeixen efectes secundaris molt greus que s'han de considerar per garantir una millor qualitat de vida del pacient i una més alta probabilitat de curació, ja que s'ha vist que els efectes secundaris són els culpables en el 10-20% dels abandonaments de la teràpia i el 20-30% dels motius



per modificar la dosi del tractament. Aquests percentatges han baixat segons estudis recents, recalçant la importància de conèixer i monitoritzar el efectes secundaris per aconseguir millors índex de RVS¹⁹⁵. Els efectes secundaris relacionats amb l'IFN es poden dividir en símptomes gripals, hipofunció de la medul·la òssia (granulopènia i trombopènia), trastorns neuropsiquiàtrics (depressió, intents de suïcidi) i síndromes autoimmunitaris (tiroïditis, diabetis, hepatitis autoimmune). Pel cas de la ribavirina, el principal problema que provoca és l'anèmia hemolítica¹⁹⁶.

Algunes d'aquestes patologies poden ser tractades (paracetamols, inhibidors de serotonina, entre d'altres) però compliquen més la situació clínica del pacient, i ja és de per sí complicada i perillosa, i per tant és urgent i necessari, millorar la teràpia existent, explorar nous fàrmacs o bé buscar factors predictius de resposta al tractament per tal d'evitar un mal major a pacients que prèviament se sap amb alta probabilitat que no arribaran a una resposta viral sostinguda amb el tractament estàndard actual.

4.3- Factors Predictius de la Resposta a la Teràpia amb IFN

Entendre perquè el 50% dels pacients infectats amb VHC de manera crònica no responen a la teràpia amb peg-IFN/RBV, és un dels principals objectius en el món de la clínica i l'experimentació bàsica amb aquest patogen. Tant factors virals com factors de l'hoste juguen un paper important en la resposta a la teràpia amb peg-IFN/RBV. Si es trobés un marcador de resposta fiable que pogués indicar que un pacient no respondrà a la teràpia abans de ser tractat, podríem evitar els efectes secundaris greus a tots aquells pacients que no reaccionaran a la teràpia i a tots aquells que recauran tant aviat deixin el tractament.

4.3.1- Factors Virals

El genotip del VHC ha estat identificat com un dels factors virals més importants involucrats en la resposta a teràpia, ja que s'ha constatat que entre els pacients infectats amb els genotips 2 o 3 del VHC, la teràpia amb peg-IFN/RBV, aconsegueix índex de RVS del 80%, mentre que entre els pacients infectats amb els genotips 1 o 4 del VHC, només aconsegueixen la RVS en el 50%^{193,11}. La càrrega viral del VHC en sang del pacient abans de rebre tractament (CV VHC basal) ha demostrat ser un bon marcador predictiu de la resposta, de manera que una alta càrrega viral basal està associada a una disminució en les taxes de resposta¹⁹⁷. També s'ha demostrat que una disminució en els nivells de l'ARN del VHC en sèrum després de 4 o 12 setmanes de tractament amb IFN- α , també pot ser un factor predictiu, per exemple, el Dr. Zeuzem i col·laboradors van demostrar que



una disminució de 3 logaritmes en els nivells de l'ARN del VHC en el sèrum de pacient en la quarta setmana de tractament, podia ser un factor predictiu fiable de resposta sostinguda, independentment del genotip del VHC en que estava infectat el pacient¹⁹⁸. Un patró d'aminoàcids concret en una zona sensible a IFN (ISDR en la proteïna NS5A) i la variabilitat genòmica del virus a nivell de quasiespècie (veure secció 1.3.2), són factors que han estat àmpliament estudiats i s'ha vist que poden estar altament associats a la resposta amb IFN^{25,26,28,29,36}.

4.3.2- Factors de l'Hoste

Molts factors genètics i biològics dels pacients com també factors externs han demostrat estar involucrats en la resposta a la teràpia amb IFN- α .

Factors Biològics

Molts estudis clínics han postulat que el pacients de raça afro-americana presenten resultats decebedors després de rebre IFN en monoteràpia o en combinació amb RBV¹⁹⁹. No està clara encara l'explicació d'aquest tret diferencial de raça, uns han postulat que podria tenir a veure en que la majoria d'afro-americans es troben infectats amb el VHC de genotip 1, però d'altres han corregit les dades obtingudes pel genotip del VHC i han trobat igualment, una diferència en la resposta al tractament entre persones de raça caucàsica i les afro-americanes. Recentment s'ha publicat un estudi que apunta que aquesta diferència podria basar-se en diferències en un polimorfisme situat en el gen de la interleucina 28B (IL28B), els detalls d'aquests estudi els analitzarem més endavant²⁰⁰. Molts estudis han suggerit que la resposta al tractament seria més favorable en dones que en homes, però molts altres han vist que el gènere no tindria res a veure amb la resolució de la infecció mitjançant la teràpia. Un estudi conduït pel Dr. Hayashi²⁰¹, va observar que els homes i les dones no presentaven diferències en aconseguir la RVS, però si els dividia per edat, les dones joves presentaven una molt més alta probabilitat de respondre positivament a la teràpia que els homes joves. Aquest fet va fer sospitar que els estrògens podrien estar jugant un paper important, amplificant els efectes positius de la teràpia basada amb IFN- α . L'edat també ha estat un dels factors associats a la resposta a la teràpia. En tots els estudis realitzats s'ha pogut observar que els joves responen millor a la teràpia que la gent d'avançada edat. Una de les raons podria ser perquè les persones grans infectades amb VHC normalment presenten estats avançats de malaltia hepàtica greu, com fibrosi o cirrosi, que a la vegada també són factors de mal pronòstic. També s'ha vist que les persones grans no presenten deficiències alhora d'activar el sistema immunitari cel·lular, humoral i innat, i això podria provocar que la



teràpia amb IFN- α els sigui menys efectiva²⁰². L'obesitat ha estat identificada com un factor que ajudaria a que la infecció pel VHC es cronifiqui i que la teràpia amb IFN- α no obtingui bons resultats^{203,204}. Així doncs el fet de perdre pes en pacients amb obesitat s'ha vist que millora la condicions histològiques del fetge, la qual cosa ajuda a que la teràpia amb IFN- α pugui ser més eficaç²⁰⁵. El dany hepàtic greu, com ja hem dit anteriorment, també és un factor de mal pronòstic alhora de tractar un pacient. La fibrosi i la cirrosi han estat vinculades a la no resposta a la teràpia estàndard^{206,207}. Alguns autors han apuntat que la sobrecàrrega de ferro en el fetge i la resistència a insulina podrien predir que el pacient no respondrà^{71,208}, però d'altres han demostrat que potser no són factors associats a resposta^{209,210}.

Factors Externs

El consum abusiu d'alcohol s'ha vist com un dels factors més associats a la no resposta a la teràpia basada amb IFN- α ^{211,212}, no es coneix en detall el mecanisme d'inhibició però es creu que l'alcohol bloquejaria les rutes de senyalització dels IFN- α , IFN- β i IFN- γ en els hepatòcits²¹³. Com ja hem vist anteriorment, estar coinfectat amb el VIH-1 i el VHC tampoc ajudaria a que el pacient pugui obtenir una RVS, després de rebre el tractament estàndard.

Factors Genètics

Els HLAs ("human leukocyte antigen") modulen la resposta immunològica, ja que controlen la presentació d'antigen a les cèl·lules leucocitàries T. Així doncs els HLAs modulen la resposta a teràpia basada amb IFN- α , mitjançant el control de la resposta immunològica adaptativa. En alguns estudis s'han observat alts índex de RVS en teràpia amb IFN α /RBV, associats als següents HLAs: DR7, DRB1*0404, DRB1*0701, DRB1*11 i DQA1*0201-DQB1*02^{214,215}, però en d'altres estudis aquesta associació no s'ha confirmat²¹⁶. Així doncs la interacció entre els diferents polimorfismes HLAs i la resposta immunològica cel·lular durant la infecció crònica del VHC i el tractament amb IFN- α encara no està del tot clara.

El receptor d'IFN- α (IFNR) ha estat àmpliament estudiat per esbrinar la seva implicació en la resposta a teràpia ja que és el principal instigador d'engegar la cadena de senyalització que durà a l'expressió dels gens efectors antivirals ISGs, un cop les seves subunitats, IFNR1 i IFNR2c, enllacin una molècula d'IFN- α (veure 3.1 resposta antiviral cel·lular). Així diferents estudis clínics han trobat alts nivells d'ARN missatgers de les subunitats IFNR1 i del IFNR2c en hepatòcits que correlacionen amb alts nivells de RVS després de rebre teràpia amb IFN- α ²¹⁷. Altres estudis han vist que grans quantitats de



la proteïna IFNR2a soluble en hepatòcits correlacionava amb nivells pobres de resposta a la teràpia²¹⁸. Aquest fet s'ha explicat mitjançant la competició per lligand que podria exercir la proteïna IFNR2a soluble amb les subunitats d'IFNR1 i IFNR2c associades a membrana. Tot i que aquests estudis evidencien l'associació de la quantitat d'ARN missatgers de les subunitats d'aquest receptor d'IFN- α a la teràpia, encara no hi ha estudis exhaustius sobre la regulació d'aquests RNA missatgers ni la seva expressió a proteïna.

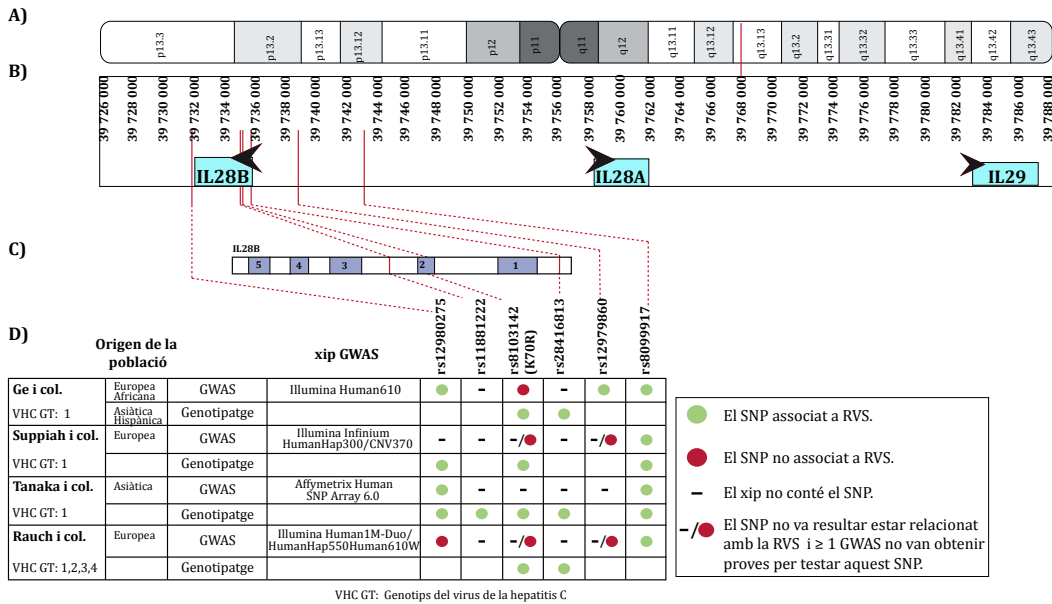
Els alts nivells de citocines en cèl·lules hepàtiques com la IL10, IL-1 β , TNF- α , IL8 i IL6 han estat associats en diferents articles amb nivells baixos de resposta a teràpia, ja que inhibeixen la via de senyalització antiviral que promou l'IFN- α . També s'ha estudiat diferents polimorfismes en al·lels de gens promotors de citocines o de receptors implicats en la resposta immunitària. Es va trobar que ser portador dels al·lels -592A* i -819*T en el gen promotor de la IL10, produïa tenir menor expressió d'aquesta citocina i per tant més alt índex de RVS. També es va trobar que ser portador de l'al·lel 59029-A, en el gen promotor del receptor CCR5, estava associat a una resposta sostinguda a la teràpia amb IFN- α . Recentment quatre estudis d'àmplia associació genòmica ("*genome-wide association*";GWA) han trobat una elevada associació a la resposta a la teràpia amb peg-IFN/RBV a través de diferents polimorfismes de nucleòtid simple (SNPs) situats en el gen o prop del gen de la IL28B, que codifica per proteïnes d'Interferó-I (IFN-I), molècula implicada en la depuració del virus en molts estudis, i en potenciar la resposta antiviral de la molècula IFN- α ^{200,219-221}.

4.3.2.1- La Implicació dels Polimorfismes del gen IL28B en la Resposta a la Teràpia

El primer d'aquests estudis d'àmplia associació genòmica (GWA) mencionats en la secció anterior, dut a terme per Ge i col·laboradors²¹⁸, va incloure 1137 pacients, de diferents races (hispanica, americana d'origen europeu i afro-americana) trets d'un estudi previ anomenat IDEAL²²², el qual va ser dissenyat per veure diferències d'efectivitat entre els diferents IFNs que s'utilitzen en teràpia (peg-IFN-alfa 2a o peg-IFN alfa 2b) combinats o no amb RBV. L'estudi IDEAL va concloure que els diferents tipus d'IFN- α no afectaven a la RVS, però sí la raça dels pacients, ja que els índex de RVS eren menors entre els pacients afro-americans, que en entre els d'origen europeu. Més de 500 000 SNPs en la cohort IDEAL van ser avaluats en l'estudi de Ge i col·laboradors però d'entre tots ells, el SNP més relacionat amb la RVS va ser el rs12979860, localitzat en el braç llarg



del cromosoma 19, en el clúster del gen de l'IFN-λ, entre els gens IL28B i IL29A (Figura 12). Així els portadors del genotip C/C pel SNP rs12979860, presentaven índex de RVS molt superiors als portadors del genotip T/T. Aquesta variació al·lèlica també podia explicar en part, el perquè els afro-americans tenien uns índex de RVS més baixa que



VHC GT: Genotips del virus de la hepatitis C

Figura 12. Diferents SNPs relacionats amb la resposta al tractament contra la infecció per VHC localitzats en el cromosoma 19, en la regió que codifica pels gens dels diferents IFN-λ, trobats en els diferents GWAS realitzats²²⁶. A) En el panell superior s'indica la posició de cada SNP en el cromosoma 19. B) En el segon panell, les posicions dels SNPs rellevants en relació amb el clúster del gen de l'IFN-λ. C) El tercer panell mostra l'estructura genòmica del IL28B, incloent els seus 5 exons, introns intercalats, i les regions reguladores que el delimiten. D) El panell inferior mostra els SNP que van resultar estar associats amb la resposta al tractament en cada un dels estudis indicats, inclosos els que van ser trobats pels estudis de mapatge genètic. Com s'indica en la llegenda, els símbols s'utilitzen per a indicar si un determinat SNP es va associar amb una RVS en cadascun dels quatre GWAS i en els estudis de mapatge genètic.

les altres races, ja que aquesta comunitat presentava una menor freqüència al·lèlica del genotip C/C respecte la d'origen europeu i la d'origen asiàtic²¹⁸. Posteriorment, Suppiah i col·laboradors²¹⁹ i Tanaka i col·laboradors²²⁰ en dos altres GWAS, van identificar la variant genotípica T/T en el SNP rs8099917, localitzada a unes 8 kb del locus del gen IL28B, com la més associada a resposta virològica sostinguda (Figura 12). És important recalcar que la plataforma (GWA) utilitzada per Suppiah i col·laboradors i Tanaka i col·laboradors no incloïa el SNP rs12979860 (Figura 12). Tanmateix ambdós estudis també van observar una associació amb la resposta al tractament a haplotips particulars de SNPs en la regió de la IL28B (Haplotip de Tanaka estava format pels SNPs rs8105790,



rs11881222, rs8103142, rs28418813, rs4803219, rs8099917 i rs7248668; Haplotip del Dr Suppiah format pels SNPs rs12980275, rs8105790, rs8103142, rs10853727, rs8109886 i rs8099917). Al mateix temps, el Dr. Thomas amb els seus col·laboradors²²³, van descriure que la variant observada per l'equip del Dr. Ge²¹⁸ (C/C pel SNP rs12979860) estaria relacionada amb una probabilitat major d'eliminació espontània del VHC. El Dr. Rauch i col·laboradors, en canvi, va relacionar aquest fenomen amb la variant estudiada pels Drs. Tanaka i Suppiah (Figura 12). El Dr. Rauch i els seus col·laboradors²²¹ en el quart GWA van veure que entre tots els SNPs relacionats amb la infecció del VHC, el SNP rs8099917 es trobava altament relacionat en la depuració del VHC en monoinfectats de diferents genotips i en coinfectats amb el VIH-1 i el VHC també de diferents genotips. Així l'equip del Dr. Rauch i els seus col·laboradors van trobar que la variant TT pel SNP rs8099917 estava implicada en l'eliminació del virus de manera espontània tant en monoinfectats com en coinfectats. També van trobar una associació d'aquest SNP amb la resposta al tractament en pacients monoinfectats i que aquesta era independent del genotip del VHC amb que es trobaven infectats.

Pocs estudis, per ara, relacionen aquests SNPs trobats en la regió de la IL28B i la resposta al tractament amb peg-IFN/RBV en pacients coinfectats amb VIH-1 i VHC, de moment només existeixen dos estudis duts a terme per la Dra. Rallón²²⁴ i el Dr. Pineda²²⁵ i els seus col·laboradors basats només en el SNP trobat pel Dr. Ge i col·laboradors²¹⁸. Tots dos van trobar una alta associació entre la variant al·lèlica CC pel SNP 12979860 i la resposta a la teràpia amb peg-IFN/RBV en pacients coinfectats amb VIH-1 i VHC de genotip 1. El gen de la IL28B codifica per la proteïna IFN- λ 3, proteïna relacionada amb la resposta antiviral cel·lular.

Interferó λ

Els IFN- λ , que inclouen l'IFN- λ 1, IFN- λ 2 i IFN- λ 3, també anomenats IL29, IL28A i IL28B, són un nou grup de citocines emparentades amb els membres de la família dels IFN i la IL10. La senyalització dels IFN- λ a través dels receptors d'IFN- λ R activen la ruta JAK-STAT i la ruta de les MAPK, per induir resposta antiviral, antiproliferativa, immune i anti-tumoral²²⁷. Encara que in vitro s'ha observat que l'IFN- λ 1 inhibeix al VHC de manera dosi dependent i reforça l'eficàcia antiviral de l'IFN- α , també s'ha pogut constatar que en cap cas supera l'eficàcia antiviral del IFN- α . Així que de moment hi ha moltes reserves a l'hora d'introduir aquesta molècula en la teràpia en solitari però sí en companyia de l'IFN- α o en combinació amb molècules inhibidores de proteïnes virals, com la proteasa NS3 i la polimerasa NS5B, les quals han demostrat tenir força eficàcia alhora d'inhibir la



replicació viral, i són les futures promeses per la teràpia contra el VHC.

4.4- Noves Teràpies (STAT-C)

Les teràpies específicament dirigides contra el VHC (*“specific target anti-viral therapy”*; STAT-C) es basen en la recerca de molècules capaces d’inhibir proteïnes importants pel sistema biològic del VHC. La inhibició farmacològica de la proteasa NS3/4A del VHC i de la NS5B polimerasa encarregada de la replicació de l’ARN-VHC, són el principal objectiu per la majoria dels fàrmacs que actualment es troben en desenvolupament. Els inhibidors de la proteasa actuen inhibint el centre catalític de l’enzim NS3 serina-proteasa, mitjançant enllaç covalent (telaprevir, boceprevir) o no covalent (BILN2061, ITMN-191, TMC435)²²⁸. Els inhibidors de la polimerasa es divideixen en anàlegs de nucleòsids, que produeixen inhibició en el centre catalític de l’enzim (NM283, R7126, MK-0608 i R1626), i en no anàlegs de nucleòsids que actuen en una regió allunyada del centre catalític i produeixen una inhibició alostèrica de l’activitat de l’enzim (HCV-796, A782759, A837093, GS-9190, HCV-371, entre d’altres) (ref). La potència antiviral dels inhibidors de la proteasa és més gran que la dels inhibidors de la polimerasa, però, la seva barrera genètica (nombre de mutacions del VHC per originar resistència al fàrmac) és baixa. Per tant, una sola mutació pot conferir resistència al fàrmac²²⁸. En la Taula 2 podem veure les diferents mutacions que s’han descrit, tant *in vivo* com *in vitro* que poden conferir resistència al VHC als diferents inhibidors fins ara descrits.

Dels inhibidors de la proteasa abans esmentats tots, excepte el BILN-2061, han entrat en assajos clínics, però només els fàrmacs telaprevir i boceprevir han arribat fins a fase clínica III²²⁹⁻²³⁵, amb combinació amb interferó- α i ribavirina. Recentment s’han publicat els resultats de diferents assajos en fase III de la triple teràpia, dos realitzats amb boceprevir, SPRINT-2229 (amb pacients naïf) i RESPOND-2230 (amb pacients que havien fracassat amb la teràpies anteriors) i tres amb telaprevir, ADVANCE^{231,233} i ILLUMINATE^{232,234} (ambdós amb pacients naïf) i REALIZE²³⁵ (amb pacients no responedors). Aquests estudis mostren que el tractament amb els inhibidors de proteasa (boceprevir i telaprevir) combinats amb peg-IFN/RBV van fer augmentat significativament la RVS, en comparació amb el tractament exclusiu amb peg-IFN/RBV, en pacients infectats amb el VHC de genotip 1, tant en aquells que no havien estat tractats prèviament, com en aquells que havien fracassat amb el tractament anterior. Tots i els bons resultats obtinguts amb la triple teràpia, també es van poder observar l’aparició

de greus efectes secundaris, els quals van ser el principal motiu d'abandonament, i també el desenvolupament de variants del VHC resistents als inhibidors en pacients no responedors a la triple teràpia.

El VHC sembla potencialment curable, però perquè en el futur això sigui una realitat, s'han de poder monitoritzar els efectes secundaris i les resistències als inhibidors dels STAT-C, ja que futurs tractaments contra el VHC, com va passar en els tractaments pel VIH, passaran per la combinació doble o bé triple d'inhibidors amb o sense peg-IFN/RBV.

Taula 2. Mutacions que confereixen resistència a diferents STAT-C²²⁸.

		inhibidors de la proteasa NS3/4A						
		macrocíclic					lineal	
inhibidors		BILN-2061	ITMN-191	TMC435	MX-7009	BI-201335	telaprevir	boceprevir
"in vivo"		no dades	R155K/Q D168T/V	Q80K/R R155K D168E/N/V	R155K D168T/V	R155K/Q/S/T D168E/G/H/N/T/V/Y	V36A/M/C T54A R155K/T A156S/T/V	V36A/L/M F43C/S T54A R155K/Q/T/M A156S V170A/T
"in vitro"		R155Q A156T/V D168A/V	Q41R F43S S138T	Q41R F43S Q80R A156G/T/V D168A D168A/E/H/V/T/V/Y S489L V23A	no dades	no dades	A156S/T/V	T54A A156S/T V170A
		inhibidors de la polimerasa NS5B						
		al·lostèrics			centre actiu			
inhibidors		ABT-333	AG-02154	BMS-650032	IDX184	R1626		
		ABT-072	PF-868554	JTK-109	MK-0608			
		ANA598	VCH-759	MK-3281	NM283			
		GS-9190	VCH-936		R7128			
		HCV-796						
"in vivo"		C316Y Y448H G554D D559G	L419S/M R422K M423A/L/T/V H482L V494A	no dades	S282T	NO DADES		
"in vitro"		H95Q/R C316F/N/S/Y S365A/T S368T N411S M414I/V/L/T Y448H/C C451R S556G G558R	L419M M423T/V M462T H482L	P495A/L/S/T P496A/S V499A	S282T	S96T N142T		



HIPÒTESI



La nostra hipòtesi és que la proteasa NS3/4A del VHC, mitjançant la interrupció de la via de senyalització implicada en la producció d'IFN- α / β , podria estar implicada en la resposta a la teràpia basada en IFN- α . L'evasió de la resposta immunològica innata probablement exerceix una influència negativa en el desenvolupament posterior de la immunitat adaptativa contra el VHC i per tant, contribueix a la persistència del virus i a la resistència a la teràpia.

Recentment, diversos SNPs, que es troben a prop del gen de la IL28B, també implicat en el desenvolupament de la immunitat innata, s'han associat a la resposta al tractament basat amb IFN contra el VHC. El paper del gen de la IL28B en la resposta al tractament del VHC pot jugar un paper important en el col·lectiu de pacients coinfectats VHC/VIH-1.





OBJECTIUS



- Amplificar i seqüenciar la zona del gen de la interleucina 28B on es situen els SNPs rs8099917 i rs 12979860 d'una cohort de 173 pacients coinfectats amb el VIH-1 i amb el VHC, que havien rebut tractament contra la infecció pel VHC basat en peg-IFN/RBV, i relacionar els genotips obtinguts, amb les respostes al tractament dels pacients.
- Amplificar i seqüenciar les quasiespècies de les proteases NS3/4A de 56 pacients coinfectats amb VIH-1 i VHC tractats amb peg-IFN/RBV, per tal d'analitzar la seva variabilitat genètica a nivell de diversitat (distàncies genètiques i distàncies sinònimes i no sinònimes) i relacionar la variabilitat trobada en les quasiespècies de la proteasa NS3/4A amb la resposta al tractament.
- Obtenir les eficiències catalítiques de cadascuna de les proteases NS3/4A majoritàries trobades en les quasiespècies de 56 pacients coinfectats amb VIH-1 i VHC, tractats amb peg-IFN/RBV, i relacionar aquestes eficiències catalítiques amb la resposta al tractament.
- Analitzar si la variabilitat i l'eficiència catalítica de la proteasa NS3, juntament amb els SNPs de la zona que codifica per la interleucina 28B, poden esdevenir nous marcadors predictius de resposta a la teràpia.





MATERIALS

I MÈTODES



1- MATERIAL BIOLÒGIC

Les mostres de sang que van ser utilitzades en aquest treball provenien de pacients coinfectats amb els virus VHC i el VIH-1, de la Unitat Clínica de malalts de VIH de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona (HUGTIP), extretes el dia abans de començar el tractament contra el VHC (mostra basal). Els pacients havien seguit el tractament estàndard contra el VHC, basat en una injecció subcutània setmanal peg-IFN i una dosi oral diària de RBV, durant 24 setmanes per aquells pacients infectats amb VHC de genotips 2 o 3 i 48 setmanes per aquells que ho estaven amb VHC de genotips 1 o 4. Coneixíem el resultat de la teràpia a la que s'havien sotmès els pacients, ja que 24 setmanes després de deixar de prendre la medicació contra el VHC, se'ls va avaluar la càrrega viral del VHC en sang, mitjançant una PCR (*"Polymerase chain reaction"*) quantitativa. Si el pacient presentava càrrega viral indetectable consideràvem que havia obtingut RVS, en canvi, si el virus continuava present en sang el consideràvem no responentor (NR). La majoria (98%) dels pacients també prenién tractament contra la infecció per VIH-1, TARGA, presentaven càrrega viral del VIH-1 en sang indetectable (81%) i tenien un nivell de cèl·lules CD4+ suficients per rebre tractament antiVHC, és a dir més de 200 cèl·lules/ml en sang (98%). Dels pacients coinfectats que van entrar a formar part d'aquest treball, n'hi havia 2 (pel cas de l'estudi 1) o 1 (pel cas de l'estudi 2) també infectats amb el virus de l'hepatitis B (VHB), en el moment de ser tractats amb peg-IFN/RBV. Aquests, però van acabar per superar la infecció per aquest patogen. Abans de realitzar aquest treball vàrem obtenir un informe de consentiment de tots els pacients implicats i vàrem comptar amb el consentiment del consell ètic de l'HUGTIP.

2- ANÀLISIS CLÍNIQUES

El genotipatge del VHC es va determinar mitjançant una tècnica comercial de PCR en temps real d'hibridació (Versant HCV Genotype v2.0 LiPA; Siemens, Barcelona, Spain). La càrrega viral del VHC va ser mesurada mitjançant la tècnica de la PCR quantitativa, en diferents períodes de temps (dels anys 90 fins l'any 2009) i per tant es van fer mitjançant diferents tècniques que es trobaven a l'abast en el moment que es va realitzar l'anàlisi (Amplicor HCV monitor test 2.0, [Roche Diagnòstics System], on el límit de detecció era de 600-700 000 UI/ml; Cobas Amplicor HCV Monitor, [Roche Diagnòstics System] on el límit era 600-850 000; Cobas taqMan [Roche Diagnòstics System], amb un límit de detecció de 10-200 000 000 UI/ml). A causa dels diferents límits de detecció de



totes les tècniques diagnòstiques emprades per obtenir la càrrega viral en sang del VHC dels pacients, vàrem haver de estratificar els valors en càrregues virals superiors o iguals a 600 000 UI/ml i en inferiors a 600 000 UI/ml en l'estudi 1 (genotipatge dels polimorfismes rs8099917 i rs 12979860), en canvi per l'estudi 2 (variabilitat genètica i eficiència catalítica) vam poder analitzar les càrregues virals amb números absoluts ja que, s'havien avaluat amb els mètodes d'anàlisi més moderns. Pel marcador d'antigen del VHB i la càrrega del VIH-1, es va utilitzar la tècnica de la PCR quantitativa en temps real. El número de cèl·lules CD4⁺ per µl. de sang es va mesurar utilitzant la tècnica de citometria de flux. El nivell de fibrosi hepàtica va ser diagnosticat i quantificat mitjançant la tècnica de la elastografia de transició (Fibroscan, Echosens, Paris, França), una tècnica no invasiva, que s'utilitza com a alternativa a la biòpsia hepàtica, amb el conseqüent benefici pel pacient. Els estudis que comparen els resultats del fibroscan (FS) amb la biòpsia hepàtica han trobat una relació significativa ($P < 0.001$) entre la mesura de la elasticitat hepàtica, mesurada en Kilopascals (KPa), obtinguda amb el FS i els estadis de fibrosi obtinguts per biòpsia²³⁶. Segons l'escala METAVIR (F = 0 a F = 4) s'estableix les següents equivalències entre el resultat del FS i la interpretació de la biòpsia : F0-1 = absència de fibrosi ≤ 7 KPa, F2 = fibrosi moderada = (7 - 9.4) KPa, F3 = fibrosi avançada = (4-12) KPa, F4 = cirrosi >12 KPa , i és la que vàrem usar per catalogar els resultats de la elasticitat hepàtica obtinguts dels nostres pacients. Els nivells dels enzims característics de dany hepàtic, la transaminasa glutamicooxalacètica (GOT) i la transaminasa glutamicopirúvica (GPT), van ser determinades utilitzant protocols clínics estàndards.

3- ESTUDI 1: GENOTIPATGE DELS POLIMORFISMES RS8099917 I RS12979860

3.1- Obtenció i Extracció de l'ADN

De la sang, extreta de 173 pacients, s'aïllaren les cèl·lules mononucleades de sang perifèrica (CMSP), mitjançant una separació per centrifugació de gradient. La sang total es va centrifugar a 1360 rpm durant 10 min, per poder descartar el plasma, i en un tub de 50 ml (falcon), dipositar el volum de component cel·lular juntament amb la meitat d'aquest volum obtingut, en tampó fosfat salí (PBS) al 10%. En aquesta mescla s'hi va afegir el Lymphoprep™ en relació 1:2 de volum i tot es va centrifugar a 1850 rpm durant 30 min., obtenint tres fases fàcilment diferenciables. Amb una pipeta vàrem recollir la fase del mig (fase de color aquós), on hi precipitaren les CMSP, i vàrem centrifugar-la



a 1190 rpm durant 10 min, dues vegades, tot netejant el precipitat cel·lular amb PBS 10%. Per tal de saber la quantitat de cèl·lules obtingudes es va realitzar un comptatge cel·lular (“*Beckman counter*”), i vàrem guardar el volum equivalent a 2×10^6 de CMSP, que vàrem preservar a -80°C . Per extreure el ADN del vial de CMSPs obtingut, vàrem seguir les instruccions descrites en el producte comercial “*QuickExtract DNA Extraction Protocol*” (Epicentre Biothechnologies) i després es va emmagatzemar l’extracció d’ADN a -70°C o es va genotipar directament.

3.2- Genotipatge del SNP rs8099917 i del SNP rs12979860

El genotipatge dels SNPs rs8099917 i rs12979860, es va dur a terme mitjançant una amplificació per PCR per cada SNP i una posterior seqüenciació del fragment amplificat. Per realitzar la PCR vàrem fer servir el joc de productes “*Platinum® TaqDNA Polymerase High Fidelity*” (Invitrogen) posant en la mescla de reacció els següents reactius: 5 μL de solució de l’ADN genòmic extreta dels CMSPs, 200 μM de desoxiribonucleòtids trifosfats (dNTP’s), 2mM de sulfat de magnesi (MgSO_4), 1x de “*High Fidelity buffer*”®, 0.25 U de “*Platinum Taq DNA polymerase*®” i 10 pmols de cada oligonucleòtid capaç d’amplificar cada SNP. En el cas del SNP rs8099917, vàrem fer servir la parella d’oligonucleòtids anomenats rs8099917-128 de sentit endavant (5’-GTGCATATGTTTTCTGAC-3’) i rs8099917-556 de sentit invers (5’-GTGGCCCCTCACCCATGC-3’) i per tal d’amplificar el rs 12979860, els anomenats rs12979860-13 de sentit endavant (5’-GACGAGAGGGCGTTAGAGC-3’) i el rs12979860-595 amb sentit invers (5’-GAGGGACCGCTACGTAAGTC-3’). Es va enrasar la dissolució amb aigua destil·lada fins arribar a un volum total de reacció de 50 μL . Els paràmetres utilitzats en el termociclador van ser: 2 min. a 94°C , seguits de 40 cicles de la següent combinació de temps i temperatures: 30 seg. a 95°C , 30 seg. a 55°C , 30 seg. a 68°C i per últim un pas final d’extensió de 7 min. a 68°C . Per comprovar que el producte obtingut de la PCR era el que ens esperàvem (445 pb pel cas del rs8099917 i 428 pb pel cas del rs 12979860) vàrem carregar els productes de la PCR en un gel d’agarosa al 1.5%, el vàrem tenyir amb el producte “*SYBR safe DNA gel*®” (Molecular probes, Innogenetics) al 0.01% i el vàrem irradiar amb llum ultraviolada. Un cop comprovat que teníem el resultat esperat, vàrem purificar les PCRs obtingudes utilitzant el producte comercial “*ExoSAP-IT*®” seguint el protocol que indica el fabricant. El producte de PCR purificat es va seqüenciar seguint les indicacions del producte “*BigDye® Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit*” (Applied Biosystems), utilitzant els oligonucleòtids ja mencionats en l’amplificació per PCR (rs8099917-128 o rs8099917-



556, pel cas del genotipatge rs8099917 i el rs12979860-13 ó 12979860-595 pel cas del genotipatge del rs12979860). Les seqüències produïdes pel seqüenciador “ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer”, es van alinear i editar mitjançant el programa Sequencher 4.9 (GeneCodes). Els oligonucleòtids utilitzats en la seqüenciació del SNP rs8099917 ens van deixar analitzar un fragment del cromosoma 19 humà, situat a 7 384 bp del gen de la interleucina 28B (IL28B) pel cantó 5’ i en el seu cantó 3’ es trobava a 15 791 bp del gen precursor de la IL28B. La posició d’estudi es localitzava dins aquest rang, en la posició 12 011 384 bp, on depenent del genoma del pacient hi trobàvem una T, una G o bé una ambigüitat G/T (Figura 13). En el cas del SNP rs12979860 el fragment que vàrem poder amplificar, amb els oligonucleòtids que havíem emprat, es situava en el seu cantó 5’ a 2 966pb del gen de la interleucina 28B i en el seu cantó 3’ a 20 128 pb del gen precursor de la interleucina 28A. La posició d’estudi en aquest rang, es situava a la posició 12 007 006 pb, on depenent del genoma del pacient hi trobàvem una C, una T o bé una ambigüitat C/T (Y) (Figura 13).

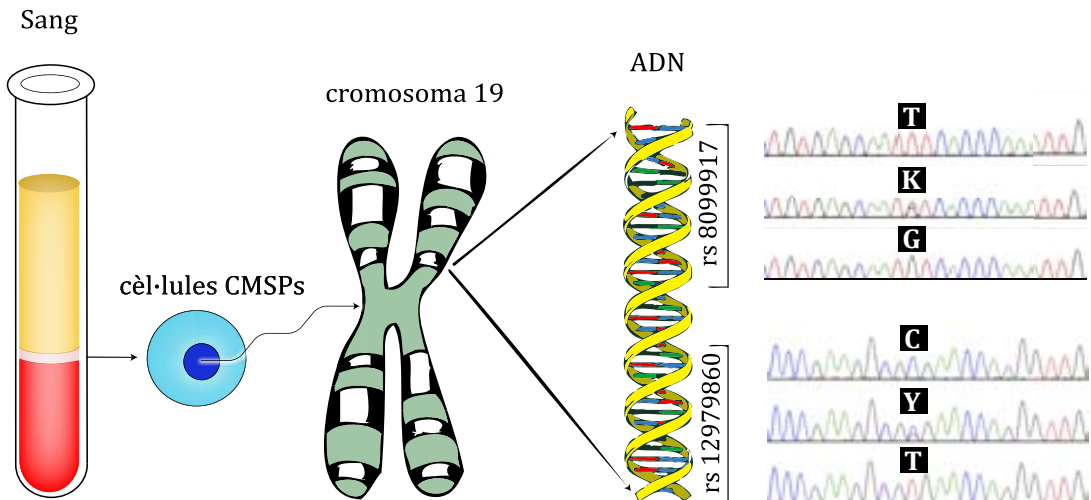


Figura 13. Esquema del protocol seguit per obtenir el genotip dels pacients pels polimorfismes rs8099917 i rs12979860. De la sang extreta del pacient vàrem separar les cèl·lules CMSPs, de les quals vàrem extreure el ADN genòmic i vàrem seqüenciar la zona genètica propera al gen de la interleucina 28B, on es localitzen els dos SNPs que volíem estudiar.

3.3- Anàlisi de les Dades de l'Estudi 1

Les característiques clíniques de la població d'estudi i els diferents paràmetres avaluats els vàrem expressar en medianes i en rangs inter quartils. L'associació entre



els diferents paràmetres qualitius amb la resposta va ser explorada utilitzant el test de Fisher, mentre que la relació entre les característiques clíniques quantitatives i la resposta va ser analitzada a través del test no paramètric de Mann-Whitney. Per analitzar la relació entre diferents grups portadors dels diferents genotips es va utilitzar l'anàlisi no paramètric de les variàncies (ANOVA).

Per calcular l'equilibri de Hardy-Weinberg, analitzar l'associació de la resposta al tractament amb els SNPs, per separat, mitjançant diferents models d'herència (codominant, dominant, recessiu, sobredominant o additiu) i analitzar les relacions dels dos SNPs en conjunt (haplotip) amb la resposta al tractament es va utilitzar el programa SNPStats²³⁷. El model d'herència escollit sempre va ser aquell que presentava el criteri d'informació de Akaike (AIC) més baix. Els anàlisis univariats i multinomials van ser utilitzats per determinar factors de predicció de resposta al tractament. Tots els anàlisis estadístics es van realitzar mitjançant el programa SPSS versió 17 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA)²³⁸. Tots els valors de P van ser considerats estadísticament significatius només quan el seu valor era menor de 0.05.

4- ESTUDI 2: VARIABILITAT GENÈTICA I EFICIÈNCIA CATALÍTICA

4.1- Obtenció i Extracció de l'ARN

De la sang extreta dels 173 pacients de l'estudi 1, es van obtenir 56 plasmes a partir d'una centrifugació a 1360 rpm durant 10 min., de només aquells pacients que es trobaven infectats amb el VHC de genotip 1 i que sabíem el resultat que havien obtingut després de seguir la teràpia estàndard contra el VHC en el moment de començar aquest segon estudi. Dels plasmes obtinguts en vàrem extreure les molècules d'ARN viral de cada pacient a partir de 140 µl d'aquests i seguint les indicacions del paquet comercial "QIAmp Viral RNA Mini Kit, de Qiagen", obtenint finalment un volum de 60 µl d'ARN eluïts en el tampó d'elució del paquet comercial utilitzat, anomenat AVE, compostat per aigua lliure d'ARNases amb el 0.04 d'azida sòdica, el qual vàrem congelar a -80°C fins al seu posterior ús.

4.2- Amplificació de la Proteasa NS3/4A del VHC

Un cop extret l'ARN de cada pacient, 5 µl de l'elució de cadascun, van ser transcrits inversament i amplificats per reacció en cadena per la polimerasa (RT-PCR<; Figura 14 A), en un sol pas i en un volum final de 50 µl, utilitzant el paquet comercial "SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity" de la casa



comercial Invitrogen, i els encebadors necessaris per hibridar la cadena d'ARN de subtipus 1a o bé els necessaris per amplificar la de subtipus 1b, depenent del genotip que presentava la mostra (informació que ja teníem abans d'efectuar la RT-PCR). Així, per amplificar les cadenes d'ARN que formaven part del genotip del VHC de subtipus 1a, es va fer servir la parella d'oligonucleòtids, a una concentració final de 0.2 μ M següent: NS3P1A1 (amb sentit endavant 5'-CAAGGGGTGGAG GTTGCTGGC-3', residus 3 389 a 3 409 de la seqüència de referència HCV-J, amb el número d'accés al GenBank D90208) i el NS4B-4 (amb sentit invers 5'-AGTACTGTA TCCCGCTGATG-3', residu 5 647 a 5 666 de la seqüència de referència HCV-J). En canvi per amplificar les molècules d'ARN del VHC del subtipus 1b, es van fer servir els encebadors, a la mateixa concentració que els anteriors, següents: el HCVproL1 (5'-GCAAGGGTGGCGACTCCTTGC-3', residus 3 392 a 3 412 de la seqüència de referència HCV-J) i el NS4B-4, mencionat anteriorment. El programa de temperatures i temps emprat en l'aparell termociclador per dur a terme la reacció va ser el següent: 45°C durant 30' (per tal de que es produís la transcripció inversa), 94°C durant 2' (per deshibridar les cadenes del cADN sintetitzades) seguits per 40 cicles a 94°C durant 15 segons (també per tal de deshibridar les cadenes de cADN, 55°C durant 30 segons (per tal d'hibridar els encebadors amb les cadenes de cADN) i 68°C durant 3 minuts (per tal d'amplificar la seqüència del gen d'interès), i finalment 68°C durant 7 minuts. Es va comprovar, per la tècnica del límit de detecció per PCR, que en cada volum de reacció per realitzar la RT-PCR hi havia un excés de RNA del VHC de cada pacient, i per tant, al menys 25 molècules de l'ARN del VHC, van ser afegides per realitzar la reacció de transcripció i amplificació. A partir de 5 μ l de la reacció RT-PCR vàrem fer una segona amplificació per reacció en cadena per la polimerasa (PCR2; Figura 14) en un volum final de 50 μ l, seguint les condicions descrites en el paquet comercial "*Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity*", (Invitrogen). Per les mostres de genotip 1a, vam utilitzar com a encebador amb sentit endavant, el NS31a1(5'-GGGT TGAATTCATGGCTCCTATTGGCTGCGTGGTCATAGTGGGCAGGATTGTTTTGTCCGGGAA GGGAGGACCCATCACGGCGTACGCCAG-3'), el qual contenia un punt de restricció capaç de ser tallat per l'enzim *Eco RI* (zona ratllada en la seqüència de l'encebador) que ens serviria per la posterior clonació, els residus del 21 al 34 de la proteïna cofactora NS4 del VHC de seqüència majoritària presents en la base de dades del VHC de referència de subtipus 1a (zona en negreta en la seqüència de l'encebador), un pont dipèptid format per dos glicines (zona en cursiva de la seqüència de l'encebador) i finalment els residus corresponents als 7 primers aminoàcids de la proteasa NS3 (zona ratllada i en



negreta de la seqüència del encebador) de seqüència majoritària en la base de dades de referència del VHC de subtipus 1a (residus 3411 a 3431 de la seqüència de referència HCV-J). Com a encebador de sentit invers per amplificar les mostres de genotip 1a vàrem utilitzar el NS31ar4 (5'-GGGAGGGGCTCGAGT**CAGGACCTCATGGTTGTCTCTAG**-3'), el qual contenia 7 aminoàcids de la part N-terminal de la proteasa NS3 (posicions aminoacídiques de la proteasa del 175 a la 181) els quals són complementaris amb les residus de 3411 a 3431 de la seqüència de referència HCV-J (en negreta i subratllat en la seqüència del encebador) seguits per un codó de terminació (en cursiva dins la seqüència del encebador) i una regió capaç de ser processada per un enzim de restricció anomenat *Xho I* (part subratllada de l'encebador). Pel cas de les mostres de subtipus 1b, per realitzar la PCR2, es va fer servir com a encebador amb sentit endavant, el HCVproL2, (5'-GGGTTGAATTCTATGGCTCCTATTGGATCTGTTGTTATTGT**TGGAGAATTATTTGTCTGGAAGAGGAGGACCTATCACCTACTCCCAA**-3') el qual contenia, com en el cas del encebador fet servir per les mostres de genotip 1a, un punt de tall de restricció per l'enzim *Eco RI* (zona subratllada en la seqüència del encebador), els residus del 21 al 34 de la proteïna cofactora NS4 del VHC de seqüència majoritària entre les seqüències de la base de dades de referència pel VHC de subtipus 1b (zona en negreta del encebador), un pont dipèptid format per dos glicines (en cursiva dintre de la seqüència de l'encebador) i els 7 primers aminoàcids de la proteasa NS3 (zona ratllada i en negreta de la seqüència de l'encebador) de seqüència majoritària en la base de dades de referència del VHC de subtipus 1b (residus 3 411 a 3 431 de la seqüència de referència HCV-J). I com a encebador de sentit invers vàrem fer servir el oligonucleòtid HCVproR (5'-GGGAGGGGCTCGAGT**CACGTGACGACCTCCAGGTCAGC**-3') amb un punt de restricció capaç de ser processat per l'enzim *Xho I* (zona subratllada de l'encebador), seguit per un codó d'aturada (en cursiva dintre de la seqüència de l'encebador) i 7 aminoàcids de la part N-terminal de la NS3 amb la seqüència majoritària d'aquest gen pel genotip 1b, extreta de la base de dades de referència del VHC (zona subratllada i en negreta de la seqüència del encebador, residus corresponents a la posició 3 933 fins a la 3 952 de la seqüència de referència HCV-J). Tots els encebadors utilitzats en la PCR2 es van utilitzar a una concentració de 0.2 µM. El programa de temperatures i temps per tal de realitzar la reacció de PCR2 en el termociclador va ser el següent: 94°C 2 minuts, seguits per 35 cicles de 94°C durant 3 segons més 45°C durant un minut i un temps d'extensió d'1 minut a 68°C cadascun, i per últim un temps d'extensió final a 68°C durant 7 minuts. Els productes amplificats en la PCR2 van ser correguts electroforèticament en un gel



d'agarosa a l'1%, el qual es va tenyir amb "SYBR Safe DNA gel" de la casa Molecular Probes (Innogenetics), posteriorment, per poder comprovar que havíem amplificat el gen desitjat d'aproximadament 650 parells de bases (pb), vàrem irradiar-lo amb llum ultraviolada.

4.3- Clonació de la Proteasa NS3/4A del VHC

Per assegurar-nos que el màxim número de proteases NS3 provinents de cada pacient (quasiespècies), eren utilitzades com a motlles en les diferents PCRs (RT-PCR i la PCR2), aquestes reaccions varen ser realitzades 4 vegades per cada pacient, i reunides en un sol tub just abans de clonar les diferents quasiespècies obtingudes, amb el plasmid BlueScript pBSK(-) (Stratagene) (Figura 14B). Així els productes de PCR amplificats per quadruplicat, i el vector a on els volíem clonar pBSK(-), van ser digerits 5 minuts a 37°C pels enzims *EcoRI* (FastDigest® EcoRI) i *Xho I* (FastDigest® XHO I) seguint les instruccions del fabricant, "Fermentas Life Science®". Els fragments innecessaris i els enzims de restricció utilitzats van ser eliminats de la mescla, mitjançant la tècnica de l'electroforesi i el paquet comercial QIAquickpurification de l'empresa QIAGEN. La lligació entre el vector pBSK(-) i els diferents inserts provinents de cada pacient, tallats en extrems cohesius i purificats, van ser el substrat de la reacció de lligació realitzada amb el tampó 2X de lligació ràpida ("2X Rapid Ligation Buffer") i l'ADN T4 lligasa, ("T4 DNA Ligase") ambdós productes subministrats per l'empresa Promega, en un volum final de 20 µl. La reacció es va dur a terme a temperatura ambient durant 5 minuts i utilitzant la relació insert : vector de 3 : 1. La meitat de la mescla de lligació, 10 µl, la vàrem transformar en les cèl·lules competents *E.coli* XL1 blue MRF, les quals ens permetien, després de ser plaquejades en un medi agar amb 100 µg/ml d'ampicil·lina, IPTG 1mM ("isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside") i X-GAL al 2% ("5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside"), poder discriminar aquelles colònies transformades que contenien el vector lligat amb l'insert (de color blanc) d'aquelles que no el contenien (de color blau). Es va verificar que aquetes colònies blanques presentaven l'insert que esperàvem dintre del vector pBSK(-), mitjançant una PCR seguint les instruccions del producte comercial "GoTaq® Green Master Mix" (Promega) amb els encebadors típics per amplificar alguns vectors comercials, T3 (5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3') i T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') i un gel d'agarosa tenyit amb "SYBR Safe" i irradiat amb llum ultraviolada. Aquelles mescles de reacció que eren positives per PCR, és a dir, que en el gel veiem una banda d'aproximadament 650 pb, eren purificades a través del producte



comercial “*Exosap-IT clean-up*” (Amersham Biosciences) per tal de ser, posteriorment, seqüenciades bidireccionalment amb els mateixos oligonucleòtids utilitzats en la PCR de comprovació d’insert, el T3 i el T7, tot utilitzant la barreja comercial “*ABI PRISM® BigDye™ Terminators V 3.0*” i el seqüenciador 3100 ambdós productes de l’empresa Applied Biosystems. Les seqüències obtingudes, de 20 a 60 clons per pacients, van ser analitzades utilitzant el programa Sequencher 4.0 (GeneCodes). Les quasiespècies prèviament clonades i analitzades en un anterior estudi dut a terme en la nostra institució per la Dra. Franco i col·laboradors²³⁹, corresponents a les mostres 50 i 51 (de 96 i 97 clons respectivament) van ser també incloses en l’anàlisi. Tots els clons obtinguts per pacient, es van alinear a nivell d’aminoàcid per tal d’esbrinar quina era la seqüència dominant o majoritària dintre de les quasiespècies obtingudes. Per obtenir aquestes proteases dominants de cada pacient i totes aquelles proteases minoritàries diferents entre elles, es va extreure el plasmidi que contenia aquestes proteases d’interès, de les colònies de *E. Coli* positives, mitjançant el producte comercial “*QIAprep spin miniprep*” (QIAGEN), el qual ens permetia obtenir uns 50 µl d’entre 100 i 300 µg/ml del plasmidi pci NS3 (Figura 14 D) que recordem, contenia una part de la proteasa cofactora NS4A (21-34 aminoàcids d’aquesta), dues glicines i la NS3 proteasa (aminoàcids 2-181) en fase amb la proteïna plasmídica β-galactosidasa, eluït en el tampó TRIS-HCl (50µM, pH = 8.5) per poder ser emmagatzemat a -20°C pel seu posterior ús.

4.4- Anàlisi de la Variabilitat Genètica de la Proteasa NS3 del VHC

Els alineaments de les seqüències obtingudes es van dur a terme mitjançant el programa Clustal W integrat en el programa Bioedit, el qual ens va deixar discernir de l’eixam de seqüències, aquelles que eren predominants dintre de les quasiespècies de cada pacient (Figura 14 C). L’arbre filogenètic construït amb totes les seqüències obtingudes (1745 clons) es va fer a través del programa MEGA 5.0²⁴⁰ utilitzant el mètode Neighbor-Joining, i com a model evolutiu “*p-distance*.” Amb el mateix programa vàrem obtenir la robustesa de les branques de l’arbre filogenètic construït, mitjançant l’anàlisi de “*bootstrap*” a partir de 1000 rèpliques de l’arbre. Valors de “*bootstrap*” superiors al 70% conferien solidesa a la distribució de les seqüències en el arbre, i varen ser anotats en les branques de l’arbre filogenètic. Les distàncies genètiques tant a nivell de nucleòtid com a nivell d’aminoàcid, entre les seqüències de les quasiespècies de cada pacient obtingudes, es van calcular, també, utilitzant el programa MEGA 5.0, amb el model evolutiu “*p-distance*”. Les proporcions de substitucions sinònimes (dS)

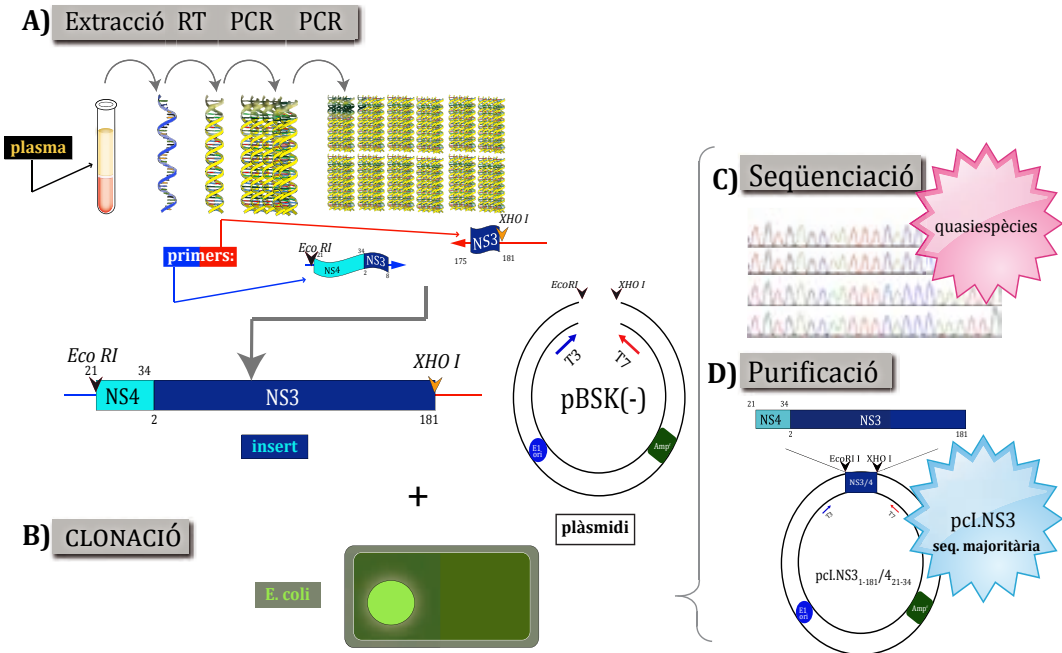


Figura 14. Esquema de l'obtenció de les seqüències de les quasiespècies dels pacients i del plasmidi pcl.NS3₂₋₁₈₁/4A₂₄₋₃₂ amb la proteasa majoritària de cada pacient. L'ARN viral provinent de plasma dels 56 pacients de la cohort d'estudi, va ser retrotranscrit i amplificat (A), per tal de poder clonar (B) i seqüenciar (C) les quasiespècies de la proteasa NS3 (més una part del cofactor NS4) de cada pacient. Un cop analitzades les seqüències de les quasiespècies obtingudes de la proteasa NS3, vàrem purificar aquells plasmidis que contenien les proteases majoritàries (D).

i les proporcions de les substitucions no sinònimes (dN), tant a nivell de nucleòtid com a nivell d'aminoàcid, que determinen la pressió selectiva dintre les quasiespècies, van ser calculades utilitzant el programa SNAP^{241,242}. Per l'estudi de la complexitat de les quasiespècies trobades, es va calcular els valors d'Heterogeneïtat i l'entropia de Shannon (ES) normalitzada (ambdós variables es van calcular tant a nivell d'aminoàcid com a nivell de nucleòtid). El % d'heterogeneïtat va ser calculat mitjançant el programa MEGA5.0 (amb valors que anaven del 0 al 100%) i pel cas de la ES es va fer seguint la següent fórmula: $ES = -\sum_i (p_i \ln p_i) / \ln N$; on p és la freqüència d'una variant determinada de la població viral i N és el total de seqüències d'aquesta població. Així l'entropia de Shannon varia de 0 a 1, on 0 indicaria mínima complexitat i 1 màxima complexitat. Per estimar pressions selectives específiques de codó es va usar el programa FEL ("fixed-effects likelihood method")²⁴³, amb el model HKY85 (model per defecte), el qual directament calcula els índex de substitucions sinònimes i no sinònimes per cada codó.



Les seqüències de la proteasa del VHC obtingudes i caracteritzades en aquest estudi van ser admeses i introduïdes en el banc internacional de seqüències GenBank, amb els números d'accés següents: HQ891983 fins a HQ893534.

4.5- Amplificació i Clonació dels Punts de Tall: CARDIF i NS5A/5B

4.5.1- Punt de Tall CARDIF

Vàrem construir el plasmidi pCl.Cardif-cro, el qual contenia el punt de processament de la proteasa del VHC NS3 anomenat CARDIF, amb la seqüència d'aminoàcids següent: EREVPC/HRPS (Figura 15). El punt de processament CARDIF va ser introduït utilitzant el plasmidi pCl.HCVNS4B/NS5A-cro com a motlle i un protocol de PCR d'extensió sobreposada ("overlap extension protocol", Figura 15), metodologia emprada prèviament en estudis anteriors realitzats per la Dra. Franco i col·laboradors²⁴⁴. Així dos fragments que contenien el punt de tall CARDIF van ser amplificats per separat (PCR 5' i PCR 3'), donant-nos el fragment 5' i el fragment 3' (Figura 15). Per l'amplificació del fragment 5' (Figura 15a), vàrem utilitzar l'encebador cI19 (5'-CCATTAACACAAGAGCAGCTT-3', que correspon a la posició 19 fins a la posició 39 de la proteïna repressora cI del bacteriòfag λ^{245}) juntament amb el encebador de sentit invers que contenia el punt de tall CARDIF i un punt de tall per l'enzim de restricció *Nsi I*, 4B5ACARDIFr (5'-TGACGGTTCGATGGCACGGTACTTCACGCTCCTCATTGCGCGCCTGAACATGAGA-3'). Pel fragment 3' (Figura 15b) es va fer servir com a encebador de sentit invers el cI697 (5'-TTCAGGCCACTGACTAGCGAT-3', seqüència que va des de la posició 679 fins a la 699 de la proteïna repressora cI del bacteriòfag λ^{245}) i com a encebador de sentit endavant el 4B5ACARDIFf i una diana per l'enzim de restricció *HINDIII* (5'-GAAGTACCGTGCCATCGACCGTCACTAAGGGATGTTTGGGCGCGCATGTTCTCACCT-3'). Per les dues PCR vàrem utilitzar el producte comercial GoTaq® DNA Polymerase (Promega), a un volum final de 50 μ l i amb els encebadors a una concentració final de 0.2 μ M. Els programes de temps i temperatures utilitzats en la màquina termocicladora varen ser: 95°C durant 2 minuts, 35 cicles de la combinació de tres temperatures i temps següents: 95°C durant 30 segons, 55°C durant 30 segons, a 72°C durant 45 segons i per acabar un temps d'extensió final de 7 minuts a 72°C. Finalment els fragments 5' i 3' van ser ajuntats (Figura 15 c), per realitzar una tercera PCR (PCR 5' + 3') amb els encebadors cI19 i cI697, sota les mateixes condicions esmentades anteriorment.

El producte d'aquesta PCR va ser digerit amb els enzims de restricció *Nsi I* i *HINDIII* (Roche) i lligat, utilitzant el mateix protocol de lligació que vàrem utilitzar per la



clonació de la proteasa NS3 amb el plasmidi pBSK(-), al plasmidi pCl.HCVNS4B/NS5A-cro, prèviament també digerit amb els mateixos enzims, produint el plasmidi pCl.Cardif-cro (Figura 15d), necessari per poder ser assajat l'eficiència de qualsevol proteasa NS3 del VHC en el sistema de criatge genètic basat en el bacteriòfag λ.

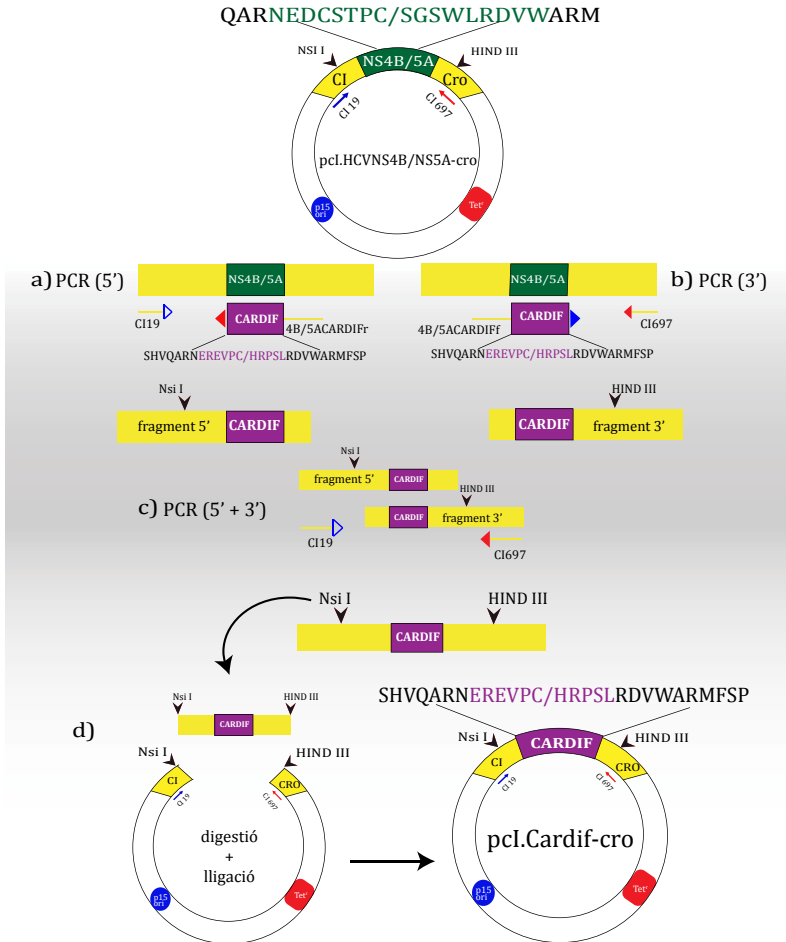


Figura 15. Esquema de l'obtenció del plasmidi pCl.Cardif-cro utilitzant el protocol de la PCR d'extensió sobreposada i el plasmidi pCl.NS4B/NS5A-cro com a motlle. A dalt de tot de la figura hem representat esquemàticament el plasmidi pCl.HCVNS4B/NS5A-cro, el punt de tall NS4B/5A (en verd) situat entre la proteïna repressora del bacteriòfag λ CI-Cro (en groc), l'origen p15 (en blau) i la resistència a tetraciclina (en vermell). a) Representació de la PCR 5', la qual utilitza com a motlle el plasmidi pCl.HCVNS4B/NS5A-cro i els oligonucleòtids CI19 i 4B/5ACARDIFr, i té com a producte final l'anomenat fragment 5'. b) Representació de la PCR 3', la qual utilitza com a motlle el plasmidi pCl.HCVNS4B/NS5A-cro i els oligonucleòtids 4B/5ACARDIFF i el CI697, i té com a producte final el fragment 3'. c) La PCR (5' + 3') té com a motlle els fragments 5' i 3' i com a oligonucleòtids els CI19 i CI697, per tal d'amplificar el punt de tall CARDIF amb les dianes de restricció Nsi I i Hind III. d) Digestió del punt de tall CARDIF i del plasmidi motlle per tal de poder realitzar la reacció de lligació, per formar finalment el plasmidi pCl.Cardif-cro, representat esquemàticament a la part inferior dreta de la figura.



4.5.2- Punt de Tall NS5A/5B

Per construir el plasmidi amb el punt de tall NS5A/5B, primer processament en trans que realitza la proteïna NS3 del VHC, vàrem escollir la seqüència d'aquest punt més representada en la base de dades de referència del VHC de genotip 1b, que consistia en 17 aminoàcids (ASEDEVVCC/SMSYTWGTGA). Per tal d'amplificar aquesta seqüència vàrem fer servir la parella d'oligonucleòtids, NS5A/5Bf (5'-TCTCATG TTCAGGCGCGCTAGTGAGGACGTCGTCTGCTGCTCAATGTCC-3') i NS5A5Br (5'-AGGT GAGAACATGCGCGCGCGCCTGTCCACGTATAGGACATTGAGCAGCAGAC-3'), el primer dels quals contenia els 8 aminoàcids primers del punt de tall de referència (zona en negreta de l'oligonucleòtid) i el segon els 12 últims (zona en negreta del oligonucleòtid), solapant-se en 3 aminoàcids del mig de la seqüència (VCC). Aquests encebadors també presentaven un punt de tall reconegut per l'enzim de restricció BssH2 (zona subratllada en els encebadors). Aquests encebadors es van utilitzar en una PCR utilitzant una mostra infectada pel VHC de genotip 1b com a motlle, produint un producte de 87 pb que va ser processat per l'enzim BssH2, purificat mitjançant el producte QIAquick purification de l'empresa QIAGEN, i lligat mitjançant el tampó 2Xligafast i la T4DNAligase, ambdós productes de Promega, al plasmidi pCl.Bss.cro, el qual també havia estat digerit prèviament pel mateix enzim, en una sola diana situada en el gen cI. Aquest plasmidi insertat en un bacteri E.coli produeix que la infecció per un bacteriòfag λ , entri en lisogènia, ja que expressa aquest gen cI, repressor del cicle lític del virus. Vàrem comprovar que insertant aquests 17 aminoàcids en mig de la proteïna repressora cI, continués exercint la seva repressió del cicle lític, i així va ser.

4.6- Assaig de l'Eficiència Catalítica de la Proteasa NS3/4A

Per avaluar l'eficiència catalítica de totes aquelles proteases majoritàries en la quasiespècie present en cada pacient, vàrem utilitzar un sistema ràpid i senzill basat en el circuit regulador de dues proteïnes cI i cro importants pel cicle de replicació del bacteriòfag λ^{246} (Figura 16). Quan aquest patògen infecta a una bactèria, com una E. coli, s'activa la proteïna repressora cI, i provoca que el virus entri en lisogènia, és a dir, fa que el genoma viral s'introdueix de manera latent en el genoma de la cèl·lula. Si aquesta proteïna repressora s'inactiva, per exemple sent processada per una proteasa, deixa que la proteïna cro actuï, i que el bacteriòfag λ entri en cicle lític produint clapes de lisi (cèl·lules mortes). Així doncs, vàrem realitzar 2 cotransformacions per cada proteasa NS3/4A majoritària dels 56 pacients (pHCVNS3₂₋₁₈₁/NS4₂₁₋₃₄), una amb el punt de

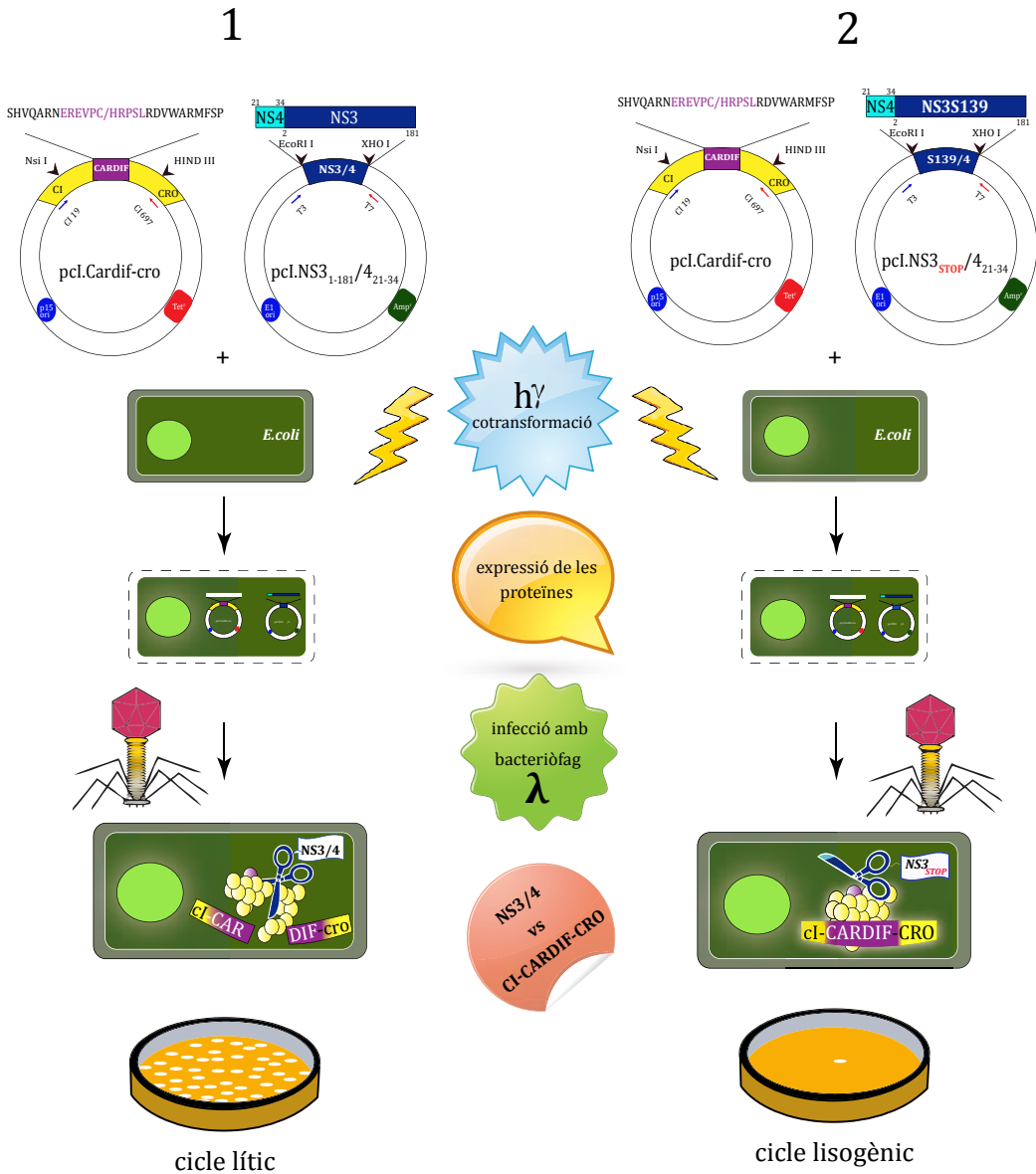


Figura 16. Esquema del protocol per obtenir les eficiències catalítiques de les diferents proteases NS3 del VHC majoritàries de cada pacient davant del punt de tall CARDIF, utilitzant el criatge genètic basat en el bacteriòfag λ . 1) la cotransformació dels plasmidis pCl.Cardif-cro i pCl.NS3₁₋₁₈₁/4₂₁₋₃₄ provoca la proteolització de la proteïna repressora CI, i per tant que la cèlula *E.coli* pugui ser infectada pel bacteriòfag λ . La quantitat de clapes de llisi serà proporcional a l'eficiència de la proteasa insertada en el plasmidi pCl.NS3₁₋₁₈₁/4₂₁₋₃₄ en processar el punt de tall inserat en la proteïna repressora (CARDIF). 2) la cotransformació dels plasmidis pCl.Cardif-cro i pCl.NS3_{stop}/4₂₁₋₃₄, provoca que la proteasa no pugui processar la proteïna repressora del bacteriòfag λ , ja que aquesta presenta la Ser del seu centre catalític mutada, i per tant, el virus entra en cicle lisogènic (control negatiu de l'experiment).



tall CARDIF insertat en la proteïna repressora cI (pCl.Cardif-cro) i l'altre amb el punt de tall NS5A/5B (pCl.NS5A/5B-cro) utilitzant les cèl·lules *E. coli* de la línia JM109. A partir d'una de les colònies producte de la cotransformació, feta créixer tota la nit a 30°C, en un medi LB en presència de dos antibiòtics, ampicil·lina i tetraciclina, es va realitzar un glicerolat (1ml de creixement cel·lular més 0.5 ml de glicerol al 60%), per tal de preservar la línia cel·lular amb els dos plasmidis insertats, a -80°C per futurs experiments. Un raspat de cada glicerolat va ser crescut en medi Liguria Bertani (LB), en presència dels antibiòtics ampicil·lina i tetraciclina, i el 0.2% de maltosa durant tota la nit a 30°C. L'endemà, el creixement cel·lular es va centrifugar, i el precipitat es va ressuspèndre en $MgSO_4$ 10 mM a 0.2 DO_{600 nm}. D'aquesta dissolució vàrem agafar 20 µl, i per tal d'activar l'expressió de la proteasa NS3 del VHC (pHCVNS3₂₋₁₈₁/NS4₂₁₋₃₄), vàrem incubar-los en 100 µl de LB que contenia 12.5 µg/ml de tetraciclina, 20 µg/ml d'ampicil·lina, 0.2% de maltosa, 10 mM de $MgSO_4$ i 0.1 mM d'IPTG durant 1h a 37°C. Passat aquest temps el cultiu cel·lular va ser infectat per 10⁵ ufc (unitats formadores de plaques de lisi). Després de 3 hores a 37°C, el cultiu infectat es va plaquejar conjuntament amb 200 µl de cèl·lules *E. coli* XL1Blue cells, ajustades prèviament a una densitat òptica de 0,2/ml a 600 nm de longitud d'ona i amb 10 mM de $MgSO_4$, en plaques de petri amb LB agar, utilitzant el medi top agar (LB més % agarosa) amb tetraciclina a 12 µg/ml, 0.2 % de maltosa i 0.1mM d'IPTG, per fixar les cèl·lules a la placa. Després d'incubar les plaques a 37°C durant 6 hores, les plaques de lisi resultants van ser comptades per tal d'avaluar el títol del bacteriòfag obtingut. D'aquesta manera el número de clapes de lisi produïdes era directament proporcional a l'eficiència catalítica de la proteasa NS3/4A introduïda en el sistema. En experiments on les cèl·lules *E. coli* que expressaven les proteases NS3/4A majoritàries d'aquest estudi, la replicació del bacteriòfag era 1.45 logaritmes (rang de -0.18 a 1.45) vegades més alta, que en cèl·lules que no expressaven cap plasmidi pHCVNS3₂₋₁₈₁/NS4₂₁₋₃₄ o que l'expressaven però amb una mutació en el centre catalític de la proteasa S139A, que provocava la seva inactivació (Figura 16-2).

4.7- Anàlisi de les Dades de l'Estudi 2

La diferència de les distàncies genètiques, les substitucions sinònimes (dS) i les no sinònimes (dN), la taxa dS/dN, el % d'heterogeneïtat i l'entropia de Shannon, les variables clíniques numèriques (edat, CV VHC, CV VIH-1, número de cèl·lules CD4+, entre d'altres) i les eficiències catalítiques de les proteases dominants entre els pacients amb RVS i els que no la van obtenir, es van analitzar mitjançant el test estadístic no para-



mètric de Mann-Whitney. Les diferències en variables clíniques de valors no escalars com el tipus de sexe, al·lels de risc pels polimorfismes rs8099917 i rs 12979860 i el genotip del VHC, entre aquests pacients diferenciats per la resposta obtinguda després del tractament seguit, es va analitzar mitjançant el test de Fisher. Ambdós tests es van dur a terme mitjançant el programa informàtic SPSS versió 17.0 (SPSSinc., Chicago, Illinois, USA)²³⁶. Les diferents regressions lineals d'aquest estudi es van dur a terme a través del programa GraphPad versió 4.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA)²⁴⁷.



RESULTATS



1- ESTUDI 1: GENOTIPATGE DELS POLIMORFISMES RS 8099917 I RS12979860

1.1- Característiques de la Població d'Estudi

La Taula 3 resumeix les característiques clíniques de la nostra població de 173 pacients coinfectats amb VHC i el VIH-1. Tots els pacients eren d'origen europeu, amb una mediana d'edat de 42 anys (Rang Interquartil, RI: 37-46) i el 70% eren de sexe masculí. La majoria (98%) estava prenent TARGA per contrarestar la infecció produïda pel VIH, presentaven càrrega viral del VIH indetectable (77%) amb una mediana de 50 (RI: 50-80) i la mediana del número de cèl·lules CD4+ per µl de sang era de 548 (RI: 406-730) cèl·lules per µl. El 78% de la població havia pres una medicació per superar la infecció produïda pel VHC basada en IFN alfa2a pegilat (pegasys®) més RBV i la resta de la població, el 22%, havia pres INF pegilat alfa2b (pegintron®) i RBV. El 38% presentava una càrrega viral de VHC basal < 600 000 UI/ ml i la distribució dels genotips del VHC era la següent : 54% VHC-1, 30% VHC-3 i 16% VHC-4. Gran part dels pacients tenien els nivells dels enzims característics de dany hepàtic, GOT (el 84% de la població) i GPT (el 91% de la població), alterats significativament, $P < 0.0001$, respecte els nivells normals (GOT: 5-32 mU/ml i GPT: 7-33 mU/ml) amb una mediana de 50 (RI: 36-75) mU/ml i 71 (RI: 46-114) mU/ml respectivament. El 67% dels pacients no tenien evidències d'un estat de fibrosi avançat. En el moment de començar el tractament contra el VHC, hi havia 2 pacients també infectats amb VHB, que van acabar resolent la infecció.

1.2- Característiques Clíniques de la Població i la seva Relació amb la Resposta a la Teràpia amb pegIFN α /RBV

Dels 173 pacients que van entrar en l'estudi, 85 (49%) van aconseguir la resposta viral sostinguda (RVS), i 87 (51%) no la van aconseguir, i els vàrem considerar no responedors (NR) (Taula 3). Ni l'edat, ni el sexe, ni la càrrega viral del VIH, ni el número de CD4+/µl, ni haver pres fàrmacs TARGA contra la infecció per VIH-1, amb o sense inhibidors de la proteasa del VIH-1, ni el tipus d'IFN pres (alfa-2a o alfa-2b), ni la dosi d'INF o la de RBV, ni el nivell d'enzims hepàtics, ni l'estat de fibrosi, ni la presència d'infecció per VHB van resultar ser variables clíniques influents en la resposta al tractament contra la infecció per VHC (Taula 3).



Taula 3. Característiques clíniques de tota la cohort de pacients coinfectats amb VHC i VIH-1, i els subgrups que vàrem establir, els pacients amb RVS i els que no la van obtenir NR.

Característiques clíniques

		Població	RVS	NR	P
Pacients [n(%)]		173 (100)	85 (49)	87 (51)	
Edat [md (RIQ)]		42 (37-46)	42(38-47)	41 (37-44)	0.054
Sexe [n (%)]	femení	52 (30)	28 (33)	24 (27)	0.507
	masculí	121 (70)	57 (67)	64 (72)	
CV VIH UI/mL [(md (RIQ)]		50 (50-80)	50 (50-80)	50 (50-80)	0.187
VIH indetectables [n (%)]		133 (77)	66 (78)	67 (77)	0.240
CD4⁺ núm. cèl./µL		548 (406-730)	553 (422-740)	546 (393-706)	0.387
TARGA [n (%)]		169 (98)	82 (97)	87 (99)	0,240
IP [n (%)]		116 (67)	56 (66)	60 (68)	0.870
T. INF [n (%)]	alfa-2a	134 (78)	66 (78)	68 (77)	1.000
	alfa-2b	39 (23)	19 (22)	20 (24)	
D. peg-INF µg/set. [md (RIQ)]		180	180	180	0.382
		(180-180)	(180-180)	(180-1200)	
D. RVB mg/dia [md(RIQ)]		1000	1000	1000	0.978
		(800-1200)	(800-1200)	(800-1200)	
CV VHC [n(%)]	≥ 600 000	104 (62*)	43 (52*)	61 (71*)	0.017
	(UI/ml) < 600 000	64 (38*)	39 (47*)	25 (29*)	
Genotip [n (%)]	1	93 (54*)	35 (41)	58 (67*)	<0.001
	3	51 (30*)	39 (46)	12 (14*)	
	4	28 (16*)	11 (13)	17 (20*)	
GOT [mU/mL md (RIQ)]		50 (36-75)	46 (33-76)	51 (40-73)	0.084
GPT [mU/mL md(RIQ)]		71 (46-114)	68 (43-111)	73 (51-115)	0.233
Estat de Fibrosi [n(%)]	0-2	71 (68*)	30 (77*)	41 (62*)	0.135
	3-4	34 (32*)	9 (23*)	25 (38*)	
VHB + [n (%)]		2 (1*)	2 (3*)	0 (0)	0.496

n = número de pacients; % =percentatge; md = mediana; RIQ = rang interquartil; CV VIH = càrrega viral del VIH-1; VIH indetectables = CV VIH<50 còpies/ml; TARGA = teràpia antiretroviral de gran activitat; IP = presa d’inhibidors de proteasa; T. INF = tipus d’Interferó; D. Peg-INF = dosi d’interferó pugilat; D. RVB = dosi de Ribavirina; CV VHC = càrrega viral VHC ; GOT = transaminasa glutamicooxalacètica; GPT = transaminasa glutamicopirúvica; Estat de fibrosi 0-2 = no fibrosi o moderada ; Estat de fibrosi 3-4 = fibrosi avançada o greu; * = el % s’ha calculat sobre els valors que desponíem.

En canvi, les variables clíniques del genotip i la càrrega viral basal del VHC, sí que es van trobar relacionats amb la resposta al tractament (P < 0.001 i P = 0.017, respectivament; Taula 3 en negra). Només el 29% dels pacients no responedors (NR)



presentaven la càrrega viral del VHC basal (CVVHC) < 600 000 UI/ml, en canvi 47% dels pacients que van aconseguir la RVS tenien la CV del VHC < 600 000 UI /ml. Entre els pacients que havien aconseguit la RVS, n’hi havien 39 d’infectats amb VHC de genotip 3 (46%), 35 infectats amb el VHC de genotip 1 (41%) i 11 infectats amb el VHC de genotip 4 (13%), en canvi entre els NR el número d’individus que presentaven infecció del VHC de genotip 3 baixava fins a 12 pacients sent el 16% d’aquest conjunt, i el genotip de VHC més prevalent va ser el genotip 1 amb un 67%, seguit pel genotip 4 amb un 23%. Aquestes diferències en la distribució dels genotips, van ser estadísticament significatives amb un valor de $P < 0.0001$ (Taula 3).

1.3- Prevalença del SNP rs8099917 en la Població

Vàrem genotipar tota la població, 173 pacients, pel polimorfisme rs8099917 i vàrem poder observar que la població d’estudi estava sota l’equilibri de Hardy-Weinberg ($P=0.15$) i la freqüència de l’al·lel T era del 80%. La prevalença dels diferents genotips en la població total va ser la següent : TT 66%, TG 28% i GG 6% (Taula 4).

Taula 4. Genotipatge del SNP rs8099917 de la cohort de pacients coinfectats amb el VHC i VIH-1.

rs8099917				
	N= 173	RVS	NR	P (RVS vs NR)
Al·lel				
T n (%)	277 (80)	149 (88)	189 (73)	0.04
G n (%)	69 (20)	21 (12)	48 (27)	
Genotip				
TT n (%)	114 (66)	68 (80)	46 (52)	< 0.001
TG n (%)	49 (28)	13 (15)	36 (41)	
GG n (%)	10 (6)	4 (5)	6 (7)	

n = número de pacients; % = percentatge; RVS = resposta viral sostinguda; NR = no responedors

Entre els portadors dels diferents genotips TT, TG, GG no hi havia diferències en termes d’edat, sexe, número de cèl·lules CD4⁺/μl de sang, càrrega viral de VIH, càrrega viral del VHC basal, estat de fibrosi, nivell d’enzims hepàtics o infecció pel VHB (Taula 5). En canvi, sí que vàrem poder trobar diferències entre els pacients portadors dels diferents genotips pel polimorfisme rs8099917 en la distribució del genotip del VHC amb el qual es trobaven infectats, i en la resposta al tractament amb peg-IFNα/RBV. Així doncs, el número de pacients infectats amb el VHC de genotip 3 era molt més elevat entre



els pacients de genotip TT (39 pacients), de manera significativa (P = 0.009), que entre els pacients que presentaven els altres genotips (TG = 9 pacients i GG = 3 pacients; Taula 5). Els pacients infectats amb el VHC de genotip 1 sumats amb els que ho estaven amb el genotip 4, eren els més nombrosos entre els tres possibles genotips TT, TG i GG.

Taula 5. Característiques clíniques dels pacients coinfectats amb VHC i VH-1 dividits pels diferents genotip del SNP rs8099917.

rs8099917		TT	TG	GG	P
C. clíniques					
Genotip VHC [n(%)]	1	59 (52)	31 (64)	2 (20)	0.009
	3	39 (35)	9 (19)	3 (30)	
	4	15 (13)	8 (17)	5 (50)	
Resposta [n (%)]	RVS	68 (60)	13 (27)	4 (40)	<0.001
	NR	46 (40)	36 (73)	6 (60)	
Sexe [n (%)]	home	74 (66)	40 (82)	7 (70)	0.102
	dona	40 (35)	9 (18)	3 (30)	
VHB [n (%)]	negatiu	91 (98*)	38 (100*)	10 (100*)	0.592
	positiu	2 (2*)	0(0)	0 (0)	
VHC CV UI/ml [n (%)]	≥ 600 000	73 (66*)	27 (57*)	4 (40*)	0.209
	< 600 000	38 (34*)	20 (43*)	6 (60*)	
Edat [mj (DS)]		41.4 (5.7)	42.4 (6.1)	42.9 (5.3)	0.516
GOT [mj (DS)]		64.2 (50.1)	64.0 (41.9)	46.67 (19.3)	0.544
GPT [mj (DS)]		94.7 (86.8)	97.9 (73.0)	59.11 (24.7)	0.412
CD4+ cèl./ml [mj (DS)]		5 86.7 (271.9)	617.9 (244.6)	655.5 (324.8)	0.630
VIH CV UI/ml [mj (DS)]		5 276(22 355)	1 579 (9 505)	1 939 (4 439)	0.495
Fibroscan [n(%)]	0-2	43 (66*)	22 (69*)	6 (75*)	0.869
	3-4	22 (34*)	10 (31*)	2 (25*)	

n= número de pacients; %= percentatge; mj= mitjana; DS= desviació estàndard; RVS= resposta viral sostinguda; NR= no responedor; VHB = virus de la hepatitis B; CV = càrrega viral GOT = transaminasa glutamicooxalacètica; GPT= transaminasa glutamicopirúvica; * = el % s'ha calculat sobre els valors que disponíem.

1.4- La Resposta a peg-IFN α /RBV i el Genotip de rs8099917

Els pacients que van arribar a una RVS eren majoritàriament portadors del genotip TT (80%), i aquesta proporció baixava substancialment (P <0.001), entre els pacients que no van aconseguir una resposta positiva a la teràpia, TT = 52% (Taula 4). En canvi la proporció de pacients portadors de genotip TG o GG era superior entre els no responedors (TG = 41% i GG = 7%) respecte aquells que van obtenir la RVS (TG=



15% i GG = 5%). En la Figura 17 podem observar gràficament com la RVS estava molt lligada a la presència del genotip TT i per tant els índex de RVS baixaven de manera significativa en la població, $P < 0.001$, quan apareixien en joc el genotip TG o GG (60%, 27% i 40% respectivament) .

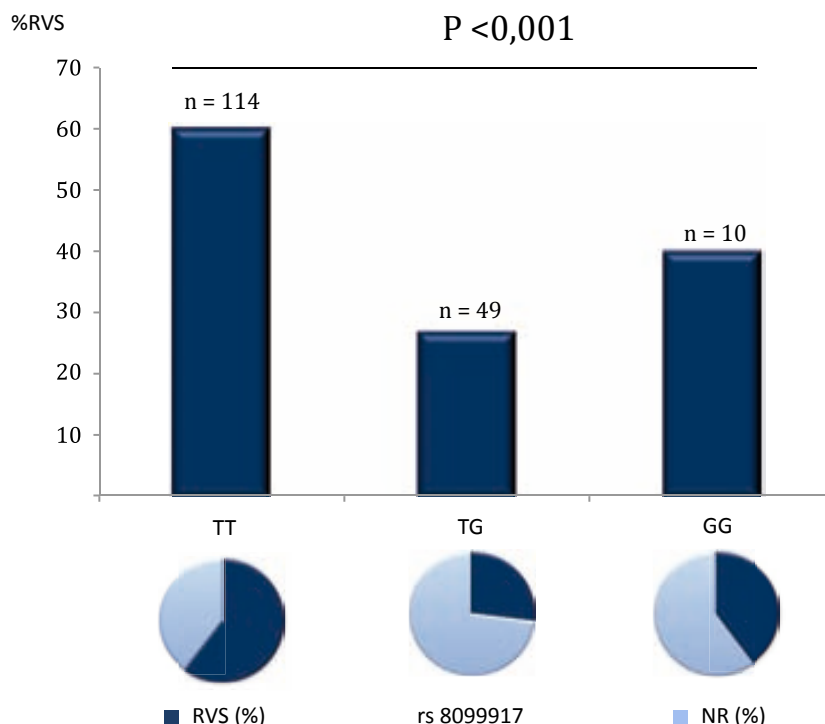


Figura 17. Percentatge de RVS de la població de 173 pacients coinfectats amb VHC-i VIH-1 en relació als diferents genotips del polimorfisme rs8099917. Els índex de RVS més elevats els presentaven aquells pacients portadors del genotip TT pel SNP rs 8099917, i baixaven substancialment entre els pacients portadors del genotip TG o GG pel mateix SNP.

El polimorfisme rs8099917 en la nostra població seguia un model d’herència dominant (TT vs TG-GG) ja que aquest, entre tots els models d’herència possibles testats, presentava el valor d’AIC més baix (AIC = 228.6, Taula 6), i segons aquest model vàrem analitzar els resultats subseqüents. Així doncs, presentar el genotip TG-GG donaria al pacient una oportunitat relativa (OR) de ser no responent de 3.65 (IC 95% = 1.75-7.13; $P = 0.0004$; Taula 6). Si expressem el mateix resultat però des del punt de vista contrari, és a dir en possibilitats d’obtenir una RVS (Probabilitat = $OR / (OR + 1)$), els pacients portadors del genotip TT pel polimorfisme rs8099917 tindrien una



probabilitat del 78% d'obtenir una RVS després d'haver seguit el tractament estàndard amb peg-IFN α /RBV.

Taula 6. Anàlisi del risc del polimorfisme rs8099917 en funció del model d'herència.

rs8099917						
Model	Genotip	RVS n(%)	NR n(%)	OR (95% IC)	P	AIC
Codominant	TT	68 (80)	46 (52)	1	4.0x10 ⁻⁰⁴	229.9
	TG	13 (15)	36 (41)	4.09 (1.96-8.55)		
	GG	4 (5)	6 (7)	2.22 (0.59-8.30)		
Dominant	TT	68 (80)	46 (52)	1	1.0x10 ⁻⁰⁴	228.6
	TG-GG	17 (20)	42 (48)	3.65 (1.86-7.18)		
Recessiu	TT-TG	81 (95)	82 (93)	1	0.55	243.4
	GG	4 (5)	6 (7)	1.48 (0.40-5.45)		
Sobredominant	TT-GG	72 (85)	52 (59)	1	1.0x10 ⁻⁰⁴	229.4
	TG	13 (15)	36 (41)	3.83 (1.85-7.94)		
Log-additiu	---	---	---	2.49 (1.42-4.36)	8.0x10 ⁻⁰⁴	232.5

n = número de pacients; % = percentatge; RVS = resposta viral sostinguda; NR = no responedors; OR= oportunitat relativa de no resoldre la infecció; AIC = criteri d'informació de Akaike.

Si dividíem als pacients segons el genotip del VHC amb el qual estaven infectats, podíem observar que en els tres grups de pacients possibles (infectats amb VHC-3, infectats amb VHC-1 o infectats amb VHC-4) sempre eren aquells portadors del genotip TT els que presentaven l'índex de RVS més elevat, respecte aquells que eren portadors dels genotips TG-GG (Figura 18). Aquesta diferència era però, només significativa en el grup de pacients infectats pel VHC de genotip 1 (51% vs 15%; P = 0.001), i no ho era en els casos d'aquells pacients infectats amb VHC de genotip 3 i de genotip 4 (TT = 77% vs TG-GG = 75%; P = 1,000; TT=53% vs TG-GG = 23 %; P = 0.137; respectivament).

1.5- Prevalença del SNP rs12979860 en la Població

També vàrem genotipar tota la població per un altre polimorfisme de la zona del cromosoma 19 humà que codifica per IL28B, anomenat rs12979860, i vàrem poder observar que la cohort es trobava sota l'equilibri de Hardy-Weinberg (P = 0.47) i que l'al·lel C era el més prevalent en la població d'estudi, amb una freqüència del

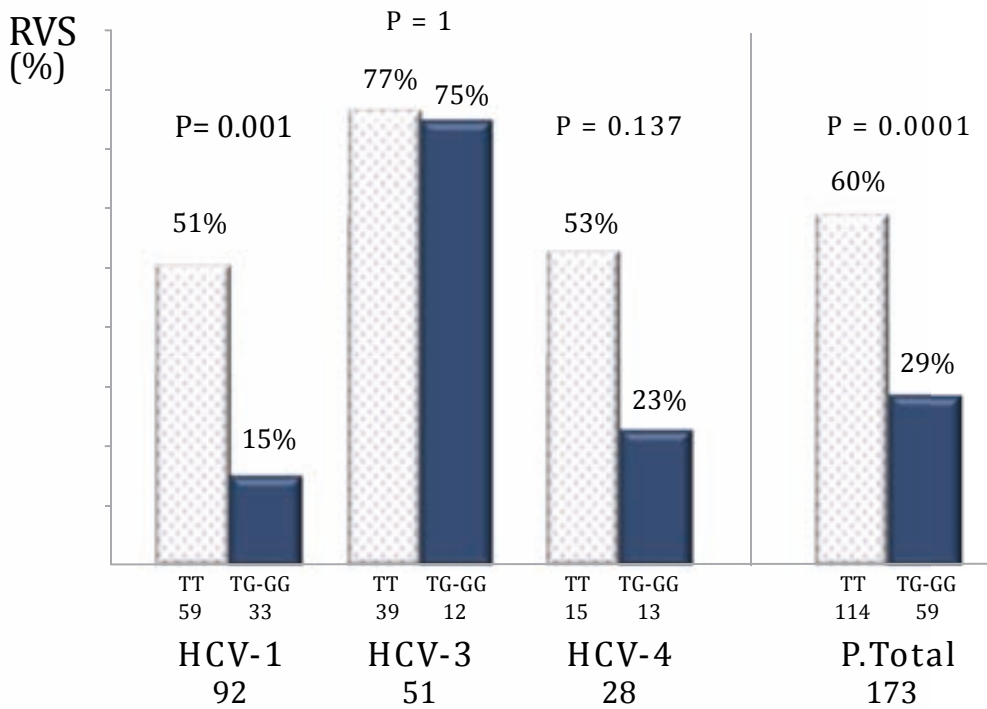


Figura 18. Índex de la RVS entre els pacients infectats pel VHC de diferents genotips segons el genotipatge del SNP rs8099917. Quan separàvem els pacients segons el genotip del VHC amb el qual estaven infectats, aquells que eren portadors del genotip TT tenien índex de resposta més elevats.

71%, respecte la freqüència de l'al·lel T que només era del 29%. La Taula 7 mostra la distribució d'aquest polimorfisme en la població total i segons la resposta al tractament pegIFN α /RBV. La freqüència al·lèlica C també era predominant entre els pacients amb RVS, de manera significativa en relació als NR (82% i 59% respectivament; $P < 0.001$). El genotip més prevalent en la població total va resultar ser el CC (51%), i també ho va ser entre els pacients amb RVS (69%), de manera significativa ($P < 0.001$) respecte els NR (CC = 33%). Els portadors dels diferents genotips per aquest polimorfisme eren comparables en edat, sexe, nivells d'enzims hepàtics, càrrega viral del VHC en sang, estat de fibrosi, número de cèl·lules CD4+/ μ l de sang, càrrega viral del VIH i infecció per VHB (Taula 8). Només podíem diferenciar els pacients portadors dels diferents genotips del polimorfisme rs12979860 en termes de genotip del VHC en que estaven infectats ($P = 0.017$) i en capacitat de resposta al tractament amb peg-IFN α /RBV ($P < 0.001$; Taula 8). Existia un número més elevat de pacients infectats amb el VHC de genotip 3 entre els

RESULTATS



Taula 7. Percentatge dels diferents genotips del SNP rs 12979860 de la cohort de pacients coinfectats amb el VHC i VIH-1.

rs 12979860				
	N= 173	RVS	NR	P (RVS vs NR)
Al·lel				
C n (%)	244 (71)	140 (82)	105 (59)	< 0.001
T n (%)	102 (29)	30 (18)	72 (41)	
Genotip				
CC n (%)	88 (51)	59 (69)	29 (33)	< 0.001
CT n (%)	68 (40)	22 (26)	46 (52)	
TT n (%)	17 (10)	4 (5)	13 (15)	

n = número de pacients; % = percentatge; RVS = resposta viral sostinguda; NR = no respondors

Taula 8. Característiques clíniques dels pacients coinfectats amb VHC i VIH-1 segons els diferents genotips del SNP rs 12979860.

rs 12979860					
C clíniques		CC	CT	TT	P
genotip VHC [n (%)]	1	45 (52)	41 (60)	6 (37,5)	0.017
	3	33 (38)	14 (21)	4 (25)	
	4	9 (10)	13 (19)	6 (37,5)	
Resposta [n(%)]	RVS	59 (67)	22 (32)	4 (23)	< 0.001
	NR	29 (33)	46 (68)	13 (77)	
Sexe [n (%)]	home	57 (65)	53 (78)	11 (65)	0.182
	dona	31 (35)	15 (22)	6 (35)	
VHB [n (%)]	negatiu	71 (100)	55 (96)	13 (100)	0.224
	positiu	0 (0)	2 (4)	0 (0)	
VHC CV UI/ml [n (%)]	≥600.000	30 (35)	25 (38)	9 (56)	0.271
	<600 000	55 (65)	41 (62)	7 (44)	
Edat [mj (DS)]		41.8 (5.7)	41,7 (5.7)	42.1 (7.0)	0.697
GOT [mj (DS)]		66.2 (50.8)	61.4 (44.5)	56.9 (30.8)	0.686
GPT [mj (DS)]		99.91 (95.5)	91,3 (67.3)	70.5 (31.7)	0.393
CD4+ cèl./ml [mj (DS)]		573.1 (266.2)	637.8 (257.7)	582.8 (302.0)	0.960
VIH CV UI/ml [mj (DS)]		5 094.2	3 385.4	1 127.6	0.316
		(20 804.2)	(18 625.7)	(3 436.7)	
Fibroscan n(%)	0-2	30 (65)	30 (65)	11 (85)	0.017
	3-4	16 (35)	16 (35)	2 (15)	

n = número de pacients; mj = mitjana; DS = desviació estàndard; RVS = resposta viral sostinguda; NR = no respondedor; VHB = virus de la hepatitis B; CV = càrrega viral; GOT = transaminasa glutamicooxalacètica; GPT = transaminasa glutamicopirúvica; * = el % s'ha calculat sobre els valors que disponíem.



portadors de genotip CC (33, 38%) que entre els portadors de genotip CT (14, 21%) o TT (4, 25%) (Taula 8). Els pacients separats pels diferents polimorfismes possibles segons el rs 12979860 estaven majoritàriament infectats amb VHC de genotip 1 i 4 (Taula 8).

1.6- La Resposta a peg-IFN/RBV i el Genotip rs 12979860

En la Figura 19 podem observar clarament com d'influent va ser en la nostra població d'estudi, ser portador del genotip CC, alhora d'aconseguir la RVS, ja que el 67% dels portadors CC van aconseguir una resposta positiva, en canvi entre els pacients portadors del genotip TG o GG només ho van aconseguir el 32% i el 23 % respectivament.

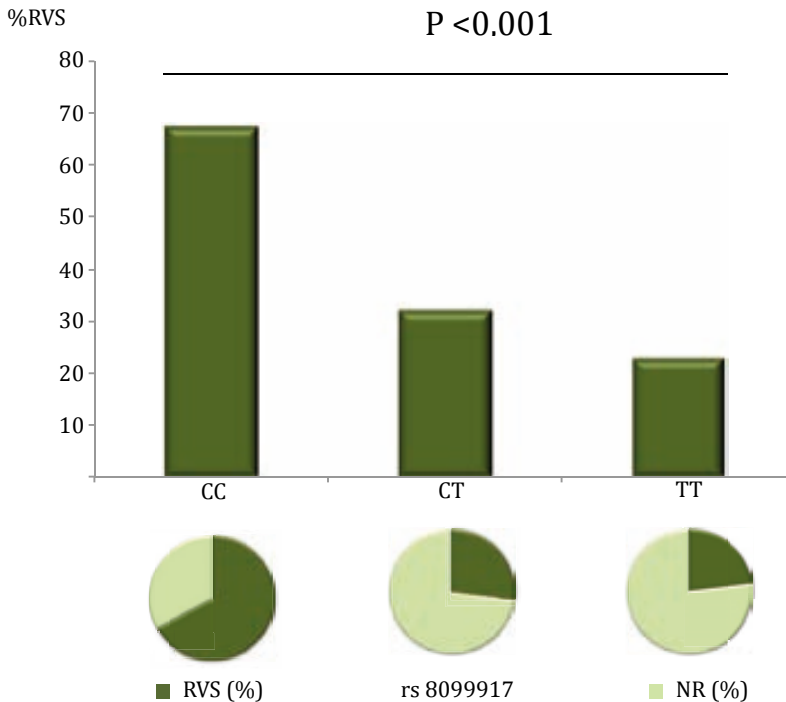


Figura 19. Percentatge de RVS en relació als diferents genotips del polimorfisme rs12979860.

Utilitzant el programa SNPstats, Vàrem determinar que el polimorfisme rs 12979860 en la nostra població, seguia un model d'herència dominant, ja que



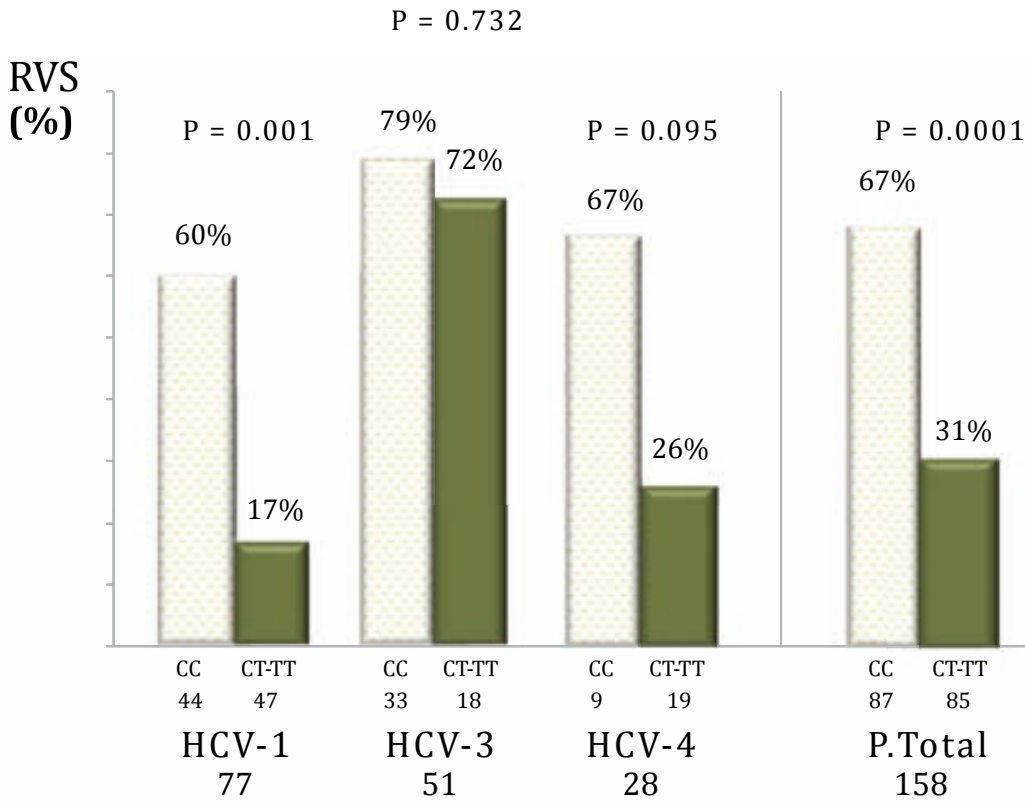
presentava el valor de AIC menor. Així doncs, en els següents anàlisis els vàrem fer tractant el polimorfisme de la forma CC vs CT-TT. D'aquesta manera el genotip CT-TT presentaria pel pacient una OR del 4.62 (IC 95% = 2.43-8.76; P = < 0.0001) d'esdevenir no responedor després de seguir el tractament estàndard basat amb peg-IFN/RBV. Dit d'una altra manera, ser portador del genotip CC pel polimorfisme rs 12979860, donaria al pacient una probabilitat del 82% d'aconseguir una resposta positiva al tractament estàndard contra el VHC (Taula 9).

Taula 9. Anàlisi del risc del polimorfisme rs 12979860 en funció del model d'herència.

rs 12979860						
Model	Genotip	RVS n(%)	NR n(%)	OR (95% CI)	p	AIC
Codominant	C/C	59 (69)	29 (33)	1	<0.0001	221.7
	C/T	22 (26)	46 (52)	4.25 (2.17-8.36)		
	G/T	4 (5)	13 (14)	6.61 (1.98-22.08)		
Dominant	C/C	59 (69)	29 (33)	1	<0.0001	220.2
	C/T-T/T	26 (31)	59 (67)	4.62 (2.43-8.76)		
Recessiu	C/C-C/T	81 (95)	75 (85)	1	0.023	238.6
	T/T	4 (5)	13 (15)	3.51 (1.10-11.24)		
Sobredominant	C/C-T/T	63 (74)	42 (48)	1	3.00x10 ⁻⁰⁴	230.9
	C/T	22 (26)	46 (52)	3.14 (1.65-5.95)		
Log-additiu	---	---	---	3.27 (1.93-5.55)	<0.0001	221.2

RVS = resposta viral sostinguda; NR = no responedors; OR= oportunitat relativa de risc a no resoldre la infecció; AIC = criteri d'informació de Akaike.

Si diferenciàvem els pacients pels diferents genotips del VHC amb els quals estaven infectats, aquells que eren portadors del genotip CC presentaven més alt índex de RVS aconseguida, respecte els que tenien un genotip TG-GG per tots els genotips de VHC possibles (Figura 20). Aquesta diferència era significativa entre els pacients infectats pel VHC de genotip 1 (65% vs 22%; P < 0.0001), i propera a la significació entre els pacients infectats pel VHC genotip 4 (67% vs 26%; P = 0.095) i, en canvi, menyspreable estadísticament pels pacients infectats pel VHC de genotip 3 (79% vs 72%; P = 0.732 ; Figura 20).



RESULTATS

Figura 20. Índex de la RVS entre els pacients infectats pel VHC de diferents genotips del VHC segons el genotipatge del SNP rs 12979860. Quan separàvem els pacients segons el genotip del VHC amb el qual estaven infectats, aquells que eren portadors del genotip CC tenien índex de RVS més elevat que aquells que eren portadors del genotip.

1.7- Anàlisi de l'Haplotip rs8099917 + rs12979860

En la Taula 10 podem observar les freqüències dels diferents haplotips formats pels dos SNPs estudiats presents en la nostra població, essent l'haplotip format pels al·lels T i C, el més freqüent en la població total (0.68) i en el grup de pacients amb RVS respecte els NR (0.78 i 0.58 respectivament). L'associació de l'haplotip amb la resposta era significativa en la nostra cohort, $P < 0,0001$. Presentar l'haplotip G+G (rs8099917+ rs12979860), generava una OR de no resoldre la infecció del 5.13 (IC = 2.45-10.73; $P < 0.0001$), i ser portador de l'haplotip T+G (rs8099917 + rs12979860) donava una OR associada a la no resposta del 2.03 (IC = 1,05-4.02; $P = 0.045$). Així doncs ser portador de l'haplotip



G+G (rs8099917 + rs12979860) o de l'haplotip T+G (rs8099917 + rs12979860) representava una probabilitat de no respondre al tractament amb peg-IFN/RBV contra la infecció pel VHC del 84% i del 67% respectivament (Taula10).

Taula 10. Estimació de les freqüències al·lèliques de l'haplotip format pels SNPs: rs8099917 i el rs12979860 i la seva relació amb la resposta al tractament peg-IFN α /RBV.

Haplotip: rs8099917 + rs12979860						
rs8099917	rs12979860	P. Total	RVS	NR	OR (95% IC)	p
T	C	0.68	0.78	0.58	1	---
G	G	0.17	0.08	0.26	5.13 (2.45 - 10.73)	<0.0001
T	G	0.12	0.10	0.15	2.03 (1.02 - 4.02)	0.045
G	C	0.03	0.04	0.01	0.35 (0.06 - 1.87)	0.22

associació global del haplotip amb la resposta P<0.0001

Ptotal = població total; RVS = resposta viral sostinguda; NR = no responedors; OR = oportunitat relativa de risc a no resoldre la infecció per VHC; IC = interval de confiança.

1.8- Anàlisi Univariat

A partir dels anteriors sabíem que hi havia certs factors virals o factors de l'hoste que podien influir en la resposta al tractament amb peg-IFN α /RBV, com ara, estar infectat amb determinat genotip del VHC, presentar una càrrega viral basal del VHC elevada o presentar determinats genotips pels polimorfismes rs8099917 i el rs12979860. Així doncs vàrem realitzar anàlisis univariats per tal de calcular la oportunitat relativa associada a la resposta i esbrinar així el grau d'implicació en la RVS d'aquestes variables en la nostra població de 173 pacients coinfectats amb VHC i VIH (Figura 21). De les característiques mencionades anteriorment, estar infectat amb el VHC de genotip 3 va obtenir la OR major de 5.29 (RC=2.52-11.11; P <0.001), ser portador del genotip CC pel SNP rs 12979860 va obtenir una OR lligada a resposta de 4.62 (2.43-8.76; P <0.001), ser portador del genotip TT pel SNP rs8099917 una OR de 3.65 (1.86-7.18; P <0.001) i tenir la càrrega viral del VHC en sang a < 600 000 UI/ml (2.21; 1.09-4.10; P = 0.032). D'aquesta manera estar infectat amb el VHC de genotip 3 donaria una probabilitat al pacient d'obtenir una RVS del 84%, presentar el genotip CC pel SNP rs12979860 li donaria una probabilitat del 82%, el genotip TT pel SNP rs8099917 del 78% i presentar la càrrega viral del VHC basal < 600 000 UI/ml una probabilitat del 68%.

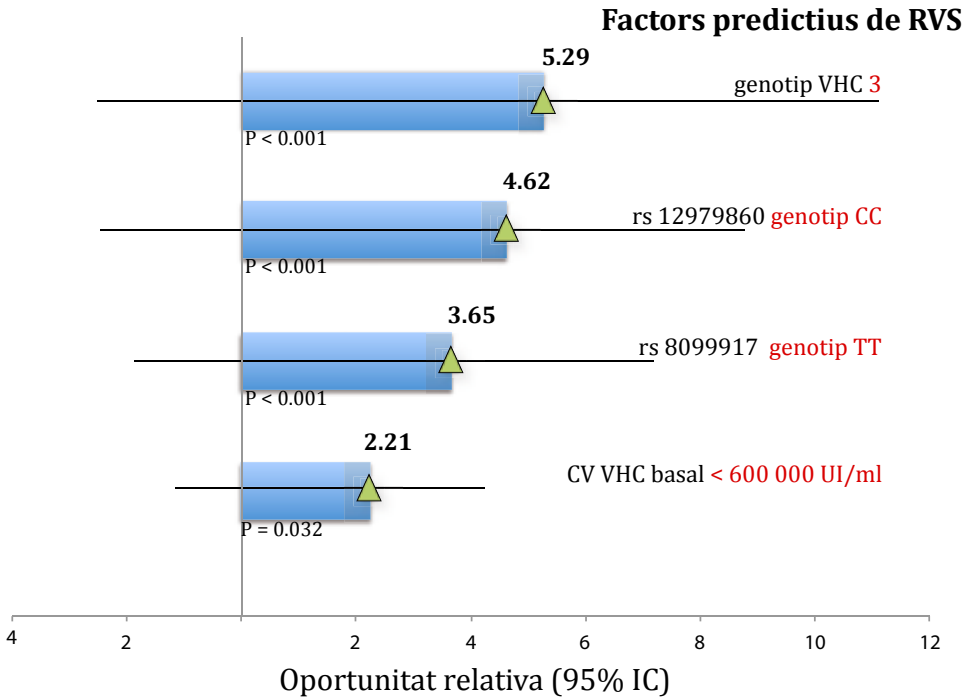


Figura 21. Factors predictius d’obtenir una resposta viral sostinguda després de seguir el tractament amb peg-IFN α /RBV en pacients coinfectats amb VHC i VIH-1.

1.9- Anàlisi Multinomial

Vàrem realitzar un anàlisi de regressió logística multinomial, per tal de calcular les oportunitats relatives d’obtenir una RVS per cada una de les variables associades a la resposta trobades anteriorment (factors predictius), per tal d’obtenir el seu efecte sobre la resposta de manera separada, és a dir independentment de l’existència d’una o de l’altre. Totes les variables presentaven menors OR relacionades amb la RVS, quan s’analtzaven de manera independent, en relació l’anàlisi univariat, menys la variable de la càrrega viral basal del VHC < 600 000 UI/ml, que va mantenir el resultat de la seva OR i inclús més elevada (de 2.21 a 2.66). L’orde de les variables segons la influència que tenien en la resposta al tractament estàndard donada pel número de OR va resultar ser diferent, ja que presentar el genotip TT pel SNP rs 8099917, va obtenir una OR més baixa que presentar la CV del VHC basal < de 600 000 UI/ml, de 1.92 (IC: 1.35 - 5.06) respecte 2.66 (IC: 1.84 - 9.42) i per tant es va situar per darrera d’aquesta variable en



influència i a més va perdre significació estadística, presentant una $P = 0.185$. Trobar-se infectat amb el del VHC de genotip 3 va continuar tenint el màxim valor de OR associat a RVS de totes les variables estudiades, i amb el valor de P amb més significació (4.16 IC : 1.25-5.67; $P = 0.0006$). Presentar el genotip CC pel SNP rs 12979860 va obtenir en aquest anàlisi una OR de 3.27 (IC : 1.35 - 7.94; $P = 0.0087$; Taula11).

Taula 11. Factors predictius de resposta en la població de coinfectats amb VHC i VIH-1 i el càlcul de les oportunitats relatives d'obtenir la RVS després de seguir el tractament amb peg-IFN/RBV a partir de l'anàlisi de regressió multinomial.

Factors Predictius de RVS	OR	IC	P
genotip VHC 3	4.16	1.25 - 5.67	0.0006
genotip rs 12979860 CC	3.27	0.73 - 5.06	0.0087
CV VHC < 600 000 UI/ml	2.66	1.84 - 9.42	0.0110
genotip rs8099917 TT	1.92	1.35 - 7.94	0.1850

Quan la regressió logística lineal es va fer només sobre aquells pacients infectats amb el VHC de genotip 1, vàrem obtenir els valors de OR (IC 95%, P) pels factors predictius analitzats següents: 75 pel genotip rs1212979860 CC (286 - 1969; $P < 0.0001$), 6.0 pel genotip rs8099917 genotip TT (2.04 - 17.63; $P = 0.001$), 2.5 per la CV VHC < 600 000 UI/ml (0.944 - 6.64; $P = 0.79$).

Si estratificàvem tots els pacients de la cohort en funció del número de factors predictius que presentaven (genotip VHC-3, genotip rs12979860 CC, genotip rs8099917 CC i/o CV basal VHC <600 000 UI/ml), l'índex de RVS augmentava a mesura que s'acumulaven factors positius de resposta (Figura 22). Entre els pacients que presentaven menys de 2 factors predictius de resposta tenien un índex de RVS d'entre 15%-23%, i en canvi aquells que acumulaven el màxim de factors positius, l'índex de RVS es disparava fins al 82% ($P < 0.0001$) (Figura 22). Si ens fixàvem només en els pacients que es trobaven infectats amb el VHC de genotip 1 ó 4, també podíem observar el mateix comportament entre els factors predictius i l'índex de RVS, passant del 15-19% de RVS entre pacients que presentaven menys de 2 factors predictius de resposta, al 82% de RVS entre pacients que presentaven 3 factors predictius ($P < 0.0001$). Aquesta relació



entre la suma dels factors predictius i l'índex de RVS no es va complir entre els pacients infectats amb el VHC de genotip 3 ($P = 0.625$)

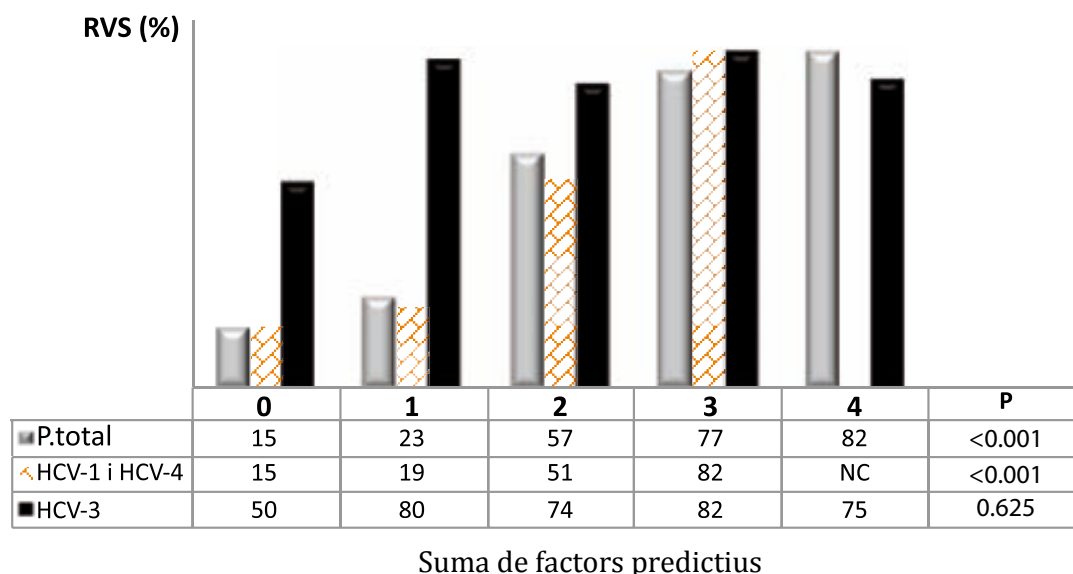


Figura 22. Índex de RVS segons el número de factors predictius acumulats (càrrega viral basal del VHC <600.000 UI/ml, genotip 3 del VHC, rs12979860 CC i rs8099917). Tant en la població total com en la comunitat de pacients infectats amb el VHC del tipus 1 ò 4, a mesura que els pacients presenten més número de factors predictius augmenta també, el coeficient de RVS. Aquest fenomen no s'observa entre els pacients infectats amb el VHC de genotip 3.



2- ESTUDI 2: VARIABILITAT GENÈTICA I EFICIÈNCIA CATALÍTICA

2.1- Població d'Estudi

Per aquest treball vàrem estudiar la mostra basal de 56 pacients, de la cohort de pacients coinfectats amb el VHC i el VIH-1 abans esmentada, infectats amb el VHC de genotip 1 i que en el moment d'iniciar aquest estudi, sabíem el resultat de la teràpia que havien seguit amb peg-IFN/RBV. Les característiques clíniques (Taula 12) van ser, per tant, molt semblants a les de la població total comentada en el estudi1. La majoria dels pacients, 98%, es trobaven sota teràpia TARGA, per tal de combatre la infecció pel VIH, i per tant, molts (80%), tenien la càrrega viral d'aquest virus en sang en nivells indetectables i un número òptim de cèl·lules CD4+/ μ l de sang (mediana = 482; RIQ = 380-675). Com ja hem esmentat anteriorment totes les mostres es trobaven infectades amb el VHC de genotip 1, però amb diferents subtipus (68% 1a i 18% 1b) i tenien una mediana de la càrrega viral del virus en sang de 1 232 631 UI/ml (RIQ = 584 849 - 3 717 500). A causa d'aquesta infecció hepàtica, la majoria (89%) tenien els enzims característics de dany hepàtic, GOT i GPT, en nivells superiors als rangs de normalitat >32 i >33 U/ml, respectivament. L'estat de fibrosi del 31% de la població (disposàvem dels anàlisis de Fibroscan de 35 pacients) era de 3-4, és a dir greu o avançada. Només un pacient es trobava infectat amb el VHB. Després de rebre el tractament durant un any amb peg-IFN/RBV, 19 (34%) pacients van obtenir la RVS. Si dividíem els pacients entre aquells que van respondre a la teràpia (RVS) i els que no (NR), podíem observar diferències significatives ($P = 0.011$) a nivell de la càrrega viral del VHC en sang, on els pacients amb RVS, presentaven valors més baixos que no els pacients NR (5.79 vs 6.28, respectivament; $P = 0.011$). També podíem copsar diferències en la distribució dels al·lels de risc pel polimorfisme rs8099917 (TG o GG) i pel rs12979860 (CT o TT) $P = 0.01$ i $P < 0.001$ respectivament, ja que dins del grup dels NR hi havia un major número de portadors d'aquests al·lels que en el grup amb RVS (Taula 12). En canvi no vàrem trobar diferències significatives entre aquests dos grups a nivell d'edat, sexe, càrrega viral del VIH-1, número de cèl·lules CD4+/ μ l, tractament contra el VIH-1.



Taula 12. Característiques clíniques de la cohort de 56 pacients coinfectats amb VHC i VIH-1, i els subgrups que vàrem establir com a pacients amb RVS i els que no la van obtenir NR.

Característiques clíniques

		Població	RVS	NR	P
Pacients [n(%)]		56 (100)	19 (34)	37 (66)	
Edat [md (RIQ)]		40 (37-43)	41(38-44)	40 (36-43)	0.368
Sexe [n (%)]	femení	13 (23)	5 (26)	8 (22)	0.745
	masculí	43 (74)	14 (74)	29 (78)	
Al·lel de risc (TG o GG) rs8099917 [n (%)]		15 (27)	2 (11)	13 (36)	0.01
Al·lel de risc (CT o TT) rs12979860 [n (%)]		26 (47)	2 (11)	24 (67)	<0.001
CV VIH UI/mL [md (RIQ)]		45 (50-80)	50 (50-80)	50 (50-80)	0.651
VIH indet. [n (%)]		45 (80)	15 (79)	30 (81)	1.000
CD4+ núm. cèl./mL		482 (380-675)	476 (442-667)	487 (379-681)	0.742
TARGA [n (%)]		55 (98)	18 (94)	37 (100)	0.339
IP [n (%)]		36 (64)	12 (63)	24 (64)	1.000
T. Peg-INF [n (%)]	alfa-2a	44 (79)	16 (84)	28 (76)	0.732
	alfa-2b	12 (21)	3 (16)	9 (24)	
D. INF µg/set. [md (RIQ)]		180 (180-180)	180 (180-180)	180 (180-1200)	0.664
D. RVB mg/dia [md (RIQ)]		1000 (800-1000)	1000 (850-1150)	1000 (800-1000)	0.327
Log₁₀ CV VHC UI/ml [md (RIQ)]		6.1 (5.8-6.8)	5.8 (5.3-6.3)	6.3 (6.0-6.6)	0.011
Genotip [n (%)]	1a	38 (68)	13 (68)	25 (68)	1.000
	1b	18 (32)	6 (32)	12 (32)	
GOT [mU/mL md (RIQ)]		46 (38-63)	42 (37-64)	49 (38-58)	0.451
GPT [mU/mL md (RIQ)]		63 (43-104)	59 (37-103)	64 (45-103)	0.703
Estat de Fibrosi [n(%)]	0-2	24 (69*)	7 (88*)	17 (63*)	0.388
	3-4	11 (31*)	1 (13*)	10 (37*)	
VHB positiu [n (%)]		1 (2*)	1 (6*)	0 (0)	0.339

n = número de pacients; % =percentatge; md = mediana; RIQ = rang interquartil; CV VIH = càrrega viral del VIH-1; VIH indetectables = CV VIH<50 còpies/ml;VIH indet.= VIH indetectables TARGA = teràpia antiretroviral de gran activitat; IP = presa d'inhibidors de proteasa; T. INF = tipus d'Interferó; D. Peg-INF = dosi d'interferó pugilat; D. RVB = dosi de Ribavirina; CV VHC = càrrega viral VHC ; GOT = transaminasa glutamicooxalacètica; GPT = transaminasa glutamicopirúvica; Estat de fibrosi 0-2 = no fibrosi o moderada ; Estat de fibrosi 3-4 = fibrosi avançada o greu; * = el % s'ha calculat sobre els valors que desponíem.



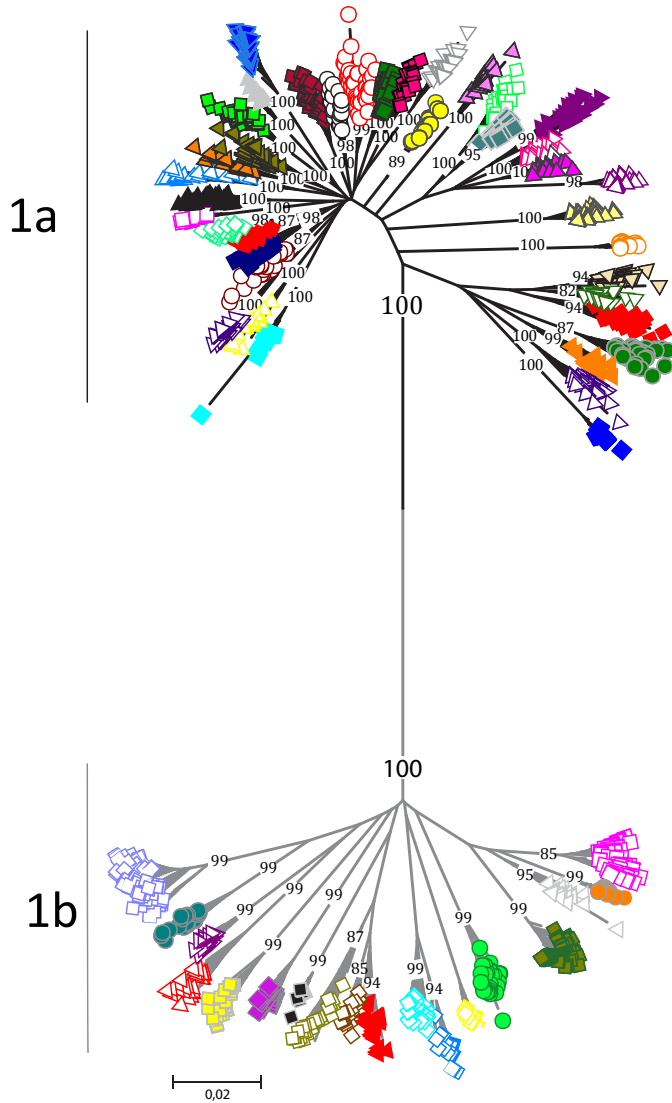
2.2- Variabilitat Genètica

2.2.1- Diversitat Genètica de les Quasiespècies de la Proteasa NS3/4A del VHC

Un total de 1745 clons (una mitjana de 31 clons per pacients) van ser aïllats, seqüenciats i analitzats. A partir de totes les variants de la proteasa NS3 obtingudes, vàrem poder construir un arbre filogenètic a nivell de nucleòtid, per tal d'analitzar les relacions evolutives entre elles (Figura 23). Aquelles proteases provinents del mateix pacient (quasiespècies de NS3) produïen un grup monofilètic robust, recolzat per un alt número de "bootstrap". De la mateixa manera els pacients infectats amb diferents subtipus (1a o 1b) també es separaven en dos grups robusts com indiquen els elevats número de bootstrap obtinguts situats en les branques de l'arbre. La mitjana dels clons aïllats per pacient amb RVS no era diferent de la obtinguda a partir dels pacients que no van aconseguir la RVS (32 i 31 respectivament $P = 0.8849$). Vàrem calcular la diversitat genètica de la proteases existents en cada pacient, a partir de les distàncies genètiques, seguint el model "*p-distance*". Així les distàncies genètiques de les quasiespècies existents en cada pacient que van aconseguir la RVS van ser inferiors a les distàncies genètiques de les variants trobades entre els pacients no responedors (0.0108 i 0.0127, respectivament; Taula 13). No obstant, aquesta diferència no va ser significativa ($P = 0.2579$). Tant entre els pacients amb RVS com entre els NR es va trobar un ampli rang de distàncies genètiques entre les seves quasiespècies (de 0.0027 a 0.0247 i de 0.0034 a 0.0243, respectivament), suggerint que diferents forces selectives havien actuat en els diferents individus. Analitzant les càrregues virals dels 56 pacients en contra posició a la distància genètica que presentaven les quasiespècies que infectaven a aquests pacients, vàrem poder observar una relació positiva entre aquestes variables ($P = 0.0205$; $y = 37.14x + 5.64$; $R^2 = 0.0955$, Figura 24). No es van trobar diferències significatives entre les distàncies genètiques, a nivell d'aminoàcid, de les quasiespècies dels pacients que van aconseguir RVS i els que no la van aconseguir (0.0073 i 0.0072; $P = 0.9122$; Taula13). Entre aquells pacients que presentaven els al·lèls de risc pel polimorfisme rs129979860 (CT o TT) o pel polimorfisme rs8099917 (TG o GG), respecte els que presentaven l'al·lel protector CC o TT respectivament, presentaven una menor distància genètica entre les seves quasiespècies, a nivell d'aminoàcid (CT-TT = 00060 vs CC = 001188, $P = 0.0084$; TG-GG = 0052 vs TT = 0081; $P = 0.0005$). Aquesta diferència també s'apreciava a nivell de nucleòtid pel SNP rs12979860, però no va resultar significativa (CT-TT = 0.0136 vs



TT =0.0150 ; P = 0.5172) i era menyspreable en el SNP rs8099917 (TG-GG = 0.0120 vs GG = 0.0121; P = 0.939).



1cm = 0,02 substitucions per nucleòtid i per lloc.

Figura 23. Arbre filogenètic més els números de bootstrap (en les branques) construït amb totes les quasiespècies de la NS3 proteasa aïllades i seqüenciades a partir de 56 pacients coinfectats amb el VHC i el VIH-1 mitjançant el programa Mega 5.0 i el model "*p-distance*". Les NS3 proteases es reparteixen en dos grans grups separats pels diferents subtipus virals (1a o 1b) al qual formen part. Cada pacient, simbolitzat per una forma geomètrica i un color, formen un grup monofilètic molt robust com indiquen els alts valors de bootstrap (en tant per cent).



Taula 13. Paràmetres de diversitat genètica de les quasiespècies de la proteasa NS3 del VHC.

Paràmetres diversitat genètica			
	RVS	NR	P
Distància			
Nucleòtids	0.0108 ± 0.0016 (0.0027-0.0247)	0.0127 ± 0.0009 (0.0034-0.0243)	0.258
Aminoàcids	0.0073 ± 0.0008 (0.0020-0.0169)	0.0072 ± 0.0006 (0.0030-0.0159)	0.912
Pressió evolutiva			
dS	0.0320 ± 0.0056 (0.0046-0.0906)	0.0412 ± 0.0032 (0.0076-0.0856)	0.131
dN	0.0032 ± 0.0003 (0.0009-0.0077)	0.0031 ± 0.0003 (0.0007-0.0073)	0.915
dS/dN	10.37 ± 1.66 (2.51-26.71)	16.08 ± 1.72 (3.48-23.11)	0.038

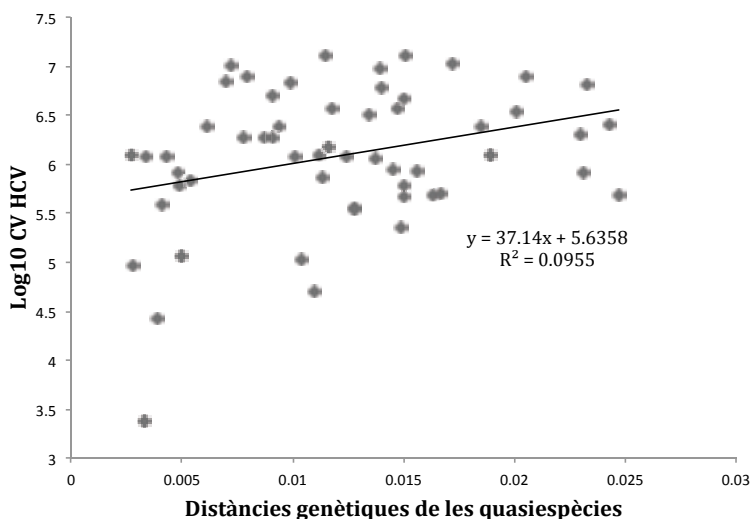


Figura 24. Distància genètica en funció de la càrrega viral del VHC. Existeix una relació positiva entre la distància genètica (nucleòtid) i la càrrega viral del VHC. Els paràmetres estan expressats en mitjanes ± error estàndard de la mitjana (rang mínim valor-max valor).



Quan es van agrupar les distàncies genètiques independentment de la resposta a la teràpia obtinguda, segons el subtipus del VHC amb que es trobava infectat el pacient (1a o 1b), no vàrem trobar diferències significatives ni a nivell de nucleòtid ni a nivell d'aminoàcid (0.0125 vs 0.0111; $P = 0.4338$, en nucleòtids i 0.0068 vs 0,0082; $P = 0.1571$ en aminoàcids). L'índex de les distàncies sinònimes respecte les no sinònimes (dS/dN), marcador de pressió selectiva, va ser calculat per les 56 mostres, i es va veure que aquest índex, sempre era superior a 1, indicant que existien una deriva genètica i pressions evolutives sobre la regió codificant que estàvem estudiant. Vàrem trobar un ampli rang d'aquest índex de mutació, dS/dN, per cada quasiespècie, sent de 2.51 a 26.71, demostrant que diferents forces selectives podien haver actuat sobre les diferents quasiespècies (Taula 13). Els pacients que van obtenir una RVS presentaven un índex dS/dN inferior que aquells NR (10.37 i 16.08 respectivament; $P = 0.0383$). Una altra vegada vàrem poder veure diferències entre els pacients portadors dels al·lells de risc pel polimorfisme rs 129979860 (CT o TT) i els que no, respecte les distàncies sinònimes i no sinònimes. Així els primers mencionats, presentaven una menor proporció de mutacions no sinònimes pels potencials llocs no sinònims (dN) que els no portadors dels al·lells de risc (0.0027 vs 0.0036; $P = 0.0490$). No obstant aquesta diferència observada en el valor de dN, no es va observar quan el valor de la proporció de mutacions sinònimes pel potencial lloc sinònim (dS) va ser calculat (0.037 vs 0.039; $P = 0.7295$).

Vàrem utilitzar el programa FEL, per tal de trobar codons sota pressió selectiva. Nou codons seleccionats positivament es van detectar en nou mostres diferents (Taula 14). D'aquestes posicions, la V33, T61, V83, P86, Q89 i la A147 estaven tipificades com a polimorfismes comuns en les variants NS3 de genotip 1²⁴⁸. Les altres posicions restants, P88, G120 i F169, havien estat tipificades com a posicions marcadament conservades, no obstant algunes variants poden ser trobades en bases de dades de seqüències genòmiques del VHC. Vuit dels codons identificats V33, T61, V83, P86, P88, Q89, G120 i A147, han estat descrits com a epítops de limfòcits citotòxics T (CTL)²⁴⁹.

Entre les quasiespècies aïllades de 35 pacients es van trobar mutacions que s'havien descrit que proporcionaven resistència als inhibidors de proteasa (IPs), (55%; Taula 15). Així doncs, en 35 seqüències dels 1745 (2%) clons analitzats existien substitucions de resistència.



Taula 14. Codons amb selecció positiva en la regió codificant de la proteasa NS3 del VHC.

Pacient	Subtipus de VHC	P *	Codó i posició
3	1a	0.010	P86
5	1a	0.043	V83
6	1a	0.072	V33
8	1b	0.009	A147
10	1a	0.059	P88
32	1a	0.071	Q89
37	1a	0.094	F169
44	1b	0.092	T61
100	1b	0.034	G120

*el valor de tall de P va ser 0.1.

Taula 15. Clons de la proteasa del VHC NS3 trobats en diferents pacients que porten substitucions de resistència (S. de Resistència).

Pacient	Clon	S. de Resistència	Pacient	Clon	S. de Resistència
1	c17	D168G	47	c23	V170A
	c37	D168N	48	c104	V36A
	c30	Q41R	50	c22	V55A
3	c54	T54A	51	c19	V36A
	c36	Q80R		c2	Q41R
	prevalent ^a	Q80K		c3	Q41R
6	c56	Q41R		c91	F43S
7	c68	V55A	54	c10	T54A
11	c15	V55A		c86	V55A
28	c7	R155T	57	c15	V36A
	c45	R155K	62	c21	D168N
29	c4	A156T	68	c43	D168G
30	prevalent ^a	V55A	69	c29	Q80R
31	c22	Q41R	76	prevalent ^a	Q80K
	c10	V55A	77	prevalent ^a	Q80K
36	c23	D168E	90	c50	F43S
37	c76	R155K	140	prevalent ^a	V36M
38	c28	D168G		prevalent ^a	Q80K
	c33	D168G	151	c21	V55A
41	c53	A156V	161	c17	V55A
44	c8	V170A	165	c22	Q80R
46	c38	V36A			

prevalent^a = més del 50% dels genomes que conformen la quasiespècie porten la substitució de resistència.



Cinc quasiespècies tenien la substitució de resistència Q80K en la majoria dels seus clons minoritaris (mutació prevalent), com també passava amb la substitució de resistència V36M i V55A, però només en una sola quasiespècie. Les mutacions V36A/M, T54A, V55A, R155K/T, A156T/V i V170A, les quals han estat vinculades en la inhibició dels efectes dels IPs Telaprevir i Boceprevir en pacients, van observar-se en clons minoritaris dins de les quasiespècies estudiades. L'aparició de mutacions descrites a conferir resistència a IPs no es va veure alterada per haver pres o no, inhibidors de proteasa del VIH-1 dins la teràpia antiretroviral (P = 0.7859).

2.2.2- Complexitat de les Quasiespècies de la Proteasa NS3 del VHC

La complexitat de les quasiespècies va ser avaluada mitjançant el càlcul dels valors de l'heterogeneïtat i l'Entropia de Shannon (ES). Significativament es va trobar que els pacients NR tenien una heterogeneïtat i una ES (a nivell de nucleòtid) més elevada que els que havien respost positivament a la teràpia (84.48 i 0.9188 vs 74.17 i 0.8278; P = 0.021 i P = 0.025, respectivament; Taula 16). A nivell d'aminoàcid els NR també presentaven valors més elevats per les dues variables però la diferència no era significativa (Taula 16).

Taula 16. Paràmetres de complexitat genètica de la proteasa NS3 del VHC en els pacients estudiats.

Paràmetres de complexitat genètica			
	RVS	NR	P (RVS vs NR)
Heterogeneïtat			
Nucleòtids	74.17 ± 5.33 (33.3-100)	84.48 ± 2.04 (52.27-100)	0.021
Aminoàcids	37.88 ± 2.93 (16.67-61.9)	43.00 ± 3.02 (17.31-80.00)	0.283
Entropia de Shannon			
Nucleòtids	0.8278 ± 0.0416 (0.4830-1.000)	0.9188 ± 0.0136 (0.6942-1.000)	0.025
Aminoàcids	0.4973 ± 0.0439 (0.1978-0.8062)	0.5525 ± 0.0339 (0.2484-0.8945)	0.334

L'heterogeneïtat la vam expressar en % i la Entropia de Shannon en mitjanes ± error estàndard de la mitjana (rang mínim valor-max valor).



Com en el cas de les distàncies genètiques, comentat anteriorment, vàrem poder identificar una relació positiva entre l'heterogeneïtat a nivell de nucleòtid i la càrrega viral del VHC ($P = 0.0011$; $y = 0.0173x + 4.67$; $R^2 = 0.1807$; Figura 25) com també entre l'ES a nivell de nucleòtid i la càrrega viral del VHC en sang ($P = 0.0002$; $y = 2.628x + 3.74$; $R^2 = 0.2278$; Figura 26).

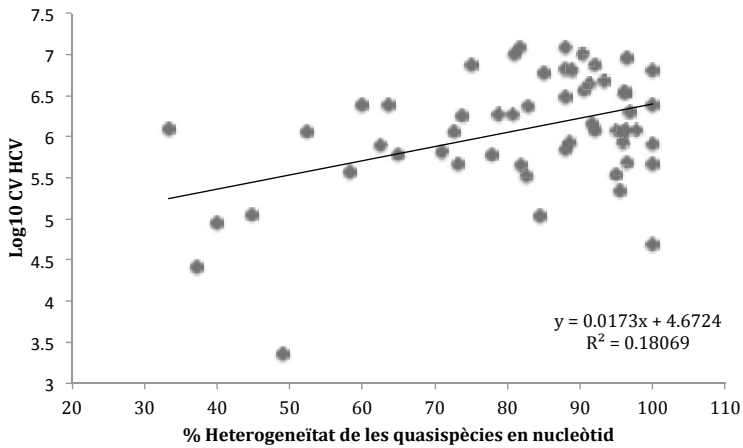


Figura 25. L'heterogeneïtat de les quasiespècies en funció de la càrrega viral del VHC. Existeix una relació positiva entre la heterogeneïtat (nucleòtid) i la càrrega viral del VHC.

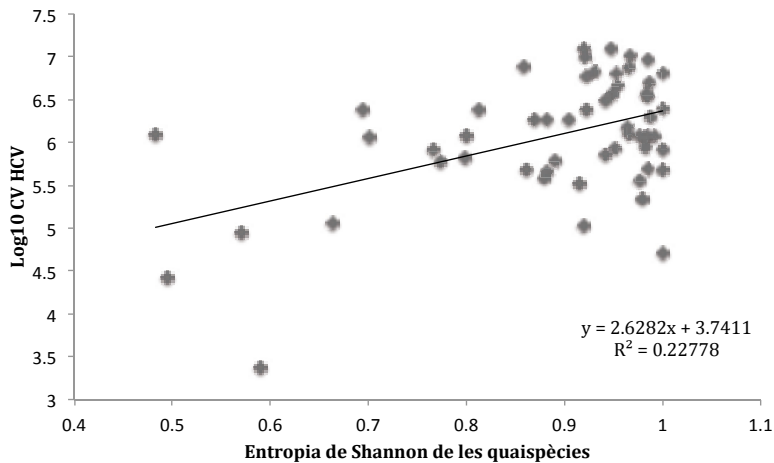


Figura 26. L'Entropia de Shannon de les quasiespècies en funció de la càrrega viral del VHC. Existeix una relació positiva entre l'Entropia de Shannon (nucleòtid) i la càrrega viral del VHC.



Quan les seqüències aminoacídiques eren agrupades per subtipus (1a o 1b), un elevat i significatiu valor de ES es va trobar entre les quasiespècies de subtipus 1b respecte les trobades entre les quasiespècies de subtipus 1a (0.614 i 0.4974 pel subtipus 1b i 1a, respectivament; $P = 0.0484$). Cap diferència significativa va ser observada a nivell de nucleòtid (0.9054 i 0.8616 pel subtipus 1a i 1b, respectivament; $P = 0.2404$).

Entre aquells pacients que presentaven els al·lels de risc pel polimorfisme rs129979860 (CT-TT) o pel polimorfisme rs8099917 (TG-GG), respecte els que presentaven l'al·lel protector (CC o TT; respectivament), presentaven un menor valor d'heterogeneïtat (CT-TT = 81.61 vs CC = 81.72 i TG-GG = 80.53 vs TT = 82.10) i d'Entropia de Shannon (CT-TT = 0.889 vs CC = 0.892 i TG-GG = 0.88 vs TT = 0.883 vs TT = 0.894) entre les seves quasiespècies, com ja havíem apreciat en l'anàlisi de les distàncies genètiques. Aquestes diferències eren molt més apreciables pel SNP rs8099917 que pel SNP rs12979860, però mai van mostrar un valor estadístic significatiu.

2.3- Eficiència Catalítica

L'eficiència catalítica va ser calculada per cadascuna de les proteases que es trobaven en més alta proporció dintre de l'eixam de seqüències presents en cada pacient (la quasiespècie majoritària), mitjançant el sistema de cribatge genètic basat en el bacteriòfag λ , davant del dos punts de tall, el cel·lular CARDIF i el viral NS5A/5B. L'activitat enzimàtica resultant de cada quasiespècie dominant va ser relativitzada a l'activitat catalítica de la proteasa del replicó I389/NS3-3' inactivada per la substitució S139A en el seu centre catalític. Les diferents activitats trobades vers els punts de tall de CARDIF i de NS5A/5B van mostrar un rang de resultats molt ampli, de 2 i 1 ordre de magnitud respectivament, fent palès que les diferents mutacions en les proteases dominants trobades en cada pacient (Figura 27a i 27b) devien afectar a l'eficiència catalítica d'aquestes (Figura 28a i 28b). Per demostrar l'especificitat del cribatge genètic utilitzat, vàrem testar una proteasa dominant que havia demostrat tenir una elevada activitat, la mostra 50c24, juntament amb el compost 25a²⁵⁰, un inhibidor de la proteasa NS3/4A del VHC. La presència de l'inhibidor feia baixar un 85% l'eficiència catalítica de la proteasa dominant del pacient 50 (Figura 27a).

2.3.1- L'Eficiència Catalítica de la Proteasa NS3/4A i la Resposta a la Teràpia amb peg-IFN/RBV

Si agrupàvem les eficiències catalítiques de les proteases dominants segons la resposta al tractament que havien obtingut els pacients dels quals provenien, podíem



observar que aquells pacients que havien obtingut una RVS estaven infectats per VHC amb proteases NS3/4A dominants més potents i eficients per processar, tant el punt de tall CARDIF com el punt de tall NS5A/5B, que els pacients no responedors (NR). Així, pel grup dels pacients amb RVS la mitjana de les eficiències trobades va ser de 0.8970 ± 0.0556 , pel processament de CARDIF, mentre que pels NR el valor era significativament

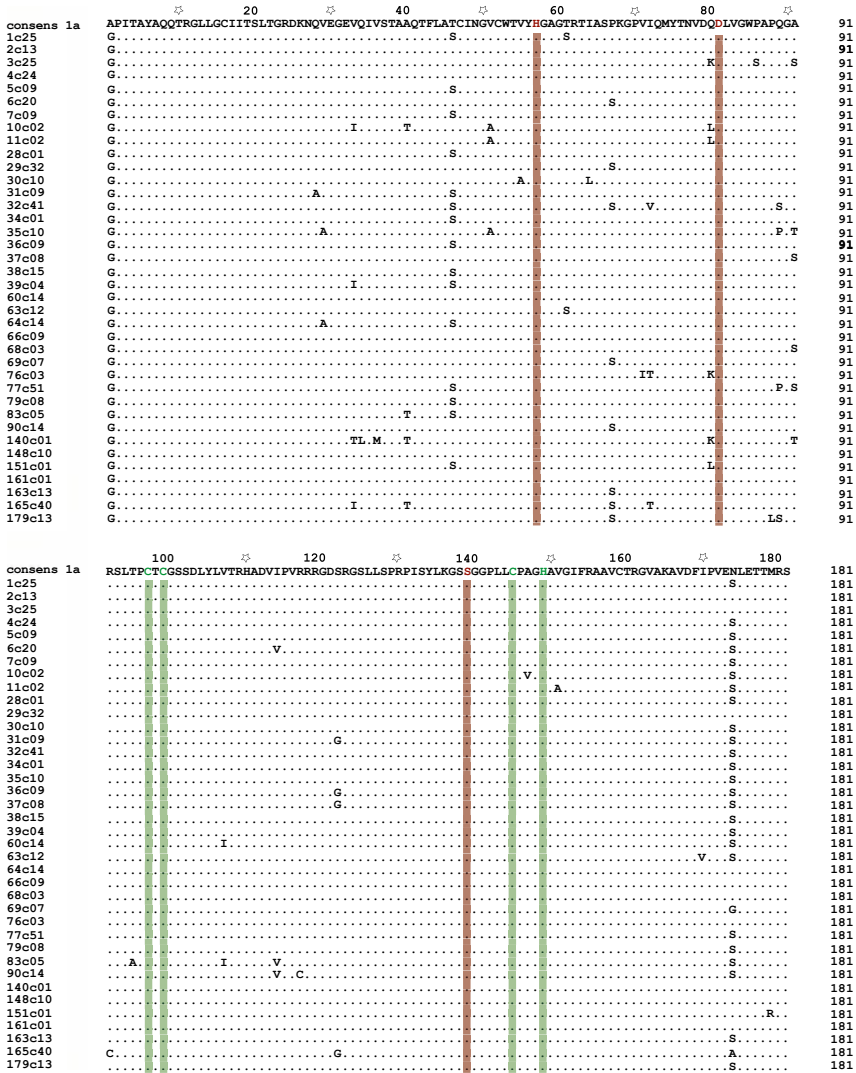


Figura 27a. Alineament de les quasiespècies dominants de la NS3/4A de subtipus 1a en aminoàcids. Totes les seqüències es van alinear en relació a una seqüència consens obtinguda a partir d'una base de dades de referència que incloïa 307 seqüències diferents de subtipus 1a (situada a dalt de tot). Els punts indiquen idèntic residu mentre que el destacament de l' aminoàcid senyala el canvi respecte a la seqüència consens. En vermell vàrem destacar el centre catalític de la proteïna: H57, D81 i S139 i en verd el lloc d'enllaç amb el Zn²⁺: C97, C99, C145 i H149.

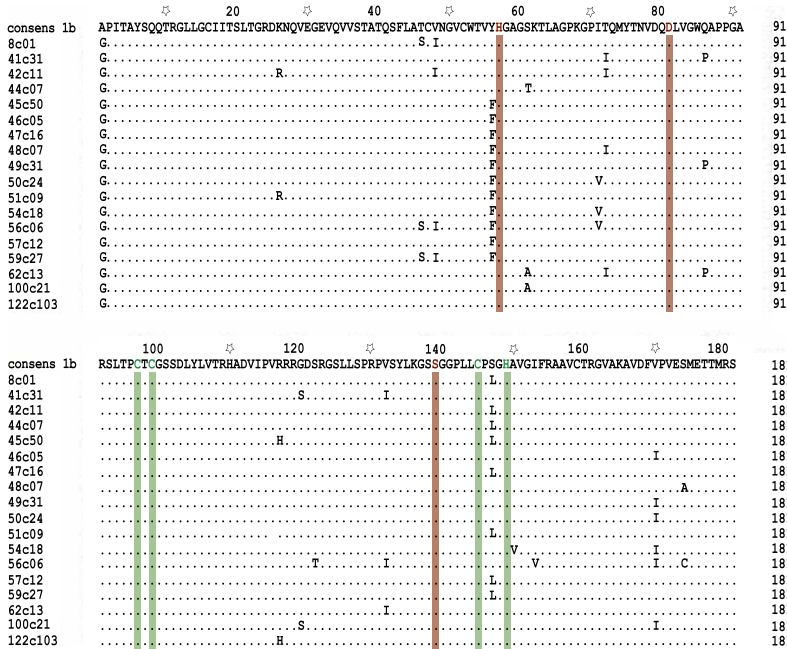


Figura 27b. Alineament de les quasiespècies dominants de la NS3/4A de subtipus 1b en aminoàcids. Totes les seqüències es van alinear en relació a una seqüència consens obtinguda a partir d'una base de dades referència que incloïa 328 seqüències diferents de subtipus 1b, situada a dalt de tot l'alineament. Els punts indiquen idèntic residu mentre que el destacament del aminoàcid senyala el canvi respecte la primera seqüència. En vermell vàrem destacar el centre catalític de la proteïna: H57, D81 i S139 i en verd el lloc d'enllaç amb el Zn²⁺: C97, C99, C145 i H149, els quals es troben conservats en totes les seqüències.

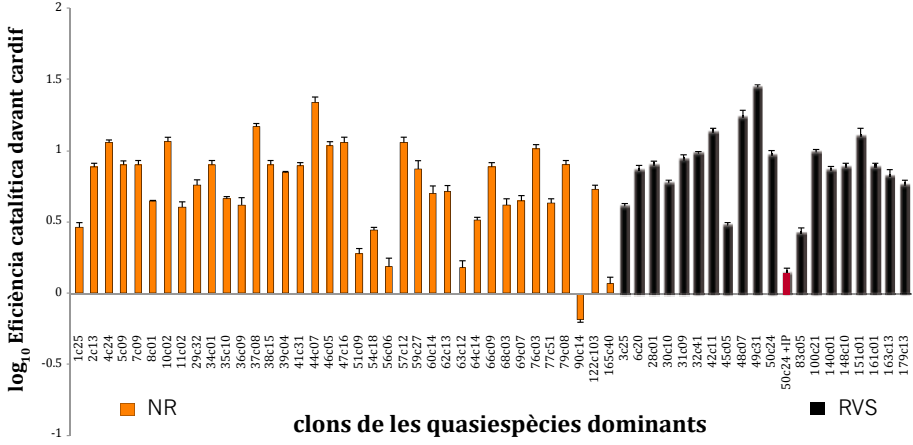


Figura 28a. Eficiències Catalítiques de les 56 proteases NS3/4A dominants davant del punt de tall CARDIF. Les eficiències que pertanyien a pacients que van resoldre la infecció (RVS) corresponen a les barres del gràfic de color negre, mentre que les corresponents als NR els vàrem simbolitzar en taronja. La barra en vermell correspon a la mostra 50c24 més l'inhibidor de proteasa 25a. L'experiment es va realitzar per triplicat i les barres en forma de "T" simbolitzen la desviació estàndard resultant.

RESULTATS

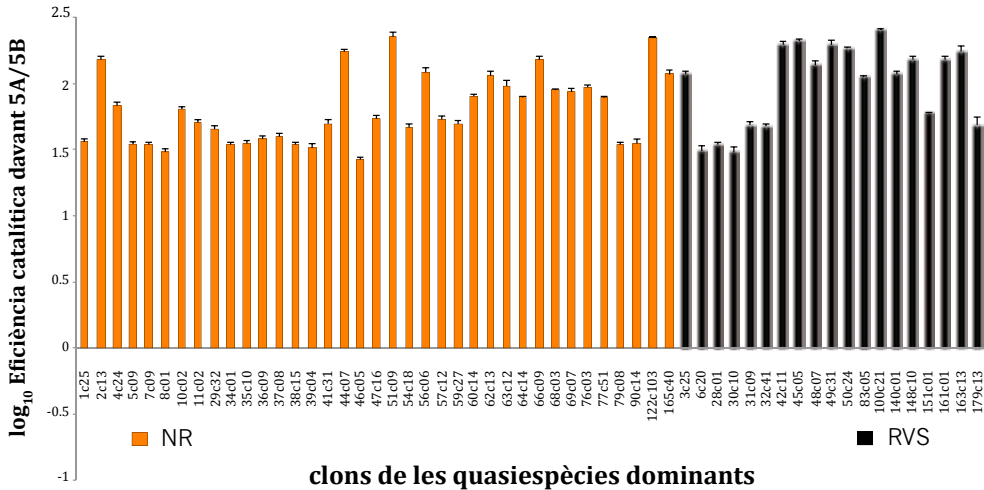


Figura 28b. Eficiències Catalítiques de les 56 proteases NS3/4A dominants davant del punt de tall 5A/5B. Les eficiències que pertanyien a pacients que van resoldre la infecció (RVS) corresponen a les barres del gràfic de color negra, mentre que les corresponents als NR els vam simbolitzar en taronja. L'experiment es va realitzar per triplicat i les barres en forma de "T" simbolitzen la desviació estàndard resultant.

menor, 0.7269 ± 0.0530 , $P = 0.049$. Com hem comentat anteriorment el mateix passava en el cas del processament del punt de tall NS5A/5B, on els pacients amb RVS presentaven una mitjana de l'eficiència catalítica de 1.9888 ± 0.3122 , valor superior de manera significativa ($P = 0.016$) al grup de pacients NR que va ser de 1.7915 ± 0.0431 . S'ha de destacar que dins del grup de pacients NR hi trobàvem proteases dominants que no presentaven activitat catalítica (mostres 90c14 i 165c40, Figura 28a) o tenien una activitat catalítica molt reduïda (mostres 51, 56 i 63, Figura 28a) davant el punt de tall CARDIF. Aquest fenomen no el vàrem observar per les mateixes proteases assajades davant del punt de tall NS5A/5B, on totes van mostrar eficiències catalítiques notables i més elevades que les presentades pel punt de tall CARDIF, com podem observar, comparant les Figures 28a i 28b o comparant les mitjanes de les eficiències catalítiques obtingudes entre els diferents punts de tall assajats (1.8584 vs 0.7843 ; respectivament; $P = 0.0001$).

Les activitats de les proteases majoritàries les vàrem dividir en 4 categories segons les seves activitats relatives al valor mínim i màxim obtingut. Així utilitzant l'equació següent: $EC_{rel} = (EC_{obt} - EC_{min}) / (EC_{màx} - EC_{min}) \times 100$ (on EC_{rel} seria l'Eficiència Catalítica relativa, EC_{obt} seria l'eficiència catalítica obtinguda, EC_{min} seria l'eficiència catalítica mínima obtinguda entre les proteases dominants pel punt de tall

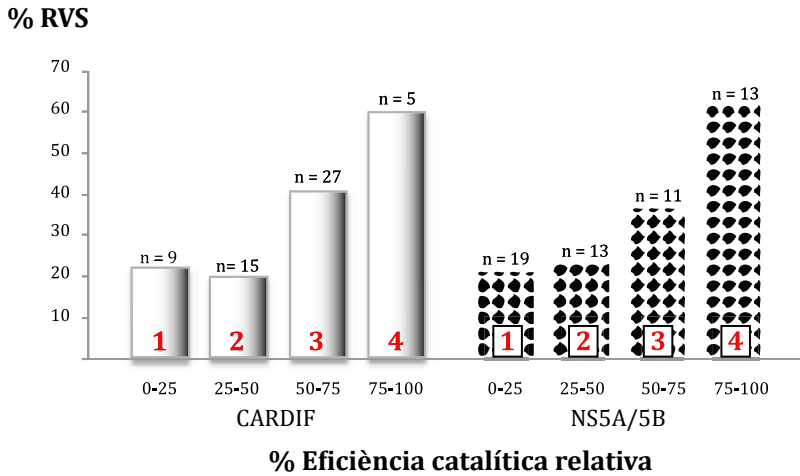


Figura 29. Eficiències catalítiques relatives de les proteases dominants en processar tant el punt de tall CARDIF com NS5A/5B, en funció de la resposta positiva al tractament amb peg-IFN/RBV. Les activitats de les proteases dominants obtingudes de processar el punt de tall CARDIF es van representar amb barres blanques i les activitats de les proteases obtingudes al processar el punt de tall NS5A/5B amb barres amb taques negres. El número de les categories establertes segons la eficiència catalítica relativa es van representar en vermell. La majoria de proteases de categoria 4 (75-100 % d'activitat relativa) derivaven de pacients que van aconseguir una RVS.

assajat i la E_Cmàx seria l'eficiència catalítica de les proteases dominants obtinguda de màxim valor pel punt de tall assajat) podíem establir la categoria número 1, on hi vàrem incloure totes aquelles proteases dominants que presentaven activitats relatives del 0 al 25 %, la categoria 2 on hi dipositàvem aquelles proteases amb activitat relativa del 25 al 50 %, la categoria 3 aquelles proteases amb activitat relativa del 50 al 75 % i finalment la categoria 4 on hi eren aquelles proteases amb les activitats més altes, del 75 al 100 % (Figura 29). Les proteases dominants amb activitat relativa de categoria 4, tant pel processament de CARDIF com pel processament del punt NS5A/5B, derivaven en gran part de pacients amb RVS. Pel processament del punt de tall NS5A/5B hi teníem gairebé el mateix número de proteases per cada categoria d'activitat relativa (valor de n en la Figura 29), en canvi en el cas del punt de tall CARDIF, el número de proteases per categoria era més desequilibrat demostrant, com ja havíem observat en les Figures 27a i 27b, que les activitats obtingudes pel punt de tall CARDIF formaven un rang de valors molt més ampli, que el que formaven les activitats relatives obtingudes pel punt de tall NS5A/5B. Analitzant les 5 seqüències proteiques que formaven la categoria 4 pel processament del punt de tall CARDIF, no vàrem trobar una mutació o patró



de mutacions que fos compartida per totes elles i que les fes diferents a les altres seqüències proteiques amb menor eficiència catalítica. Tanmateix, la proteasa amb màxim valor d'eficiència catalítica, la proteasa 49c31, provinent d'un pacient que va obtenir la RVS, presentava 3 mutacions (respecte la seqüència consens 1a) la Y56F, la Q86P i la V170I que la feien diferent a la resta. La mutació Y56F la compartien però, també altres proteases majoritàries, les quals formaven part de diferents categories d'eficiència catalítica, però mai en solitari sempre en companyia d'altres mutacions. La mutació Q86P, també la presentaven dues proteases, la 41c31 i 62c13, de categories 3 i 2 respectivament, però tampoc la presentaven en solitari. La última mutació, la V170I, era compartida per altres proteases, la 46c05, la 50c24, la 54c18 i la 56c06, de les quals les dos primeres eren de categoria 3 i les dos últimes eren de categoria 1, però tampoc la mostraven en solitari. S'ha de destacar la proteasa 46c05 (categoria 3), la qual era idèntica en aminoàcids a la 49c31 excepte per la mutació Q86P (Figura 27a i 27b). Així vàrem calcular la quantitat de mutacions que presentava cada proteasa dominant respecte a la proteasa 49c31, de màxima eficiència catalítica, i la vàrem relacionar amb l'eficiència catalítica que cadascuna mostrava pel punt de tall CARDIF. Com que la proteasa 49c31 formava part de les proteases del subtipus 1b, pel cas de les proteases del subtipus 1a, no vàrem tenir en compte totes aquelles mutacions que canviaven a causa del subtipus. Com veiem en la Figura 30 com més diferent era la seqüència de les proteïnes dominants respecte a la proteasa 49c31, menor era l'eficiència catalítica que presentaven, tot i amb això la tendència no es va mostrar significativa ($P = 0.251$).

Cal destacar que dintre de les proteases de categoria 1 pel processament de CARDIF, n'hi havia 4 amb eficiència catalítica molt reduïda, més a prop del 0 que del 25% i eren la 90c14, la 165c40 la 63c12 i 56c06 (per ordre de menor eficiència a major eficiència), totes elles obtingudes a partir de plasma de pacients que no van obtenir RVS. Analitzant les seves seqüències vàrem poder observar que la proteasa 90c14 presentava una mutació que no era compartida per cap altre proteasa dominant, la R117C, i que aquesta mutació tampoc era compartida per la totalitat de la quasiespècie derivada del pacient 90. Per la mostra 165c40 també existia una mutació que la feia diferent entre les proteases majoritàries, la R92C, però aquesta, sí que era compartida per tota la quasiespècie d'on s'havia obtingut la proteasa 165c40. El mateix succeïa per la proteasa dominant 63c12, la qual posseïa una mutació que la feia única entre les proteases dominants, la I170V, i aquesta també era compartida per totes les quasiespècies d'on formava part. Pel cas de la proteasa 56c06 vàrem trobar tres mutacions que cap altre



proteasa majoritària compartia la S122T, la I153V i la S174C, totes tres també eren presents en la quasiespècie derivada del pacient 56. Cal destacar també que la proteasa 56c06 era la proteasa que acumulava més canvis d'aminoàcid respecte la proteasa amb més eficiència catalítica per processar CARDIF, la 49c31.

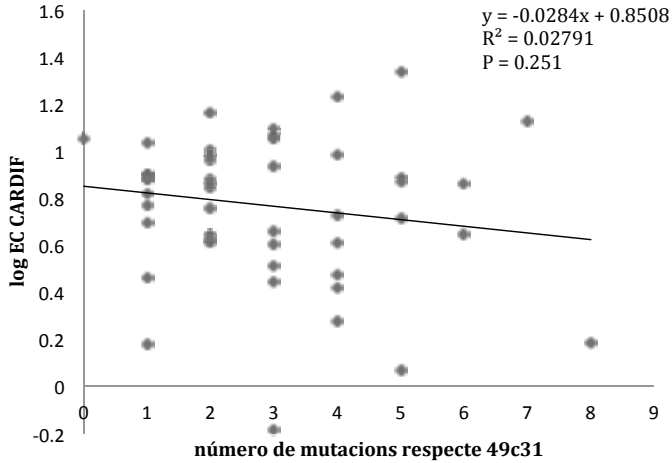


Figura 30. Número de mutacions respecte la proteasa 49c31, d'eficiència catalítica màxima, en funció de l'eficiència catalítica obtinguda en processar el punt de tall CARDIF. Existeix una relació negativa entre el número de mutacions respecte la proteasa amb màxima eficiència i l'eficiència catalítica alhora de processar el punt de tall CARDIF.

Entre les proteases de categoria 4 pel processament del punt de tall NS5A/5B, tampoc vàrem trobar una mutació o patró de mutacions en les seves seqüències aminoacídiques que les fes diferents a les proteases amb eficiència catalítica menor. Tampoc vàrem trobar cap mutació en la proteasa amb màxima eficiència catalítica per processar NS5A/5B, la 100c21 provinent d'un pacient amb RVS, que la distingís de les altres proteases dominants (Figura 27a i 27b). Tanmateix, la proteasa 100c 21 presentava 3 mutacions respecte la proteasa consens, la G60A, la G120S i la V170I, que la feien diferent a la resta. Aquestes mutacions també eren presents en altres proteases, però mai en solitari. Si contraposàvem el número de mutacions diferents a aquesta proteasa de màxima eficiència que acumulaven les altres proteases dominants amb les seves eficiències catalítiques obtingudes per processar NS5A/5B, podíem comprovar que, contràriament del que passava al processar CARDIF, com més mutacions s'acumulaven millor era l'eficiència catalítica de la proteasa per processar NS5A/5B ($P = 0.04$; Figura



31). Entre totes les proteases de categoria 1 alhora de processar NS5A/5B, tampoc existia una mutació o un patró de mutacions que les fes diferents a la resta. La proteasa amb menor eficiència va resultar ser la proteasa 46c05, provinent d'un pacient NR, la qual no presentava cap mutació única que no compartís cap altre proteasa majoritària. Cal destacar que les proteases abans esmentades com a proteases amb eficiència quasi insignificant per CARDIF, la 90c14, la 165c40, la 63c12 i la 56c06, alhora de processar NS5A/5B totes, tret de la 90c14 que formava part també de la categoria 1, formaven part de la categoria 3.

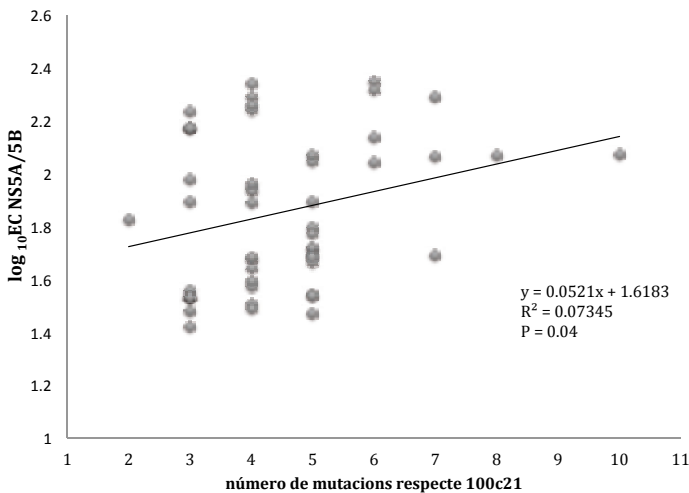


Figura 31. Número de mutacions respecte la proteasa 100c21, d'eficiència catalítica màxima, en funció del logaritme de l'eficiència catalítica obtinguda en processar el punt de tall NS5A/5B. Existia una relació positiva entre el número de mutacions que acumulaven les proteases respecte la proteasa amb màxima eficiència catalítica per processar NS5A/5B, 100c21, i l'eficiència catalítica d'aquestes per processar el mateix punt.

3- NOUS FACTORS PREDICTIUS DE RESPOSTA AL TRACTAMENT AMB PEG-IFN/RBV: VARIABILITAT GENÈTICA I EFICIÈNCIA CATALÍTICA

3.1- Anàlisi Univariat

A partir de les variables que van demostrar estar influent, estadísticament, a la resposta al tractament amb peg-IFN α /RBV, com la càrrega viral del VHC, els al·lels de risc pels polimorfismes rs8099917 i rs12979860, l'índex dS/dN, el % d'heterogeneïtat en nucleòtid, l'entropia de



Shannon en nucleòtid i l'eficiència catalítica tant per processar CARDIF com NS5A/5B, vàrem realitzar anàlisis univariats (càlcul de la oportunitat relativa OR; 95% d'interval de confiança; valor de P) per tal d'esbrinar el grau d'implicació d'aquestes en la RVS, dins la població d'estudi de 56 pacients coinfectats amb VHC i VIH-1. De les característiques clíniques mencionades (Figura 32), ser portador del genotip CC pel polimorfisme rs12979860 va resultar ser la variable amb una OR major, de 17.00 (3.36-85.97; $P < 0.001$) respecte les altres, les quals van presentar una OR molt semblant, de 6.25 a 3.6. Així, presentar una entropia de Shannon (ES), calculada sobre les quasiespècies en nucleòtids, (ES NC) menor de 0.75 va estar relacionada amb la RVS amb una OR de 6.25 (IC = 1.08-36.08; $P = 0.04$). Presentar un valor d'eficiència catalítica (en logaritme en base 10) de la proteasa dominant de la quasiespècie que infecta al pacient per processar CARDIF, major de 0.75 o per processar NS5A/5B, major de 1.9, resultava en una OR relacionada amb la RVS de 5.05 i 3.57 respectivament (ICCARDIF = 1.25-20.41; $P = 0.02$; ICNS5A/5B = 1.12-11.36;

Factors predictius de RVS

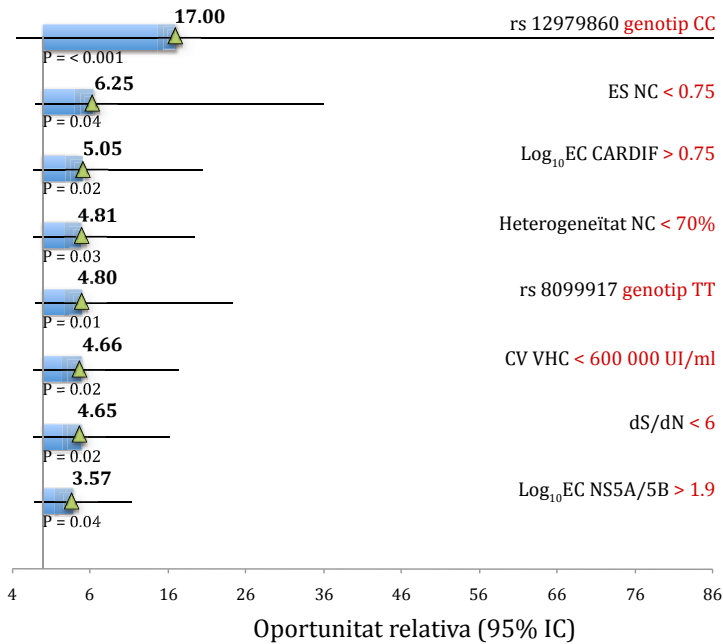


Figura 32. Nous factors predictius obtenir una resposta viral sostinguda després de seguir el tractament amb peg-IFN α /RVB en 56 pacients coinfectats amb VHC i VIH-1. El valor d'oportunitat relativa relacionada amb la RVS més elevat, per tots els factors predictius explorats va ser per la variable de ser portador del genotip TT pel polimorfisme rs12979860. ES NC = entropia de Shannon en nucleòtid; Log_{10} EC CARDIF = logaritme en base 10 de la eficiència catalítica per processar CARDIF, Heterogeneïtat NC = heterogeneïtat en nucleòtid; CV VHC = càrrega viral del virus de la hepatitis C; índex dS/dN = distàncies sinònimes respecte les distàncies no sinònimes ; Log_{10} EC NS5A/5B = logaritme en base 10 de la eficiència catalítica per processar NS5A/5B.



P = 0.04). Presentar una heterogeneïtat menor del 70% en les quasiespècies en nucleòtid que formen la infecció del pacient, va resultar en una OR lligada a la RVS de 4.81 (IC = 1.19-19.41; P = 0.03), un valor de OR molt semblant al que es va obtenir pel cas de ser portador del genotip TT pel polimorfisme rs 8099917, que va ser de 4.80 (IC= 0.96-24.16; P = 0.01). I per últim, presentar una càrrega viral del VHC basal en sang menor a 600 000 UI/ml i un índex dS/dN menor de 6, van obtenir uns valor de OR relacionats amb la RVS de 4.66 i 4.65 respectivament (IC CVVHC = 1.26-17.26; P = 0.02; IC dS/dN = 1,32-16,31; P = 0.02).

3.2- Anàlisi Multinomial

Quan vàrem fer l'anàlisi multinomial per veure quins dels factors predictius descrits anteriorment afectaven a la RVS de manera independent, vàrem trobar que en la població d'estudi, de 56 coinfectats amb el VIH-1 i el VHC de genotip 1, presentar el genotip CC pel SNP rs12979860, afectava amb una OR tant elevada respecte als altres factors predictius (ES NC > 0.75, heterogeneïtat < 70%, rs8099917 genotip TT, CV VHC < 600 000 UI/ml, dS/dN < 6, log₁₀ EC NS5A/5B > 1.9 i log₁₀ EC CARDIF > 0.75) que les feia insignificants davant d'aquesta (Taula 17). Així els factors predictius de resposta trobats anteriorment estaven subjectes a la presència o no del genotip CC pel SNP rs12979860.

Taula 17. Factors predictius de resposta en la població de coinfectats amb VHC i VIH-1 i el càlcul de les oportunitats relatives d'obtenir la RVS després de seguir el tractament amb peg-IFN/RBV a partir de l'anàlisi de regressió multinomial.

Factor predictiu de RVS	OR	IC	P
genotip rs 12979860 CC	8.89x10 ⁹	6.15x10 ⁸ - 1.28x 10 ¹¹	2.05x10⁻⁶³
log ₁₀ EC N5A/5B >1.9	0.05	0.005 - 0.564	0.0151
dS/dN < 6	12.83	1.015 - 162.263	0.0487
log ₁₀ EC CARDIF > 0.75	0.14	0.017 - 1.183	0.0711
Heterogeneïtat NC < 70%	9.25	2.09x10 ⁻⁴ - 40 9674.003	0.6836
CV VHC < 600.000 UI/ml	2.66	0.157 - 27.015	0.5832
genotip rs 8099917 TT	2.05E-09	2.046x10 ⁻⁹ - 2.046x10 ⁻⁹	1



DISCUSSIÓ



Actualment la infecció per VHC pot ser tractada amb la combinació peg-IFN α /RBV, però només un 50-60% dels pacients aconseguixen una RVS, és a dir mantenir el virus indetectable en sang 6 mesos després d'haver deixat el tractament²⁵¹. En persones coinfectades amb el VIH-1 i el VHC, la progressió a dany hepàtic greu és més ràpida, la teràpia amb peg-IFN/RBV és menys efectiva i els efectes secundaris provocats per aquesta, són molt severos. És per tant vital i necessari trobar bons marcadors de resposta positiva, per tal d'evitar mals majors a pacients que molt probablement no respondran a la teràpia actual, i poden ser bons candidats per les futures, més ben dit, les ja presents teràpies STAT-C.

En la nostra cohort de pacients coinfectats amb el VIH-1 i el VHC vàrem poder reafirmar que factors com: estar infectat pel VHC de genotip 3, presentar la càrrega viral basal < 600 000 UI/ml i un determinat patró genòmic pels SNPs rs12979860 i rs8099917 situats prop del gen de IL28B es trobaven estretament implicats en la RVS després de rebre teràpia amb peg-IFN α /RBV contra el VHC, i també vàrem poder identificar nous marcadors virals predictius de resposta associats a la complexitat de la quasiespècie a nivell de la proteasa NS3 i en la seva capacitat catalítica. Així els resultats d'aquesta tesi confirmaven els estudis anteriors basats en factors virals, com el genotip i la CV basal del VHC com a marcadors predictius de resposta, com també els estudis recents fets per la Dra. Rallón i el Dr Pineda i els respectius col·laboradors^{224,225}, ja que vàrem poder observar que presentar l'al·lel de risc T pel SNP rs12979860, localitzat a prop del gen de la IL28B, en pacients coinfectats amb el VIH-1 i el VHC, conferia al pacient una molt baixa probabilitat d'obtenir una RVS a la teràpia amb peg-IFN/RBV. A més, però vàrem afegir que l'al·lel de risc G pel SNP rs8099917, localitzat també en la regió de la IL28B, també estava associat a una resposta negativa a la teràpia basada en IFN- α , com ja s'havia vist en els estudis de Tanaka i Suppiah però en pacients monoïnfectats. Vàrem poder observar que entre els dos SNPs estudiats, tant fent un anàlisi univariat com fent un anàlisi multinomial, el genotip protector CC pel SNP rs12979860 ($OR_{univariat} = 4.62$ i $OR_{multinomial} = 3.27$), sempre presentava oportunitats relatives associades a la RVS més altes que el genotip protector TT pel SNP rs8099917 ($OR_{univariat} = 3.65$ i $OR_{multinomial} = 1.92$). L'haplotip que formaven els al·lells de risc pels dos SNPs TG (rs12979860 + rs8099917) va presentar una oportunitat relativa associada a la no resposta a la teràpia ($OR = 5.13$) més alta que les oportunitats relatives associades a la no resposta dels al·lells de risc de cadascun dels SNPs per separats (CT-TT $OR = 4.62$; TG-GG $OR = 3.65$). Això donava la idea que el SNP rs12979860 era més bon marcador de resposta a la teràpia amb peg-



IFN/RBV que el SNP rs8099917, però que aquest sol era pitjor marcador que valorar ambdós SNPs junts en forma d'haplotip. Tot i amb això, recentment s'ha publicat que en pacients monoinfectats amb VHC del Japó, el SNP rs8099917 és més eficaç alhora de predir la resposta a la teràpia basada amb IFN, que el SNP rs 12979860²⁵², suggerint l'existència de diferències racials en la freqüència d'aquests dos SNPs.

Els dos SNPs, el rs12979860 i el rs8099917 es localitzen aproximadament a 8kb i 3kb respectivament del gen de la IL28B i vàrem observar que es trobaven en desequilibri de lligament, com ja havia postulat l'equip del Dr. Rauch i col·laboradors²²¹. Això va fa pensar que aquests polimorfismes podien estar influïent en l'expressió del gen de IL28B, i per tant la resposta antiviral. En l'estudi del Dr. Ge i col·laboradors²¹⁸ també es va trobar que el SNP rs 12979860 es trobava en desequilibri de lligament amb un altre polimorfisme, el SNP rs 8183142, un polimorfisme que dona un canvi no sinònim al gen de IL28B en la posició 213 en nucleòtid (en aminoàcids K70R). Per tant, l'efecte funcional que veiem en aquests SNPs podria ser l'efecte net produït per molts SNPs diferents que afecten a l'expressió del gen de la IL28B de diverses maneres. Resultats recents en el nostre laboratori confirmen que en la nostra cohort els SNPs rs 12979860 i rs 8183142 es troben associats en més d'un 99% dels pacients (Castellarnau, Aparicio *et al.* 2011, manuscrit en preparació).

Els genotips pels SNP rs8099917 i rs 12979860 perdien la seva associació amb la resposta a la teràpia entre aquells pacients infectats amb el VHC de genotip 3, i en canvi es feien molt potents entre els pacients infectats amb el VHC de genotip 1, més inclús que presentar una càrrega viral basal < 600 000 UI/ml. Entre els pacients infectats amb VHC de genotip 4 l'associació dels SNPs a la resposta no era prou forta per ser estadísticament considerada, però creiem que era un fet més atribuïble al baix número de pacients infectats amb aquest genotip de la nostra cohort, que no pas a la no associació dels SNPs a la resposta a la teràpia en aquest genotip. Aquests resultats estan en concordança amb els treballs publicats per la Dra. Rallón i Dr. Pineda i el seus respectius col·laboradors^{225,253}, els quals, van identificar una associació important del SNP rs 12979860 amb la resposta a peg-IFN/RBV, en pacients coinfectats amb VIH-1 i VHC de genotip 1, i no pas per aquells pacients coinfectats amb VIH-1 el VHC de genotip 3 o 4. En canvi el Dr. Rauch i col·laboradors²²¹ va publicar que l'al·lel de risc pel SNP rs8099917 estava associat a la resposta a la teràpia amb peg-IFN/RBV independentment del genotip amb que es trobava el pacient. No obstant però, l'equip del Dr. Rauch i col·laboradors van veure que la predicció de resposta negativa a causa de ser portador



de l'al·lel de risc G del SNP rs8099917 era molt més potent (oportunitats relatives més altes) entre els pacients infectats amb VHC de genotip 1 o 4 que pels infectats amb genotip del VHC de genotip 2 o 3. L'estudi del Dr. Rauch i col·laboradors partia d'una cohort de monoïnfectats i d'un número de pacients molt superior a la nostra i a la de la Dra. Rallón i el Dr. Pineda i el seus respectius col·laboradors, amb molts més pacients infectats amb VHC de genotip 4 i inclús amb presència de pacients infectats amb VHC de genotip 2. Així doncs, en pacients coinfectats, els al·lells de risc dels SNPs rs8099917 i rs12979860 tindrien influència en la RVS després de seguir la teràpia estàndard, sobretot en aquells pacients, que es troben infectats amb genotips del VHC amb índexs escassos de resposta.

El Dr. Ge²¹⁸ i la Dra. McCathy i el seus respectius col·laboradors²⁵⁴ van trobar que l'al·lel protector (C) pel SNP rs12979860 estava associat a càrregues virals VHC basals altes, aquest fenomen sembla que vagi en contra d'un dels factors predictius de resposta més postulats, una càrrega viral VHC basal baixa prediu una resposta positiva a la teràpia, però no obstant, aquest fet podria estar en solfa amb la idea de què els polimorfismes en el gen de la IL28B regulen l'expressió dels ISGs, i aquest efecte pot tenir conseqüències en la càrrega viral del VHC i en la resposta al tractament. En el nostre treball els portadors de l'al·lel protector C pel SNP rs12979860 dels pacients en la nostra cohort presentaven les càrregues virals basals més baixes que els portadors de l'al·lel de risc, i en canvi pel cas del SNP rs8099917, els portadors del al·lel protector T presentaven les càrregues virals més altes que els portadors del al·lel de risc. No obstant les diferències de les càrregues virals basals del VHC entre els portadors dels diferents al·lells pels SNPs estudiats, no van ser mai estadísticament significatives, segurament a causa dels pocs pacients en la cohort respecte la cohort utilitzada pel Dr. Ge²¹⁸ i la Dra. McCarthy i el seus respectius col·laboradors²⁵⁴, i la impossibilitat de precisar la càrrega viral basal del VHC, tret de si va ser menor o major a 600 000 UI/ml, i per tant no podem afirmar un lligam entre els SNPs estudiats i la càrrega viral del VHC basal.

La relació entre la variació genètica a prop del gen de la IL28B i la depuració del VHC pel sistema immunitari sense la necessitat de tractament, també ha estat àmpliament estudiada^{221,223}. Concretament s'ha trobat que ser portador de l'al·lel de risc G pel SNP rs8099917 incrementa el risc de la persistència de la infecció del VHC, tant en pacients monoïnfectats com en coinfectats amb VIH-1 i VHC. En la nostra cohort vàrem trobar una significativa menor proporció de pacients portadors de l'al·lel G entre els pacients infectats amb VHC de genotip 3 (23%) respecte els pacients infectats amb



els genotips 1 i 4 (36% i 46%, respectivament). La prevalença de l'al·lel de risc G en el SNP rs8099917 dintre del grup de pacients infectats amb el VHC de genotip 3 de la nostra població es trobava en consonància amb la prevalença d'aquest al·lel en el SNP rs8099917 trobats en la cohort caucàsica Suïssa (17%)²⁵⁵ i dintre de la cohort caucàsica del projecte del mapa d'haplotips humà ("*human haplotype map project*"; 17-19%)²⁵⁶. Aquestes freqüències trobades en la població general suggereixen que l'al·lel G en la població de pacients infectats amb el VHC de genotip 3, no afectaria a la cronicitat del virus d'aquest genotip, i en canvi si afectaria entre els pacients infectats amb el VHC de genotips 1 i 4, ja que està en una proporció desmesurada. Així presentar el genotip protector TT entre els pacients infectats amb el VHC de genotip 1 o 4 podria conferir protecció contra la cronicitat del virus.

Resultats aportats pel Dr. Tanaka i col·laboradors²²⁰ van apuntar que els distints genotips pel polimorfisme rs8099917 podrien aportar diferències en l'expressió del gen de la IL28B, ja que va poder observar una major quantitat d'ARN missatger provinent d'aquest gen, entre pacients amb l'al·lel protector (TT) per aquest SNP que no pas entre els portadors dels al·lells de risc (TG i GG). En un article publicat pel Dr. Honda i col·laboradors²⁵⁷ on s'examinaven els nivells d'expressió dels gens estimulats per interferó (ISGs) per relacionar-los amb la resposta a la teràpia estàndard de pacients infectats amb VHC, es va trobar que els pacients no responedors presentaven més alts nivells d'expressió d'ISGs en el fetge, abans de ser tractats i després, respecte els que van assolir la RVS. Aquesta inducció de l'expressió dels ISGs *per se* abans de rebre teràpia ja s'havia vist en altres estudis, i sempre associada a una manca de resposta a la teràpia amb IFN- α ^{258,259}. Així doncs s'ha suggerit un possible model per explicar el rol dels diferents genotips trobats en el gen de la IL28B en la infecció persistent amb VHC. Així doncs, en una infecció crònica del VHC, el sistema immunològic promou l'expressió de la molècula d'interferó endògena alfa en baixes quantitats, i els pacients portadors del genotip protector pel gen de la IL28B mantindran els nivells de ISGs baixos, però quan aquests es tractin amb IFN- α exògena, podran millorar i augmentar la inducció d'aquests ISGs, la qual cosa podrà fer que puguin aconseguir la resposta viral sostinguda. En canvi, quan la infecció crònica succeeix en un pacient amb genotip no responedor pel gen de la IL28B, aquest presentarà els nivells d'expressió dels ISGs elevats, però aquest fet no li suposarà una avantatge sinó un impediment, ja que a causa d'això la via de l'IFN restarà bloquejada. Quan rebi el medicament basat en IFN- α , el pacient portador del genotip de risc per la IL28B, serà incapaç d'induir l'expressió dels



ISGs necessària per l'eliminació del virus i fracassarà al tractament.

Els polimorfismes estudiats en aquest treball es situen ben a prop dels gens IL28B, IL29A i IL29, del cromosoma 19 humà, que codifiquen per proteïnes anomenades interferons de tipus III o lambda (IFN- λ). Aquestes proteïnes han estat proposades com una possible alternativa o bé com una millora al tractament actual basat en IFN- α ^{260,261}. Un estudi en fase clínica en el qual pacients infectats amb VHC se'ls havia administrat peg-IFN λ /RBV durant 4 setmanes, va revelar una rellevant acció antiviral d'aquesta combinació²⁶⁰. A més els IFN- λ , es podrien utilitzar en un futur com a medicament profilàctic després d'una exposició al VHC, donada la relació forta que s'ha demostrat que existeix, entre la IL28B i la depuració espontània del VHC. Aquests estudis sobre els polimorfismes trobats a prop o en el gen de la IL28B ens endinsen en el món de la farmaco-genètica, on la medicina és personalitzada i podem dissenyar estratègies de tractament segons el perfil de cada pacient. Així si en la clínica ens trobéssim amb un pacient amb un perfil no responedor, amb alt risc de dany hepàtic, podríem posposar el tractament actual fins que en disposéssim d'un de més eficaç i adient, o podria ser considerat candidat per rebre un transplantament de fetge d'una manera més ràpida. Per un altre banda si estiguéssim davant d'un pacient de perfil responedor, això ajudaria al pacient en la decisió de tractar-se, i per tant començar tractament d'una manera immediata, tot i sabent els greus efectes secundaris o podria fer minvar la durada del tractament com es sol fer amb els pacients infectats amb els genotips del VHC 2 o 3. Encara que són ben clars els beneficis que podem treure en la clínica d'aquests polimorfismes a prop del gen de la IL28B, és important destacar que aquests SNPs no expliquen el 100% dels casos de no resposta al tractament, i per tant és necessari explorar nous factors associats a resposta, per tal de buscar més fiabilitat o simplement poder disposar del màxim nombre de marcadors possibles per poder apropar-nos més en la predicció de la resposta. Per això en aquest treball vàrem buscar altres indicadors de resposta, i vàrem trobar que la complexitat nucleotídica de les quasiespècies de la proteasa NS3/4A com l'eficàcia d'aquesta proteïna en processar el punt de tall cel·lular CARDIF i el punt de tall viral NS5A/5B es trobaven associats a la resposta al tractament amb peg-IFN α /RBV. Amb aquesta troballa, es reafirmen els esforços de la comunitat científica enfocats cap a la de la proteasa NS3/4A, com a diana de tota una sèrie d'inhibidors, i així trobar alternatives a la teràpia amb IFN- α o millorar els seus índexs de resposta. La idea que les proteases NS3/4A dels pacients responedors, obtinguessin valors d'eficiència catalítica més òptims, tant en processar la proteïna CARDIF com el punt viral NS5A/5B,



que les provinents de pacients no responedors resulta contra intuïtiva. Tot i amb això, aquest resultat es troben en total harmonia amb els treballs recents, el quals han vist que els pacients sensibles a IFN- α exogen (responedors) estaven associats de manera inversa a alts nivells de ISGs abans de rebre la teràpia²⁶², i que en aquest fenomen, el processament de CARDIF hi estava implicat, ja que en aquest tipus de pacients es van trobar majors nivells d'aquesta proteïna processada respecte els no responedors¹⁸¹. També s'ha observat que pacients infectats amb el VHC de genotips 2 i 3, genotips amb més alts índexs de RVS que els genotips 1 o 4, presentaven més alts nivells de la proteïna processada que els genotips del VHC més virolents¹⁸¹. A més a més, com ja hem comentat amb anterioritat, individus amb el genotip de la IL28B associat a RVS, també presenten nivells baixos d'expressió dels ISGs en fetge en l'estadi previ al tractament²⁵⁷. L'activació dels ISGs endògens es creu que obstaculitza la resposta de la teràpia basada amb IFN- α , induint a un estadi refractari a la ruta de senyalització per IFN²⁶². Tanmateix, alternatives a aquesta explicació basada amb els nostres resultats no poden descartar-se perquè existeix una àmplia variació en l'expressió i en la inducció dels ISGs, entre els pacients durant la teràpia amb IFN. A més sabem que el processament de CARDIF per la proteasa NS3/4A que influeix en la ruta de senyalització del IFN, i per tant a la resposta antiviral, no és la única manera que te la proteïna d'afectar aquesta ruta, ja que és capaç també de processar un altre proteïna implicada en aquesta, TRIF¹⁷³. Per estudis anteriors realitzats en el nostre laboratori sabem que l'eficiència catalítica del complex proteic NS3/4A davant dels punts de tall virals, depèn de quin substrat tingui al davant, i per tant una mateixa proteasa podia ser molt eficient processant el punt de tall NS5A/5B i alhora defectuosa en processar el punt de tall NS4B/5A³³. En el cas dels processaments cel·lulars ens podríem trobar en la mateixa situació, una proteasa NS3 podria ser molt òptima alhora de processar CARDIF i nefasta en processar TRIF. Tot i amb això resultats preliminars, sobre eficiències catalítiques de la NS3/4A en processar la proteïna cel·lular TRIF, han demostrat resultats semblants als trobats amb CARDIF, és a dir que el processament de TRIF semblaria ser més eficient entre les proteases provinents de pacients responedors que entre els no responedors (Parera, Aparicio, *et al.* Resultats sense publicar). Cal, doncs un anàlisi més profund englobant els dos processaments per explicar el nivell d'expressió d'ISGs previs a la teràpia, i en definitiva la resposta a la teràpia basada amb IFN- α .

Un altre resultat important a destacar en el nostre estudi va ser la relació positiva trobada entre l'eficiència catalítica en processar CARDIF per part de la proteasa NS3/4A



i la conservació dels aminoàcids, tret que no va ser observat pel cas del processament del punt de tall viral NS5A/5B. Aquest fet suggeria que petits canvis en la variabilitat aminoacídica de l'enzim afectaven negativament en la seva viabilitat per processar el punt cel·lular, però en canvi pel punt viral suposaven una millora del seu "fitness". Alhora també ens vàrem trobar que les proteases NS3/4A eren molt més eficients alhora de processar el punt viral NS5A/5B que no pas el punt cel·lular CARDIF. Sembla doncs que la propietat de bloquejar el sistema immunitari via la ruta de l'IFN- α , hagi estat una adaptació aconseguida al llarg del temps on el VHC ha coevolucionat amb la raça humana.

Els nostres resultats també amplien i confirmen els estudis recents que relacionen la complexitat de les quasiespecies³⁴, i particularment les de la proteasa NS3/4A del VHC com a marcador predictiu de la resposta a IFN- α . També vàrem trobar una correlació positiva entre aquesta complexitat i la càrrega viral basal del VHC, indicant que una elevada complexitat a nivell de quasiespècies i una elevada càrrega viral VHC basal en el moment de prendre la teràpia encaminarien al pacient a la no resposta a la teràpia amb IFN- α .

Un aspecte important que també hem pogut observar en aquest treball, és la presència de mutacions associades a conferir resistència a IPs en pacients naïf per aquests inhibidors. En concret les mutacions associades a conferir resistència a IPs observades en el nostre estudi van ser: V36A, Q41R, F43S, T54A, V55A, Q80R / K, R155K / T, A156T / V, D168G / N / E, i V170A. Tres mutacions PI (V36M, V55A, Q80K) es van trobar en variants predominants, és a dir amb alta prevalença dins la quasiespècie. Les substitucions V36M i V55A van ser identificades en una mostra, mentre que la substitució Q80K va ser detectada en quatre mostres de pacients. Remarcablement, una proteasa (la mostra número 140) tenia dos resistències predominants, les mutacions: V36M i Q80K. La mutació V36M s'ha vist que confereix una moderada resistència a telaprevir, boceprevir i narlaprevir i en canvi una resistència superior a telaprevir en combinació amb una de les mutacions següents R155K o A156T²⁶³. La mutació V55A confereix una resistència moderada a boceprevir²⁶⁴. La mutació Q80K està associada a una susceptibilitat significativament reduïda a TMC-434350 i en un menor nivell a vaniprevir i danoprevir, i en una susceptibilitat tipus wild-type per a telaprevir i boceprevir²⁶⁵. Les altres mutacions associades a resistència es van observar només com a variants de baix nivell, i la majoria d'elles van ser detectats en un clon, només les mutacions Q41R i D168G es trobaven en dos clons de la mateixa mostra. Les mutacions



R155K/T i A156T/V, que s'associen a resistència a múltiples IPs²⁶⁶, incloent telaprevir i boceprevir, es van detectar en les mostres del nostre estudi. Les mutacions A156S/T/V s'associen amb una alta resistència a telaprevir i boceprevir ^{263,264}. Aquests resultats amplien els del Dr. Chary i col·laboradors ³⁶, el que confirma que les mutacions R155K/T i A156T/V són minoria en les quasiespècies de pacients no tractats prèviament amb IPs. L'ús de la tècnica de la PCR d'al·lel específic, la qual és capaç de detectar la substitució A156S/T/V en al menys 0,05 a 0,5% de la població viral, vàrem poder observar que el 65% dels pacients no tractats prèviament amb IPs presentaven almenys una variant amb mutació de resistència en aquesta posició de la proteasa NS3 (Franco *et al.* JVH 2011, en premsa). No obstant això, falta molt encara per dilucidar, si les mutacions als inhibidors de proteasa presents en nivells baixos s'associarien a un major risc a no respondre al tractament basat en IPs.

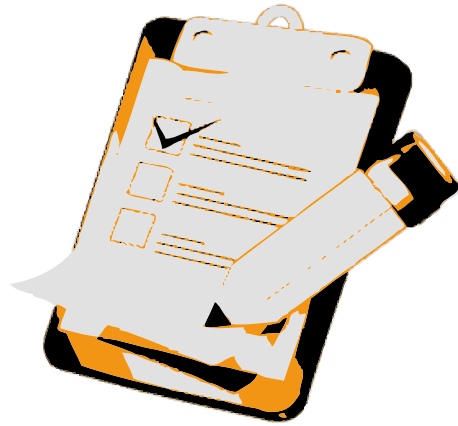
En aquesta Tesi també vàrem explorar la relació entre els genotips diferents pels polimorfismes a prop del gen de la IL28B i la diversitat i complexitat de les quasiespècies de la NS3/4A. Els nostres resultats indiquen que existeix menys diversitat i complexitat en les quasiespècies d'aquells pacients que són portadors dels al·lells de risc i per tant es podria suggerir que els portadors dels al·lells de risc pel gen de la IL28B exerceixen menys pressió selectiva sobre la proteasa NS3. Si el manteniment de menor diversitat a nivell d'aminoàcids es restringeix només en la zona genètica de la proteasa o en canvi també passa sobre altres zones del genoma del VHC, encara està per veure. Quan vàrem voler comparar el poder predictiu dels polimorfismes de la zona genètica de la IL28B respecte els factors amb marcada associació a la resposta a la teràpia amb peg-IFN α /RBV trobats en la nostra cohort de coinfectats amb el VIH-1 i el VHC, i vàrem observar que els factors genètics de l'hoste tenien més potencial alhora de predir la RVS que els nous factors virals que havíem detectat, sobretot quan vàrem analitzar l'associació de manera independent, ja que en aquest cas l'associació a la resposta estava tant vinculada al polimorfisme rs 12979860 que els altres marcadors perdien la significació. Tanmateix caldria augmentar el número de pacients per aquest tipus d'anàlisis, la nostra cohort disposava de pocs membres i a més amb un número molt reduït de pacient amb RVS. També seria molt interessant poder estudiar aquests factors virals associats a resposta trobats en aquest treball entre els pacients infectats amb altres genotips que no fossin 1, ja que per exemple entre els pacients infectats amb VHC de genotip 3 s'ha vist que presentar els al·lells protectors dels polimorfismes prop de la IL28B no afectarien en aconseguir una RVS, i potser en canvi els marcadors virals



com la diversitat o la complexitat de les quasiespècies de la proteasa NS3 o bé la seva funció catalítica, podrien marcar la tendència a obtenir la RVS.

Així doncs, amb els resultats del nostre estudi animem al món de la clínica que integri dins dels seus protocols d'anàlisi bioquímics per valorar l'estat del pacient coinfectat amb el VIH-1 i el VHC abans de ser tractat amb peg-IFN α /RBV, l'estudi genètic del gen de la IL28B, com ja s'està fent en la nostra unitat clínica, ja que serà de gran ajut per elaborar estratègies pel tractament del pacient.





CONCLUSIONS



- ✓ En la població de 173 pacients coinfectats amb el VIH-1 i el VHC de genotips 1, 3 i 4, els únics marcadors associats a la resposta al tractament contra la infecció pel VHC amb peg-IFN/RBV, van resultar ser : el genotip del VHC, la càrrega viral del VHC abans de començar el tractament i els SNPs rs8099917 i rs12979860 localitzats en la zona genètica del cromosoma humà 19 que codifica per la IL28B.
- ✓ El genotip TT pel SNP rs8099917 en la nostra cohort, donava al pacient una probabilitat del 78% d'obtenir una RVS.
- ✓ El genotip CC pel SNP rs12979860 en la nostra cohort, donava al pacient una probabilitat del 82% d'obtenir una RVS.
- ✓ Els factors predictius associats a resposta positiva per la població total de 173 pacients coinfectats amb VIH-1 i VHC, a la teràpia amb peg-IFN/RBV en ordre per la seva importància van ser:
 - i. estar infectat amb VHC de genotip 3
 - ii. presentar el genotip CC en el SNP rs 12979860
 - iii. una càrrega viral en sang basal del VHC < 600 000 UI/ml
 - iv. presentar el genotip TT en el SNP rs8099917.
- ✓ L'índex de pressió selectiva dS/dN va ser major, de manera significativa, en les quasiespècies de pacients NR que en les dels pacients amb RVS.
- ✓ Les quasiespècies dels pacients NR eren més complexes de manera significativa (alt % heterogeneïtat i alta Entropia de Shannon) que les quasiespècies provinents dels pacients amb RVS.
- ✓ L'eficiència catalítica per processar tant el factor cel·lular CARDIF com el punt de tall viral NS5A/5B, de les proteases majoritàries provinents dels pacients amb RVS, era significativament més elevada que l'eficiència catalítica de les proteases majoritàries que provenien dels pacients NR.



- ✓ En la cohort de 56 pacients coinfectats amb VIH-1 i VHC de genotip 1 s'han trobat els següents factors predictius de resposta positiva a la teràpia amb peg-IFN/RBV en ordre d'importància: presentar el genotip CC pel rs12979860, Entropia de Shannon (en nucleòtid) < 0.75 , eficiència catalítica per processar CARDIF > 0.75 , heterogeneïtat (en nucleòtid) $< 70\%$, presentar el genotip TT pel rs8099917, tenir la càrrega viral del VHC basal $< 600\ 000\text{UI/ml}$, l'índex de pressió selectiva $dS/dN < 6$, i l'eficiència catalítica per processar NS5A/5B > 1.9 .



BIBLIOGRAFIA



1. Koff, R.S. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus like antigen associated with acute illness [Science 1973;182:1026-1028]. *J. Hepatol.* **37**, 2–6 (2002).
2. Bayer, M.E., Blumberg, B.S. & Werner, B. Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's Syndrome and hepatitis. *Nature* **218**, 1057–1059 (1968).
3. Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z., Purcell, R.H., Alter, H.J. & Holland, P.V. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N. Engl. J. Med.* **292**, 767–770 (1975).
4. Choo, Q.-L. et al. Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood- Borne Non-A , Non-B Viral Hepatitis Genome. 23–26 (1988).
5. Desselberger, U. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, edited by M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo. *Virus Research* **83**, 1263 (2002).
6. Simmonds, P. et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *The Journal of general virology* **74** (Pt **11**, 2391–2399 (1993).
7. Simmonds, P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* **21**, 570–583 (1995).
8. Simmonds, P. et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **42**, 962–973 (2005).
9. Echevarria, J.M., Leon, P., Vellon, A., Pozo, F. & Avell n, A. Follow-up of the prevalence of hepatitis C virus genotypes in Spain during a nine-year period (1996-2004). *Enferm Infecc Microbiol Clin* **24**, 20–25 (2006).
10. Fang, J., Chow, V. & Lau, J. Virology of hepatitis C virus. *Clinics in Liver Disease* **1**, 493–514 (1997).
11. Manns, M.P. et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* **358**, 958–965 (2001).
12. Zhou, Y.Q. et al. Twenty-four weeks of pegylated interferon plus ribavirin effectively treat patients with HCV genotype 6a. *J. Viral Hepat.* (2010). doi:10.1111/j.1365-2893.2010.01373.x
13. Verbeeck, J. et al. HCV genotype 5: epidemiology and spread of an uncommon genotype. *Journal of clinical virology the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **41**, 170–171 (2008).
14. Eigen, M., McCaskill, J. & Schuster, P. The molecular quasi-species. *Advances in Chemical Physics* **75**, 149–263 (1989).
15. Domingo, E., Sabo, D., Taniguchi, T. & Weissmann, C. Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell* **13**, 735–744 (1978).
16. Martinez, M.A. et al. Fitness alteration of foot-and-mouth disease virus mutants: measurement of adaptability of viral quasispecies. *J. Virol.* **65**, 3954–3957 (1991).



17. Steinhauer, D.A. & Holland, J.J. Rapid evolution of RNA viruses. *Annual Review of Microbiology* **41**, 409–433 (1987).
18. Martell, M. et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J. Virol.* **66**, 3225–3229 (1992).
19. Neumann, A.U. et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-therapy. *Science* **282**, 103 (1998).
20. Bartenschlager, R. & Lohmann, V. Replication of the hepatitis C virus. *Baillieres best practice research Clinical gastroenterology* **14**, 241–254 (2000).
21. Farci, P. The Outcome of Acute Hepatitis C Predicted by the Evolution of the Viral Quasispecies. *Science* **288**, 339–344 (2000).
22. Gimenez-Barcons, M. et al. High amino acid variability within the NS5A of hepatitis C virus (HCV) is associated with hepatocellular carcinoma in patients with HCV-1b-related cirrhosis. *Hepatology* **34**, 158–167 (2001).
23. Honda, M. et al. Degree of diversity of hepatitis C virus quasispecies and progression of liver disease. *Hepatology* **20**, 1144–1151 (1994).
24. Koizumi, K. et al. Diversity of quasispecies in various disease stages of chronic hepatitis C virus infection and its significance in interferon treatment. *Hepatology* **22**, 30–35 (1995).
25. Okada, S., Akahane, Y., Suzuki, H., Okamoto, H. & Mishiro, S. The degree of variability in the amino terminal region of the E2/NS1 protein of hepatitis C virus correlates with responsiveness to interferon therapy in viremic patients. *Hepatology* **16**, 619–624 (1992).
26. Pawlotsky, J.-M. et al. Evolution of the hepatitis C virus second envelope protein hypervariable region in chronically infected patients receiving alpha interferon therapy. *J. Virol.* **73**, 6490–6499 (1999).
27. Pawlotsky, J.-M. et al. Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J. Virol.* **72**, 2795–2805 (1998).
28. Polyak, S.J., Faulkner, G., Carithers JR, R.L., Corey, L. & Gretch, D.R. Assessment of hepatitis C virus quasispecies heterogeneity by gel shift analysis: correlation with response to interferon therapy. *J Infect Dis* **175**, 1101–1107 (1997).
29. Polyak, S.J. et al. Evolution of hepatitis C virus quasispecies in hypervariable region 1 and the putative interferon sensitivity-determining region during interferon therapy and natural infection. *J. Virol.* **72**, 4288–4296 (1998).
30. Enomoto, N. et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N. Engl. J. Med.* **334**, 77–81 (1996).
31. Zeuzem, S., Lee, J.H. & Roth, W.K. Mutations in the nonstructural 5A gene of European hepatitis C virus isolates and response to interferon alfa. *Hepatology* **25**, 740–744 (1997).
32. Aslan, N. et al. The mutations in ISDR of NS5A gene are not associated with



- response to interferon treatment in Turkish patients with chronic hepatitis C virus genotype 1b infection. *The Turkish journal of gastroenterology the official journal of Turkish Society of Gastroenterology* **15**, 21–26 (2004).
33. Franco, S. et al. Characterization and evolution of NS5A quasispecies of hepatitis C virus genotype 1b in patients with different stages of liver disease. *J. Med. Virol.* **71**, 195–204 (2003).
 34. Sherman, K.E. et al. Hepatitis C virus (HCV) quasispecies complexity and selection in HCV/HIV-coinfected subjects treated with interferon-based regimens. *J. Infect. Dis.* **201**, 712–719 (2010).
 35. Shindo, M. et al. The clinical significance of changes in genetic heterogeneity of the hypervariable region 1 in chronic hepatitis C with interferon therapy. *Hepatology* **24**, 1018–1023 (1996).
 36. Chary, A. et al. Impact of interferon-ribavirin treatment on hepatitis C virus (HCV) protease quasispecies diversity in HIV- and HCV-coinfected patients. *J. Infect. Dis.* **202**, 889–893 (2010).
 37. Baldo, V., Baldovin, T., Trivello, R. & Floreani, A. Epidemiology of HCV infection. *Current Pharmaceutical Design* **14**, 1646–1654 (2008).
 38. Perico, N., Cattaneo, D., Bikbov, B. & Remuzzi, G. Hepatitis C infection and chronic renal diseases. *Clinical journal of the American Society of Nephrology CJASN* **4**, 207–220 (2009).
 39. World Health Organization, W. Global distribution of hepatitis A, B and C. *Weekly epidemiological Research* 45–48
 40. Bruguera, M. & Forns, X. Hepatitis C in Spain. *Medicina Clinica* **127**, 113–117 (2006).
 41. Solà, R. et al. Prevalence of hepatitis B and hepatitis C viruses in different counties of Catalonia, Spain: cross-sectional study. *Medicina Clinica* **119**, 90–95 (2002).
 42. Pellicano, R. et al. The epidemiology of hepatitis C virus infection. An update for clinicians. *Minerva Gastroenterologica e Dietologica* **50**, 1–7 (2004).
 43. Dalgard, O. et al. Risk factors for hepatitis C among injecting drug users in Oslo. *Tidsskrift for den Norske laegeforening tidsskrift for praktisk medicin ny raeke* **129**, 101–104 (2009).
 44. Ibáñez, A. et al. Prevalence and genotypes of GB virus C/hepatitis G virus (GBV-C/HGV) and hepatitis C virus among patients infected with human immunodeficiency virus: evidence of GBV-C/HGV sexual transmission. *J. Med. Virol.* **55**, 293–299 (1998).
 45. Pérez Cachafeiro, S. et al. Decrease in serial prevalence of coinfection with Hepatitis C virus among HIV-infected patients in Spain, 1997-2006. *CLIN INFECT DIS* **48**, 1467–1470 (2009).
 46. Loras, C. et al. Prevalence and factors related to hepatitis B and C in inflammatory bowel disease patients in Spain: a nationwide, multicenter study. *American Journal of Gastroenterology* **104**, 57–63 (2009).
 47. Agarwal, S.K., Dash, S.C., Gupta, S. & Pandey, R.M. Hepatitis C virus infection in



- haemodialysis: the “no-isolation” policy should not be generalized. *Nephron Clinical Practice* **111**, c133–c140 (2009).
48. Thompson, N.D. et al. Healthcare-associated hepatitis C virus transmission among patients in an abdominal organ transplant center. *Transplant infectious disease an official journal of the Transplantation Society* **11**, 324–329 (2009).
 49. Forns, X. et al. Hospital admission is a relevant source of hepatitis C virus acquisition in Spain. *October* **48**, 20–27 (2008).
 50. Pellicano, R. et al. Risk factors for HCV infection. Focus on ethnic and cultural characteristics. *Minerva Gastroenterologica e Dietologica* **55**, 159–162 (2009).
 51. Mortimer, P.P. Sexual transmission of hepatitis C virus. *BMJ British Medical Journal* **301**, 783 (1991).
 52. Ruf, M. et al. Setting up an enhanced surveillance of newly acquired hepatitis C infection in men who have sex with men: a pilot in London and South East region of England. *Euro surveillance bulletin europeen sur les maladies transmissibles European communicable disease bulletin* **13**, 19042 (2008).
 53. Badridze, N., Chkhartishvili, N., Abutidze, A., Gatsereia, L. & Sharvadze, L. Prevalence of hepatitis B and C among HIV positive patients in Georgia and its associated risk factors. *Georgian Medical News* 54–60 (2008).
 54. Indolfi, G. & Resti, M. Perinatal transmission of hepatitis C virus infection. *J. Med. Virol.* **81**, 836–843 (2009).
 55. Netyô, A., Lengyel, G. & Fehér, J. Intrafamilial hepatitis C virus infection. *Orvosi Hetilap* **149**, 517–520 (2008).
 56. McCaughan, G.W. et al. Clinical assessment and incidence of hepatitis C RNA in 50 consecutive RIBA-positive volunteer blood donors. *The Medical journal of Australia* **157**, 231–233 (1992).
 57. Thimme, R. et al. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *The Journal of Experimental Medicine* **194**, 1395–1406 (2001).
 58. Farci, P. et al. Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure. *N. Engl. J. Med.* **335**, 631–634 (1996).
 59. Missale, G. et al. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *Journal of Clinical Investigation* **98**, 706–714 (1996).
 60. Cooper, S. et al. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* **10**, 439–449 (1999).
 61. Gerlach, J.T. et al. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* **117**, 933–941 (1999).
 62. Bowen, D.G. & Walker, C.M. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* **436**, 946–952 (2005).
 63. Alter, M.J. et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N. Engl. J. Med.* **341**, 556–562 (1999).
 64. Kenny-Walsh, E. Clinical outcomes after hepatitis C infection from



- contaminated anti-D immune globulin. Irish Hepatology Research Group. *N. Engl. J. Med.* **340**, 1228–33. ST – Clinical outcomes after hepatitis C (1999).
65. Villano, S.A., Vlahov, D., Nelson, K.E., Cohn, S. & Thomas, D.L. Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. *Hepatology* **29**, 908–914 (1999).
66. Howell, C., Jeffers, L. & Hoofnagle, J.H. Hepatitis C in African Americans: summary of a workshop. *Gastroenterology* **119**, 1385–1396 (2000).
67. Wiley, T.E., McCarthy, M., Breidi, L. & Layden, T.J. Impact of alcohol on the histological and clinical progression of hepatitis C infection. *Hepatology* **28**, 805–809 (1998).
68. Poynard, T., Bedossa, P. & Opolon, P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* **349**, 825–832 (1997).
69. Benhamou, Y. et al. Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multivirc Group. *Hepatology* **30**, 1054–1058 (1999).
70. Bjørø, K., Frøland, S.S., Yun, Z., Samdal, H.H. & Haaland, T. Hepatitis C infection in patients with primary hypogammaglobulinemia after treatment with contaminated immune globulin. *N. Engl. J. Med.* **331**, 1607–1611 (1994).
71. D'Souza, R., Sabin, C.A. & Foster, G.R. Insulin resistance plays a significant role in liver fibrosis in chronic hepatitis C and in the response to antiviral therapy. *American Journal of Gastroenterology* **100**, 1509–1515 (2005).
72. Fattovich, G. et al. Morbidity and Mortality in Compensated Cirrhosis Type C. *Gastroenterology* 463–472 (1997).
73. Castells, L. et al. Long interval between HCV infection and development of hepatocellular carcinoma. *Liver* **15**, 159–163 (1995).
74. Gordon, S.C., Bayati, N. & Silverman, A.L. Clinical outcome of hepatitis C as a function of mode of transmission. *Hepatology* **28**, 562–567 (1998).
75. Fassio, E. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Annals of hepatology official journal of the Mexican Association of Hepatology* **9 Suppl**, 119–122 (2010).
76. Chen, S.L. & Morgan, T.R. The Natural History of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *Int J Med Sci* **3**, 47–52 (2006).
77. Tedaldi, E.M. et al. Prevalence and characteristics of hepatitis C virus coinfection in a human immunodeficiency virus clinical trials group: the Terry Beinr Community Programs for Clinical Research on AIDS. **36**, 1313–1317 (2003).
78. Buffet-Janvresse, C. et al. HIV and HCV co-infection: situation at six French university hospitals in the year 2000. *J. Med. Virol.* **69**, 7–17 (2003).
79. Troisi, C.L. et al. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. *Blood* **81**, 412–418 (1993).
80. Quaranta, J.F. et al. Prevalence of antibody to hepatitis C virus (HCV) in HIV-1-infected patients (nice SEROCO cohort). *J. Med. Virol.* **42**, 29–32 (1994).



81. Shiao, J., Guo, L. & McLaws, M.L. Estimation of the risk of bloodborne pathogens to health care workers after a needlestick injury in Taiwan. *American Journal of Infection Control* **30**, 15–20 (2002).
82. Cardo, D.M. et al. A case-control study of HIV seroconversion in health care workers after percutaneous exposure. Centers for Disease Control and Prevention Needlestick Surveillance Group. *N. Engl. J. Med.* **337**, 1485–1490 (1997).
83. Eyster, M.E. et al. Heterosexual co-transmission of hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV). *AnnInternMed* **115**, 764–768 (1991).
84. Landesman, S.H. et al. Obstetrical factors and the transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to child. *New England Journal of Medicine* **334**, 1617–1623 (1996).
85. Torriani, F.J. & Soriano, V. Chronic Hepatitis C in HIV-infected Individuals. *Aids Reviews* **2**, 168–177 (2000).
86. Tornero, C. et al. Effect of HAART on HCV viral load in the first three years of follow-up. *Medicina Clinica* **121**, 408–409 (2003).
87. Torre, D. et al. Evolution of coinfection with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus in patients treated with highly active antiretroviral therapy. *CLIN INFECT DIS* **33**, 1579–1585 (2001).
88. Ragni, M.V. & Bontempo, F.A. Increase in hepatitis C virus load in hemophiliacs during treatment with highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* **180**, 2027–2029 (1999).
89. Puoti, M. et al. Liver damage and kinetics of hepatitis C virus and human immunodeficiency virus replication during the early phases of combination antiretroviral treatment. *JInfectDis* **181**, 2033–2036 (2000).
90. Fialaire, P. et al. Sustained disappearance of hepatitis C viremia in patients receiving protease inhibitor treatment for human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* **180**, 574–575 (1999).
91. Pérez-Olmeda, M., García-Samaniego, J. & Soriano, V. Hepatitis C viraemia in HIV-HCV co-infected patients having immune restoration with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* **14**, 212 (2000).
92. Mohsen, A.H. et al. Impact of human immunodeficiency virus (HIV) infection on the progression of liver fibrosis in hepatitis C virus infected patients. *Gut* **52**, 1035–1040 (2003).
93. Martín-Carbonero, L. 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* **38**, 128–133 (2004).
94. Soto, B. et al. Human immunodeficiency virus infection modifies the natural history of chronic parenterally-acquired hepatitis C with an unusually rapid progression to cirrhosis. *J. Hepatol.* **26**, 1–5 (1997).
95. Bruno, R., Sacchi, P., Filice, C., Puoti, M. & Filice, G. Hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients with chronic hepatitis: an emerging issue. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **30**, 535–536 (2002).



96. Zoulim, F., Chevallier, M., Maynard, M. & Trepo, C. Clinical consequences of hepatitis C virus infection. *Reviews in Medical Virology* **13**, 57–68 (2003).
97. Woitas, R.P. et al. Antigen-specific cytokine response to hepatitis C virus core epitopes in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *AIDS* **13**, 1313–1322 (1999).
98. Housset, C. et al. Presence of HIV-1 in human parenchymal and non-parenchymal liver cells in vivo. *J. Hepatol.* **19**, 252–258 (1993).
99. Kaito, M. et al. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *The Journal of general virology* **75 (Pt 7)**, 1755–1760 (1994).
100. Rosenberg, S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *Journal of Molecular Biology* **313**, 451–464 (2001).
101. Pavlović, D. et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Letters* **535**, 34–38 (2003).
102. Giannini, C. & Brechot, C. Hepatitis C virus biology. *Cell Death and Differentiation* **10 Suppl 1**, S27–S38 (2003).
103. Reed, K.E. & Rice, C.M. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **242**, 55–84 (2000).
104. Brass, V., Moradpour, D. & Blum, H.E. Molecular Virology of Hepatitis C Virus (HCV): 2006 Update. *Int J Med Sci* **3**, 29–34 (2006).
105. Tellinghuisen, T.L. & Rice, C.M. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Current Opinion in Microbiology* **5**, 419–427 (2002).
106. Branch, A.D., Stump, D.D., Gutierrez, J.A., Eng, F. & Walewski, J.L. The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Seminars in Liver Disease* **25**, 105–117 (2005).
107. Walewski, J.L., Keller, T.R., Stump, D.D. & Branch, A.D. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *Rna New York Ny* **7**, 710–721 (2001).
108. Dubuisson, J. et al. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J. Virol.* **68**, 6147–6160 (1994).
109. Falkowska, E., Kajumo, F., Garcia, E., Reinus, J. & Dragic, T. Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Glycans Modulate Entry, CD81 Binding, and Neutralization. *J. Virol.* **81**, 8072–8079 (2007).
110. Goffard, A. et al. Role of N-Linked Glycans in the Functions of Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins. *Annales de Biologie Clinique* **79**, 237–246 (2005).
111. Helle, F. et al. The Neutralizing Activity of Anti-Hepatitis C Virus Antibodies Is Modulated by Specific Glycans on the E2 Envelope Protein. *J. Virol.* **81**, 8101–8111 (2007).
112. Lavie, M., Goffard, A. & Dubuisson, J. Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. *Current Issues in Molecular Biology* **9**, 71–86



- (2007).
113. Griffin, S. et al. Genotype-dependent sensitivity of hepatitis c virus to inhibitors of the p7 ion channel. *Hepatology* **48**, 1779–1790 (2008).
 114. Premkumar, A., Wilson, L., Ewart, G.D. & Gage, P.W. Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride. *FEBS Letters* **557**, 99–103 (2004).
 115. Grakoui, A., McCourt, D.W., Wychowski, C., Feinstone, S.M. & Rice, C.M. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J. Virol.* **67**, 2832–2843 (1993).
 116. Grakoui, A., McCourt, D.W., Wychowski, C., Feinstone, S.M. & Rice, C.M. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 10583–10587 (1993).
 117. Lohmann, V. et al. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**, 110–113 (1999).
 118. Phan, T., Beran, R.K.F., Peters, C., Lorenz, I.C. & Lindenbach, B.D. Hepatitis C Virus NS2 Protein Contributes to Virus Particle Assembly via Opposing Epistatic Interactions with the E1-E2 Glycoprotein and NS3-NS4A Enzyme Complexes. *J. Virol.* **83**, 8379–8395 (2009).
 119. Tai, C.L., Chi, W.K., Chen, D.S. & Hwang, L.H. The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J. Virol.* **70**, 8477–8484 (1996).
 120. Gallinari, P. et al. Modulation of hepatitis C virus NS3 protease and helicase activities through the interaction with NS4A. *Biochemistry* **38**, 5620–5632 (1999).
 121. Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J. & Jacobsen, H. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J. Virol.* **68**, 5045–5055 (1994).
 122. Tomei, L., Failla, C., Vitale, R.L., Bianchi, E. & De Francesco, R. A central hydrophobic domain of the hepatitis C virus NS4A protein is necessary and sufficient for the activation of the NS3 protease. *The Journal of general virology* **77 (Pt 5)**, 1065–1070 (1996).
 123. Lin, C., Thomson, J.A. & Rice, C.M. A central region in the hepatitis C virus NS4A protein allows formation of an active NS3-NS4A serine proteinase complex in vivo and in vitro. *J. Virol.* **69**, 4373–4380 (1995).
 124. Elazar, M., Liu, P., Rice, C.M. & Glenn, J.S. An N-Terminal Amphipathic Helix in Hepatitis C Virus (HCV) NS4B Mediates Membrane Association , Correct Localization of Replication Complex Proteins , and HCV RNA Replication. *Society* **78**, 11393–11400 (2004).
 125. Appel, N. et al. Essential Role of Domain III of Nonstructural Protein 5A for Hepatitis C Virus Infectious Particle Assembly. *PLoS Pathogens* **4**, 14 (2008).
 126. Masaki, T. et al. Interaction of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A with Core Protein Is Critical for the Production of Infectious Virus Particles. *J. Virol.*



- 82**, 7964–7976 (2008).
127. Tellinghuisen, T.L., Foss, K.L. & Treadaway, J. Regulation of Hepatitis C Virion Production via Phosphorylation of the NS5A Protein. *PLoS Pathogens* **4**, 17 (2008).
 128. Evans, M.J., Rice, C.M. & Goff, S.P. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 13038–13043 (2004).
 129. Neddermann, P. et al. Reduction of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation by Selective Inhibition of Cellular Kinases Activates Viral RNA Replication in Cell Culture. *J. Virol.* **78**, 13306–13314 (2004).
 130. Reed, K.E., Gorbalenya, A.E. & Rice, C.M. The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J. Virol.* **72**, 6199–6206 (1998).
 131. Lohmann, V., Körner, F., Herian, U. & Bartenschlager, R. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J. Virol.* **71**, 8416–8428 (1997).
 132. Bartosch, B., Dubuisson, J. & Cosset, F.-L. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *The Journal of Experimental Medicine* **197**, 633–642 (2003).
 133. Drummer, H.E., Maerz, A. & Pountourios, P. Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *FEBS Letters* **546**, 385–390 (2003).
 134. Pileri, P. Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *Science* **282**, 938–941 (1998).
 135. Scarselli, E. et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *The EMBO Journal* **21**, 5017–5025 (2002).
 136. Clayton, R.F. et al. Analysis of Antigenicity and Topology of E2 Glycoprotein Present on Recombinant Hepatitis C Virus-Like Particles. *J. Virol.* **76**, 7672–7682 (2002).
 137. Higginbottom, A. et al. Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J. Virol.* **74**, 3642–3649 (2000).
 138. Garry, R.F. & Dash, S. Proteomics computational analyses suggest that hepatitis C virus E1 and pestivirus E2 envelope glycoproteins are truncated class II fusion proteins. *Virology* **307**, 255–265 (2003).
 139. Lavillette, D. et al. Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *J. Virol.* **81**, 8752–8765 (2007).
 140. Russell, R.S. et al. Mutational analysis of the hepatitis C virus E1 glycoprotein in retroviral pseudoparticles and cell-culture-derived H77/JFH1 chimeric infectious virus particles. *J. Viral Hepat.* **16**, 621–632 (2009).
 141. Agnello, V., Ábel, G., Elfahal, M., Knight, G.B. & Zhang, Q.-X. Hepatitis C virus



- and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 12766–12771 (1999).
142. Evans, M.J. et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**, 801–805 (2007).
143. Liu, S. et al. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J. Virol.* **83**, 2011–2014 (2009).
144. Blanchard, E. et al. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* **80**, 6964–6972 (2006).
145. Egger, D. et al. Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. *J. Virol.* **76**, 5974–5984 (2002).
146. Gosert, R. et al. Identification of the Hepatitis C Virus RNA Replication Complex in Huh-7 Cells Harboring Subgenomic Replicons. *J. Virol.* **77**, 5487–5492 (2003).
147. Bartenschlager, R. & Sparacio, S. Hepatitis C virus molecular clones and their replication capacity in vivo and in cell culture. *Virus Research* **127**, 195–207 (2007).
148. Targett-Adams, P., Boulant, S. & McLauchlan, J. Visualization of double-stranded RNA in cells supporting hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* **82**, JVI.01565–07 (2008).
149. Wakita, T. et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Medicine* **11**, 791–796 (2005).
150. Zhong, J. et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 9294–9299 (2005).
151. Brass, V., Gosert, R. & Moradpour, D. Investigation of the hepatitis C virus replication complex. *Methods In Molecular Biology Clifton Nj* **510**, 195–209 (2009).
152. Raney, K.D., Sharma, S.D., Moustafa, I.M. & Cameron, C.E. Hepatitis C virus non-structural protein 3 (HCV NS3): a multifunctional antiviral target. *The Journal of Biological Chemistry* **285**, 22725–22731 (2010).
153. Yao, N., Reichert, P., Taremi, S.S., Prorise, W.W. & Weber, P.C. Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase. *Structure London England 1993* **7**, 1353–1363 (1999).
154. Hahm, B. et al. NS3-4A of hepatitis C virus is a chymotrypsin-like protease. *J. Virol.* **69**, 2534–2539 (1995).
155. Schregel, V., Jacobi, S., Penin, F. & Tautz, N. Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 5342–5347 (2009).
156. Belon, C.A. & Frick, D.N. Helicase inhibitors as specifically targeted antiviral therapy for hepatitis C. *Future Virology* **4**, 277–293 (2009).
157. Murray, C.L., Jones, C.T. & Rice, C.M. Architects of assembly: roles of



- Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nature Reviews Microbiology* **6**, 699–708 (2008).
158. Da Silveira, N.J. et al. Molecular models of NS3 protease variants of the Hepatitis C virus. *BMC StructBiol* **5**, 1 (2005).
159. De Francesco, R., Tomei, L., Altamura, S., Summa, V. & Migliaccio, G. Approaching a new era for hepatitis C virus therapy: inhibitors of the NS3-4A serine protease and the NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Res.* **58**, 1–16 (2003).
160. Brass, V. et al. Structural determinants for membrane association and dynamic organization of the hepatitis C virus NS3-4A complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 14545–14550 (2008).
161. Lindenbach, B.D. et al. The C Terminus of Hepatitis C Virus NS4A Encodes an Electrostatic Switch That Regulates NS5A Hyperphosphorylation and Viral Replication. *J. Virol.* **81**, 8905–8918 (2007).
162. Pietschmann, T., Lohmann, V., Rutter, G. & Kurpanek, K. Characterization of Cell Lines Carrying Self-Replicating Hepatitis C Virus RNAs. *Society* **75**, 1252–1264 (2001).
163. Pizzi, E. et al. Molecular model of the specificity pocket of the hepatitis C virus protease: implications for substrate recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 888–892 (1994).
164. Zhang, R. et al. Probing the substrate specificity of hepatitis C virus NS3 serine protease by using synthetic peptides. *J. Virol.* **71**, 6208–6213 (1997).
165. Sen, G.C. Viruses and interferons. **55**, 255–281 (2001).
166. Yoneyama, M. et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunology* **5**, 730–737 (2004).
167. Li, K., Chen, Z., Kato, N., Gale, M. & Lemon, S.M. Distinct poly(I-C) and virus-activated signaling pathways leading to interferon-beta production in hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 16739–16747 (2005).
168. Richmond, A. Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nature Reviews Immunology* **2**, 664–674 (2002).
169. Wang, C. et al. Alpha interferon induces distinct translational control programs to suppress hepatitis C virus RNA replication. *Society* **77**, 3898–3912 (2003).
170. Honda, K. et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**, 772–777 (2005).
171. Silverman, A.L. et al. Alfa interferon treatment of hepatitis C virus RNA-positive patients with normal or near-normal alanine aminotransferase levels. *American Journal of Gastroenterology* **92**, 1793–1795 (1997).
172. Gale, M. & Foy, E.M. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* **436**, 939–946 (2005).
173. Li, K. et al. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc. Natl. Acad. Sci.*



- U.S.A.* **102**, 2992–2997 (2005).
174. Meylan, E. et al. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**, 1167–1172 (2005).
175. Brenndörfer, E.D. et al. Nonstructural 3/4A protease of hepatitis C virus activates epithelial growth factor-induced signal transduction by cleavage of the T-cell protein tyrosine phosphatase. *Hepatology* **49**, 1810–1820 (2009).
176. Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.-K. & Chen, Z.J. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**, 669–682 (2005).
177. Kawai, T. et al. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol.* **6**, 981–8 ST – IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. (2005).
178. Xu, L.-G. et al. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol. Cell* **19**, 727–740 (2005).
179. Dixit, E. et al. Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell* **141**, 668–681 (2010).
180. Loo, Y.-M. et al. Viral and therapeutic control of IFN-beta promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 6001–6006 (2006).
181. Bellecave, P. et al. Cleavage of mitochondrial antiviral signaling protein in the liver of patients with chronic hepatitis C correlates with a reduced activation of the endogenous interferon system. *Hepatology* **51**, 1127–1136 (2009).
182. Morikawa, K. et al. Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus. *J. Viral Hepat.* **18**, 305–315 (2011).
183. Hoofnagle, J.H. et al. Treatment of Chronic Non-A, Non-B Hepatitis with Recombinant Human Alpha Interferon. *New England Journal of Medicine* **315**, 1575–1578 (1986).
184. Di Bisceglie, A.M. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of recombinant human alpha-interferon therapy for chronic non-A, non-B (type C) hepatitis. *J. Hepatol.* **11 Suppl 1**, S36–42 (1990).
185. Davis, G.L. et al. Treatment of chronic hepatitis C with recombinant alpha-interferon. A multicentre randomized, controlled trial. The Hepatitis Interventional Therapy Group. *J. Hepatol.* **11 Suppl 1**, S31–5 (1990).
186. Dusheiko, G. et al. Ribavirin treatment for patients with chronic hepatitis C: results of a placebo-controlled study. *J. Hepatol.* **25**, 591–598 (1996).
187. Schalm, S.W. et al. Ribavirin enhances the efficacy but not the adverse effects of interferon in chronic hepatitis C. Meta-analysis of individual patient data from European centers. *J. Hepatol.* **26**, 961–966 (1997).
188. McHutchison, J.G. et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1485–1492 (1998).
189. Davis, G.L. et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis



- Interventional Therapy Group. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1493–1499 (1998).
190. Lindsay, K.L. et al. A randomized, double-blind trial comparing pegylated interferon alfa-2b to interferon alfa-2b as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* **34**, 395–403 (2001).
 191. Zeuzem, S. et al. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N. Engl. J. Med.* **343**, 1666–1672 (2000).
 192. Heathcote, E.J. et al. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* **343**, 1673–1680 (2000).
 193. Fried, M.W. et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* **347**, 975–982 (2002).
 194. Di Bisceglie, A.M. & Hoofnagle, J.H. Optimal therapy of hepatitis C. *Hepatology* **36**, S121–7 (2002).
 195. Fried, M.W. Side effects of therapy of hepatitis C and their management. *Hepatology* **36**, S237–44 (2002).
 196. Manns, M.P., Wedemeyer, H. & Cornberg, M. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut* **55**, 1350–1359 (2006).
 197. Yamada, G. et al. Efficacy of interferon alfa therapy in chronic hepatitis C patients depends primarily on hepatitis C virus RNA level. *Hepatology* **22**, 1351–1354 (1995).
 198. Zeuzem, S. et al. Quantification of the initial decline of serum hepatitis C virus RNA and response to interferon alfa. *Hepatology* **27**, 1149–1156 (1998).
 199. Layden-Almer, J.E., Ribeiro, R.M., Wiley, T., Perelson, A.S. & Layden, T.J. Viral dynamics and response differences in HCV-infected African American and white patients treated with IFN and ribavirin. *Hepatology* **37**, 1343–1350 (2003).
 200. Hayashi, J. et al. Age-related response to interferon alfa treatment in women vs men with chronic hepatitis C virus infection. *Arch. Intern. Med.* **158**, 177–181 (1998).
 201. Ginaldi, L., Loreto, M.F., Corsi, M.P., Modesti, M. & De Martinis, M. Immunosenescence and infectious diseases. *Microbes Infect.* **3**, 851–857 (2001).
 202. McCullough, A.J. Obesity and its nurturing effect on hepatitis C. *Hepatology* **38**, 557–559 (2003).
 203. Bressler, B. High body mass index is an independent risk factor for nonresponse to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *Hepatology* **38**, 639–644 (2003).
 204. Hickman, I.J. et al. Effect of weight reduction on liver histology and biochemistry in patients with chronic hepatitis C. *Gut* **51**, 89–94 (2002).
 205. Banner, B.F., Barton, A.L., Cable, E.E., Smith, L. & Bonkovsky, H.L. A detailed analysis of the Knodell score and other histologic parameters as predictors of response to interferon therapy in chronic hepatitis C. *Mod. Pathol.* **8**, 232–238 (1995).
 206. Myers, R.P., Patel, K., Pianko, S., Poynard, T. & McHutchison, J.G. The rate of



- fibrosis progression is an independent predictor of the response to antiviral therapy in chronic hepatitis C. *J. Viral Hepat.* **10**, 16–22 (2003).
207. Olynyk, J.K. et al. Hepatic iron concentration as a predictor of response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **108**, 1104–1109 (1995).
208. Sievert, W. et al. Hepatic iron overload does not prevent a sustained virological response to interferon-alpha therapy: a long term follow-up study in hepatitis C-infected patients with beta thalassemia major. *Am J Gastroenterol* **97**, 982–987 (2002).
209. Merchante, N. et al. Insulin resistance is not a relevant predictor of sustained virological response to pegylated interferon plus ribavirin in HIV/HCV co-infected patients. *J. Hepatol.* **50**, 684–692 (2009).
210. Mochida, S., Ohnishi, K., Matsuo, S., Kakihara, K. & Fujiwara, K. Effect of alcohol intake on the efficacy of interferon therapy in patients with chronic hepatitis C as evaluated by multivariate logistic regression analysis. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **20**, 371A–377A (1996).
211. Ohnishi, K. et al. Interferon therapy for chronic hepatitis C in habitual drinkers: comparison with chronic hepatitis C in infrequent drinkers. *Am J Gastroenterol* **91**, 1374–1379 (1996).
212. Nguyen, V.A., Chen, J., Hong, F., Ishac, E.J. & Gao, B. Interferons activate the p42/44 mitogen-activated protein kinase and JAK-STAT (Janus kinase-signal transducer and activator transcription factor) signalling pathways in hepatocytes: differential regulation by acute ethanol via a protein kinase C-dependent mechanism. *Biochem. J.* **349**, 427–434 (2000).
213. Wawrzynowicz-Syczewska, M. et al. HLA class II genotypes associated with chronic hepatitis C virus infection and response to alpha-interferon treatment in Poland. *Liver* **20**, 234–239 (2000).
214. Romero-Gomez, M. et al. HLA class I B44 is associated with sustained response to interferon + ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* **98**, 1621–1626
215. Alric, L. et al. Study of the association between major histocompatibility complex class II genes and the response to interferon alpha in patients with chronic hepatitis C infection. *Hum. Immunol.* **60**, 516–523 (1999).
216. Morita, K. et al. Expression of interferon receptor genes in the liver as a predictor of interferon response in patients with chronic hepatitis C. *J. Med. Virol.* **58**, 359–365 (1999).
217. Mizukoshi, E. et al. Serum levels of soluble interferon Alfa/Beta receptor as an inhibitory factor of interferon in the patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **30**, 1325–1331 (1999).
218. Ge, D. et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* **461**, 399–401 (2009).
219. Suppiah, V. & Moldovan, M. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- α and ribavirin therapy. *Nature Genetics* **41**, 1100–1104



- (2009).
220. Tanaka, Y. et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nature Genetics* **41**, 1105–1109 (2009).
221. Rauch, A. et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology* **138**, 1338–45, 1345.e1–7 (2010).
222. Muir, A.J. et al. Hepatitis C treatment among racial and ethnic groups in the IDEAL trial. *J. Viral Hepat.* **18**, e134–43 (2011).
223. Thomas, D.L. et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* **461**, 798–801 (2009).
224. Rallón, N.I. 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* **24**, F23–9 ST – Association of a single nucleotide pol (2010).
225. Pineda, J.A. et al. Prediction of Response to Pegylated Interferon plus Ribavirin by IL28B Gene Variation in Patients Coinfected with HIV and Hepatitis C Virus. *CLIN INFECT DIS* **51**, 788–795 (2010).
226. Balagopal, A., Thomas, D.L. & Thio, C.L. IL28B and the control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **139**, 1865–1876 (2010).
227. Schroder, K. Interferon- : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology* **75**, 163–189 (2003).
228. Kieffer, T.L., Kwong, A.D. & Picchio, G.R. Viral resistance to specifically targeted antiviral therapies for hepatitis C (STAT-Cs). *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 202–212 (2010).
229. Poordad, F., McCone, J. & Bacon, B. Boceprevir (BOC) combined with peginterferon alfa-2b/ribavirin (P/R) for treatment-naïve patients with hepatitis C virus (HCV) genotype 1: SPRINT-2 final results. *Hepatology* 402A (2010).
230. Bacon, B., Gordon, S. & Lawitz, E. HCV RESPOND-2 final results: high sustained virologic response among genotype 1 previous nonresponders and relapsers to peginterferon/ribavirin when retreated with boceprevir plus Peginterferon (peginterferon alfa-2b)/ribavirin. *Hepatology* 430A (2010).
231. Jacobson, I.M. et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2405–2416 (2011).
232. Sherman, K.E. et al. Response-Guided Telaprevir Combination Treatment for Hepatitis C Virus Infection. *New England Journal of Medicine* **365**, 1014–1024 (2011).
233. Jacobson, I., McHutchison, J. & Dusheiko, G. Telaprevir in combination with peginterferon and ribavirin in genotype 1 HCV treatment-naïve patients: final results of Phase 3 ADVANCE study. *Hepatology* 427A
234. Sherman, K.E., Flamm, S.L., Afdhal, N.H. & Nelson, D.R. Telaprevir in combination with peginterferon alfa2a and ribavirin for 24 or 48 weeks in



- treatment-naïve genotype 1 HCV patients who achieved and extended rapid viral response: final results of phase 3 ILLUMINATE study. *Hepatology* 401A
235. Zeuzem, S. et al. Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2417–2428 (2011).
236. Castéra, L. et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **128**, 343–350 (2005).
237. Solé, X., Guinó, E., Valls, J., Iñiesta, R. & Moreno, V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics (Oxford, England)* **22**, 1928–1929 (2006).
238. Microsoft SPSS software. **2010**, (2006).
239. Franco, S., Parera, M., Aparicio, E., Clotet, B. & Martínez, M.A. Genetic and catalytic efficiency structure of an HCV protease quasispecies. *Hepatology* **45**, 899–910 (2007).
240. Tamura, K. et al. MEGA5. 1–24 (2011).
241. HIV Databases. *hiv.lanl.gov* at <<http://www.hiv.lanl.gov/>>
242. Korber, B. *Computational Analysis of HIV Molecular Sequences*. 55–72 (Dordrecht, Netherlands,).
243. Kosakovsky Pond, S.L. & Frost, S.D.W. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Molecular Biology and Evolution* **22**, 1208–1222 (2005).
244. Franco, S., Parera, M., Aparicio, E., Clotet, B. & Martínez, M.A. Genetic and catalytic efficiency structure of an HCV protease quasispecies. *Hepatology* **45**, 899–910 (2007).
245. Sauer, R.T. DNA sequence of the bacteriophage gamma cI gene. *Nature* **276**, 301–302 (1978).
246. Martínez, M.A. & Clotet, B. Genetic screen for monitoring hepatitis C virus NS3 serine protease activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1760–1765 (2003).
247. Prism, G. GraphPad Prism. **5**, (2002).
248. Kuiken C, Y.K.B.L.R.R. HCV sequence data base. *Bioinformatics (2005)*, **21(3):379-84**. (2005).
249. Yusim, K. et al. Los alamos hepatitis C immunology database. *Appl. Bioinformatics* **4**, 217–225 (2005).
250. Liverton, N.J. et al. Molecular modeling based approach to potent P2-P4 macrocyclic inhibitors of hepatitis C NS3/4A protease. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 4607–4609 (2008).
251. Kronenberger, B. & Zeuzem, S. Current and future treatment options for HCV. *Annals of hepatology official journal of the Mexican Association of Hepatology* **8**, 103–112 (2009).
252. Ito, K. et al. The rs8099917 polymorphism, when determined by a suitable genotyping method, is a better predictor for response to pegylated alpha interferon/ribavirin therapy in Japanese patients than other single nucleotide



- polymorphisms associated with interleukin-28B. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1853–1860 (2011).
253. Rallón, N.I. 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* **24**, F23–9 (2010).
254. McCarthy, J.J. et al. Replicated Association Between an IL28B Gene Variant and a Sustained Response to Pegylated Interferon and Ribavirin. *Gastroenterology* **138**, 2307–2314 (2010).
255. Firmann, M. et al. The CoLaus study: a population-based study to investigate the epidemiology and genetic determinants of cardiovascular risk factors and metabolic syndrome. *BMC Cardiovasc Disord* **8**, 6 (2008).
256. HapMap Homepage. [Http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/](http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/)
257. Honda, M. et al. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **139**, 499–509 (2010).
258. Chen, L. et al. Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology* **128**, 1437–1444 (2005).
259. Feld, J.J. et al. Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: Identifying molecular pathways for treatment response. *Hepatology* **46**, 1548–1563 (2007).
260. Muir, A.J. et al. Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection. *Hepatology* **52**, 822–832 (2010).
261. Dodds, M.G., Hausman, D.F. & Miller, D.M. Viral kinetic modeling during treatment with interferon lambda-1a in genotype 1 chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* **50** IS -, S342–S343 (2009).
262. Sarasin-Filipowicz, M. et al. Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 7034–7039 (2008).
263. Sarrazin, C. et al. Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. *Gastroenterology* **132**, 1767–1777 (2007).
264. Susser, S. et al. Characterization of resistance to the protease inhibitor boceprevir in hepatitis C virus-infected patients. *Hepatology* **50**, 1709–1718 (2009).
265. Bae, A. et al. Susceptibility of treatment-naive hepatitis C virus (HCV) clinical isolates to HCV protease inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 5288–5297 (2010).
266. Sarrazin, C. & Zeuzem, S. Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **138**, 447–462 (2010).





PUBLICACIONES



- Aparicio E, Parera M, Franco S, Perez- Alvarez N, Tural C, Clotet B and Martínez MA (2010). IL28B SNP rs8099917 is strongly associated with pegylated interferon- α and ribavirin therapy treatment failure in HCV/HIV-1 coinfecting patients. *PLoS one*, 5: e13771.

- Aparicio E, Franco S, Parera M, Tural C, Clotet B, Martínez MA (2011). Hepatitis C virus NS3/4A protease quasispecies diversity and catalytic efficiency influence responsiveness to peginterferon- α plus ribavirin treatment in HCV/HIV-co-infected patients. *Journal of Virology*, 85: 5961-5969.

- Castellarnau M, Aparicio E, Franco S, Parera M, Tural C, Clotet B and Martínez MA (2011). Deciphering the interleukin-28B variant that better predict pegylated interferon- α and ribavirin therapy treatment response in HCV/HIV-1 coinfecting patients. Manuscrit en preparació.



IL28B SNP rs8099917 Is Strongly Associated with Pegylated Interferon- α and Ribavirin Therapy Treatment Failure in HCV/HIV-1 Coinfected Patients

Esther Aparicio¹, Mariona Parera¹, Sandra Franco¹, Nuria Pérez-Alvarez^{2,3}, Cristina Tural², Bonaventura Clotet^{1,2}, Miguel Angel Martínez^{1*}

1 Fundació irsiCaixa, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Badalona, Barcelona, Spain, **2** Fundació de la Lluita contra la Sida, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain, **3** Statistics and Operations Research Department, Technical University of Catalonia, Barcelona, Spain

Abstract

Recent genome-wide association studies report that the SNP rs8099917, located 8.9 kb upstream of the start codon of IL28B, is associated with both disease chronicity and therapeutic response to pegIFN- α and RBV in patients infected with genotype 1 HCV. To determine the effect of rs8099917 variation on the response of HCV to therapy, we genotyped this variant in a cohort of 160 HCV/HIV-1 coinfecting patients in our clinic unit who received combined peg-IFN- α /RBV therapy. The rs8099917 T/G or G/G genotypes were observed in 56 patients (35%). Treatment failure occurred in 80% of G-allele carriers versus 48% of non-carriers ($P < 0.0001$). This result reveals that the G allele was strongly associated with treatment failure in this patient cohort. Importantly, a highly significant association was found between the G-allele and response to therapy in HCV genotype 1-infected patients ($P < 0.0001$) but not in HCV genotype 3-infected patients. Multivariate analysis (odds ratio; 95% confidence interval; P value) indicated that the rs8099917 TT genotype was a strong predictor of treatment success (5.83; 1.26–26.92; $P = 0.021$), independent of baseline plasma HCV-RNA load less than 500 000 IU/ml (4.85; 1.18–19.95; $P = 0.025$) and absence of advanced liver fibrosis (5.24; 1.20–22.91; $P = 0.025$). These results reveal the high prevalence of the rs8099917 G allele in HCV/HIV-1 coinfecting patients as well as its strong association with treatment failure in HCV genotype 1-infected patients. rs8099917 SNP genotyping may be a valid pre-treatment predictor of which patients are likely to respond to treatment in this group of difficult-to-treat HCV/HIV-infected patients.

Citation: Aparicio E, Parera M, Franco S, Pérez-Alvarez N, Tural C, et al. (2010) IL28B SNP rs8099917 Is Strongly Associated with Pegylated Interferon- α and Ribavirin Therapy Treatment Failure in HCV/HIV-1 Coinfected Patients. PLoS ONE 5(10): e13771. doi:10.1371/journal.pone.0013771

Editor: Esper Georges Kallas, University of Sao Paulo, Brazil

Received: June 22, 2010; **Accepted:** October 6, 2010; **Published:** October 29, 2010

Copyright: © 2010 Aparicio et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación, Fondo de Investigaciones Sanitarias project PI07/0098 and through "Red Temática de Investigación Cooperativa en SIDA" Grant RD06/0006. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

* E-mail: mmartinez@irsicaixa.es

Introduction

The hepatitis C virus (HCV), a positive-stranded RNA virus, is the causal agent of chronic liver infection afflicting more than 170 million people worldwide [1]. HCV infection is usually persistent, with 70–80% of patients becoming chronic carriers. After an asymptomatic period that often lasts for years, many patients develop chronic liver disease, including cirrhosis and hepatocellular carcinoma [2].

The standard of care for patients with chronic hepatitis C is pegylated interferon alpha (peg-IFN- α) in combination with ribavirin (RBV) [3]. A positive response to treatment is defined as a sustained virological response (SVR; a negative hepatitis C PCR test 6 months after cessation of therapy). The SVR rate for individuals infected with HCV genotypes 1 or 4 ranges between 40 and 50% and requires 12 months of therapy. Patients infected with HCV genotypes 2 or 3 typically achieve SVRs of nearly 75% after only 6 months of therapy [4,5,6,7]. HCV genotype is the most important predictive factor for the treatment response of patients with chronic hepatitis C; however, host factors such as age, sex, race, liver fibrosis, and obesity have also been associated with peg-IFN- α /RBV therapy outcome [8,9].

Chronic HCV infection in human immunodeficiency virus type 1- (HIV-1-) positive patients is a frequent and emerging health problem. HCV and HIV-1 are both transmitted by blood and blood products. Coinfection is therefore common in people with high exposure to blood. Hepatitis C is found in 60 to 90% of HIV-1-positive hemophiliacs and in 50 to 70% of HIV-1-positive intravenous drug users [10]. Although sexual transmission of HCV is rare, small epidemics of acute hepatitis C have been reported recently in homosexual men. In our clinic unit, nearly 50% of the HIV-1 patients are coinfecting with HCV [11]. In the highly active antiretroviral therapy (HAART) era, HCV/HIV-1 coinfection increases the risk of hospitalization and death compared with HIV-1 infection alone [12]. Importantly, standard therapy with peg-IFN- α /RBV elicits significantly lower rates of SVR in HCV/HIV-1 coinfecting patients than in HCV mono-infected individuals. Among patients infected with HCV genotypes 1 or 4, the SVR rate is only about 30%. The corresponding rate among patients infected with HCV genotype 2 or 3 is closer to 60% [13,14]. These results illustrate the difficulties in successfully treating HCV infection in HCV/HIV-1 coinfecting patients.



Four genome-wide association studies recently reported associations of several single nucleotide polymorphism (SNP) in the IL28B gene on chromosome 19, which encodes type III IFN- λ , with the response to HCV peg-IFN- α /RBV-based therapy [15,16,17,18]. Interestingly, the rs8099917 SNP was the only SNP in these four studies that was strongly associated with response to therapy, but the studies did not specifically investigate the association between IL28B variation and response to peg-IFN- α /RBV-based therapy in HCV/HIV-1 coinfecting patients. Recently, the rs12979860 SNP, also located near the IL28B gene, has been associated with HCV treatment response in HIV-1-infected patients with chronic hepatitis C due to genotypes 1 or 4 [19,20]. To directly address the role of the rs8099917 SNP in HCV treatment response in HCV/HIV-1 coinfecting patients, we genotyped 160 individuals from our clinic unit who were treated with peg-IFN- α /RBV combination therapy.

Results

rs8099917 SNP prevalence

Of the 160 patients in the study, 86 (54%) were chronically infected with HCV genotypes 1, 46 (29%) with HCV genotype 3, and 28 (17%) with HCV genotype 4 (Table 1). To genotype the rs8099917 SNP, we developed a direct sequencing PCR-based protocol. Genotyping revealed a high prevalence of G alleles (TG or GG) in our study cohort (n = 56, 35%) (Table 2). rs8099917 genotypes were in the Hardy-Weinberg equilibrium (P = 0.118). No significant associations were found between the rs8099917 SNP genotype and patient sex, age, CD4+ T cell count, HBV infection, liver enzyme levels, liver fibrosis, or HCV RNA viral load (data not shown). The proportion of the rs8099917 TT, TG, and GG genotypes were 60%, 35%, and 5% among HCV genotype 1

patients; 78%, 15%, and 7% among genotype 3 patients; and 57%, 29%, and 14% among genotype 4 patients. Genotypes 1 and 4 showed similar proportion of G alleles, 40% and 43%, respectively. Interestingly, there was a significant difference between the prevalence of G alleles in HCV genotype 3-infected patients, 22%, and the prevalence in patients infected with HCV genotypes 1 or 4 (P < 0.05, Chi-square test). The lower proportion of the G allele in genotype 3-infected patients suggested that G carriers may be less prone to be chronically infected by genotype 3 viruses or, alternatively, that the rs8099917 homozygous TT genotype is not associated with spontaneous clearance of HCV genotype 3.

rs8099917 SNP and treatment response

The clinical characteristics and HCV treatment responses of the 160 HCV/HIV-1 coinfecting patients included in the study are summarized in Table 1. Most patients were on antiretroviral therapy (159, 99.5%), and most patients had controlled HIV-1 replication (130, 81%). Sixty-seven patients (42%) responded successfully to HCV treatment (i.e. achieved SVR). The proportion of patients infected with HCV genotype 3 who achieved SVR (63%) was significantly higher than in patients infected with HCV genotypes 1 or 4 (34% and 32%, respectively) (P < 0.05, Chi-square test). A significantly higher HCV RNA viral load was observed in patients who failed treatment (P < 0.05, unpaired t test). Likewise, severe fibrosis was significantly associated with treatment failure (P < 0.05, Chi-square test) (Table 1). These three clinical parameters, HCV genotype, HCV RNA viral load, and severe fibrosis, are known to be associated with treatment response. We found no significant differences in our study cohort between those who achieved SVR and those who did not with respect to sex, age, HIV-1 viral load, liver enzymes, or CD4+ T cell count (Table 1).

Table 1. Clinical Characteristics of patients with chronic HIV-1 and HCV co-infection and treated with peg-IFN- α /RBV therapy.

	Treatment Success	Treatment Failure	P
Patients, n (%)	67 (42%)	93 (58%)	-
Age (mean \pm SEM)	48.42 \pm 0.6773	47.21 \pm 0.6283	ns
Gender, n (%)			ns
Female	24 (45%)	29 (55%)	
Male	43 (40%)	64 (60%)	
CD4+ (cell counts/mL) (mean \pm SEM)	597.9 \pm 27.82	584.6 \pm 31.85	ns
HCV genotype n (%)			<0.005
1	29 (34%)	57 (66%)	
3	29 (63%)	17 (37%)	
4	9 (32%)	19 (68%)	
Fibrosis stage n (%)			<0.05
0-1	12 (36%)	21 (64%)	
2	3 (18%)	14 (82%)	
3	1 (11%)	8 (89%)	
4	2 (9%)	21 (91%)	
ALT (U/L) (mean \pm SEM)	90.84 \pm 10.90	85.54 \pm 5.039	ns
AST (U/L) (mean \pm SEM)	60.31 \pm 6.522	62.35 \pm 3.248	ns
HCV RNA (IU/mL) (mean \pm SEM)	5.808 \pm 0.097	6.036 \pm 0.050	<0.05
Undetectable HIV-1 RNA, n (%)	55 (82%)	75 (81%)	ns

Age, Mann-Whitney U test; Gender, Chi-square test; CD4+T cell count, Mann-Whitney U test; HCV genotype Chi-square test; Fibrosis stage, Chi-square test between F0-2 and F3-4, fibrosis data was missing in 78 patients; ALT and AST, Mann-Whitney U test; HCV RNA, unpaired T test; Undetectable HIV-1, Chi-square test.
doi:10.1371/journal.pone.0013771.t001



Table 2. Association of rs8099917 SNP with response to peg-IFN α /RBV treatment.

HCV genotype	Treatment Success (SVR) n = 67 (42%)		Treatment Failure n = 93 (58%)		P value
	TT	TG or GG	TT	TG or GG	
1 n = 86 (54%)	26 (90%)	3 (10%)	26 (46%)	31 (54%)	<0.0001
3 n = 46 (29%)	23 (79%)	6 (21%)	13 (76%)	4 (24%)	ns
4 n = 28 (17%)	7 (78%)	2 (22%)	9 (47%)	10 (53%)	ns

To calculate P values (Chi-square test), patients were stratified in two groups according to host polymorphism (host rs8099917 G allele carriers (TG and GG) versus noncarriers (TT). SVR, sustained virologic response; ns, not significant, to calculate.
doi:10.1371/journal.pone.0013771.t002

We then correlated the rs8099917 SNP genotype with the HCV peg-IFN- α /RBV treatment response. The proportions of rs8099917 TT, TG, and GG genotypes were 51.5%, 41.0%, and 7.5% among patients with treatment failure, versus 83.5%, 10.5% and 6% among those with SVR. Overall, allele G carriers had a significantly higher risk of treatment failure than patients carrying the TT genotype ($P < 0.0001$, Chi-square test). This suggests that this rs8099917 SNP may predict treatment failure before peg-IFN- α /RBV therapy. When the data was stratified by HCV genotype, we found that of patients infected with HCV genotype 1, 91% of the rs8099917 G allele carriers had treatment failure (Fig. 1). Among patients infected with HCV genotype 1, the association between the rs8099917 G allele and treatment failure was highly significant ($P < 0.0001$, Chi-square test) (Table 2). Similarly, of patients infected with HCV genotype 4, 83% of the rs8099917 G allele carriers failed treatment (Fig. 1 and Table 2). The sample size of patients infected with HCV genotype 4 was small ($n = 28$), limiting our ability to detect a significant association between the G allele and treatment failure. In contrast to patients infected with HCV genotypes 1 and 4, HCV genotype 3-infected patients that failed therapy had a similar proportion of TT and TG/GG genotypes (36% and 40%, respectively) (Fig. 1). Thus for patients infected with HCV genotype 3, there was no significant association between rs8099917 SNP genotype and treatment failure (Table 2).

Next, factors associated with treatment failure as HCV genotype ($P < 0.005$), fibrosis stage ($P < 0.05$), higher pretreatment HCV RNA viral load ($P < 0.05$) and rs8099917 SNP genotype ($P < 0.0001$) (Table 1) were subjected to univariate and multivariate logistic regression analysis (odds ratio; 95% confidence interval; P value). In the univariate analyses, rs8099917 SNP genotype TT (4.73; 2.19–10.20; $P = 0.00006$), baseline HCV-RNA viral load less than 500 000 IU/ml (3.10; 1.44–6.66; $P = 0.003$), absence of severe liver fibrosis (stages F0–F2) (4.14; 1.06–16.04; $P = 0.036$) and HCV genotype 3 (3.20; 1.58–6.49; $P = 0.001$) were significantly associated with treatment success. When a multivariate model was built with the previous factors, the rs8099917 TT genotype remained a strong predictor of treatment success (5.83; 1.26–26.92; $P = 0.021$), independently of baseline plasma HCV-RNA load less than 500 000 IU/ml (4.85; 1.18–19.95; $P = 0.025$) and fibrosis stages F0–F2 (5.24; 1.20–22.91; $P = 0.025$).

Discussion

HIV-1 accelerates the course of HCV-associated liver disease. SVR after peg-IFN- α /RBV therapy in patients coinfecting with HCV/HIV-1 reduces liver-related complications and mortality [22]. However, side effect rates for anti-HCV therapy in HIV-1 coinfecting patients are very high, and premature treatment

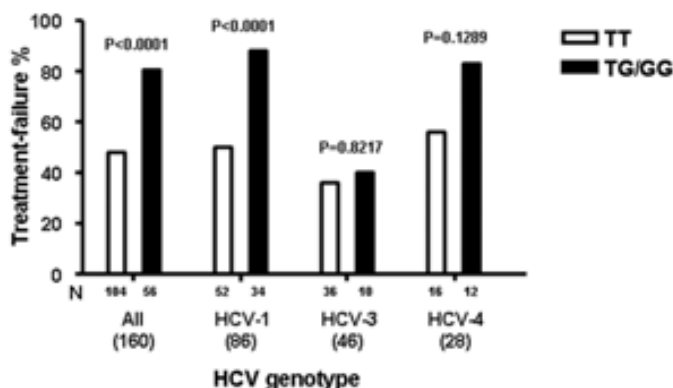


Figure 1. Rate of treatment failure according to rs8099917 SNP genotype in patients with hepatitis C virus (HCV) genotype 1, 3, and 4. P values correspond to Chi-square test.
doi:10.1371/journal.pone.0013771.g001





discontinuation due to serious adverse events ranges between 15% and 30%. Therefore, there is a need to improve treatment strategies in this specific group of coinfecting patients in order to minimize side effects and treatment discontinuations and to maximize treatment success. Therapy is particularly recommended for coinfecting patients with a high likelihood of achieving a SVR, i.e. patients infected with HCV genotype 2 or 3 and those infected with genotype 1 if the viral load is low (400 000–500 000 IU/mL) [23]. Insulin resistance and liver fibrosis tests are also recommended for patients with a low likelihood of achieving SVR.

The findings presented here confirm that HCV genotype 1 patients carrying an rs8099917 G allele have a low probability of treatment success; therefore, rs8099917 genotyping seems to be a valid pre-treatment approach for maximizing treatment success and minimizing HCV therapy-related toxicity. Coinfecting patients with HCV genotype 4 may also benefit from rs8099917 genotyping. HCV genotype 4-infected patients carrying rs8099917 G alleles had similar rates of treatment failure as HCV genotype 1-infected patients. Nevertheless, the small number of HCV genotype 4-infected patients in our study prevented us from drawing conclusions about the predictive value of rs8099917 genotyping in this group of patients. Overall, our results are in agreement with those reported by Rallon et al. and Pineda et al. [19,20], which have demonstrated a significant influence of the rs12979860 SNP, that is in linkage disequilibrium with rs8099917 [18], on the treatment response of HIV-1 patients coinfecting with HCV genotypes 1 and 4. In the 160 patients of our study cohort, the rs12979860 SNP genotype was also highly associated with treatment success ($P < 0.0001$, Chi-square test) (4.16; 2.2–8.21; $P = 0.00003$) (manuscript in preparation). However, it remains to be elucidated which of these two IL28B associated SNPs are more powerful to predict treatment success.

Similar to findings for HCV-monoinfected patients [18], the rate of treatment failure in patients infected with HCV genotype 3 was not affected by rs8099917 genotype, suggesting that the predictive value of genotyping this SNP is limited to patients infected with HCV genotypes that have low rates of treatment success. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of HCV has also been described [18,24]. In particular, the rs8099917 G allele increases the risk of progression to chronic HCV infection in both HCV-monoinfected and HCV/HIV-1 coinfecting patients [18]. We found a significantly lower proportion of rs8099917 G alleles, 22%, in genotype 3-infected patients than would be expected given the prevalence of this allele (40% and 42%, in HCV genotype 1- and 4-infected patients, respectively). The prevalence of rs8099917 G alleles in HCV genotype 3-infected patients in our study cohort was within the ranges reported in an unrelated cohort of Swiss Caucasians (17%) [25] and in the Caucasian cohort of the Human Haplotype Map project (HapMap, www.hapmap.org) (15–19%); this suggests that the rs8099917 G allele may not affect the rate of chronicity of HCV genotype 3. In contrast, the high prevalence of the rs8099917 G allele in HCV genotype 1- or 4-infected patients shows that the rs8099917 TT genotype may have a protective effect in terms of preventing the persistence of these two HCV genotypes. Since the rs8099917 G allele has been correlated with lower expression levels of IL28 genes [17], the different frequencies of the rs8099917 G allele in patients infected with different HCV genotypes may indicate that the innate immune system interacts differently with the different HCV genotypes. However, the viral factors involved in this interaction remain unknown. The IL28B, IL28A, and IL29 genes are closely related cytokine genes in chromosomal region 19q13 that encode proteins known as type III IFNs (IFN- λ s) [26]. IFN- λ has been proposed as

a possible treatment for hepatitis C [27,28]. A phase 1b study involving 4 weeks of peg-IFN- λ plus RBV given to patients with chronic HCV infection showed that this combination had antiviral activity [27]. A comparison of the efficacy of IFN- λ against non-1 HCV genotypes may provide some clues about the interaction of this virus with the innate immune system.

An important question that remains to be answered is whether the rs8099917 genotype has higher treatment predictive value in HCV/HIV-1 coinfecting patients than in HCV monoinfected individuals. Previous studies with HCV genotype 1-monoinfected patients found that the proportion of rs8099917 G allele carriers associated with treatment failure ranges from 50% to 87% [16,17,18]. In our cohort of patients coinfecting with HIV-1 and HCV genotype 1, 88% of the rs8099917 G allele carriers failed therapy with peg-IFN- α /RBV. This percentage is within the high range of previous studies and suggests that IL28B genotyping may have a higher predictive value in coinfecting patients. Further studies of cohorts with different ethnic profiles and treatment regimes will be necessary to determine whether there are differences between mono- and coinfecting patients in regard to the predictive value of IL28B genotyping.

The recent development of compounds that directly inhibit HCV replication through interaction with viral proteins will increase the options for treating HCV infection. These compounds, which are now in phase 1, 2, and 3 trials, include reagents that target the HCV nonstructural (NS) 3 protease, the NS5A protein, and the RNA-dependent RNA-polymerase NS5B [29]. Data from phase 2 studies show that SVR rates improve significantly in patients receiving triple therapy consisting of an NS3 protease plus peg-IFN- α /RBV [30]. However, triple therapy has not been effective in all patients infected with HCV genotype 1 because of side effects, non-responsiveness to peg-IFN- α or RBV, or development of NS3 protease resistance. The rate of triple therapy treatment failure may be higher in HCV/HIV-1 coinfecting patients. Most of the coinfecting patients carrying IL28B risk alleles treated with this triple therapy may respond only to the NS3 protease inhibitor. Monotherapy with specific viral inhibitors poses a higher risk of selection of resistant variants and treatment failure [31]. Taken together, these results strongly suggest that more than one specific HCV inhibitor will be needed to successfully treat patients at high risk for non-response to peg-IFN- α /RBV treatment.

Materials and Methods

Patients

A total of 160 HCV/HIV-1 coinfecting patients from our HIV clinic unit who had a standard course of treatment with peg-IFN- α /RBV with known virological response status at 24 weeks post-treatment were included in this study. Patient characteristics are shown in Table 1. Treatment success (i.e. achieved SVR) was defined as undetectable plasma HCV RNA using a sensitive RT-PCR assay 24 weeks post-treatment cessation. HCV genotype, a marker for hepatitis B virus (HBV) infection, HCV and HIV-1 viral load, CD4+ T cell count, and liver enzymes levels were determined using standard procedures. Severe fibrosis was considered in patients with a METAVIR score \geq F3. Written informed consent was obtained from each patient who participated in the study. Likewise, ethics approval was obtained from our Institutional Review Board (Hospital Universitari Germans Trias i Pujol).

DNA collection and extraction

Blood was collected into EDTA tubes following standard procedures. Genomic DNA was extracted from peripheral blood



mononuclear cells (PBMCs) using the QuickExtract DNA Extraction Protocol (EPICENTRE Biotechnologies). Briefly, 2×10^6 cells were resuspended in 0.5 mL of QuickExtract Solution, incubated at 65°C for 10 min, incubated at 98°C for 2 min, and then stored at -70°C.

rs8099917 SNP genotyping

SNP genotyping was performed by PCR amplification and direct PCR sequencing. The oligonucleotides used for PCR were rs8099917-128 (5'-GTGCATATGTTTCTGAC-3', sense) and rs8099917-556 (5'-GAGGCCCTCACCCATGC-3', antisense). The PCR amplification mixture contained 5 μ L of PBMC genomic DNA solution, 10 pmol of each oligonucleotide, 200 μ M deoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs), 2 mM MgSO₄, 1x high-fidelity PCR buffer (Invitrogen), and 0.25 U Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) in a total reaction volume of 50 μ L. Cycling parameters were one cycle of denaturation at 94°C for 2 min, 40 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, and extension at 68°C for 30 s. Extension was followed by a 7-min incubation at 68°C. The resulting 430-nt PCR product was sequenced using two flanking PCR oligonucleotides, termed rs8099917-128 and rs8099917-556, with the Big Dye v3.1 kit and the 3100 DNA sequencing system (Applied Biosystems) as described previously

[21]. Sequence alignment and editing was performed with the Sequencer version 4.1 (GeneCodes) software program. Hardy-Weinberg equilibrium was calculated using the Hardy-Weinberg Calculator software as implemented in <http://www.tufts.edu>.

Statistical analysis

The association between the rs8099917 SNP and the response to peg-IFN- α /RBV treatment was assessed by a two-sided Chi-square test. The Mann-Whitney U test, unpaired t test, and two-sided Chi-square tests used to analyze baseline covariates were performed using GraphPad Prism version 4.00 for Windows (San Diego, CA, USA). Univariate and multivariate logistic regression analyses were used to determine the predictors of treatment success. We calculated the odds ratios and 95% confidence intervals. P values less than 0.05 were considered significant. Regression analyses were performed using the STATISTICA software version 9.1 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MAM. Performed the experiments: EA MP SF MAM. Analyzed the data: EA MP SF NPA CT BC MAM. Contributed reagents/materials/analysis tools: NPA CT BC. Wrote the paper: MAM.

References

1. World Health Organization (accessed 2009) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>.
2. Chevaliez S, Pawlotsky JM (2007) Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 13: 2461-2466.
3. Kronenberger B, Zeuzem S (2009) Current and future treatment options for HCV. *Ann Hepatol* 8: 103-112.
4. Fried MW, Shiffman ML, Sterling RK, Weinstein J, Crippin J, et al. (2000) A multicenter, randomized trial of daily high-dose interferon- α 2b for the treatment of chronic hepatitis c: pretreatment stratification by viral burden and genotype. *Am J Gastroenterol* 95: 3225-3229.
5. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, et al. (2002) Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347: 975-982.
6. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, et al. (2001) Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. *Lancet* 358: 958-965.
7. Hadziyannis SJ, Sette H, Jr., Morgan TR, Balan V, Diago M, et al. (2004) Peginterferon- α 2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 140: 346-355.
8. Gao B, Hong F, Radaeva S (2004) Host factors and failure of interferon- α treatment in hepatitis C virus. *Hepatology* 39: 890-890.
9. Walsh MJ, Jonsson JR, Richardson MM, Lipka GM, Purdie DM, et al. (2006) Non-response to antiviral therapy is associated with obesity and increased hepatic expression of suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS-3) in patients with chronic hepatitis C, viral genotype 1. *Gut* 55: 529-535.
10. Rockstroh JK, Spengler U (2004) HIV and hepatitis C virus co-infection. *Lancet Infect Dis* 4: 437-444.
11. Ibanez A, Gimenez-Barcons M, Tajahuera A, Tural C, Sirera G, et al. (1998) Prevalence and genotypes of GB virus C/hepatitis G virus (GBV-C/HGV) and hepatitis C virus among patients infected with human immunodeficiency virus: evidence of GBV-C/HGV sexual transmission. *J Med Virol* 55: 293-299.
12. Chen TY, Ding EL, Seage III GR, Kim AY (2009) Meta-analysis: increased mortality associated with hepatitis C in HIV-infected persons is unrelated to HIV disease progression. *Clin Infect Dis* 49: 1605-1615.
13. Torriani FJ, Rodriguez-Torres M, Rockstroh JK, Lissen E, Gonzalez-Garcia J, et al. (2004) Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 351: 438-450.
14. Ballesteros AL, Franco S, Fuster D, Planas R, Martinez MA, et al. (2004) Early HCV dynamics on Peg-interferon and ribavirin in HIV/HCV co-infection: indications for the investigation of new treatment approaches. *AIDS* 18: 59-66.
15. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, et al. (2009) Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461: 399-401.
16. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, et al. (2009) IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- α and ribavirin therapy. *Nat Genet* 41: 1100-1104.

17. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, et al. (2009) Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 41: 1105-1109.
18. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, et al. (2010) Genetic Variation in IL28B Is Associated With Chronic Hepatitis C and Treatment Failure: A Genome-wide Association Study. *Gastroenterology* 138: 1338-1345.
19. Rallon NJ, Naggie S, Benito JM, Medrano J, Restrepo C, 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* 24: F23-29.
20. Pineda JA, Caruz A, Rivero A, Neukam K, Salas I, et al. (2010) Prediction of Response to Pegylated Interferon plus Ribavirin by IL28B Gene Variation in Patients Coinfected With HIV and Hepatitis C Virus. *Clin Infect Dis* 51: 788-795.
21. Franco S, Parera M, Aparicio E, Clotet B, Martinez MA (2007) Genetic and catalytic efficiency structure of an HCV protease quasispecies. *Hepatology* 45: 899-910.
22. Berenguer J, Alvarez-Pellicer J, Martin PM, Lopez-Aldeguer J, Von Wichmann MA, et al. (2009) 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* 50: 407-413.
23. Rockstroh JK, Bhagani S, Benhamou Y, Bruno R, Mauss S, et al. (2008) 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* 9: 82-88.
24. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, et al. (2009) Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 461: 798-801.
25. Firmann M, Mayor V, Vidal PM, Bochud M, Pecoud A, et al. (2008) The CoLauS study: a population-based study to investigate the epidemiology and genetic determinants of cardiovascular risk factors and metabolic syndrome. *BMC Cardiovasc Disord* 8: 6.
26. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, et al. (2003) IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 4: 69-77.
27. Muir A, Shiffman ML, Zaman A, Yoffe B, Lopez-Talavera JC, et al. (2009) A PHASE 1B DOSE-RANGING STUDY OF 4 WEEKS OF PEG-INTERFERON (IFN) LAMBDA (PEG-RIL-29) IN COMBINATION WITH RIBAVIRIN (RBV) IN PATIENTS WITH CHRONIC GENOTYPE 1 HEPATITIS C VIRUS (HCV) INFECTION. *Hepatology* 50: 1591.
28. Dodds MG, Hausman DF, Miller DM (2009) VIRAL KINETIC MODELING DURING TREATMENT WITH INTERFERON LAMBDA-1A IN GENOTYPE 1 CHRONIC HEPATITIS C PATIENTS. *Journal of Hepatology* 50: 942.
29. Sarrazin C, Zeuzem S (2010) Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 138: 447-462.
30. Hezode C, Forestier N, Dusheiko G, Ferenci P, Pol S, et al. (2009) Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med* 360: 1839-1850.
31. Mas A, Lopez-Galindez C, Cacho I, Gomez J, Martinez MA Unfinished stories on viral quasispecies and Darwinian views of evolution. *J Mol Biol* 397: 865-877.



Complexity and Catalytic Efficiency of Hepatitis C Virus (HCV) NS3 and NS4A Protease Quasispecies Influence Responsiveness to Treatment with Pegylated Interferon plus Ribavirin in HCV/HIV-Coinfected Patients^{∇†}

Ester Aparicio,¹ Sandra Franco,¹ Mariona Parera,¹ Cristina Andrés,¹ Cristina Tural,² Bonaventura Clotet,^{1,2} and Miguel Angel Martínez^{1*}

Fundació irsiCaixa, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain,¹ and Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Fundació de la Lluita contra la Sida, Badalona, Spain²

Received 14 February 2011/Accepted 29 March 2011

The role of the hepatitis C virus (HCV) NS3/4A protease in ablating the signaling pathway involved in the production of alpha/beta interferon (IFN- α/β) suggests a relationship between NS3/4A proteolytic activity and a patient's response to IFN-based therapy. To identify viral factors associated with the HCV treatment response, we analyzed the pretreatment NS3/4A protease gene quasispecies composition of 56 HCV genotype 1–HIV-1-coinfected patients treated in our clinic with pegylated IFN (pegIFN) plus ribavirin (RBV). The catalytic efficiency of the dominant (i.e., the most abundant) quasispecies was also assayed for Cardif cleavage and correlated with treatment outcome. A total of 1,745 clones were isolated and sequenced. Significantly less nucleotide quasispecies heterogeneity and lower Shannon entropy values were detected within the responder group ($P < 0.05$). A correlation was also found between the efficiency of NS3/4A protease Cardif cleavage and therapy outcome. Proteases from sustained responder patients were more efficient at processing Cardif (mean \pm standard error of the mean [SEM], 0.8960 ± 0.05568 ; $n = 19$) than proteases from nonresponders (mean \pm SEM, 0.7269 ± 0.05306 ; $n = 37$; $P < 0.05$). Finally, the amino acid p distance (the proportion [p] of nucleotide sites at which two sequences being compared are different) was significantly shorter in patients with an interleukin-28B (IL-28B) risk allele ($P < 0.01$), suggesting that IL-28B risk allele carriers exert a lower positive selection pressure on the NS3/4A protease. NS3/4A protease efficiency in cleaving Cardif may be associated with the pegIFN-RBV treatment response, as shown in our cohort of HIV-HCV-coinfected patients. Greater NS3/4A nucleotide heterogeneity and higher Shannon entropy values in nonresponders suggest that less HCV quasispecies complexity may favor a better response to pegIFN-RBV.

Hepatitis C virus (HCV) nonstructural protein 3 (NS3) contains a serine protease that cleaves the virus-encoded polyprotein and inactivates cellular proteins required for innate immunity. HCV NS3/4A protease functions as an antagonist of virus-induced interferon (IFN) regulatory factor 3 activation and IFN- β expression through its ability to block retinoic acid-inducible gen I (RIG-I) and Toll-like receptor 3 signaling by cleaving caspase recruitment domain adaptor-inducing IFN- β (Cardif) and Toll/interleukin-1 (IL-1) receptor domain-containing adaptor-inducing IFN proteins, respectively. NS3/4A protease activity allows the virus to evade the cellular innate immune response, which may influence the subsequent development of adaptive immunity to HCV, virus persistence, and the response to IFN-based therapy (21).

HCV is the causal agent of chronic liver infection, which afflicts more than 170 million people worldwide (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>), and one of the

leading causes of liver cirrhosis and failure (9). The standard of care for patients with chronic hepatitis C is treatment with pegylated IFN- α (pegIFN- α) plus ribavirin (RBV). However, only 50 to 60% of the patients treated with pegIFN- α and RBV achieve a sustained virologic response (SVR) (18). In human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) patients coinfecting with HCV, standard therapy elicits significantly lower rates of SVR. Among patients infected with HCV genotype 1 or 4, the SVR rate is only about 30% (5, 50). Therefore, a considerable effort has been made to develop markers associated with a better response to IFN-based therapies in HCV–HIV-1-coinfected patients.

Similar to other RNA viruses, one prominent feature of HCV is its genetic variability (30). Experimental evidence has demonstrated that HCV populations consist of a distribution of mutant genomes termed quasispecies (25). High mutation rates and the quasispecies dynamics of HCV are intimately related to both viral disease and antiviral treatment strategies (30). Several directly acting antiviral (DAA) agents for HCV infection are in phase 1 to 3 clinical trials (41). The most advanced compounds are inhibitors of the NS3/4A protease and include telaprevir and boceprevir, which are in phase 3 clinical development in combination with pegIFN- α and RBV. However, DAA therapies may be limited by the rapid selection of resistant virus unless administered in combination with

* Corresponding author. Mailing address: Fundació irsiCaixa, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, 08916 Badalona, Spain. Phone: 34 934656374. Fax: 34 934653968. E-mail: mmartinez@irsicaixa.es.

† Supplemental material for this article may be found at <http://jvi.asm.org/>.

∇ Published ahead of print on 6 April 2011.



TABLE 1. Clinical characteristics of patients with chronic HIV-1-HCV coinfection treated with pegIFN- α -RBV therapy

Parameter	SVR	Treatment failure	P value ^a
No. (%) of samples	19 (34)	37 (66)	
Mean patient age, yr (range)	40.9 (32-53)	39.4 (23-50)	0.3680
No. (%) of patients with IL-28B risk allele rs12979860	2 (11)	24 (65)	0.0002
No. (%) of:			0.6936
Females	5 (26)	8 (22)	
Males	14 (74)	29 (78)	
No. (%) with HCV subtype:			1.0000
1a	13 (68)	25 (68)	
1b	6 (32)	12 (32)	
Mean CD4 ⁺ cell count/ μ l (range)	553 (309-1186)	546 (265-1165)	0.7423
Mean ALT activity (U/liter) (range)	77.1 (13-208)	78.9 (15-239)	0.7033
Mean AST activity (U/liter) (range)	48.0 (19-89)	55.2 (24-157)	0.4516
Mean HCV RNA level (log ₁₀ IU/ml) (range)	5.75 (3.37-7.11)	6.25 (5.04-7.10)	0.0112
No. (%) of patients with undetectable HIV-1 RNA (<50 copies/ml)	15 (79)	30 (81)	1.0000

^a Age, Mann-Whitney U test; IL-28B genotype, Fisher's exact test; gender, Fisher's exact test; HCV subtype, Fisher's exact test; CD4⁺T cell count, Mann-Whitney U test; ALT (alanine aminotransferase) and AST (aspartate aminotransferase), Mann-Whitney U test; HCV RNA level, unpaired *t* test; undetectable HIV-1 RNA, Fisher's exact test.

pegIFN- α and RBV. Thus, pegIFN is likely to remain a basis of therapy in the near future.

We hypothesize that NS3/4A protease, by disrupting the signaling pathway involved in the production of IFN- α / β , could be implicated in the response to IFN-based therapy. Evasion of innate immune responses likely exerts a negative influence on the subsequent development of adaptive immunity to HCV and possibly contributes to virus persistence and resistance to therapy. We previously established the relationships between genotype, phenotype, and fitness within the NS3/4A quasispecies (13). In the present study, the impact of NS3/4A protease activity and quasispecies complexity on virus clearance after IFN-based therapy was examined in HCV-HIV-1-coinfected patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients. A total of 56 samples from 56 HCV-HIV-1-coinfected patients at our HIV clinic were analyzed (Table 1). All patients included in this study were infected with HCV genotype 1 (38 with subtype 1a and 18 with subtype 1b) and had a standard course of treatment with pegIFN- α and RBV with a known virologic response status at 24 weeks posttreatment. The duration of treatment was the same for all patients. Plasma samples were taken at the pegIFN- α -RBV treatment baseline. Patients 50 and 51 correspond to patients A and B in the study by Franco et al. (13). The HCV genotype, a marker for hepatitis B virus (HBV) infection, HCV and HIV-1 viral loads, CD4⁺ T cell counts, and liver enzyme levels were all determined using standard procedures. IL-28B genotyping was performed as described previously (2). Written informed consent was obtained from each patient who participated in this study, and ethics approval was obtained from our Institutional Review Board.

Recovery and analysis of HCV NS3 protease sequences. RNA extraction and amplification were performed as previously described (14, 26). Briefly, the HCV RNA was extracted from 140 μ l of plasma and amplified by PCR using a nested primer set. After the viral RNA was isolated, 5 μ l of resuspended RNA was reverse transcribed and PCR amplified by using the SuperScript III One-Step reverse transcription (RT)-PCR system with Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) and genotype 1a oligonucleotides NS3PIA1 (sense; 5'-CAAGGG GTGGAGGTTGTGGC-3', residues 3389 to 3409 of the HCV-J strain with

GenBank accession number D90208) and NS4B-4 (antisense; 5'-AGTACTGT ATCCCGCTGATG-3', residues 5647 to 5666 of the HCV-J strain). The oligonucleotides for subtype 1b were HCVpro11 (5'-GCAAGGGTGGCAGCTCT TGC-3', residues 3392 to 3412 of the HCV-J strain) and NS4B-4. A nested PCR was then performed with a 5' subtype 1a oligonucleotide (NS31a1a) containing an EcoRI site (underlined), residues 21 to 34 of NS4, and a dipeptide linker, Gly-Gly, along with residues 2 to 8 of NS3 (residues 3411 to 3431 of the HCV-J strain): 5'-GGGTTGAATTCATGGCTCCTATTGGCTGCGTGGTCATAG TGGGCAGGATTGTTTTGTCCGGGAAGGGAGGACCCATCACGGCGCT ACGCCAG-3'. The 3' oligonucleotide (NS31ar4) was complementary to residues 3930 to 3950 of the HCV-J strain (amino acid residues 175 to 181 of NS3) and contained an in-frame stop codon (bold) flanked by an XhoI site (underlined): 5'-GGGAGGGGCTCGAGTCAGGACCTCATGGTTGTCTAG-3'. For subtype 1b, oligonucleotides HCVpro12 (sense, 5'-GGGTTGAATTCAT GGCTCCTATTGGATCTGTTGTTATTGTTGGGAAGAATTATTTGTCTG GAAGAGGAGGACCTATCACGGCTACTCCAA-3', residues 3414 to 3434 of the HCV-J strain) and HCVproR (antisense, 5'-GGGAGGGGCTCG AGTCAAGACCCATAGTAGTTTCCAT-3', residues 3933 to 3952 of the HCV-J strain) were used. The PCR products were digested with EcoRI and XhoI and ligated to pBSK (Stratagene) to generate a β -gal-HCV NS3₂₋₁₈₁/4₂₁₋₃₄ protease fusion protein (pHCVNS3₂₋₁₈₁/4₂₁₋₃₄ protease). To ensure that multiple NS3/4 protease templates were present in each quasispecies that was analyzed, four different PCR amplifications were performed for each sample and pooled before cloning. Endpoint RNA limiting dilution was performed before RT-PCR to ensure that an excess of template HCV RNA was present in the PCR amplification mixtures. At least 25 RNA molecules were added in each of the four PCR amplifications. A minimum of 20 individual plasmid clones were obtained and analyzed for each sample (range, 20 to 60). The previously cloned quasispecies (13), samples 50 and 51 (96 and 97 clones, respectively), were also included in the analysis. The different proteases were sequenced with the flanking oligonucleotides T3 (5'-ATTAACCCCTACTAAAGGGA-3') and T7 (5'-TAATAC GACTCACTATAGGG-3') using the BigDye v3.1 kit in the 3100 DNA sequencing system (Applied Biosystems). Sequence alignment and editing were performed with the Sequencer version 4.1 (GeneCodes) software program. For phylogenetic analysis, the PAUP* 4.028 software package was used with a GTR + G model of evolution. Nucleotide and amino acid *p* distances (the proportions [p] of nucleotide sites at which two sequences being compared are different) were calculated by the MEGA 4 software package (48). Nucleotide and amino acid heterogeneity data were obtained from the distance matrix generated by the MEGA 4 software package used to calculate *p* distances. The normalized

Shannon entropy (Sn) value was calculated as $S_n = -\sum_i (p_i \ln p_i) / \ln N$, where N is the total number of sequences analyzed and p_i is the frequency of each sequence in the viral quasispecies. Sn varies from 0 (no complexity) to 1 (maximum complexity) (51). To determine possible selective pressures, the proportion of synonymous substitutions to potential synonymous sites and the proportion of nonsynonymous substitutions to potential nonsynonymous sites were calculated by the SNAP software program (19). To estimate codon-specific selection pressures, we used the fixed-effects likelihood (FEL) method, which directly estimates nonsynonymous and synonymous substitution rates at each site (17). The HKY85 nucleotide substitution bias model was used with FEL.

Genetic screen for determining the catalytic efficiency of HCV NS3/4A proteases. The catalytic efficiency of the different HCV NS3/4A proteases was determined using a previously described bacteriophage lambda (λ)-based genetic screen (13, 26). A plasmid with the Cardiff NS3/4A protease cleavage site, EREVPC/HRPS, was constructed (pCl.Cardifcro). The Cardiff cleavage site was introduced by using pCl.HCVNS4B/NS5Acro (13) as a template and a PCR overlap extension protocol (37). Two fragments containing the Cardiff cleavage site were amplified in separate amplifications. For amplification of the 5' fragment, the c119 oligonucleotide (sense; 5'-CCATTAAACAAGAGCAGCTT-3', positions 19 to 39 of the λ cI repressor) (42) was used with an antisense oligonucleotide containing the Cardiff cleavage site 4B5ACARDIFR (5'-TGACGGTCGATGGCAGCGTACTTACCGCTCTCATTGCGCGCCTGAACATGAGA-3'). For amplification of the 3' fragment, c1697R (antisense; 5'-TTCA GGCACCTGACTAGCGAT-3', positions 679 to 699 of the λ cI repressor) was used with a sense oligonucleotide containing the Cardiff cleavage site 4B5ACARDIFF (5'-GAAGTACCGTGCCATCGACCGTCACTAAGGGATGTTGGCGCGCATGTTCTCACCT-3'). The PCR mixture contained 20 pmol of each primer, 200 μ M deoxynucleoside triphosphates, 2.5 mM MgCl₂, PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, and 50 mM KCl), and 0.5 U *Taq* polymerase (Promega) in a total reaction volume of 50 μ l. Cycling parameters were 1 cycle of denaturation at 95°C for 2 min, followed by 35 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 55°C, and 45 s at 72°C, with a final extension step of 72°C for 7 min. The 5' and 3' PCR fragments were mixed with oligonucleotides c119 and c1697R, and a second PCR was performed under the conditions described above. The resulting PCR products were digested with NsiI and HindIII and ligated to pCl.HCVNS4B/NS5Acro previously digested with NsiI and HindIII. *Escherichia coli* JM109 cells containing plasmid pCl.Cardifcro were then transformed with plasmid pHCVNS3_{2-181/421-34} protease. Transformed cells were grown overnight at 30°C in the presence of 0.2% maltose–12.5 μ g/ml of tetracycline–20 μ g/ml of ampicillin, harvested by centrifugation, and resuspended to an optical density at 600 nm of 2.0/ml in 10 mM MgSO₄. To induce the expression of HCV NS3_{2-181/421-34} protease, cells (20 μ l) were incubated in 100 μ l of Luria-Bertani (LB) medium containing 12.5 μ g/ml tetracycline, 20 μ g/ml ampicillin, 0.2% maltose, 10 mM MgSO₄, and 0.1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 1 h. The cell cultures were then infected with 10⁵ PFU of λ phage. After 3 h at 37°C, the titer of the resulting phage was determined by coplating the cultures with 200 μ l of *E. coli* XL-1 Blue cells (adjusted to an optical density at 600 nm of 2.0/ml in 10 mM MgSO₄) on LB plates using 3 ml of top agar containing 12.5 μ g of tetracycline/ml, 0.2% maltose, and 0.1 mM IPTG. After incubation at 37°C for 6 h, the resulting phage plaques were counted in order to score growth. In the experiments in which *E. coli* cells express master protease sequences from study samples, λ phage replicated up to 1.45 log (range, –0.18 to 1.45)-fold more efficiently than in cells that did not express the HCV NS3_{2-181/421-34} construct or a construct with a patient protease variant carrying the inactivating substitution S139A.

Statistical analysis. The unpaired *t* test, the Mann-Whitney U test, Fisher's exact test, and linear regression analysis of covariates were performed using GraphPad Prism version 4.00 for Windows (GraphPad, San Diego, CA).

Nucleotide sequence accession numbers. The HCV NS3 sequences obtained and characterized in this study have been submitted to the GenBank database under accession numbers HQ891983 to HQ893534.

RESULTS

Study population. Most patients (55/56, 98%) were on antiretroviral therapy, and most patients (45/56, 80%) had controlled HIV-1 replication (below 50 copies/ml). Nineteen patients (34%) responded successfully to HCV treatment (i.e., achieved SVR). The proportion of patients infected with HCV subtype 1a who achieved SVR (32%) was not significantly different from the proportion of patients infected with subtype

1b viruses (32%, $P = 1.0000$, Fisher's exact test). A significantly higher HCV RNA load was measured in patients who failed treatment ($P = 0.0112$, unpaired *t* test). Likewise, IL-28B risk allele rs12979860 was significantly associated with treatment failure ($P = 0.0002$, Fisher's exact test). HBV infection was detected in only one sample (from patient 45). No significant differences were found between those who achieved SVR and those who did not with respect to sex, age, HIV-1 viral load, liver enzymes, or CD4⁺ T cell count.

HCV NS3/4A quasispecies diversity. A total of 1,745 clones (an average of 31 clones per patient) were isolated, sequenced, and analyzed. Neighbor-joining phylogenetic reconstruction was performed for all NS3 protease nucleotide sequences to determine the evolutionary relationships of the different variants. Sequences from each individual produced a monophyletic group, which was supported by bootstrap analysis (data not shown). Similarly, sequences from subtype 1a and 1b viruses segregated separately. Similar numbers of clones per patient were obtained from those in the SVR and treatment failure groups (32 and 31, respectively, $P = 0.8849$, unpaired *t* test). Diversity was assessed by calculating intrasample genetic distances. Mean nucleotide p distances were higher in the group of patients who failed therapy than in the patient group with SVR (0.0127 and 0.0108, respectively; Table 2). However, these values were not significantly different ($P = 0.2579$, unpaired *t* test). A wide range of different nucleotide p distances was found within the two groups of patients (0.0034 to 0.0027 and 0.0027 to 0.0247, respectively), suggesting that different diversifying forces are acting in different individuals. Remarkably, we identified a positive relationship between the nucleotide p distance and patient viral load ($P = 0.0205$, linear regression; Fig. 1A). No significant difference was found between the amino acid p distance of therapy failures and SVRs (0.0072 and 0.0073, respectively, $P = 0.9122$, unpaired *t* test). Interestingly, the amino acid p distance was significantly shorter in patients with an IL-28B risk allele (0.0060 versus 0.0188, $P = 0.0084$, unpaired *t* test). This difference in the amino acid p distance was not observed at the nucleotide level (0.0136 versus 0.0150, $P = 0.5172$, unpaired *t* test). This result suggests that IL-28B risk allele carriers exert a lower positive selection pressure on the NS3/4A protease.

The synonymous-to-nonsynonymous (ds/dn) mutation ratio, a marker of selective pressure, was compared between patients with SVR and those who failed treatment (Table 2). The ds/dn ratio was greater than 1 in the 56 quasispecies analyzed, indicating a preponderance of genetic drift over selection within the coding region studied. However, different values were found for each quasispecies, ranging from 2.51 to 26.71, demonstrating that different selective constraints may be acting on different quasispecies. Patients who failed treatment exhibited a significantly higher mean ds/dn ratio (16.08) than SVRs (10.37) ($P = 0.0383$, unpaired *t* test; Table 2). Again, a significantly lower proportion of nonsynonymous mutations to potential nonsynonymous sites (dn) was observed in patients with an IL-28B risk allele (0.0027 versus 0.0036, $P = 0.0490$, unpaired *t* test). In contrast, this difference in the dn value was not observed when the proportion of synonymous mutations to potential synonymous sites (ds) was calculated (0.0037 versus 0.0039, $P = 0.7295$, unpaired *t* test). Positive selective pressures were also evaluated using FEL, which directly estimated syn-



TABLE 2. Comparison of HCV NS3 protease coding region quasispecies

Parameter	SVR (<i>n</i> = 19)	Treatment failure (<i>n</i> = 37)	<i>P</i> value ^a
p distance			
Nucleotides	0.0108 ± 0.0016 (0.0027–0.0247) ^b	0.0127 ± 0.0009 (0.0034–0.0027) ^b	0.2579
Amino acids	0.0073 ± 0.0008 (0.0020–0.0169)	0.0072 ± 0.0006 (0.0030–0.0159)	0.9122
% Heterogeneity			
Nucleotides	74.17 ± 5.33 (33.33–100)	85.48 ± 2.04 (52.27–100)	0.0208
Amino acids	37.88 ± 2.93 (16.67–61.90)	43.00 ± 3.02 (17.31–80.00)	0.2825
ds	0.0320 ± 0.0056 (0.0046–0.0906)	0.0412 ± 0.0032 (0.0076–0.0856)	0.1311
dn	0.0032 ± 0.0003 (0.0009–0.0077)	0.0031 ± 0.0003 (0.0007–0.0073)	0.9145
ds/dn ratio	10.37 ± 1.66 (2.51–26.71)	16.08 ± 1.72 (3.48–23.11)	0.0383
Sn value			
Nucleotides	0.8278 ± 0.0416 (0.4830–1.000)	0.9188 ± 0.0136 (0.6942–1.000)	0.0252
Amino acids	0.4973 ± 0.0439 (0.1978–0.8062)	0.5525 ± 0.0339 (0.2484–0.8945)	0.3343

^a Unpaired *t* test.

^b Values are mean ± SEM (range).

onymous and nonsynonymous substitution rates at each site (17). Nine positively selected codons were identified in nine samples (see Table S1 in the supplemental material). Six of these positions, V33, T61, V83, P86, Q89, and A147, are common polymorphisms found in genotype 1 isolates (19). The other three positions, P88, G120, and F169, are highly conserved, though a few variants can be found in databases. Eight of the codons identified, V33, T61, V83, P86, P88, Q89, G120, and A147, have been described as belonging to a cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitope (52).

When the nucleotide or amino acid *p* distances were grouped by subtype, 1a or 1b, independent of therapy response, no significant differences were observed (0.0125 to 0.0111, *P* = 0.4338, for nucleotides; 0.0068 to 0.0082, *P* = 0.1571, for amino acids [unpaired *t* test]).

Mutations conferring resistance to NS3 protease inhibitors (PIs) were also found in 31 (55%) of the study quasispecies (see Table S2 in the supplemental material). Thirty-five (2.0%) of 1,745 individual clones had one resistance substitution. Five quasispecies had the resistance substitution Q80K in the majority of their individual clones. Similarly, one quasispecies had the V55A substitution as a dominant variant. The mutations V36M/A, T54A, V55A, R155K/T, A156T/V, and V170A, which have been found in patients who fail therapy with the PIs telaprevir and boceprevir (40, 41, 47), were also observed in individual clones (see Table S2 in the supplemental material). The proportion of resistance mutations was not different between patients undergoing antiretroviral therapy including or not including HIV-1 PI (*P* = 0.7859, Fisher exact test).

HCV NS3/4A quasispecies complexity. Complexity was assessed by computing the heterogeneity and Sn value of each quasispecies. Significantly greater quasispecies nucleotide heterogeneity and higher Sn values were found within the group of patients who failed therapy (Table 2). At the amino acid level, patients who failed therapy also had higher values but the difference was not significant. Similar to nucleotide *p* distance analysis, we identified a positive relationship between nucleotide heterogeneity and the Sn value and the patient's HCV viral load (*P* = 0.0011 and *P* = 0.0002, respectively, linear regression analysis; Fig. 1B and C). These results demonstrate

that lower treatment baseline NS3 protease quasispecies complexity is associated with SVR.

When sequences were grouped by subtype, a significantly higher Sn value was observed in subtype 1b amino acid quasispecies (0.4974 and 0.6104 for subtypes 1a and 1b, respectively, *P* = 0.0484, unpaired *t* test). No significant differences were observed at the nucleotide level (0.9054 and 0.8616 for subtypes 1a and 1b, respectively, *P* = 0.2404, unpaired *t* test).

Catalytic efficiency of HCV NS3/4A protease and response to IFN-based therapy. The catalytic efficiency of the dominant quasispecies of each type (Fig. 2) was assayed for Cardif cleavage using a bacteriophage λ genetic screen (13, 26). The enzymatic activities of variant proteases were evaluated by engineering the Cardif cleavage site in the λ cI repressor. The enzymatic activity was related to the activity of a patient protease variant carrying the inactivating substitution S139A. The distribution of log enzymatic activity values ranged over 2 orders of magnitude, which likely reflects the fact that mutations present in the different proteases affected their catalytic Cardif-cleaving efficiency (Fig. 3A). To further demonstrate the specificity of the genetic screen employed here, the assay was also performed in the presence of 25a, an inhibitor of the HCV NS3/4A protease (22). The enzymatic activity of one of the proteases that displayed a high efficiency level (sample 50) was inhibited by 25a (Fig. 3A). When the log enzymatic activities were grouped by patient response to IFN-based therapy, a significantly higher value was obtained in the SVR group (mean ± standard error of the mean [SEM], SVR versus treatment failure group, 0.8970 ± 0.0556 versus 0.7269 ± 0.0530; *P* = 0.0497, unpaired *t* test; Fig. 3B). Remarkably, within the treatment failure group, some proteases had no Cardif-cleaving activity (samples 90 and 156; Fig. 3A) or very low activity (samples 51, 56, and 63). Proteases with low catalytic efficiency were not observed in the SVR group. Notably, the former low-activity proteases displayed good catalytic efficiency when tested with the HCV NS5A/NS5B cleavage site (data not shown). When proteases were grouped by IL-28B genotype, those obtained from patients carrying the IL-28B risk genotype displayed a lower mean log catalytic efficiency level (mean ± SEM, 0.7013 ± 0.0856 versus 0.8175 ± 0.0456).

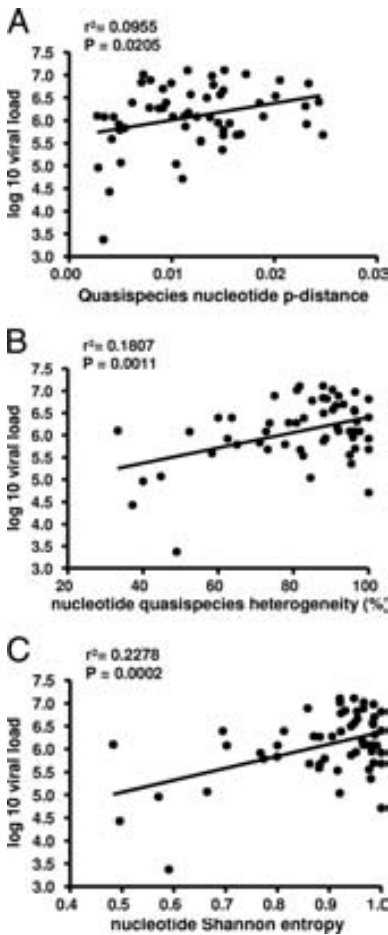


FIG. 1. (A) Quasispecies nucleotide p distance as a function of the HCV viral load. (B) Quasispecies nucleotide heterogeneity as a function of the HCV viral load. (C) Quasispecies nucleotide S_n value as a function of the HCV viral load. In panels A, B, and C, a significant positive linear correlation was found.

However, this difference was not significant ($P = 0.2027$, unpaired t test). Overall, these results suggest that NS3/4A protease Cardif-cleaving efficiency may be associated with the pegIFN-RBV treatment response in HIV-HCV-coinfected patients.

Next, the relationship between protease enzymatic activity and sequence conservation was investigated. The protease Cardif-cleaving activity was compared to how conserved the protease amino acid sequences were relative to amino acid frequencies in a reference database that included 307 sequences of subtype 1a (consensus 1a in Fig. 2A) and 328 sequences of subtype 1b (consensus 1b in Fig. 2B) (19). A positive linear relationship was found between the conservation of sequences

relative to the site-specific database frequencies and their relative catalytic efficiency ($r^2 = 0.1151$, $P = 0.0105$, linear regression; Fig. 4). This result indicates that selected or random deleterious mutations are imprinted in HCV NS3 protease sequences. In contrast, no correlation was found between protease activity and patient HCV viral load ($r^2 = 0.0008$, $P = 0.8284$, linear regression).

Finally, when protease catalytic efficiencies were grouped by subtype, a significantly higher activity level was observed in 1b samples (mean \pm SEM, 1b versus 1a, 0.9119 ± 0.0564 versus 0.7238 ± 0.0517 ; $P = 0.0307$, unpaired t test). Dominant quasispecies were also grouped by subtype (Fig. 2). Noticeably, subtype 1b virus nucleotide and amino acid p distances were significantly greater than those of 1a viruses (0.0694 and 0.0872 for nucleotide subtypes 1a and 1b, respectively, $P < 0.0001$; 0.0240 and 0.0272 for amino acid subtypes 1a and 1b, respectively, $P = 0.0074$, unpaired t test), indicating greater nucleotide and amino intersample diversification among 1b dominant quasispecies.

DISCUSSION

Treatment-induced clearance of HCV infection can be affected by various host and viral factors. Because a significant number of patients fail to respond to current IFN-based therapy or have significant side effects, predicting the treatment response is of major interest. In addition, patients with HIV-1 coinfection, particularly those infected with HCV genotype 1, have significantly lower rates of treatment response than HCV-monoinfected patients. Significant factors associated with SVR are the baseline HCV load and genotype. Despite HCV quasispecies and treatment response being a controversial topic, HCV quasispecies complexity before therapy has been independently associated with treatment response (1, 7, 8, 10, 29, 31, 36, 43, 45). However, although prior studies have demonstrated correlations in the genetic complexity of HCV hypervariable region 1 (HVR1) at the baseline and nonresponse to IFN-based therapy (31), other studies have found that HVR1 genetic complexity or heterogeneity did not correlate with HCV susceptibility to IFN-based therapy (23, 38). Genetic studies recently identified several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in and near IL-28B (which encodes IFN- λ 3) that are strongly associated with HCV clearance and SVR after IFN-based therapy (15, 35, 46, 49). This association is highly significant for genotype 1-infected patients and more controversial for non-genotype 1 infections (27, 28, 34, 35). Importantly, HIV-1 infection does not affect the association between IL-28B SNPs and HCV clearance (2, 32, 34). However, the IL-28B genotype does not have a positive predictive value of 100% for SVR and cannot be used as the only predictor of the IFN-based treatment response (4).

In this study, low NS3 protease nucleotide quasispecies complexity and high NS3/4A protease Cardif-cleaving efficiency were significantly associated with a successful response to pegIFN- α -RBV treatment. These findings provide support for a role for the NS3/4A protease in IFN-based therapies. Though the correlation between low protease Cardif-cleaving efficiency and treatment failure is counterintuitive, this result reflects the fact that sensitivity to exogenous IFN is inversely associated with levels of IFN-stimulated genes (ISGs) (39).

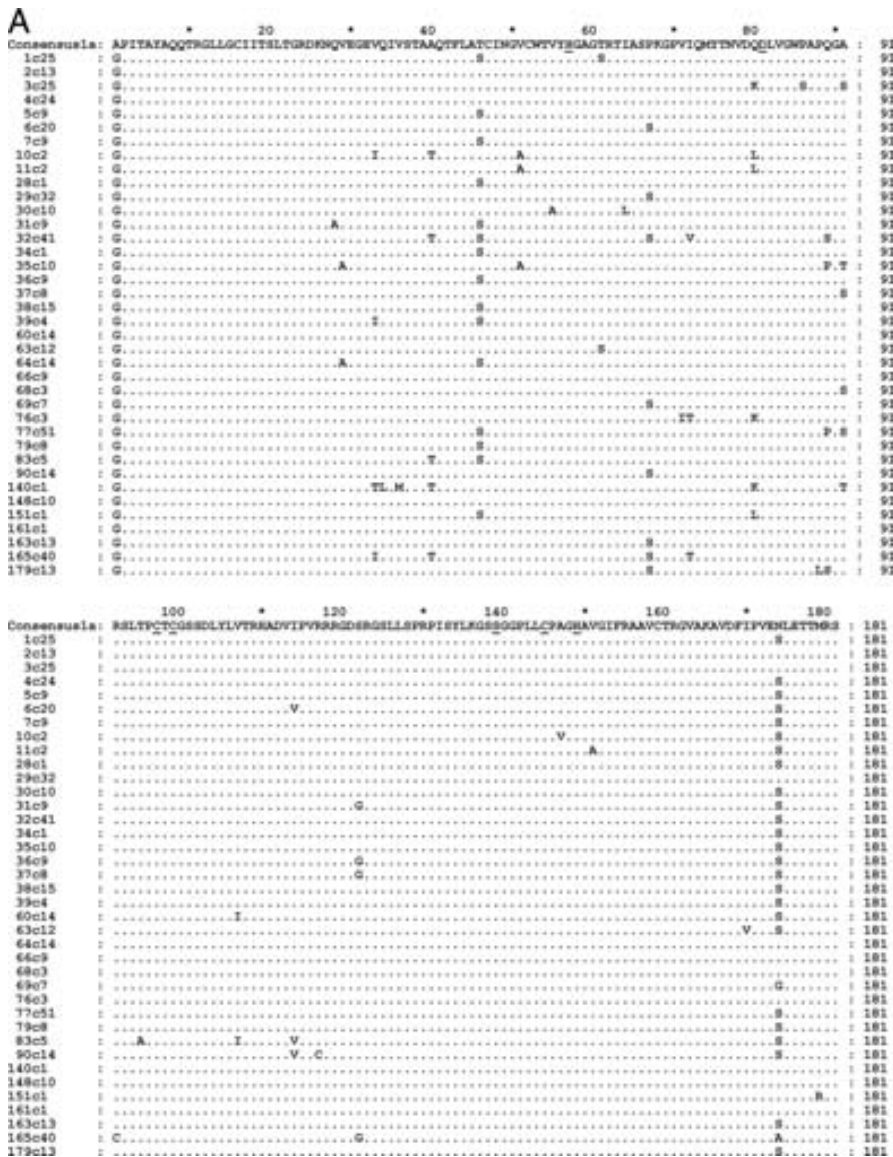


FIG. 2. (A) Amino acid sequence alignment of the subtype 1a NS3/4A dominant quasiespecies. (B) Amino acid sequence alignment of the subtype 1b NS3/4A dominant quasiespecies. Amino acid changes are indicated relative to a consensus amino acid obtained from a reference database that included 307 sequences of subtype 1a or 328 sequences of subtype 1b (19). The catalytic triad of the NS3/4A protease formed by His 57, Asp 81, and Ser 139 is underlined. The Zn²⁺ binding site, Cys 97, Cys 99, Cys 145, and His 149, is also underlined. Dots indicate amino acid sequence identity.

Moreover, individuals with IL-28B genotypes associated with SVR have lower pretreatment levels of hepatic ISG expression than individuals carrying the risk genotypes (16). Activation of the endogenous IFN system in HCV-infected patients may

hamper the response to IFN-based therapy, most likely by inducing a refractory state of the IFN signaling pathway (39). Nevertheless, alternative interpretations of our findings cannot be discarded because there is a wide variation in the ISG

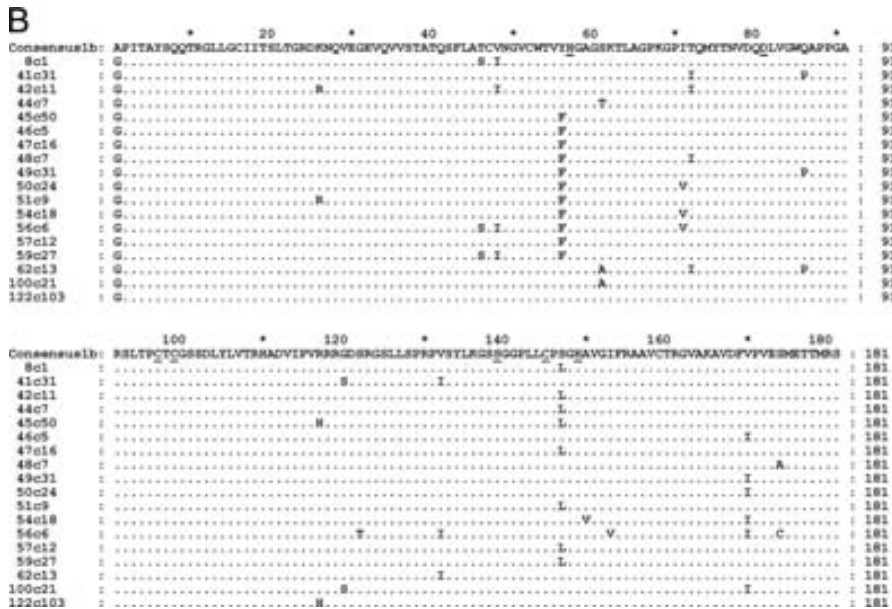


FIG. 2—Continued.

expression and induction levels among patients during IFN-based therapy. A recent study has demonstrated that NS3/4A-mediated Cardif cleavage is an important, but not unique, determinant of activation of the IFN system in the livers of patients with chronic hepatitis C (6). We also observed significantly lower protease activity in 1a samples than in 1b samples. Similarly, subtype 1a has been associated with a weaker response to IFN-based therapy than subtype 1b (20).

Another important correlation found in this study is the positive relationship between the catalytic efficiency of the NS3/4A protease and its amino acid conservation. The precise

conservation of some NS3 protease segments implies that certain amino acid changes affect enzyme viability. Indeed, mutations associated with drug resistance and CTL escape have been shown to have an impact on HCV fitness (44). Yet, little is known about the distribution of catalytic efficiency among NS3 protease mutations at the population level. Our results demonstrate how positive selection processes, random drift, or purifying negative selection of insufficiently fit variants can imprint HCV NS3 protease sequences and, as a consequence, modulate HCV fitness. Importantly, some mutations can affect the capability of the protease to process Cardif but not its

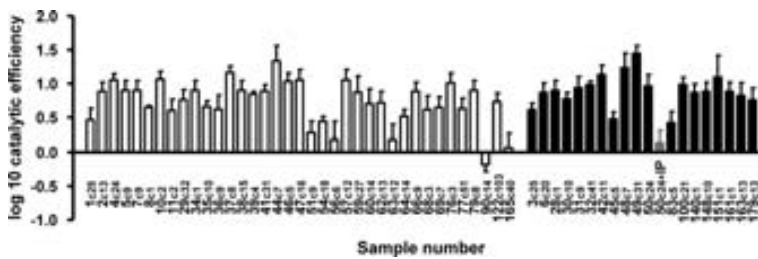


FIG. 3. Comparative catalytic efficiencies of 56 master HCV NS3/4A proteases based on Cardif cleavage. The catalytic efficiency of each protease variant was compared to that of a patient protease variant carrying the inactivating substitution I139A (0.0). White bars correspond to patients who failed therapy. Black bars correspond to patients with SVR. One gray bar corresponds to sample 50, which was tested in the presence of 20 μ M 25a, an inhibitor of the HCV NS3/4A protease (22). Three independent replicates were performed for each sample. Error bars correspond to standard deviations. Catalytic efficiency distribution of 37 master NS3/4A proteases from treatment failure patients (squares) compared to the distribution of 19 proteases from patients with SVR (triangles). The horizontal continuous lines represent the mean values. NR, nonresponders.

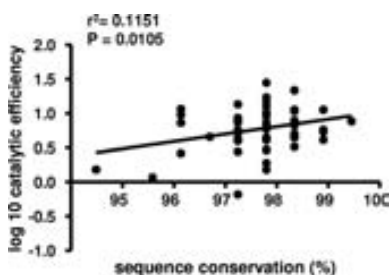


FIG. 4. HCV NS3/4A protease catalytic efficiency based on Cardif cleavage as a function of sequence conservation. The catalytic efficiency was measured for 56 master proteases obtained from 56 patients and compared to how conserved the protease amino acid sequences were relative to amino acid frequencies in a reference database that included 307 sequences of subtype 1a and 328 sequences of subtype 1b (19).

ability to cleave viral polyprotein. This finding has implications not only for HCV fitness at the population level but also for therapeutic strategies targeting NS3/4A protease and aimed at limiting viral replication.

This study extends and confirms recent studies in which HCV quasispecies (43), in particular, NS3 quasispecies (8), complexity before treatment was identified as an independent predictor of SVR. A wide range of nucleotide and amino acid quasispecies diversity was observed in both patient groups, those with SVR and those who failed treatment. However, no significant differences were detected between the groups. A positive correlation was found between quasispecies nucleotide diversity and sample viral load, indicating that both high NS3 quasispecies diversity and a heavy viral load are signaling in the same direction: treatment failure.

To the best of our knowledge, this is the first study to investigate the relationship between HCV quasispecies diversity and the host IL-28B genotype. Our results provide compelling evidence of less NS3 protease amino acid quasispecies diversification in patients with an IL-28B risk allele and suggest that IL-28B risk allele carriers exert less positive selection pressure on the NS3/4 protease. Whether the lower amino acid quasispecies diversification in patients with an IL-28B risk allele is restricted to the NS3 protease coding region or affects other viral genomic regions remains to be elucidated. Lower NS3 protease amino acid quasispecies complexity (heterogeneity and Sn value) was also detected in IL-28B risk allele carriers, but this difference was not significant (data not shown). Taking into account the diversification of nucleotide quasispecies, which is essentially almost identical in the two groups of IL-28B genotype carriers, a tendency for less NS3 protease amino acid quasispecies diversification in patients carrying the IL-28B risk allele is clear. Determination of the IL-28B genotype in longitudinal HCV quasispecies previously reported in studies may provide critical insights into the relationship between IL-28B and early spontaneous virus clearance (12), IFN-associated viral clearance (8, 11, 31), HCV emergence following liver transplantation (24), and the association with progression to end-stage liver disease (33).

PI mutations observed in our study include V36A, Q41R,

F43S, T54A, V55A, Q80R/K, R155K/T, A156T/V, D168G/N/E, and V170A. Three PI mutations (V36M, V55A, and Q80K) were found as dominant variants. The substitutions V36M and V55A were identified in one sample, whereas the substitution Q80K was detected in four patient samples. Remarkably, one sample (number 140) had two dominant resistance mutations: V36M and Q80K. The V36M mutation confers low-to-moderate resistance to telaprevir, boceprevir, and narlaprevir and higher resistance to telaprevir in conjunction with a R155K or A156T mutation (40). The V55A mutation confers low resistance to boceprevir (47). The Q80K mutation is associated with significantly reduced susceptibility to TMC-434350 and low-level resistance to vaniprevir and danoprevir but wild-type susceptibility to telaprevir and boceprevir (3). The other mutations associated with resistance were observed only as low-level variants, and most of them were detected in one clone per sample; only mutations Q41R and D168G were found in two clones of the same sample. The mutations R155K/T and A156T/V, which are associated with resistance to multiple PIs (41), including telaprevir and boceprevir, were also detected in our study samples. The A156S/T/V mutations are associated with high resistance to telaprevir and boceprevir (40, 47). These findings expand upon those of Chary et al. (8), confirming that the mutations R155K/T and A156T/V are minority variants in PI-naïve patients. Using an allele-specific PCR protocol that detects the A156S/T/V substitutions in at least 0.05 to 0.5% of the viral population, we observed that 65% of PI-naïve patients had at least one minor resistance variant at this NS3 position (S. Franco et al., unpublished data). Nevertheless, whether drug-resistant mutants present at low levels are associated with an increased risk of PI therapy failure remains to be elucidated.

Our study has some limitations that are worth noting. First, although our conclusions were supported statistically, they had narrow significance. Our results were likely limited by the small sample size, particularly by the small group of patients with SVR. Nevertheless, our results are in agreement with previous work and show a consistent trend. Second, the *in vitro* approach used to measure the capability of the protease to cleave Cardif only partially mimics what happens *in vivo*. However, the finding that defective or highly deleterious proteases that cleave Cardif were observed only in patients who failed therapy strongly supports the hypothesis of a role for the NS3/4A protease in the response to IFN-based therapies. Future work should include an evaluation of the pretreatment hepatic activation of endogenous IFN and whether it is related to the catalytic efficiency of the HCV NS3/4A protease *in vivo*.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (BFU2010-15194 and SAF2010-21617).

We thank Daria Hazuda of Merck, Sharp and Dohme for providing the Z5a protease inhibitor.

REFERENCES

- Abbate, I., et al. 2004. HVR-1 quasispecies modifications occur early and are correlated to initial but not sustained response in HCV-infected patients treated with pegylated- or standard-interferon and ribavirin. *J. Hepatol.* 40:831-836.
- Aparicio, E., et al. 2010. IL28B SNP rs8099917 is strongly associated with pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy treatment failure in HCV-HIV-1 coinfecting patients. *PLoS One* 5:e13771.



3. **Bae, A., et al.** 2010. Susceptibility of treatment-naïve hepatitis C virus (HCV) clinical isolates to HCV protease inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:5288–5297.
4. **Balagopal, A., D. L. Thomas, and C. L. Thio.** 2010. IL28B and the control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **139**:1865–1876.
5. **Ballesteros, A. L., et al.** 2004. Early HCV dynamics on Peg-interferon and ribavirin in HIV/HCV co-infection: indications for the investigation of new treatment approaches. *AIDS* **18**:59–66.
6. **Bellecave, P., et al.** 2010. Cleavage of mitochondrial antiviral signaling protein in the liver of patients with chronic hepatitis C correlates with a reduced activation of the endogenous interferon system. *Hepatology* **51**:1127–1136.
7. **Chambers, T. J., et al.** 2005. Quasispecies heterogeneity within the E1/E2 region as a pretreatment variable during pegylated interferon therapy of chronic hepatitis C virus infection. *J. Virol.* **79**:3071–3083.
8. **Chary, A., et al.** 2010. Impact of interferon-ribavirin treatment on hepatitis C virus (HCV) protease quasiespecies diversity in HIV- and HCV-coinfected patients. *J. Infect. Dis.* **202**:889–893.
9. **Chevaliez, S., and J. M. Pawlotsky.** 2007. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J. Gastroenterol.* **13**:2461–2466.
10. **Donlin, M. J., et al.** 2007. Pretreatment sequence diversity differences in the full-length hepatitis C virus open reading frame correlate with early response to therapy. *J. Virol.* **81**:8211–8224.
11. **Farci, P., et al.** 2006. Evolution of hepatitis C viral quasiespecies and hepatic injury in perinatally infected children followed prospectively. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:8475–8480.
12. **Farci, P., et al.** 2000. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasiespecies. *Science* **288**:339–344.
13. **Franco, S., M. Parera, E. Aparicio, B. Clotet, and M. A. Martínez.** 2007. Genetic and catalytic efficiency structure of an HCV protease quasiespecies. *Hepatology* **45**:899–910.
14. **Franco, S., C. Tural, B. Clotet, and M. A. Martínez.** 2007. Complete nucleotide sequence of genotype 4 hepatitis C viruses isolated from patients co-infected with human immunodeficiency virus type 1. *Virus Res.* **123**:161–169.
15. **Ge, D., et al.** 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* **461**:399–401.
16. **Honda, M., et al.** 2010. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **139**:499–509.
17. **Kosakovsky Pond, S. L., and S. D. Frost.** 2005. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Mol. Biol. Evol.* **22**:1208–1222.
18. **Kronenberger, B., and S. Zeuzem.** 2009. Current and future treatment options for HCV. *Ann. Hepatol.* **8**:103–112.
19. **Kuiken, C., K. Yusim, L. Boykin, and R. Richardson.** 2005. The Los Alamos hepatitis C sequence database. *Bioinformatics* **21**:379–384.
20. **Legrand-Abravanel, F., et al.** 2009. Influence of the HCV subtype on the virological response to pegylated interferon and ribavirin therapy. *J. Med. Virol.* **81**:2029–2035.
21. **Lemon, S. M.** 2010. Induction and evasion of innate antiviral responses by hepatitis C virus. *J. Biol. Chem.* **285**:22741–22747.
22. **Liverton, N. J., et al.** 2008. Molecular modeling based approach to potent P2-P4 macrocyclic inhibitors of hepatitis C NS3/4A protease. *J. Am. Chem. Soc.* **130**:4607–4609.
23. **López-Labrador, F. X., et al.** 1999. Relationship of the genomic complexity of hepatitis C virus with liver disease severity and response to interferon in patients with chronic HCV genotype 1b infection [correction of interferon]. *Hepatology* **29**:897–903.
24. **Lyra, A. C., et al.** 2002. Evolution of hepatitis C viral quasiespecies after liver transplantation. *Gastroenterology* **123**:1485–1493.
25. **Martell, M., et al.** 1992. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasiespecies nature of HCV genome distribution. *J. Virol.* **66**:3225–3229.
26. **Martínez, M. A., and B. Clotet.** 2003. Genetic screen for monitoring hepatitis C virus NS3 serine protease activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1760–1765.
27. **McCarthy, J. J., et al.** 2010. Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. *Gastroenterology* **138**:2307–2314.
28. **Montes-Cano, M. A., et al.** 2010. Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *Hepatology* **52**:33–37.
29. **Morishima, C., et al.** 2006. Hepatitis C virus-specific immune responses and quasi-species variability at baseline are associated with nonresponse to antiviral therapy during advanced hepatitis C. *J. Infect. Dis.* **193**:931–940.
30. **Pawlotsky, J. M.** 2006. Hepatitis C virus population dynamics during infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **299**:261–284.
31. **Pawlotsky, J. M., et al.** 1998. Genetic complexity of the hypervariable region 1 (HVR1) of hepatitis C virus (HCV): influence on the characteristics of the infection and responses to interferon alpha therapy in patients with chronic hepatitis C. *J. Med. Virol.* **54**:256–264.
32. **Pineda, J. A., et al.** 2010. Prediction of response to pegylated interferon plus ribavirin by IL28B gene variation in patients coinfecting with HIV and hepatitis C virus. *Clin. Infect. Dis.* **51**:788–795.
33. **Qin, H., et al.** 2005. HCV quasiespecies evolution: association with progression to end-stage liver disease in hemophiliacs infected with HCV or HCV/HIV. *Blood* **105**:533–541.
34. **Rallón, N. I., et al.** 2010. 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* **24**:F23–F39.
35. **Rauch, A., et al.** 2010. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology* **138**:1338–1345.
36. **Salmerón, J., et al.** 2008. Quasiespecies as predictive factor of rapid, early and sustained virological responses in chronic hepatitis C, genotype 1, treated with peginterferon-ribavirin. *J. Clin. Virol.* **41**:264–269.
37. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory, NY.
38. **Sandres, K., et al.** 2000. Genetic heterogeneity of hypervariable region 1 of the hepatitis C virus (HCV) genome and sensitivity of HCV to alpha interferon therapy. *J. Virol.* **74**:661–668.
39. **Sarasin-Filipowicz, M., et al.** 2008. Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**:7034–7039.
40. **Sarrazin, C., et al.** 2007. Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. *Gastroenterology* **132**:1767–1777.
41. **Sarrazin, C., and S. Zeuzem.** 2010. Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **138**:447–462.
42. **Sauer, R. T.** 1978. DNA sequence of the bacteriophage gamma cI gene. *Nature* **276**:301–302.
43. **Sherman, K. E., et al.** 2010. Hepatitis C virus (HCV) quasiespecies complexity and selection in HCV/HIV-coinfected subjects treated with interferon-based regimens. *J. Infect. Dis.* **201**:712–719.
44. **Shimakami, T., et al.** 2011. Protease inhibitor-resistant hepatitis C virus mutants with reduced fitness from impaired production of infectious virus. *Gastroenterology* **140**:667–675.
45. **Shire, N. J., et al.** 2006. HCV kinetics, quasiespecies, and clearance in treated HCV-infected and HCV-HIV-1-coinfected patients with hemophilia. *Hepatology* **44**:1146–1157.
46. **Suppiah, V., et al.** 2009. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat. Genet.* **41**:1100–1104.
47. **Susser, S., et al.** 2009. Characterization of resistance to the protease inhibitor boceprevir in hepatitis C virus-infected patients. *Hepatology* **50**:1709–1718.
48. **Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar.** 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**:1596–1599.
49. **Tanaka, Y., et al.** 2009. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat. Genet.* **41**:1105–1109.
50. **Torriani, F. J., et al.** 2004. Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients. *N. Engl. J. Med.* **351**:438–450.
51. **Wolinsky, S. M., et al.** 1996. Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection. *Science* **272**:537–542.
52. **Yusim, K., et al.** 2005. Los Alamos hepatitis C immunology database. *Appl. Bioinformatics* **4**:217–225.





AGRAÏMENTS



Pensava que aquest capítol de la Tesi, els agraïments, seria el més fàcil d'escriure ja que el tenia en ment, abans i tot de començar, o perquè potser era el que em feia més il·lusió de redactar, però a l'hora de la veritat... he estat postergant aquest moment al màxim... fins ara que estic a punt d'imprimir tots aquest anys passats en paper i just ara... tinc la ment en blanc. Crec que la raó del meu bloqueig, rau en què quan acabi aquest capítol, aquest sí! Que serà el tant esperat punt i final, el s'ha acabat el bròquil!, el "game over", el "this is the end, my only friend" (amb el permís de Jim Morrison i de Teddy Bautista...) ... i fa mal! Perquè han sigut uns anys brutals que no oblidaré mai... com tampoc a la gent que m'ha acompanyat en aquest viatge científic, i me l'ha fet més fàcil i agradable. I per això en aquestes quatre lletres intentaré plasmar la meva estima cap aquestes persones. I quan costa arrancar... el que s'ha de fer és començar pel principi...

Vull agrair:

primer de tot, al **Miguel Àngel Martínez**, el "jefe", que em donés la oportunitat de poder arribar fins aquí. Sense ell i la seva confiança dipositada en mi no hagués pogut saber el que és formar part d'un grup d'investigació, on el més important és la curiositat, l'afany per saber més i la cooperació entre persones. Tampoc hagués pogut fer la meva primera xerrada en públic, superant pors, nervis, estrès i un herpes horrorós, en una sala tant brutal com la Sala Prat de la Riba, ni creuar l'Atlàntic per anar a un dels congressos més importants en la nostra disciplina, el CROI, on em vaig donar compte del perquè ens passem les hores que ens passem treballant i picant pedra per superar tots els problemes i entrebancs que sorgeixen en el laboratori, el perquè de tants nervis, d'alguns plors, de certs mal humors o esporàdiques nits d'insomni... que bonic és saber que no estàs sol... i que hi ha un munt de gent treballant i esforçant-se perquè gent que està malalta, pugui arribar a estar millor o inclús curar-se. Gràcies per permetre'm tots aquests anys meravellosos, on he après més del que em podria imaginar.

Després, vull agrair amb totes les meves forces al meu grup, "les molones":

A la **Sandra**, per tot el seu temps i paciència en els moments en que jo era una estudiant de pràctiques, i havia de suportar-me, com una paparra al seu costat, espiant cada moviment amb la pipeta que feia, preguntant el per què? de tot els passos i per encaixar amb esportivitat les pífies típiques d'algú que comença...ups!. També li he d'agrair tots aquests anys de doctorat, en què mai es va desvincular del meu treball, ajudant-me sempre amb tot i fent-se seus, els meus problemes, talment com si un cordó umbilical científic ens unís. Gràcies per tenir-ho tot apuntat i poder confiar sempre, en les teves llibretes. I també he d'agrair-li tots els moments "after-lab", que em compartit, els ànims que m'ha donat en moments importants i per la paraula màgica que em va regalar, la qual sempre m'acompanyarà i m'ajudarà allà on sigui "TOOOOWANDAAAAAAA"! Amb aquest mot podrem amb tot, Sandra!

A la **Mariona**, per tota la teva feina, dedicació, esforç, suor (buf! davant el bunsen mil hores a l'estiu!, no hi ha paraules per agrair això), les teves llibretes amb els protocols apuntats al mil·límetre (faria un monument de les teves llibretes!), la teva feina posant



ordre al laboratori (de la qual cosa, al final em vaig fer una “fun” absoluta i em vaig tornar una obsessiva... ja se sap amb els deixebles, a vegades superen al mestre...) la teva vitalitat i energia (tot i dormir poc...) s’encomana i et posa les piles en un moment. I també per ser, a part d’una companya de feina excepcional i eficient, una amiga, amb qui es pot comptar.

A la **Jelen**, la Capel, a la meva Elena... la teva arribada al grup va ser com si entrés la primavera al laboratori i es quedés per sempre. Un raig d’energia positiva i bon rotllo ens va embriagar, i encara n’estem extasiats. La teva alegria s’encomana i ens fa la feina més fàcil i agradable a tots, la qual cosa és molt important, en el nostre gremi, ja que molt sovint ens trobem amb frustracions i culs de sac, difícils de pair. No només t’he d’agrar el teu suport i complicitat al lab., sempre escoltant els meus problemes amb els clons... sinó que també fora d’ell, on ets una persona important, amb qui compto cegament.

A la **Maria**, li vull agrair tots els seus consells tant sobre temes científics, plens de sapiència, experiència, i professionalitat, com sobre temes no tan científics. Li agraeixo tot el seu temps, dedicació i paciència en aquelles tardes on jo estava enganxada amb problemes de PCRs, ordinador bloquejat, programa de seqüències incomprendible... i ella tot i tenir 50.000 compostos per provar i ser passades les 19h... allí es quedava aguantant la meva “txapa” i les meves “rallades”, per consolar-me, entendre’m, i donar-me una idea nova per provar.

A la **Glòria**, li vull agrair la seva gran disposició, tot i estar enfeinada fins a les celles, sempre a punt per donar una resposta, per alleugerir un protocol, per a plantejar noves preguntes, en definitiva per a donar un cop de ma costí, el que costí. La seva capacitat de feina és al·lucinant, i envejable, com també el seu entusiasme i dedicació a la ciència.

Vull agrair també a tota la gent del laboratori, dels altres grups:

Al Gerard, al meu amic de l’ànima. Primer he d’agrar que es quedés a Irsi, tot i ja ser doctor... ja que pensar en pujar al laboratori i no trobar-lo és una idea, que simplement no podria suportar. Ja em va costar de pair quan va marxar cap a Alemanya... massa temps pel meu gust... je je... que només d’imaginar-me que no podria sentir a l’hora de dinar, o entre passadissos o a p3, un dels seus acudits, una de les seves frases ocurrents, una recomanació d’un llibre, d’un concert, d’una pel·lícula o d’un CD, una imitació o com canta una cançó de Javier Ruival, buf! Quina pena! Per mi ets una gran persona tant a nivell humà, sensible, bo, generós, amic dels seus amics i com a científic, dels investigadors que viu més la seva feina i la fa gaudir als altres.

A la **Samandhy**, mi chama! A mi amiga tanto dentro del lab como fuera. Por todos los momentos vividos, los duros y difíciles en los que has sido un pilar, una columna de estas griegas, con cariátidas y todo, las cuales no se immutant caiga la que caiga, pase lo que pase, auguantando estoicamente y encima con glamour... y los momentos de “rauxa i disbauxa” dónde me ha acompañado siempre, con tu alegría y ganas de vivir.



A les grecas: a la **M^aCarmen**, per el seu “carinyo” enorme (totalment recíproc!), el seu somriure sempre a punt, per les ganes i el ímpetu que posa en la seva feina i en fer-nos la vida més fàcil a tots, en el laboratori. Per ser una manetes, no només en la seva feina, sinó fora, pregunteu-li pels seus “fistros”. A la **Judith**, la incombustible i incondicional Judith. Capaç de recolzar-te en tot i a ultrança, sense renecs, ni recances. “*Full equip, full time, 24 hours, 365 days, by Mobile*”. Olé tu, olé tu! A la **Júlia**, per tots els seus consells boníssims i sempre a punt, paraules justes i certes. Per la templança, serenor i pau que regala, perquè es puguin superar el moment més estressant de la vida. A la **Itziar**, zure laguntza tekniko eta emozionala esker, zure amuarrain sinestezinak eta zure irribarre inborrable egiteko. La veritat és que no sé, si el que acabo d’escriure és correcte... perquè he fet una traducció al google... però el que si sé dir en euskera és: Eskerrik asko polita! Que seria un resum del dit abans. A la **Núria**, por ser una erudita en el mundo de las dendrites y por hacer que el resto nos apasionemos contigo, y nos encontremos sin querer un día, hablando con nuestras MT4 en la estufa de cultivos no infectados. A **M^a Teresa**, por ser más que buena persona (mira que es buena persona!), una perfeccionista de la hòstia que cada día nos hace ser mejores. A **M^a José**, por toda tu ayuda en mi momento CROI. Por estar allí siempre dispuesta a ayudar a los demás, aunque en silencio y en la retaguardia. A la **Maria Pino** per recordar-me amb la il·lusió de la teva mirada, l’entusiasme que té una al començar un l’aventura d’un doctorat a Irsicaixa. Que tinguis molta sort! estàs en bones mans.

A la **Martona Curriu**, la “correcaminos”, més ben dit la “correviesdeltren” preferida del lugar! Tu ja saps, que jo i ma mare som “funs” del teu avi... però després de coneixa’t a tu, ens sembles més artista tu que ell! si és que això possible! Deixem-ho en un empat! M’han encantat les teves xerrades sobre XMRV, sobre la fatiga crònica, sobre vinyes, sobre aulives, sobre el que sigui... parlar amb la Curriu és un plaer, sobre qualsevol cosa, perquè saps que tard o d’hora acabaràs fent una “carcajada” de les bones amb una de les seves peripècies. Per quant un Phd comics based on Marta’s experience! Seria genial! Ei! I que sàpigues que et considero una valenta per enfrontar-te cada dia a les teves pors i neures, per seguir endavant amb la teva aventura tarragonina, tot i les adversitats, i les opinions en contra i que encara que no vinguis a jugar, sempre seràs una ohdiosa!

A la **Isa**, li agraeixo tots els bons moments fora del laboratori, aquelles birres al Buenavista, després de mil hores a P3, aquells sopars de nadal on no podíem parar de riure i de menjar pa, els karaokes, les ballaruques i per fer-me descobrir la sèrie Little Britain... amb un humor tant surrealista com el seu. Brutal!

A la **Sílvia**, per haver comptat amb la seva ajuda quan algun aparell m’ha fet la guitza, que ha estat bastant sovint... més del que haguéssim volgut totes dues... I per aquells moments de cafè parlant de les relacions d’avui i d’ahir, aquells moments de sopars de nadal i ballaruques i per aquelles festes de gràcia on vam popularitzar la beguda de la nit : orxata amb melindros... encara ara, es parla de nosaltres en aquell bar! Ei! Queda pendent una sortida nocturna amb patints... que sàpigues que ho tinc en ment.



Al **Jorge**, un pozo de sabiduría sin fondo! La persona con más argumentos sobre cualquier cosa que conozco, capaz de hacer que cualquiera reflexione y piense, ya que cuando él habla, no se puede hacer otra cosa que escuchar y aprender. Gracias por tus palabras, tus consejos, tus ánimos, tus cuidados y por ser como eres!

A la **Marta Massanella**, per fer-me veure que tot és possible amb voluntat, ganes, esforç i treball. Cap pregunta sense resposta amb Marta la masbella! És el millor buscador de tots, millor que google! Arribaràs molt lluny perquè tens una empenta que fa por, i allà tant lluny... et vindrem a veure!

A la **Eli**, per ensenyar-me el que és tenir caràcter i personalitat i ser franca i sincera. També li vull agrair que de tant en tant em fes notar la seva estima, encara que fos en moments curts i puntuals, però meravellosos per la meva part.

Al **Francesc**, li vull agrair el seu somriure franc i sincer, i que per cert, fa caure de cul. Per fer-me partícip dels seus entrebancs i cabòries en el gran món de la “venganza de los clones”... m’ha encantat compartir errors i peripècies amb tu, com també els nervis abans d’un partit del Barça o abans d’un partit dels nostres propis equips. Espero que segueixin les porres al lab perquè amb el Barça que tenim, avui en dia, dona gust jugar-se-la.

A la **Ruth**, li agraeixo tota la tendresa transmesa, tota la seva confiança amb mi, totes les paraules d’ànims i de suport, les seves visites al meu lloc de treball (on no em venia a veure ni déu!), ja sigui per xerrar un momentet entre centrífugues amb la Mariona o posar a punt, el llibre de radioactivitat. Al teu costat ens fas sentir millors persones.

A la **Esther Jiménez**, “la alegría de la huerta!”, la més valenta d’irsi, la més “hechada pa lante” que hi ha en el lab. Em flipen les teves aventures, Marroc, parapente, raid marítim... no pares nunca! Y no dejes de explicarnoslo que siempre es la major parte... cuando tu lo cuentas!

Al **Ferdinand**, li agraeixo tots els seus intents per ensenyar-me francès, tot començant converses on l’únic que entenia era el “sabà” (no sé ni com s’escriu) inicial... i res més... i per tant jo sempre contestava “saba bian”! I allí acabava tot. Ho intentaré altre cop, ara que tindrè més temps.

A l’**Ester Ballana**, tot el seu suport, el seu temps sempre generós per escoltar qualsevol dubte o problema trobat en el camí d’aquesta Tesi. Li vull agrair el seu gran valor humà, per mi francament admirable i totes les històries i anècdotes que m’explicava de la seva iaia (una crack!), fent-me pensar que, si hagués pogut tenir alguna de les meves iaies fins a la nostra edat, m’hagués agradat ser al menys la meitat de bona neta que ha estat ella. El seu somriure serà difícil d’oblidar.

A l’**Emmanuel**, también le quiero agradecer sus ánimos, su apoyo y su cariño hacia mí, tanto en el laboratorio como fuera de él. Seguramente nos faltan más cafeses y más cervecitas juntos, pero estoy segura que tarde o temprano encontraremos el momento.

A l’**Alba**, li vull agrair el seu bon rotllo, la pau que em transmet. No em tingut molt



de temps per compartir, però el poc que hem tingut per mi ha estat un plaer! Que tinguis molta sort bonica, en l'aventura que comences a Irsi.

A l'**Encarna**, per escoltar-me sempre que venia cap a la sala de becaris de P3 amb les meves cabòries, i no trobava ningú del meu grup amb qui buidar el pap... i ella en copsar la situació... em regalava un petit temps, quatre paraules intercanviades, per poder tornar al meu lloc i tornar a començar de nou amb aire renovat.

Al **Marc**, li agraeixo la seva templança, la sereno i la calma que transmet ja que dona pau a la gent que l'envolta. M'ha encantat que compartís amb mi les seves peripècies amb les PCRs, tot un món fóra del P3 on es sentia com peix fora de l'aigua. La meva total admiració pel Kilian Jornet del lab... algun dia ens trobarem en una maratón... el menys en la sortida segur.. ja vorem a l'arribada.

A la **Teresa**, li he d'agrair les millors converses de dinar que he tingut a Irsi, on sempre s'apren alguna cosa, ja sigui sobre el món dels invertebrats com sobre els drets civils d'un pare sobre el seu nadó... vamos! un altre pou de sapiència sense fi! A la **Tània**, li agraeixo les seves confidències, la seva energia que encomana! i el seu bon rotllo. I balla, balla!, no paris de ballar i de fer ballar a la gent. A l'**Eulàlia**, li hauria de fer un monument! Per totes les mostres facilitades, la seva predisposició per ensenyar-me MIL vegades com funcionava la base de dades "onemorettime", per canviar-me la contrasenya contínuament, i per fer tot això i més, sense cap mena de recansa ni cap queixa, sinó amb l'alegria que la caracteritza. A la **Lucía**, la seva serenor, tranquil·litat i predisposició a escoltar, per mi admirable. Molta sort en l'etapa de la vida que estàs a punt de començar! A la **Cristina R**, li vull agrair aquelles converses en la sala de PCRs i al Pre-PCR, que feien la posada en marxa de la reacció i de la màquina molt amena, i a la **Susanna** a part d'agrair-li fermament la seva feina, que en l'ombra i sense fer soroll, ens ha donat qualitat de vida en el lab, li he d'agrair l'entusiasme, els ànims i el suport que sempre m'ha donat en totes les meves activitats extra-lab. A la **Rafi**, la incansable! A tu (i sé que a més gent, a tot el grup de mostres en general...) et dec mil reverències per tota la gran feina que fas atresorant, i elaborant i ordenant, aquestes mostres que tant valuoses són per totes nosaltres. Gràcies per la feina feta! També t'he d'agrair tot el carinyo i l'estima que he sentit sempre al teu costat.

Al **Christian**, pel seu bon humor, les seves bromes àcides i picants impossibles de no arrancar algun somriure. A la **Rocio**, la preciosa Rocio, a qui adoro per la seva bondat, per les seves ganes, pel seu entusiasme i pel carinyo que li sento. Ja tinc ganes de veure la careta de l'Alex! Molta sort en el nou projecte! Al **Matia**, gli voglio ringraziare il tuo incoraggiamento e la cura per me e che in quei Venerdì dalla fine del mese, che iniziavano male, a la fine finivano benissimo con le lasagne buone, buone da vero ah! E ti ringrazio anche, che tu sempre pensavi con la versione vegetariana per me.

A l'**Anuska**, per el seu gran talent, tant en el laboratori, com en els escenaris. Per venir a veure a ma mare, en una de les seves actuacions, per ajudar-me i recolzar-me en tots els projectes ja fossin científics com d'altre que no tant.



A l'equip de secretariat i administració, la **Cris** i la **Penélope** un tàndem perfecte que fa que tot aquell material que necessitem ara i aquí... pugui arribar al més ràpid possible.

A l'equip de comunicació, la **Rosina** i l'**Elisenda** per fer-me veure que la ciència no acaba al laboratori, en un congrés o en un article. Gràcies per deixar-me participar en alguna de les vostres bones idees per divulgar ciència.

Als jefes de grup com el Dr. **Julià Blanco**, el Dr **Javier Martínez-Picado**, el Dr. **José Esté**, el Dr. **Roger Paredes**, el Dr. **Christian Brander**, la Dra. **Margarita Bofilla** i la Dra. **Lídia Ruiz**, al costat dels quals s'apren cada dia que passa.

A la gent de lluita com la Dra. **Cristina Tural**, en Dr. **Jou**, l'**Anna sales**, la **Cristina Miranda** i el **Jordi Puig**, sense la feina dels quals, la nostra seria impossible.

També a la gent que formava part d'Irsi, com la **Gemma Moncu**, el **Jordi Senserich** i la **Mer**, el trio meravelles. Els quals he trobat molt a faltar! No puc deixar de pensar els grans moments que em passat junts a Irsi, com fora del lab. El nostre viatge a Menorca, el tinc gravat a la retina com un dels nostres més grans moments. No canvieu mai... i estigueu sempre ben prop. També a l'**Edu**, al **Guerau**, a la **Natalia**, la **Mireia**, la **Charo**, la **Berta**, a la **Imma**, a la **Gemma Coma** i al **Raul**, companys i amics, monstres de la ciència, amb qui vaig aprendre molt. També he d'agrair a la gent que ha passat com un estel fugaç pel lab, però han deixat la seva pols d'estrella en la meva ànima, com la **Mari Pau** i en **Javi Ibarrondo**. També a tots els becaris amb qui he tingut la sort de treballar. A ells els dono les gràcies per la seva ajuda i per encomanar-me la il·lusió del qui comença, amb una especial menció a la **Rebeca** i la **Cristina**, amb qui vaig tenir la sort de compartir més enllà del lab.

I Finalment al Dr. **Bonaventura Clotet**, el Ventu, l'artífex i home clau d'Irsicaixa. A ell li dec tot, ja que sense el seu somni, fet laboratori punter i centre clínic de referència de la lluita contra la sida, jo no seria ara aquí plena d'orgull de tots aquesta anys passat, de tota aquesta gent coneguda i viscuda i tota la feina feta.

Ja sabem que en el laboratori ens hi deixem moltes hores... però en les poquetes hores que manquen per acabar el dia, tinc a una gent al meu costat, que fan que la vida tingui sentit.

Sobretot als meus **parets**, a qui no puc agrair en paraules (i menys amb només un paragraf... necessitaria una tesi sencera! Com a mínim...) tot el que han fet per mi, perquè sempre quedaran curtes, però ho intentaré... Gràcies per recolzar-me sempre en totes les decisions, per alegrar-vos més que jo, amb els petits èxits aconseguits, per fer-me riure a més no poder, inclús en dies on les cabòries t'anul·len i per fer-me sentir



sempre la seva estima i carinyo incondicional, la qual cosa em dona ales per poder creure, el que sempre m'han dit: que voler és poder. També li vull agrair al meu germà, a l'**Uri**, tota l'estima i carinyo que em professa, tots els seus ànims i "cuidados" cap a mi, talment com si encara volgués que fos "sucre", com quan érem petits. A ell li he d'agrair grans moments, i un d'ells són les entrades a la feina pel matí (moment dur per tots els mortal), una rutina fàcil de repetir, ja que per esmorzar, tenia un cafè i una gran "carcajada" assegurada.

També vull agrair a "les meves nenes" a la **Laurins**, la **Rous**, la **Èlia**, la **Marieta** i la **Marta**, tots els bons moment passats aquests anys. Totes les aventures, les xerrameques organitzant i canviant el món, les festes, els carinyos, els embolaos, les voràgines, i en definitiva el gran suport que m'han donat sempre. Sóc molt feliç d'haver-me topat amb vosaltres en algun moment de la meva vida.

A la gent del poble de Sant Andreu, companys d'il·lusions i projectes: **Oliver**, **Uri**, **Víctor**, **Helena**, el **Patis**, l'**Andrea**, el **Ru**, el **Sergi** i la **Peus**, al **Ferran Pons**, el **Metal**, a l'**Alba Lu**, al **Thierry**, al **Hèctor** (deixeu de buscar en yeti... ell és el "hombre de las nieves"), ... i un llarg etcètera de noms de gent de la contrada, grans persones que m'han acompanyat en aquest viatge, i m'han portat les maletes, perquè les pujades del camí fossin menys dures.

A la gent de la trini: al **Mariano**, al **Barbas**, al **Juanito**, al **Pater**, al **Facu**, a la **Cande** i al **Flash**, gent increïble, que espero que no parin mai de lluitar i canviar les coses. I sobretot al **Jaki**, una de les millors persones que conec, sinceritat en estat pur, generositat i humilitat per donar i per vendre, amb qui es pot comptar sempre, bondat personificada, sense el suport del qual, no estaria posant el punt i final d'aquesta Tesi.

A la **Marta Puig**, una amiatat de sempre i per sempre. A ella li he d'agrair un munt de coses, ja que ha estat una companya de fatigues en molts moments importants de la meva vida, però sobretot li he d'agrair que em fes anar a Irsicaixa a provar sort, quan era una recent llicenciada amb poques confiances, i provocar que tot això tingués un principi. No sé si li podré agrair mai el que va fer per mi... però bé, tenim tota la vida.

A les **Ohdiosas**, el millor equip de futbol de la ciutat! a l'**Alba**, a la **Núria** i l'**Anna Macià**, a la **Peuets**, a la **Txemiqui**, a la **Èlia**, a la **Marieta**, a l'**A18**, a la **Jelen**, a la **Curriu**, a la **Mar**, a la **Gemita**, a la **Soraya**,...i a les esporàdiques, que ens han tret d'algun "apuro més d'una vegada"...i per renovar-me l'esperit cada dimarts al vepre-nit. Ohdiosas sí! Que és més que un club!

Al **Javi de Màlaga**, de los amigos que tengo lejos y más cerca a la vez. Gracias por tus ánimos, y cariños y por pensar siempre, que me saldría con la mía. Te debo un buen cazón y un baño en la Malaguita. Lo debido es deuda! Nos vemos pronto amigo!



Al **Xavi** Simio, la Xàvia, una gran amic i millor persona. Li agraeixo tots els ànims i tot el suport que m'ha donat sempre en aquest camí dur i feixuc. Gracies al seu esperit crític, a les seves reflexions i a les seves ganes de compartir sapiència.

Als **bioquímics**: a l'Albert, al Martí, a la Cristina, a la Nere, a l'Albert, al David, al Xavi Castells, al Rubisco Morenazo, al Xavi Muñoz, Isaac, a la Miris, al Yeral (one more time!) i al la Gemma, perquè sou genials i m'heu donat sempre suport i amistat a "tutiplen"! perquè sou la meva admiració i us adoro i espero sempre tenir notícies vostres i trobar-vos al menys un cop a l'any en el nostre dia especial, del "amic inservible"! una gran tradició que no podem perdre mai!

Això ja s'acaba... i no puc acabar sense agrair al Steve Jobs (al cel sia!) que inventés la ferramenta que més m'ha ajudat arribar fins aquí. Ara sí! Que sí! Que això està fet...
alea jacta est!

