

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**

Departamento de Medicina



**INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LAS CITOCINAS EN LA
GRAVEDAD DE LA RECIDIVA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C, EN LA
INCIDENCIA DE RECHAZO AGUDO DEL INJERTO Y EN LA RESPUESTA AL
TRATAMIENTO ANTIVIRAL EN PACIENTES ADULTOS CON TRASPLANTE
HEPÁTICO POR CIRROSIS POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C.**

TESIS DOCTORAL

ISOLINA BAÑOS PÉREZ

MADRID, 2008

ISOLINA BAÑOS PÉREZ

TÍTULO: INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LAS CITOCINAS EN LA GRAVEDAD DE LA RECIDIVA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C, EN LA INCIDENCIA DE RECHAZO AGUDO DEL INJERTO Y EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTIVIRAL EN PACIENTES ADULTOS CON TRASPLANTE HEPÁTICO POR CIRROSIS POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C.

DIRECTORES: **Prof. D. VALENTÍN CUERVAS-MONS MARTÍNEZ**, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID, JEFE DEL SERVICIO DE MEDICINA INTERNA Y JEFE DE LA UNIDAD DE TRASPLANTE HEPÁTICO DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO DE MADRID.

Dra. Dña MARÍA JESÚS CITORES SÁNCHEZ, DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS. DOCTORA CONTRATADA EN EL LABORATORIO DE MEDICINA INTERNA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO DE MADRID.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

2008

VALENTÍN CUERVAS-MONS MARTÍNEZ, Doctor en Medicina, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, Jefe del Servicio de Medicina Interna y Jefe de la Unidad de Trasplante Hepático del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid y **MARÍA JESÚS CITORES SÁNCHEZ**, Doctora en Ciencias Biológicas, Contratada en el Laboratorio de Medicina Interna del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid,

en calidad de Directores del Trabajo de Tesis Doctoral titulado “INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LAS CITOCINAS EN LA GRAVEDAD DE LA RECIDIVA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C, EN LA INCIDENCIA DE RECHAZO AGUDO DEL INJERTO Y EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTIVIRAL EN PACIENTES ADULTOS CON TRASPLANTE HEPÁTICO POR CIRROSIS POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C”, presentado por **ISOLINA BAÑOS PÉREZ**, para optar al Grado de Doctor

CERTIFICAN

que es un trabajo original de investigación sobre un tema de interés clínico que cumple con los requisitos legales, de metodología y rigor científico y aportaciones originales, para constituir un trabajo de Tesis Doctoral.

Lo que certificamos en Madrid, a cinco de Mayo de 2008.

Prof. Valentín Cuervas-Mons Martínez

Dra. María Jesús Citores Sánchez

**A Martín,
a Sam.**

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Laboratorio de Medicina Interna y en la Unidad de Trasplante Hepático del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid, y ha sido parcialmente subvencionada por la Fundación Mutua Madrileña y por una Beca Predoctoral de la Cátedra de Trasplantes UAM-ROCHE.

Agradecimientos

Dicen que escribir los agradecimientos de una tesis doctoral es lo más fácil, pero a mí me ha resultado bastante más complicado de lo esperado, ya que las pocas o muchas palabras que escriba en estas líneas probablemente no serán capaces de reflejar el profundo agradecimiento que siento y la impronta humana que han dejado en mí muchas de las personas que han estado a mi lado durante estos meses. Es verdad que ya había escrito hace algún tiempo parte de lo que quería transmitir, pero no pensé que la intensidad de lo que he sentido con la gente que me ha acompañado, fuera a incrementarse de forma exponencial con el paso de los días, de las horas, de los minutos.....así que ahora ya me he quedado sin palabras suficientes. De todos modos ahí va; tome aliento el lector.....

APARTADO 1: LA FAMILIA

En primer lugar vaya el agradecimiento a mis padres. Ellos me han inculcado de forma magistral el sentido del trabajo bien hecho y de la dedicación en su profesión, con su actitud y con su ejemplo. El mundo es mejor ahora desde que ellos ejercieron en sus respectivos campos con su profunda convicción de servicio a los demás. Igualmente, por su preocupación continua y desinteresada por mi bienestar desde el día cero de mi existencia hasta hoy. Gracias de corazón.

A María, por su amor, por su sensibilidad, por sus enseñanzas, por su lucha y por su cálido corazón en los momentos más áridos de mi vida. Te quiero.

A Sam, por todo el amor que me ha dado y todo lo que me da cada segundo de nuestro caminar, y a Martín, porque ya no concibo la vida sin su luz.

Gracias a todos ellos hoy estoy aquí, en este punto del camino.

APARTADO 2: LOS AMIGOS

A Chusa, por todas las tardes (y mañanas) compartidas, por tantas risas, por tanta dedicación desinteresada y por tanta estopa, el punto justo de lo que necesito para un óptimo rendimiento.

A Reichi, por ser como es, por darlo todo sin estridencias en cada acto que se propone, en cada acto que realiza. Por su cercanía, por su consideración, por su templanza en los peores momentos, por su sinceridad y por su tierno corazón.

A Silvi la pizpireta, por su optimismo, por sus ánimos continuos, por su cariño incondicional, por su enorme bondad y, sobre todo, porque todas estas virtudes las ha puesto a mi disposición en todo momento y de manera sincera.

A las tres, porque vuestra mayor virtud es SER. Os quiero.

A Marta, a Bego; porque a pesar de la distancia conseguís que el hueco que ocupáis en mi corazón no apague nunca su llama, que desde hace ya muchos años, me ilumina y alimenta en mi caminar.

APARTADO 3: LOS MAESTROS

A la Dra. M^a Jesús Citores, que con su solidez de conocimientos, su claridad a la hora de plasmarlos, su exhaustividad y capacidad de trabajo inagotable, ha hecho posible que esta iniciativa viera la luz. Una gran parte de esto es culpa de la investigadora que llevas dentro, y esto no sólo se hace, sobre todo se nace. Eres el alma de este trabajo.

Al Dr. Prof. Valentín Cuervas-Mons porque su integridad y optimismo se transmite en cada acto que realiza, contagiando a todo el que tiene a su alrededor, porque por la confianza que ha depositado en mí, ha sido capaz de poner en marcha una maquinaria que parecía oxidada. En esta ocasión, no me importa ser esclava de mis palabras. Gracias Valentín.

A la Dra. Raquel Castejón, que es el alma y la voz de gran parte de lo que ocurre en el laboratorio de Medicina Interna y hace fácil lo difícil. Por ella me embarqué en esta aventura.

Al Dr. Juan Antonio Vargas y al ya fallecido Dr. Duránte, porque de alguna manera fueron los responsables de sembrar en mí la semilla de la investigación.

Al Dr. Miguel Yebra Bango, *el maestro*, el trabajador incansable, el poeta, el amigo. Porque gran parte de lo que soy como profesional es mérito suyo, porque me enseñaste

un camino de profesionalidad y humanidad en su justa medida y, sobre todo, porque fuiste el primero en confiar en mí. Sin gente como tú este mundo sería gris. Eres el genio.

APARTADO 4: LOS COLABORADORES

Aunque este es el último apartado, no por ello es el menos importante.

A Ana Noblejas y Pedro Durán, con el Dr./a delante o sin él, porque sin su voluntariedad y obstinado trabajo esto no hubiera sido posible, porque hacen más sencillo y más dinámico el día a día y porque cada momento aprendo algo de y con vosotros. Por tantos momentos compartidos en viajes y en hoteles mientras yo duermo Gracias.

A Carlos Vílchez, por colaborar en la obtención de las muestras de ADN.

A Susana Mellor y a Pablo Tutor, por su ejemplo y por el aliento “del que ya estuvo ahí”.

A Concha y a Gloria que me iniciaron con enorme paciencia en el mundo de la pipeta, con su profesionalidad y con su compañía diaria acompañada de cafés y de tertulias. Gracias.

A todos vosotros porque, en diferentes momentos de este trabajo, cada uno estaba presente. También es vuestro.

Abreviaturas

3'UTR: región 3' no traducida (de 3' *untranslated region*)

A: Adenina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ALT: Alanina aminotrasferasa

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

AST: Aspartato aminotransferasa

C: Citosina

CMV: Citomegalovirus

CPA: Célula presentadora de antígeno

E: Especificidad

G: Guanina

HVR-1: Región hipervariable 1 (de *hypervariable region 1*)

IC 95%: Intervalo de confianza al 95%

IFN: Interferón

IL: Interleucina

IL-1R: Receptor de la interleucina 1

IL-1RA: Receptor antagonista de la interleucina 1

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

MMF: Micofenolato de mofetil

NK: Asesina natural (de *natural killer*)

OR: Odds ratio

RVS: Respuesta viral sostenida

S: Sensibilidad

SNP: Polimorfismo de un nucleótido (de *single nucleotide polymorphism*)

T: timina

TGF: Factor de crecimiento transformante (de *Transforming growth factor*)

Th: Linfocito T cooperador ó *helper*

TLR: Receptor toll like (de *Toll like receptor*)

TNF: Factor de necrosis tumoral (de *Tumoral necrosis factor*)

Tregs: T reguladores

VEB: Virus de Epstein-Barr

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

VPP: Valor predictivo negativo

VPP: Valor predictivo positivo

Índice

INTRODUCCIÓN	1
I. Epidemiología de la infección por el virus de la Hepatitis C (VHC)	1
1. Mecanismos de transmisión del VHC y grupos de riesgo	1
2. Enfermedad hepática por el VHC	4
II. Estructura y características moleculares del VHC	5
III. Respuesta inmunológica frente al VHC. Inmunopatogénesis de la enfermedad	7
1. Mecanismos de respuesta inmunológica	7
2. Claves en la respuesta inmune de la hepatitis viral	9
IV. Recidiva de la infección del VHC en pacientes trasplantados	12
1. Historia natural de la recidiva del VHC	12
1.1. Origen de la infección y cinética viral postrasplante	12
1.2. Recidiva de la infección por VHC	13
1.3. Supervivencia de los pacientes trasplantados por VHC	14
2. Factores de riesgo asociados con la recidiva del VHC	15
2.1. Factores víricos	15
2.2. Factores del huésped	16
2.3. Factores del donante	17
2.4. Influencias externas del entorno y/o iatrogénicas	17
V. Polimorfismos genéticos de las citocinas en la infección por VHC	19
1. Polimorfismos e infección crónica por VHC	19
2. Polimorfismos y recidiva del VHC	23
3. Polimorfismos y rechazo agudo del injerto	24
HIPÓTESIS	26
OBJETIVOS	27

PACIENTES Y MÉTODOS	28
I. Características del estudio	28
1. Diseño del estudio	28
2. Población estudiada	28
II. Variables analizadas	29
1. Datos clínicos	29
2. Definición de las variables analizadas	29
2.1. Recidiva de la enfermedad por VHC	29
2.2. Gravedad de la recidiva histológica	30
2.3. Respuesta al tratamiento antiviral	30
2.4. Rechazo agudo del injerto	30
III. Pacientes por grupos de estudio	31
1. Recidiva del VHC	31
2. Rechazo agudo	31
3. Respuesta al tratamiento antiviral	31
IV. Metodología	32
1. Recogida de muestras	32
2. Purificación de ADN genómico	32
3. Análisis de los polimorfismos genéticos de citocinas	33
V. Análisis estadístico	36
RESULTADOS	37
I. Características demográficas y clínicas de la población estudiada	37
1. Régimen inmunosupresor	38
2. Rechazo agudo del injerto	38
3. Recidiva del VHC	39
4. Tratamiento antiviral post-trasplante	39

II. Características generales relacionadas con la gravedad de la recidiva, con la respuesta al tratamiento antiviral y con el rechazo agudo del injerto	41
1. Recidiva viral grave y factores generales asociados	41
2. Rechazo agudo del injerto y factores generales asociados	43
3. Respuesta al tratamiento antiviral y factores generales asociados....	44
III. Distribución de los polimorfismos genéticos de las citocinas en pacientes trasplantados por cirrosis por VHC	45
IV. Polimorfismos genéticos y recidiva grave del VHC	48
V. Polimorfismos genéticos y rechazo agudo del injerto	51
VI. Polimorfismos genéticos y respuesta al tratamiento antiviral	54
DISCUSIÓN	57
I. Frecuencias de los polimorfismos genéticos	59
II. Polimorfismos y recidiva grave	61
III. Polimorfismos y rechazo agudo	65
IV. Aplicabilidad práctica de los resultados	66
CONCLUSIONES	67
BIBLIOGRAFÍA	68
ANEXO: Difusión de los resultados derivados de este estudio.....	82

Introducción

I. EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es endémica en el mundo, con una prevalencia global estimada del 3% (variando desde un 0.1% a un 5% dependiendo del país analizado) y 170 millones de individuos afectados (1). Existen 150 millones de portadores crónicos del VHC, de los cuales se estima que hay 3 millones en USA (2), 5 millones en Europa Occidental y 10 millones en Europa del Este. La prevalencia de la infección en España se sitúa entre la de los países del centro de Europa y la de Italia, oscilando entre el 1.6 y 2.6% de la población (3), lo que nos permite calcular que en España existen entre 480.000 y 760.000 personas infectadas por el VHC.

La incidencia de infección sintomática debido al VHC ha sido estimada en 1-3 casos/100.000 habitantes/año (2.3 en España en el año 2003) (3), aunque la incidencia sería mucho mayor si tuviéramos en cuenta los casos que cursan de manera asintomática.

1. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN DEL VHC Y GRUPOS DE RIESGO

La transmisión por vía parenteral del VHC es bien conocida, aunque este mecanismo sólo explica entre el 30 y el 70% de todos los casos, según las regiones geográficas, y existe un porcentaje no despreciable de pacientes con serología positiva para el VHC (aproximadamente un 30%), en los que no llega a identificarse con certeza el mecanismo responsable de la transmisión.

La transfusión de sangre y productos hemoderivados constituyó la vía de transmisión más frecuente de la enfermedad en los países desarrollados antes del año 1986 (incidencia del 5-13%), y estaba directamente relacionada con el número y cantidad de productos sanguíneos recibidos (4). La descripción de pruebas diagnósticas para la determinación de anticuerpos frente al VHC y su generalización en el cribado de los donantes de sangre hacia el año 1990 hizo que disminuyera la incidencia (menos del 1%).

En Europa, se estima que la incidencia de infección por VHC en pacientes sometidos a *hemodiálisis* es del 11.6%, y parece estar directamente relacionada con la duración de la

diálisis y el número de transfusiones recibidas. En España, la incidencia derivada de esta vía de transmisión es ligeramente superior que en el resto de países europeos (19.5%) (5).

Los *usuarios de drogas por vía parenteral* constituyen actualmente el grupo de riesgo con mayor prevalencia de infección por VHC (entre el 31% y 98% según la localización geográfica) debido al uso compartido de jeringas contaminadas, constituyendo un reservorio potencial en la comunidad. Sin embargo esta vía de transmisión ha disminuido de forma muy importante en los últimos años con la aplicación de precauciones universales en este grupo de riesgo, aunque en la actualidad continúa siendo el principal modo de transmisión, suponiendo el 38% de los casos nuevos (6).

La *vía de transmisión sexual* es poco frecuente en parejas heterosexuales que no realizan prácticas de riesgo, ya que el VHC no se encuentra presente en el semen ni en el fluido vaginal. Se estima que la seroprevalencia del VHC en las parejas de un miembro infectado es del 2-3% (7), siendo el riesgo de infección mayor para la mujer que para el varón (2). Sin embargo, la seroprevalencia se eleva al 4-6% entre las personas con múltiples parejas sexuales o que desarrollan prácticas sexuales de riesgo, como relaciones vía anal o prácticas sexuales traumáticas (2).

La transmisión perinatal del VHC de niños nacidos de madre seropositiva para el VHC, ocurre en un 2% de los casos, incrementándose la incidencia al 4-7% si la madre tuviera detectable el ARN del virus durante el embarazo y en el momento del parto (2).

Otros grupos de riesgo lo constituyen los consumidores de drogas por vía intranasal, dada la frecuencia con que se comparte el material de inhalación (8), la acupuntura, el tatuaje y las perforaciones a diferentes niveles, si el equipo utilizado estuviera contaminado (8), y el personal sanitario, cuyo riesgo de transmisión tras un pinchazo accidental está en torno al 2% (2;4;8).

Finalmente, la vía de *transmisión intrafamiliar* no está clara, y se especula que el uso compartido de cepillos dentales, cuchillas, maquinillas de afeitar y utensilios de limpieza personal, ejercieran como vías de transmisión. No existe evidencia de que estornudar, besar o compartir utensilios de comida, se asocie con la transmisión del VHC (2).

2. ENFERMEDAD HEPÁTICA POR EL VHC

En los países industrializados el VHC es responsable del 20% de las hepatitis agudas, del 70% de los casos de hepatitis crónica, del 40% de los casos de estadios finales de cirrosis y del 60% de los casos de carcinoma hepatocelular (6).

Las secuelas de la infección crónica por VHC (cirrosis, carcinoma hepatocelular) son responsables de 8.000-10.000 muertes cada año en Estados Unidos (6) y constituyen la principal indicación de trasplante hepático en este país y en Europa, suponiendo aproximadamente el 35% de todos los trasplantes hepáticos realizados en España (9).

A pesar de la reducción en la incidencia de la infección por VHC, el “Center for Disease Control” estima que el número de pacientes con infección crónica que desarrollarán estadios terminales de cirrosis y la mortalidad actual como consecuencia de la infección por el VHC, se multiplicará por dos o por tres en las próximas dos décadas (7). Se ha estimado que el número total de personas infectadas crónicamente por el VHC, alcanzará su pico máximo en el año 2015 (10). Existen modelos que predicen que entre los años 2010 y 2019 en Estados Unidos, el VHC será el causante de 165.900 muertes por cirrosis, 27.200 muertes por hepatocarcinoma, y un gasto económico de 10.7 billones de dólares (11).

El tratamiento farmacológico más eficaz en los pacientes infectados por el VHC, en la actualidad, es la combinación de interferón pegilado y ribavirina durante periodos prolongados de tiempo (12;13). Dado que sólo un 50% de los pacientes infectados por el VHC responderán a esta combinación, el trasplante hepático se presenta como la única alternativa eficaz para aquellos pacientes no respondedores que desarrollan estadios terminales de cirrosis y hepatocarcinoma. Sin embargo, una vez trasplantados este problema se perpetúa debido a la recidiva universal de la infección por el VHC sobre el órgano trasplantado (14;15). Las consecuencias de la recidiva del VHC son muy variables entre los diferentes individuos, pero en general la evolución de la enfermedad es más rápida y más agresiva que en los pacientes no trasplantados, encontrando que el 50% de los pacientes habrán desarrollado cirrosis a los 10 años del trasplante, con la consecuente necesidad de retrasplante como única alternativa terapéutica.

II. ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DEL VHC

El VHC es un virus hepatotrofo que pertenece al género hepacivirus dentro de la familia flavoviridae, que incluye los flavovirus y los pestivirus. Este virus presenta una gran variabilidad genética existiendo al menos 9 genotipos, divididos a su vez en más de 100 subtipos (16). Los genotipos se denominan mediante un número (del 1 al 9) y los subtipos mediante una letra minúscula, por orden de descubrimiento (p.ej., 1a, 1b, 2a, 3a, etc.) (17). Además, la alta capacidad de mutación del virus da lugar a la aparición de cuasiespecies, que son variantes genéticas de un mismo genotipo o subtipo dentro de un mismo individuo.

Cada virión está compuesto por una única cadena de ácido ribonucleico (ARN) que muestra pequeñas variaciones entre los distintos genotipos. Esta cadena de ARN consta de aproximadamente 9.4 KB y codifica para una poliproteína de unos 3000 aminoácidos (Figura 1) que es procesada en 10 proteínas estructurales y no estructurales o reguladoras (18). Desde el extremo carboxi-terminal codifica para la proteína no estructural del core y dos glicoproteínas de la cubierta (E1 y E2), y para las proteínas no estructurales que incluyen proteasas (NS 2/3 y NS3), helicasa (NS3) y ARN polimerasa (NS 5B), que realizan funciones esenciales en el ciclo vital viral.

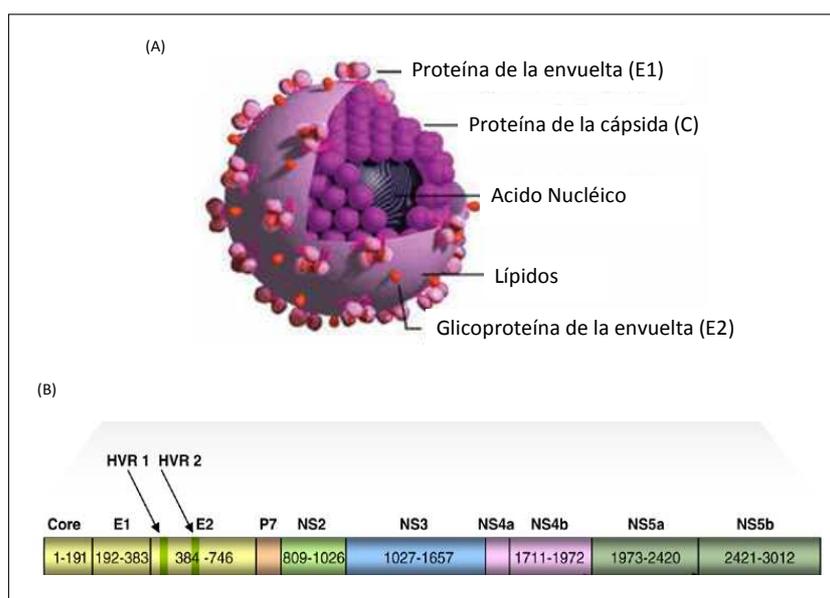


Figura 1. Esquema representativo de la estructura del VHC (A) y de la región codificante del ARN del virus (B)

Flanqueando al ARN genómico existen dos regiones no codificantes de secuencias muy conservadas. La región situada en el extremo 5' comprende 341 nucleótidos, siendo la región más conservada del genoma del virus y cuyas variaciones caracterizan los distintos genotipos (19). La región no codificante situada en el extremo 3' se divide a su vez en tres regiones diferentes. Una de ellas, de 98 nucleótidos altamente conservados denominada región 3'X, parece desempeñar un papel importante en la replicación e infectividad vírica.

III. RESPUESTA INMUNOLÓGICA FRENTE AL VHC. INMUNOPATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD

1. MECANISMOS DE RESPUESTA INMUNOLÓGICA

La respuesta inmune innata es el primer mecanismo de defensa inmunológica frente a antígenos extraños. Se caracteriza por ser muy rápida, no específica y no conservar memoria inmunológica. Cuando los mecanismos de esta respuesta innata no son capaces de erradicar el antígeno extraño, se pone en marcha la respuesta adaptativa, que tarda varios días en ser operativa, debido al tiempo requerido para la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos T y B en las correspondientes células efectoras.

Los linfocitos T vírgenes circulantes entran en los órganos linfoides secundarios y reconocen la combinación específica de péptido antigénico-molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de una célula presentadora de antígenos (CPA), que desencadena la respuesta inmune adaptativa. La dosis, naturaleza y tiempo de exposición del antígeno, así como las citocinas producidas durante la respuesta innata, influirán de manera determinante en la diferenciación funcional de las subpoblaciones de los linfocitos T colaboradores (T helper; Th) CD4+ a células Th1, Th2 o Th17 (20;21) (figura 2).

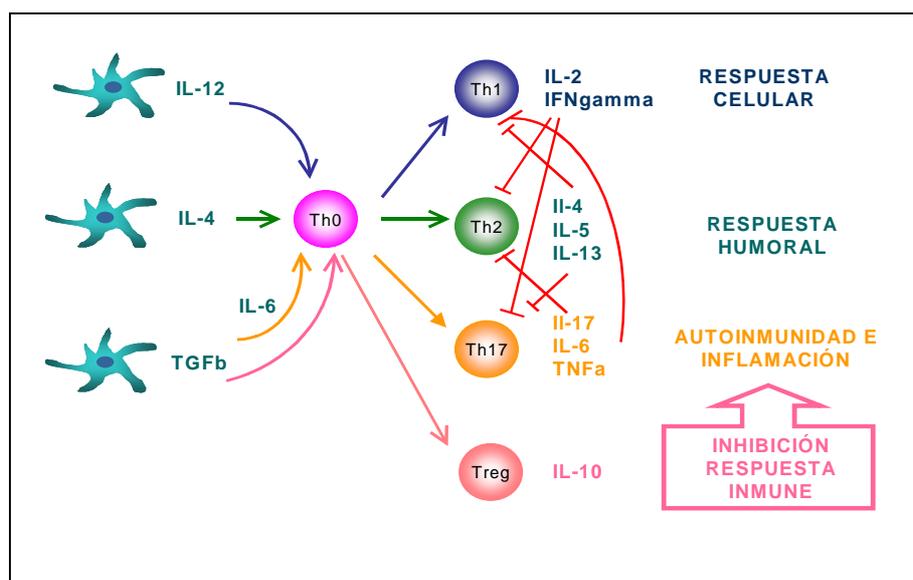


Figura 2. Papel de las citocinas en la diferenciación de los linfocitos T CD4

Los linfocitos T CD4⁺ se diferencian a células Th1 cuando son estimuladas por antígenos extracelulares (presentados por las moléculas del MHC-de clase I) en presencia de interleucina (IL)-12 (producida por macrófagos y células dendríticas) e interferon (IFN)-gamma (producido por células asesinas naturales (natural killer; NK) y células presentadoras de antígenos (CPA). Estas células se caracterizan por secretar IL-12 y grandes cantidades de IFN-gamma, que activa a las células NK y linfocitos citotóxicos CD8⁺, dando lugar a la respuesta inmune mediada por células. En cambio, las células T CD4⁺ que se activan por antígenos extracelulares presentados por las moléculas del MHC de clase II en un entorno rico en IL-4 (secretada por mastocitos) se diferencian a células Th2, caracterizadas por secretar IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Estos linfocitos actúan como colaboradores de los linfocitos B en su ruta de activación, proliferación y diferenciación a células plasmáticas secretoras de anticuerpos (inmunidad humoral).

Recientemente se ha descrito una tercera subpoblación de células T colaboradoras, denominada Th17, caracterizada por la producción de IL-17 y que también produce otras citocinas como la IL-6 y el factor de necrosis tumoral (Tumor Necrosis Factor; TNF)-alfa, cuyo efecto está encaminado a la activación de los neutrófilos y el consecuente desarrollo de una respuesta inflamatoria con capacidad para la eliminación de bacterias extracelulares y hongos. El desarrollo de una respuesta inmune de clase Th17 depende del factor de crecimiento tumoral (Transforming Growth Factor; TGF)-beta (citocina con efecto pleiotrópico producida por múltiples linajes de leucocitos y células estromales) en presencia de la citocina proinflamatoria IL-6 (producida principalmente por monocitos y macrófagos).

Esta ruta de activación en la que participa TGF-beta también está relacionada, en ausencia de la IL-6, con el desarrollo y función de las células T reguladoras (Tregs) (20). La respuesta de las células T efectoras está estrechamente controlada por las células Tregs, que se encargarán de mantener una homeostasia adecuada de la respuesta inmune, ya que la actividad inapropiada o pobremente controlada de las células T efectoras, puede causar patología en el propio huésped, como enfermedades autoinmunes, procesos alérgicos y procesos inflamatorios crónicos.

2. CLAVES EN LA RESPUESTA INMUNE DE LA HEPATITIS VIRAL

El VHC es esencialmente un virus hepatotrope, aunque es capaz de infectar otro tipo de tejidos como los órganos linfoides, páncreas, glándulas suprarrenales y médula ósea (22;23). La lesión producida por el VHC sobre los hepatocitos no es un daño directamente citopático sino inmunomediado (24), jugando en este sentido un importante papel tanto la inmunidad innata como la inmunidad adquirida. Cuando los mecanismos responsables del aclaramiento viral fallan y no son capaces de eliminar el virus, la persistencia del estímulo antigénico induce una respuesta inflamatoria mantenida, que es la que va a determinar el daño hepático.

En la figura 3 se muestra una representación esquemática de la respuesta inmune que tiene lugar durante la infección por el VHC.

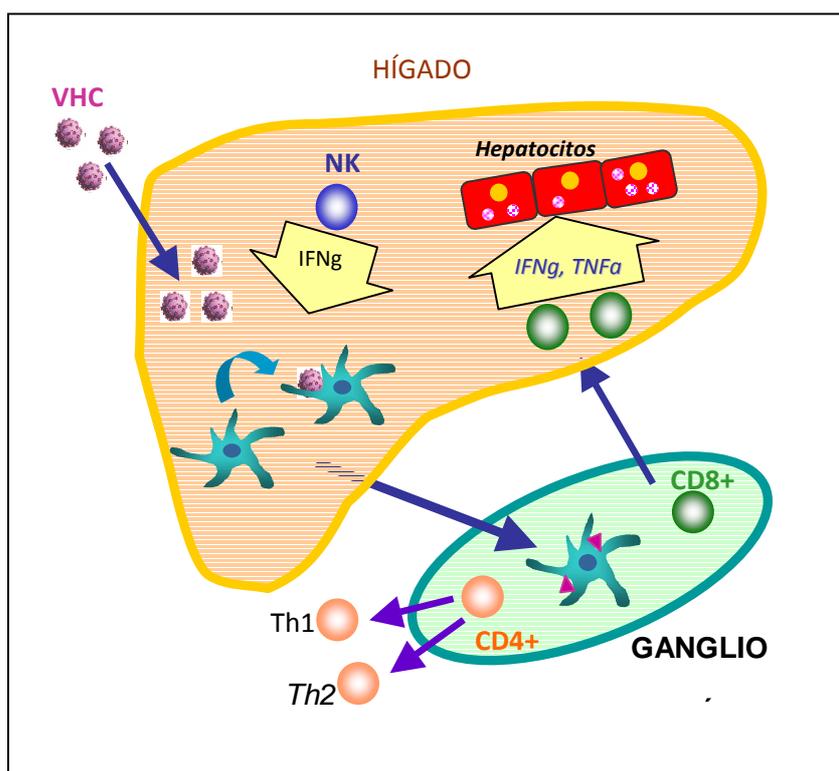


Figura 3. Esquema representativo de la respuesta inmune frente al VHC. Cuando el VHC infecta el hígado se activan tanto la respuesta inmunológica innata como la adaptativa. Por un lado, las células asesinas naturales (NK) producen IFN-gamma. Por otro lado, las células presentadoras de antígeno (CPA) que reconocen el virus, lo procesan y migran a los ganglios linfáticos donde presentan los péptidos antigénicos a los linfocitos T induciendo la diferenciación de los linfocitos Th1 y Th2 así como la activación de los linfocitos CD8+ citotóxicos.

Durante las fases iniciales de la infección primaria por el VHC, los niveles del ARN del virus se incrementan rápidamente en los primeros días y se mantienen elevados a lo largo de todo el periodo de incubación (25), que puede durar 10-12 semanas. Sin embargo, aunque los mecanismos de respuesta inmune innata ya se han puesto en marcha, la carga viral no disminuye, sugiriendo que el VHC impide de alguna manera la ejecución de las maquinarias antivirales. En este sentido se han involucrado varias proteínas derivadas del VHC en la supresión de las señales necesarias para inducir la producción de proteínas antivirales como el IRF-3 (interferon regulatory factor-3), inhibido por la proteasa NS3/4A del virus (26); NFkB (nuclear factor kappa B), cuya activación es inhibida por las proteínas del core (27), y PKRs (protein kinasas RNA-dependent) inhibidas por las proteínas NS5 y E2 del virus (28). También se ha descrito que la proteína de la cubierta E2 inhibe la expresión de CD81 en las células NK (29).

La respuesta inmune adaptativa, a través de los linfocitos T CD4+ y T CD8+, desempeña un papel determinante en el resultado final de la infección por el VHC. Se considera que para la resolución de la infección es necesaria una respuesta tipo Th1 precoz, vigorosa, mantenida en el tiempo y multiepitopo específica (25;30-33). Así, en los pacientes que desarrollan hepatitis crónica por VHC, la respuesta de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ se encuentra funcionalmente debilitada y presentan una actividad no sostenida en el tiempo (31). Se han propuesto varios mecanismos para explicar el fallo funcional de las células T que se observa en los pacientes con hepatitis crónica por VHC:

- Mutaciones genéticas del VHC en aquellos epítomos que son reconocidos por las células T CD8+ (31;32;34-40)
- Fracaso primario de las células T o agotamiento de las mismas
- Debilitamiento en la presentación de antígenos
- Debilitamiento en la maduración de las células T (37;41)
- Supresión de las células T por proteínas virales (41)
- Supresión de las células T por las células Tregs (37)
- Presencia de un ambiente hepático tolerogénico (32)

Por otra parte, parece que tras ejercer su función efectora, las células T específicas frente al VHC experimentan apoptosis (42). La muerte de células inflamatorias en el hígado, la lisis de algunos hepatocitos infectados y la secreción de citocinas inflamatorias (43) de forma mantenida en el tiempo, podrían activar las células hepáticas estrelladas, que son la fuente principal de la matriz extracelular en la fibrosis hepática (44). Por tanto, además del fallo funcional de los linfocitos T para erradicar el virus, estas células también pueden producir daño hepático por ellas mismas, siendo éste un factor crucial en el desarrollo de la fibrosis hepática y cirrosis.

IV. RECIDIVA DE LA INFECCIÓN DEL VHC EN PACIENTES TRASPLANTADOS

1. HISTORIA NATURAL DE LA RECIDIVA DEL VHC

La recidiva de la infección del VHC en pacientes con trasplante hepático por cirrosis por VHC, es casi universal (>98%) si no han recibido tratamiento antiviral previamente (14;15;45;46).

Las consecuencias de la infección por el VHC después del trasplante hepático son muy variables entre los diferentes individuos, y no son tan indolentes como sugerían los estudios iniciales. Se ha demostrado que la progresión de la hepatitis C tiene un curso acelerado y más grave en los pacientes trasplantados que en aquellos inmunocompetentes. Así, un 20-30% de los pacientes trasplantados con recidiva de la hepatitis C, desarrollan cirrosis en un periodo de tiempo de 4-5 años, y hasta un 50% de los pacientes tienen cirrosis del injerto transcurridos 10 años del trasplante (47-49).

1.1 Origen de la infección y cinética viral postrasplante

Aunque cabría esperar que una vez extraído el órgano infectado por el VHC se produciría la resolución completa de la infección, la realidad es que en el 98% de los pacientes se detecta ARN del VHC en suero una vez trasplantados. Esto ocurre porque el virus, a pesar de ser principalmente hepatotrofo, se perpetúa en otros reservorios extrahepáticos, fundamentalmente en los ganglios linfoides, y desde esta localización vuelven a infectar el órgano trasplantado (22;23;50). Además, los viriones que forman parte del remanente sanguíneo continúan replicando (51;52). Así, en la fase anhepática se produce un descenso brusco de la carga viral (53), sin embargo a partir de las 12-24 horas posteriores a la reperusión, se produce una replicación viral muy rápida con el consiguiente aumento de viremia, que alcanza sus niveles máximos a los 4-5 días del trasplante (54-56).

Para poder aclarar el virus, es necesaria una respuesta inmunológica tipo Th1 rápida, vigorosa y mantenida en el tiempo, lo que sucede en el 20-50% de los pacientes inmunocompetentes y en casi ninguno de los pacientes trasplantados, en gran parte por la inmunosupresión a la que se encuentran sometidos, lo que condiciona una respuesta inmunológica débil y tardía, y como consecuencia, la persistencia viral y cronificación de la enfermedad.

1.2 Recidiva de la infección por el VHC

La recidiva de la infección por el VHC es prácticamente universal y el 50-90% de los pacientes virémicos presentarán evidencia histológica de la hepatitis por VHC dentro del primer año post-trasplante, siendo muy variable el espectro de lesión histológica entre los distintos individuos (47;57-59). En la mayoría de los pacientes con seguimiento histológico superior a 6 meses, los hallazgos histológicos observados son de hepatitis crónica activa, con o sin cirrosis (60).

Existe un pequeño porcentaje de pacientes (2-8%) que desarrollan una forma acelerada de hepatitis (61), denominada hepatitis colestásica fibrosante, caracterizada por ictericia intensa y rápida progresión hacia el fallo hepático. Se acompaña de lesiones histológicas muy específicas, que consisten en balonización de los hepatocitos, escasa inflamación, grado variable de proliferación colangiolar sin pérdida de ductos biliares y fibrosis en puentes (62). Este tipo de lesión hepática no se produce por un efecto inmunomediado, sino por un efecto citopático del propio virus, y evoluciona hacia cirrosis del injerto de forma mucho más rápida que el resto de los individuos (63;64).

En el otro polo de la recidiva de la infección por el VHC se encuentra un pequeño subgrupo de pacientes con viremia positiva, incluso con niveles altos de ARN del VHC, que no tienen lesiones histológicas tras varios años de seguimiento (47;57;65), lo que sugiere la existencia de un estado de “portador sano”, al igual que sucede en los individuos inmunocompetentes (66).

En los pacientes trasplantados con recidiva de la infección por VHC, la probabilidad acumulada de desarrollar cirrosis del injerto aumenta progresivamente hasta alcanzar el 20-30% a los 5 años del trasplante, y existen varios estudios que sugieren que el tiempo medio entre el trasplante y la instauración de cirrosis es de 9.5 años (46;47;67-70), muy poco tiempo si se compara con el de los pacientes inmunocompetentes, que precisan de una media de 30 años desde que son infectados hasta que desarrollan cirrosis (65;71;72). Una vez instaurada la cirrosis sobre el hígado trasplantado, el tiempo transcurrido hasta la primera descompensación hepática, disminuye drásticamente en estos individuos con respecto a los no trasplantados y el porcentaje de descompensación hepática es del 40% durante el primer año, y mayor del 60% una vez transcurridos 3 años (73). Paralelamente, la supervivencia a los 3 años de la primera descompensación es del 10%, frente al 60% en los pacientes inmunocompetentes.

1.3 Supervivencia de los pacientes trasplantados por VHC

Aunque la infección por el VHC no parece repercutir de forma negativa sobre la supervivencia del paciente en los primeros meses postrasplante, existen cada vez más evidencias del descenso de la supervivencia de estos individuos a partir del primer año del trasplante como efecto directo de la infección por el VHC. La supervivencia media de estos pacientes es de 8.5 años (63), un 56.6% menos que aquellos pacientes no infectados con el VHC y trasplantados por otras causas, cuya supervivencia media es de 15 años. Además, la recidiva de la infección por VHC se ha convertido en la primera causa de mortalidad a partir del primer año del trasplante hepático en los pacientes trasplantados por cirrosis por VHC. Así, la supervivencia de estos pacientes a los 5 años del trasplante es del 60-70% frente al 80% en los pacientes trasplantados por otras etiologías (46;72). Estos porcentajes parecen disminuir progresivamente en los trasplantes sucesivos, encontrando que la supervivencia media de los pacientes con un retrasplante por infección crónica por VHC, desciende hasta los 3 años.

La terapia antiviral, en particular el tratamiento con IFN-alfa y ribavirina, se ha mostrado eficaz únicamente en el 15-20 % de los individuos con recidiva de la infección por VHC (45;74-78), por lo que el resto de pacientes que no toleran el tratamiento, o que

no responden al mismo, están abocados a una evolución más rápida y agresiva de una enfermedad cuyo único tratamiento en los estadios finales será el trasplante hepático, con las dudas éticas y elevada morbi-mortalidad que el mismo conlleva (79-81).

2. FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS CON LA RECIDIVA DEL VHC

Los factores que predisponen a una evolución desfavorable de la hepatitis por VHC después del trasplante no están bien definidos, pero cada vez existen más evidencias de que están relacionados con: 1. las características intrínsecas de la cepa vírica infectante; 2. las características propias del receptor; 3. las características propias del donante; y 4. las Influencias externas del entorno y/o iatrogénicas

2.1 Factores víricos

Los factores dependientes del virus parecen ser importantes en la patogénesis de la lesión hepática, bien a través del daño hepático directo por el acúmulo de viriones o bien indirectamente a través de la respuesta inmune desencadenada, que es variable en función de la cepa vírica infectante.

- *Genotipo viral*

Existe controversia respecto al papel que desempeña el genotipo viral en la evolución de la hepatitis por VHC después del trasplante. A pesar de que algunos autores han descrito la asociación entre la infección por el genotipo 1b y el desarrollo de hepatitis más agresiva (58;69;82) otros autores no han observado estos resultados (59;83).

- *Viremia*

A partir de las 72 horas del trasplante, los niveles de viremia aumentan unas 10-20 veces con respecto a los niveles existentes pre-trasplante (54). No se ha encontrado asociación entre la carga viral postrasplante y la gravedad de la recidiva del VHC, sugiriendo que el mecanismo patogénico de lesión celular es inmunomediado y no citopático como se pensaba en un principio. Sin embargo, cada vez existen más estudios

que describen una asociación significativa entre los niveles elevados de ARN del VHC en el pre-trasplante y en el post-trasplante inmediato, con una peor evolución de la hepatitis por el VHC sobre el injerto (59;84;85).

- *Cuasiespecies del VHC*

Varios estudios realizados con individuos inmunocompetentes han analizado el papel de la diversidad del VHC (86;87) en la gravedad de la hepatopatía, con resultados no siempre homogéneos (88;89). La diversidad genética presente principalmente en la región hipervariable 1 (HVR-1) del gen de la proteína de la envuelta E2, condiciona la existencia de cuasiespecies virales (34), dando lugar a una población compleja de diferentes genomas cuyas secuencias difieren únicamente en una pequeña cantidad de nucleótidos y que se encuentran presentes en un mismo individuo (86). Se ha sugerido que existe una relación entre el grado de inmunosupresión y la complejidad de las cuasiespecies en los pacientes con trasplante hepático (90). Este hecho podría ser el responsable de la recidiva del VHC debido a la emergencia de nuevas variantes que facilitan la evasión del virus frente al sistema inmunológico. La complejidad genética se vuelve constante 36 meses después del trasplante en pacientes con fibrosis grado 3-4, mientras que los pacientes con fibrosis 1-2 presentan un patrón de complejidad más heterogéneo (91;92) sugiriendo que la disminución de la complejidad de las cuasiespecies podría estar asociada con la recidiva del VHC y con la progresión de la fibrosis.

2.2 Factores del huésped

Está bien establecido que las características propias del huésped, tales como la edad en el momento del trasplante, el sexo femenino, la gravedad de la enfermedad antes del trasplante y la raza diferente a la caucásica, son factores que influyen negativamente sobre la supervivencia del injerto y del paciente (59;93). Sin embargo, existen pocos estudios que correlacionen estos factores con la severidad de la recidiva del VHC. También se ha demostrado que los pacientes portadores del antígeno de histocompatibilidad de clase II DR3, tienen una tasa de recidiva por el VHC mayor y

desarrollan una enfermedad hepática más agresiva, con el consiguiente descenso en la supervivencia del injerto (94).

2.3 Factores del donante

Está bien establecido que la edad del donante es un factor asociado con la gravedad de la recidiva viral en pacientes con trasplante hepático. Numerosos estudios han descrito una forma de recidiva más grave y más precoz en aquellos pacientes que han recibido el órgano de un donante mayor de 40 años (95-97). En los últimos años, la edad del donante se ha incrementado de forma importante ya que se han empezado a utilizar injertos procedentes de donantes añosos.

En cuanto al trasplante de donante vivo, no existen datos suficientes para poder determinar si es o no un factor de riesgo asociado con la gravedad de la recidiva del VHC en pacientes trasplantados (98-101), al igual que ocurre con la esteatosis del donante (102), la concentración hepática de hierro (103), el grado de compatibilidad HLA entre donante y receptor (104) y factores genéticos propios del mismo que median en la respuesta inflamatoria frente al virus (105).

2.4 Influencias externas del entorno y/o iatrogénicas

El exceso de inmunosupresión en los pacientes trasplantados tiene un efecto deletéreo sobre la evolución de la recidiva del VHC, ya que es el responsable de la disminución del aclaramiento viral. Parece que el grado de inmunosupresión global, y/o los cambios bruscos en los niveles de inmunosupresión, son responsables de una evolución más agresiva de la recidiva. Sin embargo, no se ha podido relacionar el efecto de ningún inhibidor de la calcineurina en concreto con la misma, ya que los resultados de los estudios existentes al respecto son muy contradictorios (106-108). Aunque la ciclosporina ha mostrado tener un efecto antiviral “in vitro” (109;110) se precisan estudios prospectivos con potencia suficiente para poder establecer esta asociación “in vivo”. Recientemente se ha publicado un meta-análisis que no encontró diferencias

significativas entre el uso de pautas inmunosupresoras basadas en ciclosporina frente a tacrolimus con la mortalidad, supervivencia del injerto, rechazo agudo o la presencia de hepatitis colestásica fibrosante (111). Los datos existentes al respecto con el uso de micofenolato de mofetilo (MMF) también son contradictorios. Aunque se ha observado un incremento de la carga viral del VHC tras el tratamiento con MMF, y una peor evolución de la recidiva en algunos estudios retrospectivos (112;113), existen ensayos clínicos aleatorizados que comparan el tratamiento con MMF y azatioprina, (114) y que no confirman estos resultados.

Igualmente, los resultados sobre el impacto que ejercen los anticuerpos anti-CD25, el sirolimus y la azatioprina sobre la gravedad de la recidiva son controvertidos (115-117), y se precisa de estudios prospectivos para dilucidar el efecto de estos fármacos en este tipo de pacientes.

El número y gravedad de los episodios de rechazo agudo (57;118) y el tratamiento del mismo con pulsos de esteroides y/o OKT3 se han asociado con la gravedad de la recidiva del VHC y el desarrollo de cirrosis. Varios estudios han demostrado que el uso de pulsos de esteroides aumenta la carga viral del VHC e induce una recidiva más precoz y más grave (59;119). Las dosis acumuladas de esteroides también parecen tener un efecto deletéreo sobre la recidiva de la hepatitis. Sin embargo, aunque parezca paradójico, la retirada brusca y precoz de los mismos parece aumentar la tasa de fibrosis, sugiriendo la existencia de un “rebote inmunológico” (112;115).

Finalmente, la infección por citomegalovirus (CMV) ha demostrado asociarse con una peor evolución de la recidiva del VHC (97;120), probablemente por el efecto modulador que ejerce el CMV. Así mismo, el daño de preservación del injerto y el tiempo de isquemia fría del injerto (121;122) también se han relacionado con una recidiva más grave.

V. POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LAS CITOCINAS EN LA INFECCIÓN POR VHC

1. POLIMORFISMOS E INFECCIÓN CRÓNICA POR VHC

Los polimorfismos genéticos son variaciones en la secuencia de un gen que aparecen con una frecuencia superior al 1% en la población normal. Pueden encontrarse en regiones tanto codificantes como no codificantes y dependiendo de su localización dentro del gen pueden afectar a la tasa de transcripción (polimorfismos en el promotor), a la estabilidad del ARN mensajero (ARNm) (polimorfismos en la región 3' que no se traduce), a la maduración (situados en intrones) o pueden implicar cambios de aminoácidos en las regiones codificantes que modifiquen la estructura y por tanto la funcionalidad de la proteína. Los polimorfismos de sustitución de un sólo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism; SNP), son un tipo de variación génica ampliamente distribuidos por todo el genoma.

Aunque los factores relacionados con el aclaramiento espontáneo del virus o el desarrollo de infección crónica no han sido aún bien definidos, existe cada vez un mayor número de estudios que revelan el impacto de los polimorfismos genéticos de ciertos genes de proteínas implicadas en la respuesta inmune sobre la susceptibilidad para desarrollar una infección crónica y sobre la gravedad de la enfermedad hepática en los pacientes infectados por el VHC.

El TNF-alfa es una citocina proinflamatoria (123) que ha sido implicada en una gran variedad de enfermedades hepáticas como mediador patogénico (124). En la región promotora del gen que codifica para esta citocina se han identificado 2 polimorfismos de sustitución en las posiciones -238 guanina (G)/adenina (A) y -308 G/A que afectan a la producción de dicha citocina. Algunos estudios sugieren la posibilidad de que dichos polimorfismos pudieran tener influencia sobre la gravedad de la infección crónica por el VHC (125-127) y sobre la respuesta al tratamiento antiviral (128), sin embargo no todos los autores han podido demostrar esta relación (129-132).

La IL-10 es una importante citocina de tipo Th2, producida principalmente por monocitos, macrófagos y células T. Su principal función biológica parece ser la limitación y finalización de la respuesta inflamatoria y la regulación de la diferenciación y proliferación de varias células del sistema inmune, como los linfocitos T, linfocitos B, células NK, APCs, mastocitos y granulocitos (133). Como hemos comentado anteriormente, es necesaria una respuesta de las células T CD4+ y T CD8+ vigorosa y mantenida, y una respuesta inmunológica predominantemente Th1 para poder controlar la infección por el VHC. Así, los pacientes que muestran una respuesta predominantemente Th2, favorecen la persistencia del VHC (134;135).

Los pacientes infectados crónicamente por el VHC y no tratados presentan niveles séricos elevados de IL-10, y la producción "*in vitro*" de esta citocina por las células mononucleares de sangre periférica es mayor que la que se observa en aquellos individuos con una infección autolimitada (136;137). Estas observaciones han dado lugar al desarrollo de numerosos estudios genéticos sobre el papel de la IL-10 en este tipo de enfermos, ya que está bien establecida la funcionalidad de tres SNPs en el promotor del gen de la IL-10 en las posiciones -1082 G/A, -819 citosina (C)/timina (T) y -592 C/A (138). Estos polimorfismos están en desequilibrio de ligamiento y los haplotipos ACC/ACC, ACC/ATA y ATA/ATA, están asociados a una baja producción de IL-10, GCC/ACC y GCC/ATA está considerados como productores intermedios y GCC/GCC es altamente productor (139).

Se especula que aquellos pacientes portadores de genotipos de la IL-10 que condicionan una alta producción de esta citocina, serían propensos a inhibir la respuesta Th1, traduciéndose finalmente en un fallo en el aclaramiento del virus (efecto proviral de la IL-10). De hecho, varios autores han descrito que existe una asociación de los genotipos y haplotipos altos productores de esta citocina, con la cronificación de la infección por VHC (140-142), observación que otros autores no han podido confirmar (127;143).

Basándose en la observación de que los pacientes con elevados niveles séricos de IL-10 presentaban una respuesta muy pobre al tratamiento con IFN-alfa (144-146), varios autores han tratado de dilucidar el papel que pudieran jugar los polimorfismos genéticos de esta citocina en la respuesta al tratamiento antiviral. Sin embargo, los resultados

obtenidos a este respecto son muy contradictorios. Mientras que en algunos trabajos se ha encontrado una asociación entre la falta de respuesta al tratamiento antiviral y los genotipos que condicionan una alta producción de esta citocina (147-149), otros asocian estos genotipos a una respuesta viral sostenida (RVS) (141) o no encuentran relación con la respuesta al tratamiento (150).

El IFN-gamma es una citocina multifuncional representativa de la respuesta inmune Th1 que desempeña un papel relevante en la defensa contra virus y patógenos intracelulares, induciendo una respuesta inflamatoria. El IFN-gamma inhibe la replicación del VHC in vitro (151) y parece relacionarse con el aclaramiento viral en chimpancés (152) y en humanos (32).

La producción del IFN gamma está controlada genéticamente y el polimorfismo genético A/T localizado en la posición +874, influye directamente sobre los niveles de producción del IFN-gamma, siendo los genotipos AA, TA y TT bajos, intermedios y altos productores de IFN-gamma respectivamente (153).

Aunque está bien establecida la asociación del IFN-gamma con el control de la replicación del VHC y con la ralentización en la progresión de la enfermedad (136;154), apenas existen datos en la literatura que relacionen los polimorfismos genéticos de esta citocina con la gravedad de la enfermedad por VHC (155;156), y además muestran resultados contradictorios. Por otra parte, aunque existen varios trabajos en la literatura que intentan relacionar este polimorfismo con la respuesta al tratamiento con IFN-alfa, no se ha encontrado asociación entre ambos (157).

La IL-6 es una citocina implicada en una gran variedad de funciones celulares en los sistemas hematopoyético, neuronal y hepático (158;159). En el hígado, la IL-6 estimula a los hepatocitos para producir proteínas de fase aguda como C3, proteína C reactiva y macroglobulina, en respuesta a estímulos inflamatorios (160). Estudios recientes en ratones ponen en evidencia que la IL-6 puede tener un papel importante en la regeneración hepática y un efecto protector frente al daño hepático (161;162).

Existe un polimorfismo bien estudiado en la región promotora de la IL-6 en la posición -174. Los genotipos GG y GC, se correlacionan con un fenotipo alto productor,

mientras que el genotipo CC se asocia con una baja producción de IL-6 (163). Sin embargo existen muy pocos estudios, contradictorios y poco concluyentes, sobre la asociación de este polimorfismo y la evolución de la infección por el VHC (130;143), así como de su asociación con la respuesta al tratamiento antiviral con IFN-alfa (164).

La IL-12 es una citocina que gobierna la respuesta inmune tipo Th1, responsable del aclaramiento viral. El polimorfismo genético de esta citocina en la posición 1188 del extremo 3' que no se traduce (3'UTR) del gen que codifica para la proteína p40 de la IL-12, se relaciona con un incremento (genotipo CC) o una disminución (portador del alelo A) en la secreción de esta citocina (165), derivando finalmente en la polarización de la respuesta inmune hacia Th1 o Th2. Por esta razón se justifica la asociación de los distintos genotipos de esta citocina con algunas enfermedades autoinmunes como la psoriasis o la enfermedad de Crohn (166;167). Existen escasos trabajos que estudien la posible relación de los polimorfismos de la IL-12 con la evolución de la infección por VHC, pero algunos autores relacionan el genotipo AA (bajos productores) con la cronificación de la infección por VHC (168;169), y a los portadores del alelo C como respondedores al tratamiento antiviral (170).

El TGF-beta1 es una citocina pluripotencial que promueve la fibrogénesis hepática, estimulando la síntesis e inhibiendo la degradación de las proteínas que forman la matriz extracelular (171). Esta citocina induce la activación de las células estrelladas hepáticas a miofibroblastos en aquellas regiones tisulares con actividad necroinflamatoria, paso que es considerado como crucial en la fibrogénesis hepática (44). Además, el TGF-beta es un potente inductor de la apoptosis hepatocitaria, hecho que también podría ser relevante en la fibrogénesis (172). Al igual que otras muchas citocinas, la producción de TGF-beta se encuentra sujeta al control genético, y se han descrito varios polimorfismos que podrían afectar a la secreción de la misma. En concreto, existen dos polimorfismos en los codones 10 (CTG>CCG) en posición +869 y 25 (CGG>CCG) en posición +915 que implican un cambio de aminoácido. Estos polimorfismos se han asociado con diversas enfermedades como la hipertensión arterial (173) y la fibrosis pulmonar en pacientes trasplantados (174). En el hígado se ha observado una correlación entre el grado de fibrosis y el polimorfismo genético del codón 25 en pacientes afectados de enfermedades inflamatorias crónicas hepáticas (127). Sin embargo, existen pocos estudios y con resultados controvertidos, que

analicen la influencia de estos polimorfismos con el grado de fibrosis en pacientes con hepatitis crónica por el VHC (127;175).

La IL-1 es una de las citocinas más estudiadas debido al papel que desempeña en la respuesta inflamatoria como mediador clave en la respuesta innata (176). La IL-1 cuenta con dos isoformas, IL-1 alfa e IL-1 beta, que interactúan con un receptor común (IL-1R), que actúa en concierto con la proteína accesoria del IL-1R (IL-1RAcP) para formar un complejo que inicia la cascada de transducción de señal en el interior celular. El antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1RA) es una proteína soluble que compite con el IL-1R en su unión con la IL-1alfa e IL-1beta, inhibiendo por tanto la respuesta inflamatoria.

Se han descrito varios polimorfismos genéticos de la IL-1alfa (-889), IL-1beta (-511, +3962) y del IL-1Ra (11100) con consecuencias funcionales (177-179) y que se han asociado con numerosas enfermedades de base inflamatoria como la enfermedad inflamatoria intestinal y la artritis reumatoide (180;181). Existe un SNP en posición +1970 del gen del IL-1R, cuyas consecuencias funcionales no se han descrito hasta el momento y que se ha asociado con el riesgo de padecer la enfermedad de Behcet en los pacientes homocigotos TT (182). No se ha encontrado ningún estudio en la literatura que intente relacionar los polimorfismos de estas citocinas con la infección crónica por el VHC ni con su tratamiento.

2. POLIMORFISMOS Y RECIDIVA DEL VHC

La potencial relación entre los polimorfismos de algunas citocinas con el rechazo y la fibrosis, han sido ampliamente estudiados en pacientes trasplantados de corazón, pulmón y riñón (174;183-186). Sin embargo, existen muy pocos estudios que relacionen los polimorfismos de las citocinas con la progresión de la recidiva de la enfermedad por VHC en pacientes trasplantados de hígado. En este sentido, sólo 4 estudios valoran la relación de los polimorfismos genéticos de algunas citocinas con la recidiva de la enfermedad después del trasplante. Tambur y colaboradores (187) en el año 2001, estudiaron el papel que desempeñan los polimorfismos genéticos del TNF- alfa, IFN-gamma, IL-6 e IL-10 en la recidiva de la enfermedad por el VHC en los pacientes trasplantados de hígado,

encontrando una asociación, aunque no significativa, entre el genotipo de la IL-10 bajo productor con la recidiva de la enfermedad por el VHC durante el primer año después del trasplante. Aunque este mismo grupo (188) no pudo confirmar este resultado en un estudio posterior con más pacientes, sí encontró una asociación significativa entre el polimorfismo del IFN-gamma bajo productor (+874 AA), y la recidiva de la enfermedad en los primeros 12 meses postrasplante. No se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre los polimorfismos del TNF-alfa y de la IL-6 con la recidiva de la enfermedad por el VHC (187;188), aunque se ha observado una tendencia en los pacientes que no presentan recidiva de la enfermedad en los primeros 12 meses postrasplante, a tener genotipos considerados como bajos productores de la IL-6 (-174 CC) y del TNF-alfa (-308 GG, -238 GG) (189).

Recientemente se ha descrito una asociación significativa entre los genotipos bajos productores de IL-10 (-1082 AA) y altos productores de IFN-gamma (+874 TT) con una menor tasa de fibrosis en pacientes trasplantados por cirrosis por VHC, así como entre el haplotipo que condiciona una alta producción de TGF-beta con una mayor tasa de fibrosis (156).

3. POLIMORFISMOS Y RECHAZO AGUDO DEL INJERTO

Las variaciones alélicas de los genes de las citocinas se han asociado en un gran número de estudios con los episodios de rechazo en los trasplantes de riñón, corazón y pulmón (174;183;190). Los individuos que genéticamente están predispuestos a secretar grandes cantidades de citocinas de tipo Th1 o inflamatorias (IL-2, IFN-gamma, TNF-alfa), son más propensos a desarrollar episodios de rechazo, mientras que los individuos con elevada capacidad de secreción de citocinas del tipo Th2 (IL-4, IL-10) suprimen la inflamación, siendo individuos que presentan cierta inmunotolerancia.

Tras el trasplante hepático, los pacientes reciben fármacos inmunosupresores para prevenir el rechazo, con los consecuentes efectos secundarios derivados de los mismos, como son un mayor riesgo de infección, osteoporosis, tumores malignos, hipertensión arterial, diabetes mellitus y disfunción renal (191-193). De ahí el interés de encontrar marcadores genéticos capaces de identificar a los individuos con menor riesgo de

presentar rechazo y poder así modular la inmunosupresión y minimizar estos efectos secundarios.

Existen varios estudios cuyo objetivo principal es relacionar los polimorfismos genéticos de las citocinas con la presencia de rechazo agudo en el trasplante hepático, con resultados muy controvertidos.

Se ha descrito un mayor riesgo de presentar rechazo agudo del injerto en aquellos individuos portadores del alelo A del TNF-alfa en la posición -308 (-308 AA/GA) (189;194;195) y en la posición -238 (189), en homocigotos TT en la posición +869 del codón 10 del gen del TGF-beta1 (196) y en homocigotos GG en la posición -1082 de la IL-10 (197). Sin embargo estas asociaciones no han podido ser confirmadas en otros estudios (187;194;198-200).

Por otra parte, a pesar de que el polimorfismo genético de la IL-6 en la posición +174 se ha asociado con el rechazo agudo en el trasplante renal (190) y pulmonar (184), esta relación no ha podido ser demostrada en el trasplante hepático (189;196;199).

Hipótesis

La infección por el VHC es la primera causa de trasplante hepático en el mundo y la recidiva del VHC después del trasplante es prácticamente universal, aunque la evolución de la enfermedad es muy variable entre los diferentes individuos. Se han identificado numerosos factores propios del virus y del huésped que determinan un peor pronóstico de la recidiva viral, y entre los factores del huésped, las citocinas juegan un papel fundamental en la generación de una respuesta inmune adecuada para la erradicación viral, existiendo diferencias interindividuales en la capacidad de secreción de las mismas, atribuibles en parte a la presencia de polimorfismos en los genes que codifican para éstas. Los estudios que intentan relacionar los polimorfismos genéticos de las citocinas con la gravedad de la recidiva del VHC, con el riesgo de padecer rechazo agudo del injerto y/o con la respuesta al tratamiento antiviral, son escasos y con resultados contradictorios. Esta inconsistencia en los resultados podría deberse al pequeño tamaño muestral, a las diferencias étnicas entre los distintos grupos de estudio y a las comorbilidades asociadas, entre otras causas.

Basándonos en estas observaciones, se podría especular que aquellos pacientes que desarrollan una enfermedad grave sobre el injerto, podrían tener un patrón de secreción de citocinas alterado que pudiera estar influido por polimorfismos genéticos en las regiones reguladoras y/o codificantes. Estos diferentes polimorfismos actuarían como marcadores genéticos que podrían predecir el riesgo de recidiva de una manera sencilla y no invasiva.

Por tanto, la hipótesis que se plantea en este trabajo es que

“Los polimorfismos genéticos de las citocinas influyen en la gravedad de la recidiva, en la respuesta al tratamiento antiviral y en el rechazo agudo del injerto en pacientes sometidos a trasplante hepático por infección crónica por el VHC”.

Objetivos

Objetivo principal

El objetivo principal de este trabajo consiste en evaluar la influencia de los polimorfismos genéticos de un amplio número de citocinas (TNF-alfa, TGF-beta1, IFN-gamma, IL-6, IL-10, IL-12, IL-1alfa , IL-1beta, IL-1Ra) y del IL-1R en la gravedad de la recidiva viral en una cohorte de pacientes españoles sometidos a trasplante hepático por cirrosis por VHC.

Los objetivos secundarios son:

1. Describir la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos genéticos de las 9 citocinas y del IL-1R en esta población
2. Relacionar los polimorfismos genéticos de las citocinas mencionadas con la respuesta al tratamiento antiviral después del trasplante
3. Valorar la relación de los polimorfismos genéticos estudiados con el rechazo agudo del injerto

Pacientes y Métodos

I. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio retrospectivo, mediante la recogida de datos de las historias clínicas y del banco de datos del registro de trasplantes hepáticos mantenido prospectivamente en la Unidad de trasplante hepático.

2. POBLACIÓN ESTUDIADA

Pacientes atendidos en la consulta externa de la Unidad de trasplante hepático del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid, durante el periodo comprendido entre enero del 2005 y junio de 2007.

Criterios de inclusión: Pacientes adultos, ambos sexos, de raza caucasiana, con cirrosis hepática por VHC a los que se les realizó trasplante hepático, de donante cadáver, en el Hospital Universitario Puerta de Hierro, durante el periodo comprendido entre septiembre de 1988 y septiembre de 2006.

Criterios de exclusión: Pacientes con retrasplante o con trasplante combinado de hígado y otro órgano, pacientes coinfectados por virus de la hepatitis B (VHB) o por virus de la inmunodeficiencia humana y pacientes con antecedentes de enolismo crónico o con seguimiento postrasplante inferior a 9 meses.

II. VARIABLES ANALIZADAS

1. DATOS CLÍNICOS

Se analizaron los siguientes datos de la historia clínica de los pacientes:

- Datos del donante: Edad, sexo, grupo sanguíneo, causa de la muerte y serología del VHC, VHB, CMV y virus de Epstein-Barr (VEB).
- Datos del receptor: Edad, sexo, grupo sanguíneo y serología del VHC, VHB, CMV y VEB. Genotipo del VHC y cuantificación de la viremia-VHC pretrasplante
- Datos de la cirugía: Duración total de la cirugía.
- Datos del seguimiento post-trasplante: Fecha del trasplante, tratamiento inmunosupresor de inducción y de mantenimiento, presencia y episodios de rechazo, tratamiento del rechazo, recidiva de la enfermedad por VHC, tiempo transcurrido hasta el desarrollo de la recidiva y gravedad de la misma.

2. DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES ANALIZADAS

2.1 Recidiva de la enfermedad por VHC

El diagnóstico de recidiva de la enfermedad por VHC en el injerto se realizó por criterios virológicos (viremia), analíticos (elevación puntual o crónica de las transaminasas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato transaminasa (AST)) e histológicos (hepatitis lobulillar o periportal). En todos los pacientes se detectó el ARN del VHC por técnica de PCR, todos tenían hipertransaminemia no atribuible a otras causas y con exclusión de infección por CMV, rechazo agudo, obstrucción biliar e isquemia, mediante pruebas serológicas, inmunohistoquímicas, radiológicas y endoscópicas.

2.2 Gravedad de la recidiva histológica

Un patólogo experto en histopatología hepática del trasplante hepático revisó todas las muestras histológicas de los pacientes incluidos en el estudio, cuantificando la actividad necroinflamatoria (graduado del 0 al 12) y el grado de fibrosis (graduado del 0 al 4) de acuerdo con la escala de Knodell (201). Se consideró recidiva grave la existencia de fibrosis grado 3-4 o cirrosis establecida (definida por criterios histológicos o clínicos y de imagen) durante los primeros 5 años después del trasplante. Los pacientes con fibrosis grado 0-2 en la biopsia realizada al quinto año del trasplante y que no habían recibido tratamiento antiviral se consideraron como pacientes con recidiva no grave.

2.3 Respuesta al tratamiento antiviral

Se consideró respuesta viral sostenida, cuando la viremia del VHC no era detectable en suero durante al sexto mes de la finalización del tratamiento antiviral con interferón pegilado y ribavirina.

2.4 Rechazo agudo del injerto

Se consideró rechazo agudo la elevación de ALT, AST, fosfatasa alcalina, o bilirrubina con confirmación histológica de rechazo (202) o con exclusión de otros posibles procesos intercurrentes mediante pruebas analíticas, serológicas o de imagen, y que se resolvió mediante intensificación de la inmunosupresión (aumento de dosis del inhibidor de la calcineurina, administración de bolos de metilprednisolona, asociación de MMF o anticuerpos anti-CD3 (OKT3)).

III. PACIENTES POR GRUPOS DE ESTUDIO

1. RECIDIVA DEL VHC

En este grupo de estudio se consideraron únicamente aquellos pacientes que desarrollaron fibrosis grado 3-4 o cirrosis establecida durante los primeros cinco años desde el trasplante y aquellos con un seguimiento postrasplante mínimo de 5 años (65 pacientes).

2. RECHAZO AGUDO

Los 90 pacientes que se incluyeron inicialmente en el estudio han sido considerados en este grupo de estudio.

3. RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTIVIRAL

De los 35 pacientes tratados, 11 debieron suspender el tratamiento por efectos secundarios de los fármacos y sólo 24 pacientes cumplieron el tiempo estipulado del tratamiento según el genotipo viral (12 meses para el genotipo 1 y 6 meses para el genotipo 3), que son los que se han considerado en este grupo de estudio.

IV. METODOLOGÍA

1. RECOGIDA DE MUESTRAS

Se recogieron 10 ml de sangre periférica de cada sujeto de estudio, en tubos Venoject con 150u de heparina de litio (Terumo Europe N.V. Leuven, Belgium) para la extracción de ADN genómico y el análisis de los polimorfismos genéticos de las citocinas. Esta muestra de sangre se incubó durante 10 minutos con una solución de lisis de hematíes que contenía 50 mM NaCl y 5 mM MgCl en un tampón 10 mM Tris-Cl pH 7,6 (todos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). A continuación, se lavó con tampón fosfato salino y las células de la serie blanca se conservaron en sedimento seco a -80°C hasta el momento de la extracción del ADN genómico.

2. PURIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO

Los leucocitos de los pacientes se incubaron a 37°C durante 24 horas en una solución de lisis de células blancas que contenía 10mM Tris-Cl pH 7,6, 10 mM ácido etileno diamino tetracético (EDTA) y 50 mM NaCl, 10% dodecil sulfato sódico (SDS) (todos de Sigma-Aldrich) en presencia de 150ug/ml de proteinasa K y de 2 ug/ml de ARNasa (ambos de Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). A continuación se purificó el ADN genómico mediante el método convencional de separación con disolventes orgánicos y posterior precipitación con isopropanol (203). La concentración y pureza del ADN obtenido se valoraron mediante espectrofotometría con el sistema "GeneQuant II, RNA/DNA calculator" (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden), y se ajustaron todos a la misma concentración (50 ug/ml).

3. ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE CITOCINAS

Se analizaron los siguientes polimorfismos de sustitución:

- IL-1alfa: C ó T en la posición -889 de la región promotora
- IL-1beta: C ó T en la posición -511 del promotor y en la posición +3962
- IL-1R: C ó T en la posición pstI1970
- IL-RA: C ó T en la posición mspal11100
- IL-12B: A ó C en la posición 1188 en 3'UTR
- TNF-alfa: A ó G en las posiciones -308 y -238 de la región promotora
- IFN-gamma: A ó T en la posición +874 del intrón 1
- IL-6: G ó C en la posición -174 de la región promotora
- IL-10: A ó G en la posición -1082, C ó T en la posición -819 y A ó C en la posición -592 de la región promotora
- TGF-beta: T ó C en la posición +869 (codón +10) y C ó G en la posición +915 (codón +25)

Los polimorfismos mencionados se analizaron mediante el uso del kit comercial "LIFECODES Cytokine-SSO Typing" (Tepnel Molecular Diagnostics, Stamford, CT, USA), que incluye los cebadores específicos para las 9 citocinas incluidas en el estudio y para el IL-1R, así como cebadores específicos para valorar los haplotipos de TNF-alfa. Este método está basado en la hibridación de productos de PCR de cadena sencilla con sondas específicas de oligonucleótidos. Con esta técnica, la amplificación de cada fragmento que contienen los polimorfismos se lleva a cabo con cebadores en cantidades no equimolares, de forma que durante los ciclos iniciales de la reacción de amplificación se obtiene ADN de cadena doble, pero cuando se agota el cebador presente en cantidades limitantes, el cebador en exceso genera ADN de cadena sencilla. Así, este método genera ADN tanto de cadena doble como de cadena sencilla, que después de un proceso de desnaturalización, participarán en la reacción de hibridación con sondas específicas para cada uno de los posibles alelos. Las sondas utilizadas están unidas a microesferas fluorescentes

distinguibles entre sí por la intensidad de fluorescencia que emite cada una de ellas, diseñadas para ser analizadas con el sistema Luminex® que distingue cada sonda unida a cada fragmento de ADN en virtud de su intensidad de fluorescencia. Por otra parte, los cebadores utilizados en la reacción de amplificación están marcados con biotina, que tras ser incubados con estreptavidina unida a ficoeritrina, emite fluorescencia que será cuantificada por este sistema Luminex®, permitiendo así conocer la cantidad relativa de producto amplificado unido a cada sonda. De esta manera, en una misma reacción se pueden analizar simultáneamente diferentes polimorfismos en una sola muestra. Debido a que el tipaje de los polimorfismos puede verse afectado por la cantidad e integridad del ADN genómico utilizado, la señal emitida por cada par de sondas específicas para un locus concreto debe normalizarse entre ellas para corregir las variaciones en el producto amplificado. De esta manera, mediante la señal relativa obtenida para cada sonda, permite valorar la presencia o ausencia de cada alelo y, por tanto, la asignación del genotipo de la muestra analizada.

La amplificación de ADN se realizó mediante tres PCR múltiples conteniendo cada una de ellas los cebadores que se muestran en la tabla 1, 100 ng de ADN genómico y 1U de ADN polimerasa (Taq ADN polymerase; GE Healthcare) en un volumen final de 20 µl de la mezcla de reacción incluida en el kit. Las condiciones de la reacción incluían un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 32 ciclos conteniendo tres etapas consecutivas de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, unión de los cebadores a los moldes durante 45 segundos a 60°C en los 8 primeros ciclos y a 63°C en los ciclos restantes, y polimerización a 72°C durante 45 segundos. Después de estos 32 ciclos, la reacción continuó con una extensión final de 15 minutos a 72°C. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador “GeneAmp PCR system 2700” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

La reacción de hibridación se realizó en placas de 96 pocillos, conteniendo cada pocillo 5 µl del producto amplificado con 15 µl de una mezcla conteniendo las sondas específicas para los cebadores utilizados en cada PCR múltiple. Esta reacción, que se llevó a cabo en el mismo termociclador utilizado para la amplificación, incluía un paso inicial de desnaturalización a 97°C durante 5 minutos, seguido de una incubación a 47°C durante

30 minutos. Este producto de hibridación se mantuvo a 56°C durante 10 minutos, tras los que se añadió a cada pocillo una solución de estreptavidina.

Tabla 1. Mezla de cebadores utilizadas para cada una de las tres PCR múltiples

Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3
IL-1alfa -889C/T	TNFalfa -308 A/G*	TGFbeta +869 C/T
IL-1beta -511 C/T	TNFalfa -238 A/G*	TGFbeta +915 C/G
IL-1beta +3962 C/T	IFN-gamma +874 A/T	
IL-1R pst11970 C/T	IL10 -1082 A/G	
IL1RA mspal11100 C/T	IL10-819 C/T	
IL12 1188 C/A	IL10 -592 C/T	
	IL6 -174 C/G	

* incluye cebadores tanto para los genotipos como para los haplotipos

Las muestras se analizaron dentro de los siguientes 90 minutos en el sistema Luminex-100 y la asignación de alelos se realizó con el programa informático “Quick-type for Lifematch” versión 2.2.0 (Tepnel Molecular Diagnostics).

V. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis comparativos se realizaron con el programa informático “SPSS versión 10.0”, y se consideraron niveles de significación estadística por debajo del 5% ($p < 0.05$).

Las variables cuantitativas consideradas en este estudio se categorizaron para su análisis como variables cualitativas excepto la edad del receptor. Para comparar esta variable entre los distintos grupos de pacientes considerados, se utilizó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney para dos medias independientes.

El estudio estadístico utilizado para relacionar variables cualitativas, se realizó mediante tablas de contingencia con objeto de comparar la frecuencia de cada variable en los grupos de estudio. Para las tablas 2x2 se calculó el valor de p utilizando la prueba Chi cuadrado con la corrección de continuidad de Yates o la corrección exacta de Fisher con dos colas cuando las muestras eran pequeñas. La fuerza de la asociación se midió mediante el cálculo de la Odds Ratio (OR) y el intervalo de confianza del 95% (IC 95%) tomando el valor de los límites exactos. En el caso de tablas de contingencia 2x3 o 2x4, el valor de p se calculó mediante la Chi cuadrado de Pearson.

Para comprobar la independencia de asociación entre dos variables con diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de pacientes considerados, se realizó un estudio multivariante mediante regresión logística o mediante la prueba de Mantel-Haenzel para tablas de contingencia estratificadas para diferentes variables. En este tipo de análisis se consideraron estadísticamente significativos aquellos valores de $p < 0.1$.

Resultados

I. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

En el estudio se incluyeron 90 pacientes, 65 (72.2%) varones y 25 (27.8%) mujeres, con una mediana de edad de 52 años (valores extremos 28-68 años).

Setenta y siete (85.5%) pacientes estaban infectados por el genotipo 1 del VHC (5 1a y 72 1b), 8 (8.8%) por el genotipo 3 y un sólo paciente por el genotipo 2. No se conoció el genotipo en los 4 pacientes restantes. Siete pacientes recibieron tratamiento antiviral antes del trasplante, no habiendo respondido ninguno de ellos. La carga viral pretrasplante se conoció en 56 (62,2%) de los 90 pacientes siendo superior a 1×10^6 copias en 29 (51,8%) de ellos.

Treinta y ocho (42.2%) de los 90 pacientes habían sido trasplantados entre septiembre de 1988 y diciembre de 1997, y los 52 pacientes restantes recibieron el trasplante entre enero de 1999 y septiembre de 2006. Los injertos procedían de donantes cadavéricos (54 varones y 36 mujeres) con una mediana de edad de 41.5 años (valores extremos 16-83 años) y 42 (46.7%) de ellos tenían una edad inferior a 40 años. El tiempo medio de cirugía fue de $323,9 \pm 119,1$ minutos (mediana 300, valores extremos 109-665 minutos). La serología para VHC fue negativa en todos los donantes.

Todos los pacientes presentaban compatibilidad ABO con sus donantes y ninguno de ellos presentó infección concomitante por CMV a lo largo del seguimiento.

La mediana de seguimiento post-trasplante fue 82.5 meses (valores extremos 9 y 32 meses), y 55 de los 90 pacientes tuvieron un seguimiento superior a 60 meses. Cinco pacientes fallecieron durante el periodo de estudio como consecuencia directa de la recidiva del VHC. La media de supervivencia de estos pacientes fue de 110,8 meses (valores extremos 45-130 meses).

1. RÉGIMEN INMUNOSUPRESOR

La inmunosupresión inicial postrasplante se basó en regímenes con tacrolimus en 53 (58,9%) pacientes y en regímenes con ciclosporina en los 37 (41,1%) pacientes restantes. La pauta de inmunosupresión inicial varió a lo largo del tiempo. Tacrolimus se administró asociado a esteroides (n=44), a esteroides y MMF (n=2) o a MMF y daclizumab (n=7). Ciclosporina se administró asociada a esteroides (n=8), esteroides y azatioprina (n=17), esteroides y MMF (n=2), OKT3 (n=2), o azatioprina y OKT3 (n=8)

La inmunosupresión que estaban recibiendo los pacientes en el momento de su inclusión en el estudio fue monoterapia con tacrolimus en 55 (61.1%) pacientes, monoterapia con ciclosporina microemulsión en 33 (36.7%), y monoterapia con MMF o con sirolimus en 1 paciente, respectivamente.

2. RECHAZO AGUDO DEL INJERTO

Treinta y tres (36.7%) pacientes desarrollaron un episodio de rechazo durante los tres meses posteriores al trasplante. Todos los pacientes presentaban niveles de inmunosupresión dentro del rango terapéutico en el momento del diagnóstico del rechazo. El rechazo fue confirmado histológicamente en 7 pacientes.

El episodio de rechazo se trató con bolos de esteroides (500 mg a 1000 mg/día durante tres días) en 23 pacientes, resolviéndose en 17 (73,91%) pacientes. En los 6 pacientes con rechazo resistente a esteroides (18.2%), se resolvió con la administración de OKT3. En los 10 pacientes restantes, el rechazo se trató con la asociación de MMF a la inmunosupresión de base, con resolución del rechazo en todos ellos.

3. RECIDIVA DEL VHC

En 8 de los 90 pacientes no se demostró recidiva de la infección VHC después de un seguimiento medio postrasplante de 82.5 meses (valores extremos 32-165 meses). En los 82 pacientes restantes se demostró recidiva postrasplante de la infección VHC. Uno de estos pacientes recibió tratamiento antiviral después de la recidiva transcurridos 4 meses del trasplante y que tuvo una RVS, fue excluido del análisis. Los 81 pacientes restantes presentaron recidiva del VHC (reaparición de la viremia) y en 66 de ellos se realizó una biopsia hepática que demostró lesiones histológicas del injerto en forma de hepatitis aguda o crónica. La recidiva del VHC tuvo lugar a los 5.7 ± 6.7 meses del trasplante, dentro del primer año en 77 pacientes y después del año en los cuatro restantes. Veintidós (33.8%) de los 81 pacientes tuvieron una recidiva grave de la enfermedad, con desarrollo de fibrosis grado 3-4 ó cirrosis durante los primeros cinco años del trasplante.

4. TRATAMIENTO ANTIVIRAL POST-TRASPLANTE

Treinta y cinco (43,2%) de los 81 pacientes con recidiva VHC en el injerto recibieron tratamiento antiviral con interferon-alfa pegilado y ribavirina. El momento postrasplante en que se introdujo el tratamiento antiviral varió mucho entre los individuos, siendo la mediana de 38,5 meses postrasplante y el intervalo de 4-190 meses. La dosis recibida de interferón pegilado osciló entre 80 y 120 μg semanales y la de ribavirina entre los 800 y 1200 mg/día, dependiendo del peso del paciente y de los efectos adversos producidos por los fármacos.

De los 35 pacientes tratados, 11 debieron suspender el tratamiento por efectos secundarios de los fármacos y los 24 pacientes restantes cumplieron el tiempo estipulado del tratamiento según el genotipo viral (12 meses para el genotipo 1 y 6 meses para el genotipo 3), y 14 de éstos (58,3%) alcanzaron una RVS. En la tabla 2 se muestra la distribución de los genotipos virales en los pacientes tratados, según intención de tratamiento y en los pacientes que recibieron el tratamiento completo.

Tabla 2. Respuesta al tratamiento antiviral de los pacientes clasificados en función del genotipo del virus

	Intención de Tratamiento n (%)	Tratamiento completo n (%)	RVS n (%)*
Genotipo 1	29 (82.1)	19 (79.2)	9 (47.4)
Genotipo 3	6 (17.1)	5 (20.8)	5 (100)

* Porcentaje de los pacientes con RVS con respecto a los pacientes que finalizan el tratamiento

II. CARACTERÍSTICAS GENERALES RELACIONADAS CON LA GRAVEDAD DE LA RECIDIVA, CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTIVIRAL Y CON EL RECHAZO AGUDO DEL INJERTO

Se realizó un estudio estadístico para valorar la posible asociación entre las características generales de los pacientes, de los donantes, del virus y de otros factores externos con la gravedad de la recidiva del VHC, con la respuesta al tratamiento antiviral y con la presencia de rechazo agudo en los tres meses posteriores al trasplante. Las características que se consideraron fueron las siguientes: edad y sexo del receptor y del donante, año del trasplante, genotipo viral, episodios de rechazo agudo y su tratamiento, y tratamiento inmunosupresor de mantenimiento.

1. RECIDIVA VIRAL GRAVE Y FACTORES GENERALES ASOCIADOS.

En este grupo de estudio se consideraron únicamente los 65 pacientes que tuvieron un seguimiento postrasplante mínimo de 5 años o que desarrollaron recidiva grave durante los primeros 5 años.

Se observó una asociación significativa entre el riesgo de desarrollar recidiva grave con la edad del donante y con el año del trasplante. Como se observa en la tabla 3, el 68.2% de los pacientes que desarrollaron recidiva grave habían recibido injertos procedentes de donantes mayores de 40 años, mientras que la mayoría de los pacientes que no presentaron recidiva grave (60.8%) recibieron un injerto procedente de un donante con edad inferior a 40 años ($p=0.035$). Así mismo, de los 31 pacientes que se trasplantaron antes del año 1998, sólo 2 desarrollaron recidiva grave sobre el injerto, mientras que de los 34 pacientes trasplantados a partir del año 1998, desarrollaron recidiva grave 20 (58.8%) ($p<0.001$). Estas dos variables fueron dependientes entre sí, debido a que hubo un mayor porcentaje de donantes mayores de 40 años después del año 1998 (64.4% frente a un 32.3% antes del 1998; $p=0.007$).

Dado que el 97.8% de los pacientes que se trasplantaron antes del año 1998 recibieron tratamiento con ciclosporina, para valorar la influencia del tratamiento inmunosupresor sobre la recidiva grave, en el estudio estadístico se consideraron únicamente a los pacientes trasplantados posteriormente al año 1998, no encontrando

diferencias significativas entre el tratamiento inmunosupresor utilizado y el riesgo de desarrollar recidiva grave. Igualmente, el sexo del donante, la edad y sexo del receptor, la presencia de rechazo agudo y su tratamiento y el genotipo viral, son factores que no se han asociado con la gravedad de la recidiva en este estudio.

Tabla 3. Factores de riesgo de recidiva grave del VHC en el análisis univariante

	Recidiva grave [n (%)]		p*	OR (IC 95%)**
	Si (n=22)	No (n=43)		
Año de trasplante				
- después de 1998	20 (90.9)	14 (32.6)	<0.001	2.79 (1.78-4.38)
- antes de 1998	2 (9.1)	29 (67.4)		
Edad del donante				
- ≥ 40 años	15 (68.2)	16 (37.2)	0.035	1.83 (1.13-2.97)
- < 40 años	7 (31.8)	27 (60.8)		
Sexo del donante				
- varón	12 (54.5)	29 (67.4)	0.42	0.80 (0.52-1.23)
- mujer	10 (45.5)	14 (32.6)		
Edad del receptor (años) (media ± DE)				
	53.6 ± 9	49.6 ± 10.7	0.16 ¹	
Sexo del receptor				
- varón	18 (81.8)	28 (65.1)	0.27	1.26 (0.94-1.67)
- mujer	4 (18.2)	15 (34.9)		
Genotipo del VHC				
- 1a	0	4 (9.8)	0.36 ²	
- 1b	20 (90.9)	34 (82.9)		
- 2	0	1 (2.4)		
- 3	2 (9.1)	2 (4.9)		
Rechazo agudo				
- sí	8 (36.4)	17 (39.5)	1	0.92 (0.47-1.79)
- no	14 (63.6)	26 (60.5)		
Tratamiento del rechazo				
- bolos de esteroides	5 (71.4)	7 (38.9)	0.34 ²	
- OKT3	1 (14.3)	5 (27.8)		
- Otros	1 (14.3)	6 (33.3)		
Inhibidor de calcineurina***				
- Ciclosporina	3 (15)	4 (28.6)	0.41	0.52 (0.14-1.99)
- Tacrolimus	17 (85)	10 (71.4)		

*p calculada mediante la prueba de χ^2 con la corrección de continuidad de Yates, excepto ¹U de Mann-Whitney, y ² χ^2 de Pearson para tablas 2xn

** Odds ratio (intervalo de confianza del 95%)

***Sólo incluyendo los pacientes trasplantados desde el año 1998 (n=34).

2. RECHAZO AGUDO DEL INJERTO Y FACTORES GENERALES ASOCIADOS

En la tabla 4 se muestran los resultados del análisis de los factores generales y su relación con la presencia de rechazo agudo.

Tabla 4. Factores pronóstico del rechazo agudo del injerto

	Rechazo agudo [n (%)]		p*	OR (IC 95%)**
	Si (n=33)	No (n=57)		
Año de trasplante				
- después de 1998	18 (54.5)	41 (71.9)	0.15	0.76 (0.53-1.1)
- antes de 1998	15 (45.5)	16 (28.1)		
Edad del donante				
- ≥ 40 años	18 (54.5)	30 (52.6)	1	1.04 (0.7-1.54)
- < 40 años	15 (45.5)	27 (47.4)		
Sexo del donante				
- varón	23 (69.7)	31 (54.4)	0.14	1.34 (0.97-1.86)
- mujer	10 (30.3)	26 (45.6)		
Edad del receptor (años) (media ± DE)				
	48.9 ± 9.8	52.5 ± 9.4	0.092 ¹	
Sexo del receptor				
- varón	28 (84.8)	37 (64.9)	0.07	1.3 (1.03-1.66)
- mujer	5 (15.2)	20 (35.1)		
Genotipo del VHC				
- 1a	3 (9.7)	2 (3.6)	0.52 ²	
- 1b	26 (83.9)	47 (83.9)		
- 2	0	1 (1.8)		
- 3	2 (6.5)	6 (10.7)		
Inhibidor calcineurina				
- Ciclosporina	19 (57.6)	18 (31.6)	0.028	1.82 (1.13-2.95)
- Tacrolimus	14 (42.4)	39 (68.4)		

*p calculada mediante la prueba de χ^2 con la corrección de continuidad de Yates, excepto ¹U de Mann-Whitney, y ² χ^2 de Pearson para tablas 2xN

** Odds ratio (intervalo de confianza del 95%)

Se encontró una relación significativa entre el régimen inmunosupresor inicial utilizado y el riesgo de presentar rechazo agudo durante los tres meses posteriores al trasplante. Así, la incidencia de rechazo agudo en los pacientes tratados con regímenes basados en ciclosporina fue del 51.3% (19/37 pacientes) frente al 26.4% de los tratados con regímenes basados en tacrolimus (14/53 pacientes), (p=0.028).

La edad y sexo del donante y del receptor, el año del trasplante y el genotipo viral no se han asociado en este estudio con el riesgo de rechazo agudo.

3. RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTIVIRAL Y FACTORES GENERALES ASOCIADOS.

Como se describe en el apartado “pacientes y métodos”, en este grupo de estudio se han considerado únicamente a los 24 pacientes que completaron el tratamiento.

El único factor que ha mostrado en este estudio tener relación con la respuesta al tratamiento antiviral fue el genotipo del VHC (tabla 5). La totalidad de los pacientes infectados con el genotipo 3 respondieron al tratamiento (5/5 pacientes), frente al 47.4% de los pacientes con genotipo 1 (9/19 pacientes) ($p=0.05$).

Tabla 5. Factores pronóstico de la respuesta al tratamiento antiviral

	Respuesta viral sostenida [n (%)]		p*	OR (IC 95%)**
	Si (n=14)	No (n=10)		
Año de trasplante				
- después de 1998	13 (92.9)	7 (70)	0.27	1.33 (0.86-2.04)
- antes de 1998	1 (7.1)	3 (30)		
Edad del receptor (años) (media \pm DE)	51.1 \pm 7.1	51.5 \pm 12.3	0.98 ¹	
Sexo del receptor				
- varón	13 (92.9)	8 (80)	0.55	1.16 (0.82-1.63)
- mujer	1 (7.1)	2 (20)		
Genotipo del VHC				
- 1	9 (64.3)	10 (100)	0.05	
- 3	5 (35.7)	0		
Inhibidor de calcineurina				
- Ciclosporina	1 (7.1)	4 (40)	0.12	0.18 (0.02-1.37)
- Tacrolimus	13 (92.9)	6 (60)		

*P calculada mediante la prueba de χ^2 con la corrección de Fisher con dos colas, excepto ¹U de Mann-Whitney.

** Odds ratio (intervalo de confianza del 95%)

III. DISTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LAS CITOCINAS EN PACIENTES TRASPLANTADOS POR CIRROSIS POR VHC

Uno de los objetivos del estudio fue analizar la distribución de las frecuencias de los polimorfismos genéticos de la IL-1alfa, IL-1beta, IL-1R, IL-1RA, IL-12, IFN-gamma, TNF-alfa, IL-6, IL-10 y TGF-beta, en una población trasplantada por cirrosis por VHC. Dado que la distribución de las frecuencias de los polimorfismos genéticos de las citocinas varían mucho en función de la raza estudiada, los 90 pacientes que hemos seleccionado en este estudio son todos individuos de raza blanca nacidos en España. No se pudieron analizar los polimorfismos de todas las citocinas en todos los pacientes ya que en algunas muestras no se amplificaron todos los polimorfismos, probablemente debido a un menor grado de pureza de algunas de éstas.

Las frecuencias alélicas y distribuciones genotípicas de las citocinas estudiadas se muestran en la tabla 6. Como se puede observar en la misma, no hay ningún paciente homocigoto para el alelo C del polimorfismo TGF-beta +915. y menos de un 5% de los pacientes son homocigotos para IL-1alfa -889 TT, IL-1beta +3962 TT, IL-1RA CC o TNF-alfa -238 AA. Los polimorfismos del IFN-gamma +874 A/T muestran una distribución normal en la población estudiada.

Tabla 6. Frecuencias alélicas y genotípicas de citocinas en pacientes trasplantados por cirrosis VHC

CITOCINA	POSICIÓN (n)	ALELOS n (frec)	GENOTIPOS* n (frec)		
IL-1alfa	-889 (n=77)	C: 120 (0.779) T: 34 (0.221)	CC: 45 (0.584)	CT: 30 (0.39)	TT: 2 (0.026)
IL-1beta	-511 (n=86)	C: 104 (0.605) T: 68 (0.395)	CC: 26 (0.302)	CT: 52 (0.605)	TT: 8 (0.093)
	+3962 (n=82)	C: 128 (0.78) T: 36 (0.22)	CC: 47 (0.573)	CT: 34 (0.415)	TT: 1 (0.012)
IL-1R	pstI1970 (n=83)	C: 107 (0.645) T: 59 (0.355)	CC: 31 (0.374)	CT: 45 (0.542)	TT: 7 (0.084)
IL-1Ra	mspaI11100 (n=85)	T: 128 (0.753) C: 42 (0.247)	TT: 44 (0.518)	TC: 40 (0.47)	CC: 1 (0.012)
IL-12B	1188 (n=76)	A: 117 (0.77) C: 35 (0.23)	AA: 45 (0.592)	AC: 27 (0.355)	CC: 4 (0.053)
TNF-alfa	-308 (n=69)	G: 118 (0.855) A: 20 (0.145)	GG: 51 (0.739)	GA: 16 (0.232)	AA: 2 (0.029)
	-238 (n=73)	G: 126 (0.863) A: 20 (0.137)	GG: 57 (0.781)	AG: 12 (0.164)	AA: 4 (0.055)
IFN-gamma	+874 (n=83)	A: 89 (0.536) T: 77 (0.464)	AA: 24 (0.289)	AT: 41 (0.494)	TT: 18 (0.217)
IL-6	-174 (n=90)	G: 144 (0.8) C: 36 (0.2)	GG: 62 (0.689)	GC: 20 (0.222)	CC: 8 (0.089)
IL-10	-1082 (n=89)	A: 125 (0.702) G: 53 (0.298)	AA: 47 (0.528)	AG: 31 (0.348)	GG: 11 (0.124)
	-819 (n=89)	C: 125 (0.702) T: 53 (0.298)	CC: 42 (0.472)	CT: 41 (0.461)	TT: 6 (0.067)
	-592 (n=87)	C: 105 (0.603) A: 69 (0.397)	CC: 35 (0.402)	AC: 35 (0.402)	CC: 17 (0.195)
TGF-beta	+869 (n=75)	T: 99 (0.66) C: 51 (0.34)	TT: 30 (0.4)	CT: 39 (0.52)	CC: 6 (0.08)
	+915 (n=69)	G: 125 (0.906) C: 13 (0.094)	GG: 56 (0.812)	GC: 13 (0.188)	CC: 0

n: número de pacientes, alelos o genotipos según corresponda; frec: frecuencia

*el primer genotipo corresponde al alelo mayoritario en homocigosis, la segunda columna corresponde al genotipo heterocigoto, y la tercera columna al alelo minoritario en homocigosis.

En la tabla 7 se muestran también la distribución de los haplotipos de la IL-10 y del TNF-alfa.

Tabla 7. Haplotipos de IL-10 Y TNF-alfa en pacientes trasplantados por cirrosis por VHC

CITOCINA (n)	POSICIÓN	HAPLOTIPOS n (frec)
IL-10 (n=87)	-1082 -819 -592	GCC/GCC: 11 (0.126)
		GCC/ACC: 16 (0.184)
		GCC/ATA: 10 (0.115)
		GCC/ACA: 4 (0.046)
		ACC/ATA: 19 (0.218)
		ACC/ACC: 9 (0.103)
		ATA/ATA: 4 (0.046)
		ATA/ACA: 13 (0.149)
		ACC/ACA: 1 (0.011)
		TNF-alfa (n=68)
GA/GG: 9 (0.132)		
GG/GA: 1 (0.015)		
GA/GA: 4 (0.059)		
AG/GG: 14 (0.206)		
AG/AG: 2 (0.029)		
AG/GA: 1 (0.015)		

IV. POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y RECIDIVA GRAVE DEL VHC

Tabla 8. Genotipos de citocinas en pacientes trasplantados por cirrosis VHC, clasificados según la gravedad de la recidiva

CITOCINA	POSICIÓN (n)	GENOTIPOS	RECIDIVA GRAVE [n (%)]	RECIDIVA NO GRAVE [n (%)]
IL-1alfa	-889 (n=54)	CC	9 (50)	21 (58.3)
		CT	9 (50)	14 (38.9)
		TT	0	1 (2.8)
IL-1beta	-511 (n=63)	CC	7 (33.3)	12 (29.3)
		CT	13 (61.9)	24 (58.5)
		TT	1 (4.8)	5 (12.2)
	+3962 (n=59)	CC	10 (50)	21 (53.8)
		CT	10 (50)	17 (43.6)
		TT	0	1 (2.6)
IL-1R	pst11970 (n=59)	CC	5 (26.3)	16 (40)
		CT	10 (52.6)	23 (57.5)
		TT	4 (21.1)	1 (2.5)
IL-1Ra	mspal11100 (n=61)	TT	10 (50)	20 (48.8)
		TC	10 (50)	20 (48.8)
		CC	0	1 (2.4)
IL-12B	1188 (n=54)	AA	13 (72.2)	19 (52.8)
		AC	5 (27.8)	15 (41.7)
		CC	0	2 (5.6)
TNF-alfa	-308 (n=50)	GG	14 (77.8)	23 (71.9)
		GA	4 (22.2)	8 (25)
		AA	0	1 (3.1)
	-238 (n=54)	GG	17 (89.5)	23 (65.7)
		GA	1 (5.3)	9 (25.7)
		AA	1 (5.3)	3 (8.6)
IFN-gamma	+874 (n=60)	AA	7 (36.8)	10 (24.4)
		AT	9 (47.4)	18 (43.9)
		TT	3 (15.8)	13 (31.7)
IL-6	-174 (n=65)	GG	13 (59.1)	30 (69.8)
		GC	6 (27.3)	10 (23.3)
		CC	3 (13.6)	3 (7)
IL-10	-1082 (n=64)	AA	11 (52.4)	25 (58.1)
		AG	8 (38.1)	12 (27.9)
		GG	2 (9.5)	6 (14)
	-819 (n=64)	CC	8 (38.1)	20 (46.5)
		AT	10 (47.6)	20 (46.5)
		TT	3 (14.3)	3 (7)
	-592 (n=63)	CC	7 (33.3)	19 (45.2)
		CA	11 (52.4)	13 (31)
		AA	3 (14.3)	10 (23.8)
TGF-beta	+869 (n=52)	TT	7 (38.9)	14 (41.2)
		TC	10 (55.6)	18 (52.9)
		CC	1 (5.6)	2 (5.9)
	+915 (n=48)	GG	4 (22.2)	8 (26.7)
		GC	14 (77.8)	22 (73.3)
		CC	0	0

n: número de pacientes o genotipos según corresponda.

En este grupo de estudio se consideraron 65 pacientes según se describe en el apartado “pacientes y métodos”, 22 (33.8%) de los cuales desarrollaron recidiva grave sobre el injerto. En la tabla 8 se muestran las distribuciones genotípicas de los polimorfismos estudiados con respecto a la gravedad de la recidiva.

Sólo se encontró una relación estadísticamente significativa entre el polimorfismo del IL-1R y la gravedad de la recidiva (figura 4). Este polimorfismo fue analizado en 59 pacientes, 19 (32.2%) de los cuales desarrollaron recidiva grave sobre el injerto. Como se muestra en la tabla 8, observamos que el 97.5% de los pacientes que no desarrollaron recidiva grave presentaban genotipos distintos al TT.

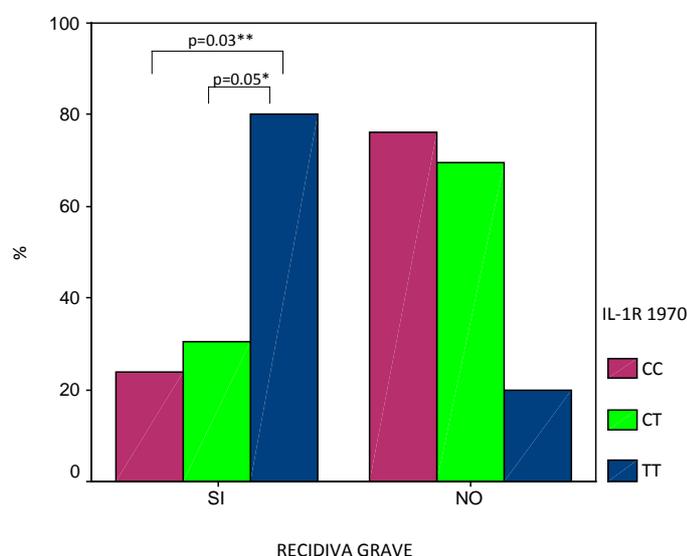


Figura 4. Genotipos de IL-1R en pacientes con trasplante hepático por cirrosis VHC, clasificados en función de la gravedad de la recidiva.

* OR para TT = 6.9; IC 95% = 0.8-55.4.

** OR para TT = 7.56; IC 95% = 1-57.9

Se realizó un análisis comparativo entre los pacientes homocigotos para el alelo T y aquellos que poseían genotipos diferentes y que habían desarrollado recidiva grave, observando que el riesgo de desarrollar recidiva grave es 8.4 veces mayor en el grupo de pacientes homocigotos TT que en el resto (figura 4). La sensibilidad (S) fue del 21.1%, la especificidad (E) del 97.5%, el valor predictivo positivo (VPP) del 80% y el valor predictivo negativo (VPN) del 72.2%.

Finalmente, dado que la gravedad de la recidiva se ha asociado en este trabajo con la edad del donante, se realizó un estudio estadístico en el que se valoró la relación del polimorfismo del IL-1R con la gravedad de la recidiva, estratificando a los pacientes en función de la edad del donante (mayor o menor de 40 años). La prueba de Mantel-Haenszel demostró que el polimorfismo del IL-1R se mantenía como factor de riesgo asociado con la gravedad de la recidiva, (OR=7.3, IC 95%=0.88-62.5) (p=0.081) independiente de la edad del donante.

Así mismo no se ha observado ninguna asociación significativa entre las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de la IL-1A, IL-1B, IL-1RA, IL-12, IFN-gamma, TNF-alfa, IL-6, IL-10 y TGF-beta en las posiciones descritas ni entre los haplotipos de TNF-alfa y de IL-10 en los pacientes agrupados en función de la gravedad de la recidiva.

V. POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y RECHAZO AGUDO DEL INJERTO

Tabla 9. Genotipos de citocinas en pacientes trasplantados por cirrosis VHC, clasificados según la presencia de rechazo agudo del injerto en los tres primeros meses del trasplante

CITOCINA	POSICIÓN (n)	GENOTIPOS	RECHAZO [n (%)]	NO RECHAZO [n (%)]	
IL-1alfa	-889 (n=77)	CC	18 (62.1)	27 (56.3)	
		CT	10 (34.5)	20 (41.7)	
		TT	1 (3.4%)	1 (2.1)	
IL-1beta	-511 (n=86)	CC	9 (29)	17 (30.9)	
		CT	18 (58.1)	34 (61.8)	
		TT	4 (12.9)	4 (7.3)	
	+3962 (n=59)	CC	19 (59.4)	28 (56)	
		CT	12 (37.5)	22 (44)	
		TT	1 (3.1)	0	
IL-1R	pstl1970 (n=83)	CC	13 (40.6)	18 (35.3)	
		CT	16 (50)	29 (56.9)	
		TT	3 (9.4)	4 (7.8)	
IL-1Ra	mspal11100 (n=85)	TT	17 (54.8)	27 (50)	
		TC	14 (45.2)	26 (48.1)	
		CC	0	1 (1.2)	
IL-12B	1188 (n=76)	AA	18 (62.1)	27 (57.4)	
		AC	10 (34.5)	17 (36.2)	
		CC	1 (3.4)	3 (6.4)	
TNF-alfa	-308 (n=69)	GG	17 (65.4)	34 (79.1)	
		GA	9 (34.6)	7 (16.3)	
		AA	0	2 (4.7)	
	-238 (n=73)	GG	23 (85.2)	34 (73.9)	
		GA	2 (7.4)	10 (21.7)	
		AA	2 (7.4)	2 (4.3)	
IFN-gamma	+874 (n=83)	AA	10 (32.3)	14 (26.9)	
		AT	13 (41.9)	28 (53.8)	
		TT	8 (25.8)	10 (19.2)	
IL-6	-174 (n=90)	GG	18 (54.5)	44 (77.2)	
		GC	10 (30.3)	10 (17.5)	
		CC	5 (15.2)	3 (5.3)	
IL-10	-1082 (n=89)	AA	15 (45.5)	32 (57.1)	
		AG	12 (36.4)	19 (33.9)	
		GG	6 (18.2)	5 (8.9)	
	-819 (n=89)	CC	17 (51.5)	25 (44.6)	
		AT	13 (39.4)	28 (50)	
		TT	3 (9.1)	3 (5.4)	
	-592 (n=87)	CC	15 (45.5)	20 (37)	
		CA	10 (30.3)	25 (46.3)	
		AA	8 (24.2)	9 (16.7)	
	TGF-beta	+869 (n=75)	TT	12 (44.4)	18 (37.5)
			TC	14 (51.9)	25 (52.1)
			CC	1 (3.7)	5 (10.4)
+915 (n=69)		GG	20 (83.3)	36 (80)	
		GC	4 (16.7)	9 (20)	
		CC	0	0	

n: número de pacientes o genotipos según corresponda.

De los 90 pacientes estudiados, 33 desarrollaron un episodio de rechazo agudo sobre el injerto durante los 3 meses posteriores al trasplante, mostrándose la distribución genotípica de las citocinas en la tabla 9. Sólo se encontró una relación estadísticamente significativa entre el polimorfismo genético de la IL-6 en la posición -174 y el desarrollo de rechazo agudo.

Al analizar los genotipos, se observó que sólo presentaron rechazo agudo un 29% de los pacientes homocigotos GG (18/62 pacientes) frente al 53.6% (15/28) de los pacientes portadores de genotipos diferentes, siendo esta diferencia significativa ($p=0.045$) entre ambos grupos (Figura 5). El valor de E de esta asociación fue del 77.2%, siendo la S, VPP y VPN un 45.5%, 53.6% y 71% respectivamente.

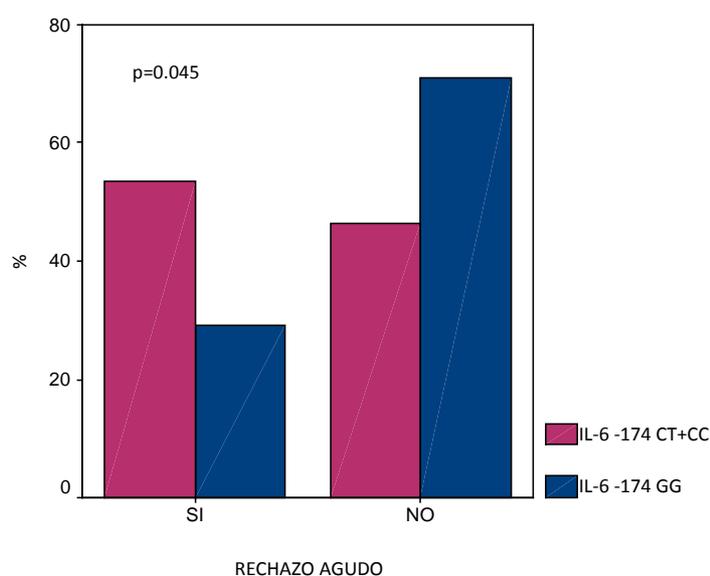


Figura 5. Polimorfismo IL-6 -174 en pacientes con trasplante hepático por VHC clasificados en función de la presencia de rechazo agudo. OR para CT+CC =1.99; IC 95% = 1.1-3.6.

Igualmente, al comparar las frecuencias de los alelos C y G del gen de la IL-6 en la posición -174, se observó una relación significativa entre la presencia del alelo C y el desarrollo de rechazo agudo sobre el injerto ($p=0.015$) (OR=2.2 IC 95% (1.2-3.9)).

Se realizó un análisis multivariante entre los factores de riesgo asociados a rechazo agudo en este estudio (tratamiento inmunosupresor basado en ciclosporina y genotipos portadores del alelo C de la IL-6), encontrando que ambos factores eran independientes en relación a la presencia de rechazo agudo ($p=0.05$) (OR=4.15, IC 95% =1.5-11.3).

No se encontró ninguna asociación significativa entre las frecuencias alélicas y los haplotipos considerados en los pacientes agrupados en función de la presencia de rechazo agudo.

VI. POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTIVIRAL

Tabla 10. Genotipos de citocinas en pacientes trasplantados por cirrosis VHC, clasificados según la respuesta al tratamiento antiviral

CITOCINA	POSICIÓN (n)	GENOTIPOS	RVS [n (%)]	NO RESPUESTA [n (%)]
IL-1alfa	-889 (n=19)	CC	3 (27.3)	4 (50)
		CT	8 (72.7)	4 (50)
		TT	0	0
IL-1beta	-511 (n=20)	CC	3 (23.1)	2 (22.2)
		CT	9 (69.2)	7 (77.8)
		TT	1 (7.7)	0
	+3962 (n=59)	CC	2 (16.7)	3 (37.5)
		CT	10 (83.3)	5 (62.5)
		TT	0	0
IL-1R	pstl1970 (n=21)	CC	3 (25)	7 (77.8)
		CT	7 (77.8)	2 (22.2)
		TT	2 (16.7)	0
IL-1Ra	mspal11100 (n=22)	TT	7 (53.8)	2 (22.2)
		TC	6 (46.2)	7 (77.8)
		CC	0	0
IL-12B	1188 (n=19)	AA	6 (54.5)	4 (50)
		AC	5 (45.5)	4 (50)
		CC	0	0
TNF-alfa	-308 (n=19)	GG	8 (72.7)	5 (62.5)
		GA	2 (18.2)	3 (37.5)
		AA	1 (9.1)	0
	-238 (n=19)	GG	10 (90.9)	6 (75)
		GA	1 (9.1)	2 (25)
		AA	0	0
IFN-gamma	+874 (n=21)	AA	7 (63.6)	3 (30)
		AT	3 (27.3)	6 (60)
		TT	1 (9.1)	1 (10)
IL-6	-174 (n=24)	GG	8 (57.1)	8 (80)
		GC	5 (35.7)	1 (10)
		CC	1 (7.1)	1 (10)
IL-10	-1082 (n=24)	AA	5 (35.7)	6 (60)
		AG	6 (42.9)	3 (30)
		GG	3 (21.4)	1 (10)
	-819 (n=24)	CC	8 (57.1)	4(40)
		AT	4 (28.6)	6 (60)
		TT	2 (14.3)	0
	-592 (n=23)	CC	6 (46.2)	3 (30)
		CA	7 (53.8)	5 (50)
		AA	0	2 (20)
TGF-beta	+869 (n=19)	TT	3 (27.3)	2 (25)
		TC	6 (54.5)	5 (62.5)
		CC	2 (18.2)	1 (12.5)
	+915 (n=18)	GG	9 (81.8)	5 (71.4)
		GC	2 (18.2)	2 (28.6)
		CC	0	0

n: número de pacientes o genotipos según corresponda; RVS: respuesta viral sostenida.

De los 90 pacientes estudiados, 24 completaron el tratamiento antiviral con interferón pegilado y ribavirina durante el tiempo estipulado dependiendo del genotipo viral infectante como se describe en el apartado “pacientes y métodos”. De éstos, el 57,1 % (n=14) alcanzaron una RVS. En la tabla 10 se muestran las frecuencias genotípicas de las citocinas estudiadas en función a la respuesta al tratamiento antiviral.

Como se muestra en la figura 6, el 81,8% de los pacientes portadores del alelo T para el polimorfismo del IL-1R alcanzaron una RVS, mientras que sólo lo hicieron el 30% de los homocigotos para el alelo C (CC), siendo esta diferencia significativa ($p=0.038$) entre ambos grupos. Los valores de S, E, VPP y VPN fueron del 75 %, 77.8%, 81.8 % y 70 % respectivamente.

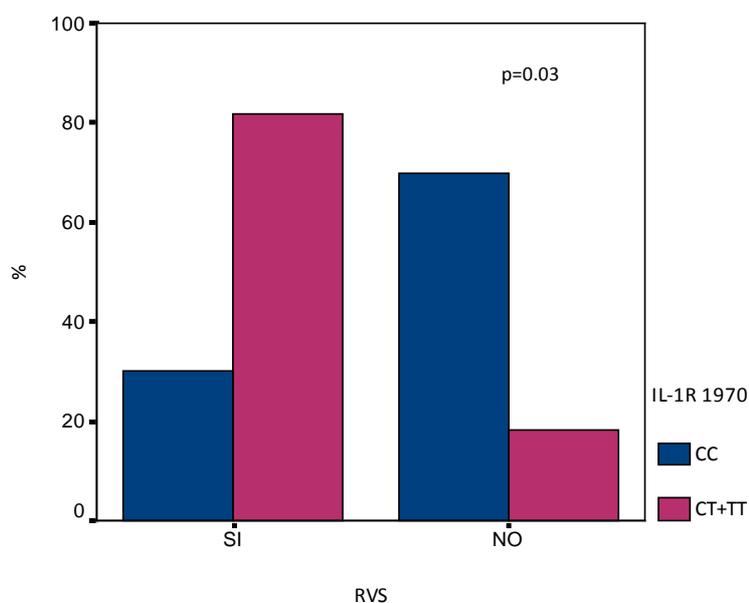


Figura 6. Distribución alélica de IL-1R 1970 en pacientes con trasplante hepático por VHC clasificados en función de la respuesta al tratamiento antiviral.
OR para CT+TT =3.37; IC 95% = 0.9-12

Dado que este polimorfismo también se ha asociado con la gravedad de la recidiva viral en este estudio, se realizó un análisis estadístico en el que se comprobó que la mayoría de los pacientes que recibieron tratamiento antiviral eran aquellos que habían desarrollado una recidiva grave (OR= 2.35, IC 95%=1.28-4.42; $p=0.025$) (Tabla 11).

Tabla 11. Indicación de tratamiento antiviral en los pacientes clasificados según la gravedad de la recidiva

	Recidiva grave (n=22) n (%)	Recidiva no grave (n=43) n (%)
Con tratamiento antiviral	10 (45.5)	7 (16.3)
Sin tratamiento antiviral	12 (54.5)	36 (83.7)

n: número de pacientes

No se pudo realizar un análisis multivariante con los factores que se han asociado con la RVS en este trabajo (genotipo 3 del VHC, genotipo TT del IL-1R), ya que en este grupo de estudio el número de pacientes fue muy reducido.

Así mismo no se ha observado ninguna asociación significativa entre las frecuencias alélicas de los polimorfismos de la IL-1A, IL-1B, IL-1RA, IL-12, IFN-gamma, TNF-alfa, IL-6, IL-10 y TGF-beta en las posiciones descritas ni en los haplotipos de TNF-alfa y de IL-10 en los pacientes agrupados en función de la respuesta al tratamiento antiviral.

Discusión

La cirrosis por VHC es la principal indicación de trasplante hepático en el mundo y la recidiva del virus, definida como la presencia de viremia después del trasplante, es casi universal, con presencia de lesión crónica del injerto en la mayoría de los pacientes (47;57;204). Los pacientes trasplantados como consecuencia de la infección por VHC tienen una menor tasa de supervivencia a largo plazo que los trasplantados por otras etiologías (63). Además, existe un subgrupo de pacientes trasplantados por cirrosis por VHC con una evolución más rápida y más agresiva de la enfermedad, que desarrollarán cirrosis del injerto en los primeros 5 años después del trasplante (20-30%) (47-49). Esta variabilidad interindividual en la gravedad de la recidiva por el VHC se debe a múltiples factores interrelacionados que dependen del huésped, de la cirugía, del propio virus y del donante (58;59;97). La detección precoz de este subgrupo de pacientes que desarrollarán recidiva grave del VHC, permitiría adoptar medidas preventivas y terapéuticas que podrían mejorar la supervivencia y retrasar, o incluso evitar, la necesidad de retrasplante.

A su vez, es bien conocido que el exceso de inmunosupresión plantea problemas como el aumento del riesgo de padecer tumores (193), aumento de los factores de riesgo cardiovascular (191) o insuficiencia renal (192), y además ha demostrado tener influencia sobre la gravedad de la recidiva del VHC (117). La existencia de un posible marcador genético, fácil de identificar y no invasivo, que predijera el riesgo de rechazo agudo, permitiría individualizar la inmunosupresión y el riesgo inmunológico del paciente, evitando los problemas derivados del exceso de inmunosupresión.

Las citocinas juegan un papel muy importante, directo e indirecto, en la generación de la respuesta inmunológica frente a los virus: directamente, inhibiendo la replicación viral, e indirectamente, determinando el tipo de respuesta inmunológica frente a este tipo de patógenos. La capacidad máxima de producción de citocinas está sujeta a una gran variabilidad interindividual, atribuible a ciertos mecanismos moleculares, entre los que se encuentran las variaciones de nucleótidos dentro de las regiones reguladoras y codificantes más importantes. Estos polimorfismos genéticos afectan a la expresión y secreción de citocinas *“in vitro”* e *“in vivo”*, y se ha descrito una asociación de los mismos con el rechazo agudo y con la fibrosis del injerto en los pacientes receptores de trasplante cardíaco, renal y pulmonar (174;183;184;186). Sin embargo, esta asociación ha sido poco

estudiada en pacientes receptores de trasplante hepático con cirrosis por VHC y los trabajos existentes muestran resultados contradictorios (189;196;197;199). Es posible que estas discrepancias se deban al escaso número de pacientes estudiados, a las diferencias étnicas existentes entre los grupos de trabajo, a la heterogeneidad de las variables asociadas y/o a la falta de consenso a la hora de definir recidiva grave. Además, algunos autores al valorar el rechazo agudo, no consideran exclusivamente a los pacientes trasplantados por cirrosis por VHC, sino que incluyen también a pacientes trasplantados por otras etiologías. En este estudio nos propusimos relacionar los polimorfismos genéticos de las citocinas con la gravedad de la recidiva del VHC, con el rechazo agudo y con la respuesta al tratamiento antiviral en una cohorte amplia de pacientes trasplantados por VHC. Para ello, se seleccionó un grupo de 90 pacientes de raza caucásica, representativo de la población trasplantada por VHC en nuestro centro. Al mismo tiempo, se tuvieron en cuenta otras variables relacionadas en la literatura con el riesgo de recidiva grave, rechazo agudo o respuesta al tratamiento antiviral, no siempre recogidas en los estudios previos.

Las características generales y demográficas de la población estudiada, la incidencia de rechazo agudo (36.7%), el porcentaje de pacientes que desarrollaron recidiva viral grave (33.8%) y la tasa de RVS (58.3%) de los pacientes tratados, son muy similares a las descritos en la literatura, lo que apoya que la población seleccionada en este estudio es representativa de la de los pacientes con trasplante hepático por VHC y por tanto, los resultados obtenidos extrapolables a la población general de trasplantados por VHC.

I. FRECUENCIAS DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Las frecuencias de los polimorfismos genéticos de las citocinas estudiadas en este trabajo en pacientes sometidos a trasplante hepático por cirrosis por VHC son muy similares a las encontradas por otros autores en la población española sana no trasplantada (205-209), indicando que la población estudiada es representativa de la población española. Únicamente hemos encontrado en nuestros pacientes una mayor representación del haplotipo de la IL-10 que condiciona una baja producción de esta citocina y de los genotipos del TGF-beta que condicionan una alta producción de dicha citocina, que las descritas en la literatura en población sana (210-212). Estos resultados también han sido observados por otros autores con respecto a la población sana de su área geográfica (187;188;213). Es bien conocido el papel antiinflamatorio de la IL-10, por lo que se le puede presuponer un efecto protector de la fibrogénesis hepática en este tipo de pacientes, tal como sugieren algunos estudios clínicos y experimentales (144;214). Hamada H. y colaboradores (215) demostraron que los pacientes con infección crónica por el VHC y que eran portadores de haplotipos que condicionan una alta producción de la IL-10, tenían menos fibrosis que el resto de pacientes, lo que sugiere que la IL-10 pudiera retrasar la progresión de la enfermedad. Estas observaciones podrían explicar la mayor representación de los haplotipos considerados bajos productores de IL-10 en la población incluida en este estudio, ya que son pacientes que han precisado un trasplante hepático por la mala evolución de la enfermedad.

En este trabajo también se ha encontrado una frecuencia disminuida del genotipo CC del gen del TGF-beta en posición +869 en el codón 10 con respecto a las frecuencias de la población española sana, hecho observado también por Mas y colaboradores en una cohorte de pacientes trasplantados por VHC (189). Algunos estudios en humanos han demostrado una correlación entre la presencia del alelo T en posición +869 en el codón 10 y niveles séricos elevados del TGF-beta, relacionando este hecho con una elevada tasa de fibrosis en pacientes con trasplante pulmonar (174). Esto sugiere que los pacientes con genotipos que condicionan una alta producción de TGF-beta podrían desarrollar fibrosis hepática más rápidamente y, como consecuencia, precisar un trasplante hepático más precozmente, produciéndose una selección de los pacientes con estos genotipos que serían los candidatos al trasplante.

Los trabajos encontrados en la literatura que estudien los polimorfismos genéticos de las citocinas en población trasplantada por cirrosis por VHC son escasos y los sujetos estudiados pertenecen a grupos étnicos muy distintos. Es bien conocido que existen diferencias étnicas en las frecuencias de los polimorfismos de algunas citocinas (216;217), lo que supone un escollo más a la hora de comparar las frecuencias entre distintas poblaciones. Aún así, las frecuencias obtenidas en los pacientes objeto de este estudio para las citocinas TNF-alfa, IFN-gamma e IL-6 son muy similares a las obtenidas en pacientes italianos trasplantados por VHC (156), no así a las obtenidas en poblaciones norteamericana (189) e israelí (188), respectivamente.

II. POLIMORFISMOS Y RECIDIVA GRAVE

En este trabajo hemos encontrado que existe una asociación significativa entre el genotipo TT del IL-1R en la posición +1970 y el riesgo de padecer recidiva viral grave en pacientes trasplantados por cirrosis VHC, asociación no descrita previamente en la literatura. La IL-1, citocina proinflamatoria por definición, es un mediador clave en la activación de la respuesta inmune innata, y los polimorfismos de ambas isoformas (IL-1alfa e IL-1beta) están implicados en el desarrollo de ciertas enfermedades de base autoinmune que presentan un gran componente inflamatorio (181;218), al igual que ocurre con el polimorfismo del IL-1Ra (180). La funcionalidad del polimorfismo del IL-1R no ha sido descrita, aunque recientemente se ha encontrado una asociación entre el genotipo TT en la posición 1970 con el riesgo de padecer enfermedad de Behcet (182). Al igual que sucede en muchas otras enfermedades autoinmunes, en la enfermedad de Behcet existe un perfil predominante de citocinas de tipo Th1 (219), y también se ha descrito una asociación entre los polimorfismos de citocinas proinflamatorias, como el TNF-alfa (220) con el riesgo y gravedad de la enfermedad.

En la infección crónica por el VHC, a pesar de lo débil y defectuosa que pueda ser la respuesta inmunitaria tipo Th1, se cree que pueda ser un factor crucial en el desarrollo de fibrosis hepática y cirrosis (43). La respuesta inmunitaria celular parece contribuir al control del virus en etapas iniciales de la infección y potencialmente a la inflamación hepática en la infección crónica (221). La muerte de células inflamatorias en el hígado, la lisis de algunos hepatocitos infectados y la secreción de citocinas inflamatorias (43) de forma mantenida en el tiempo, podrían activar las células estrelladas, que son la principal fuente de la matriz extracelular en la fibrosis hepática (44). Esta explicación justificaría la asociación de ciertos polimorfismos de citocinas proinflamatorias, como TNFalfa, con el riesgo de desarrollar fibrosis grave en pacientes con infección crónica por el VHC antes (125) y después del trasplante (189), y podría explicar los resultados obtenidos en este trabajo con respecto al IL-1R.

El IL-1R comparte la misma vía de señalización de los receptores toll like (toll like receptors; TLRs), involucrados en la transducción de señales intracelulares que desembocan en la producción de diversas proteínas relacionadas con la inflamación y con la activación de la respuesta inmunológica innata y adquirida. El IL-1R y los TLR contienen una región con una secuencia altamente conservada en su dominio citoplasmático denominada dominio TIR (Toll/IL-1R), que es la responsable de iniciar la cascada de señalización. Se ha demostrado que los TLR2 y TLR4 reconocen a las proteínas del core y la NS3 del VHC “in vitro”, y se cree que son los responsables de la orquestación de la inmunidad innata y adaptativa frente al virus (222-224). Recientemente se ha descrito la asociación de un polimorfismo genético del TLR2 con la presencia de cirrosis precoz en pacientes trasplantados hepáticos con recidiva del VHC (225), lo que refuerza la idea de que el IL-1R, al compartir la misma vía de señalización de los TLRs, pudiera estar también involucrado en la gravedad de la recidiva viral.

Finalmente, el análisis del polimorfismo del IL-1R y la detección de los pacientes homocigotos TT en los trasplantados por cirrosis VHC tiene una especificidad (97.5%) y un VPP (80%) lo suficientemente elevados como para considerar esta determinación en la valoración del riesgo de recidiva grave de cada paciente y adecuar las medidas preventivas y terapéuticas a cada individuo.

En este trabajo también se han considerado otras variables relacionadas en la literatura con la gravedad de la recidiva, demostrándose que la edad del donante mayor de 40 años y haber recibido el trasplante hepático a partir del año 1998, tienen relación con la gravedad de la recidiva viral, hecho ampliamente descrito por otros autores (96;97;108). Probablemente esta asociación se deba a que a partir de los años 1997-1998 comenzaron a utilizarse injertos procedentes de donantes mayores para poder optimizar al máximo el número de órganos, por lo que estas variables parecen ser parcialmente dependientes entre sí. Para evitar el sesgo del año en el análisis estadístico, se estratificó a los pacientes en dos grupos en función del año del trasplante (anterior a 1998 o a partir de 1998) comprobando que la edad del donante mayor de 40 años seguía siendo un factor de riesgo de recidiva viral grave independientemente del año de trasplante. La

influencia del año del trasplante en la recidiva grave en este estudio puede deberse a que una gran parte de los pacientes trasplantados antes de 1998 y que fallecieron tras desarrollar recidiva grave sobre el injerto, no han podido ser considerados en este estudio dado el carácter retrospectivo del mismo. Es probable que este sesgo en la selección de los pacientes trasplantados antes del año 1998, sea el responsable de la significación estadística del año del trasplante con la recidiva grave. Debido a que la edad del donante se mantenía como factor de riesgo de recidiva grave, se realizó la prueba de Mantel-Haenszel estratificando a los pacientes en función de la edad del donante (mayor o igual a 40 años), demostrándose que el polimorfismo del IL-1R se mantenía como factor de riesgo independiente asociado con la gravedad de la recidiva.

Otro problema añadido, al tratarse de un estudio retrospectivo, es que los pacientes trasplantados que fallecieron antes de iniciar este estudio no pudieron ser incluidos en el mismo, con el riesgo de cometer un sesgo en la selección de la cohorte, habiendo seleccionado teóricamente aquellos pacientes con una evolución de la enfermedad más indolente. Para valorar esta posibilidad, analizamos, en la base de datos de todos los pacientes trasplantados en la Unidad, la media de supervivencia de los pacientes que fallecieron como consecuencia directa de la recidiva del VHC y el porcentaje de recidiva grave de la población estudiada, comprobando que ambas eran similares. Por ello, consideramos que la muestra de pacientes incluido en este estudio es representativa de todos los pacientes trasplantados por VHC en la Unidad.

En los estudios publicados por otros autores, se ha relacionado el genotipo que condiciona una alta producción de IFN-gamma (+874 AA) con el menor riesgo de padecer una recidiva precoz (188), y los genotipos bajos productores de IL-10 -1082 GG (156), altos productores de IFN-gamma +874 TT (156), y los haplotipos altos productores de TGF-beta (188), con una mayor tasa de progresión de fibrosis sobre el hígado trasplantado. Sin embargo, en el presente estudio no se ha encontrado ninguna relación entre los polimorfismos genéticos de las citocinas descritas y el riesgo de desarrollar recidiva grave sobre el injerto, aunque se ha encontrado una mayor representación de los

haplotipos bajos productores de la IL-10 (ACC/ACC, ACC/ATA y ATA/ATA) y del genotipo alto productor del TGF-beta +869 CC, que, a su vez, se han asociado en la literatura con una mayor tasa de fibrosis hepática en pacientes con infección crónica por el VHC no trasplantados. Basándonos en este hecho, parece lógico pensar que se ha producido una selección de pacientes con una elevada tasa de fibrosis, lo que podría condicionar los resultados obtenidos en este trabajo con respecto a los polimorfismos del TGF-beta e IL-10.

Al igual que sucede en los pacientes con recidiva grave, en este trabajo se ha identificado un grupo de pacientes homocigotos para el alelo T en posición +1970 del IL-1R, que tenían una mayor tasa de respuesta viral mantenida tras el tratamiento antiviral. Sin embargo, al analizar con más detalle la población que recibió tratamiento, se detectó que la mayoría de los pacientes tratados fueron aquellos que desarrollaron una recidiva grave de la enfermedad. Esto nos lleva a considerar que posiblemente se ha producido un sesgo en la distribución de los polimorfismos de las citocinas en este grupo de pacientes que condicionarían los resultados obtenidos.

III. POLIMORFISMOS Y RECHAZO AGUDO

Otro de los aspectos analizados en este trabajo fue valorar si los pacientes que han presentado algún episodio de rechazo agudo tienen una susceptibilidad genética al mismo.

En este estudio se ha encontrado que el régimen inmunosupresor inicial y el polimorfismo de la IL-6 en posición -174, se relacionan con la incidencia de rechazo agudo en los pacientes trasplantados por cirrosis por el VHC. La incidencia de rechazo en los pacientes tratados con ciclosporina, fue significativamente mayor que en aquellos tratados con tacrolimus, hecho ampliamente descrito en la literatura (226;227). En el presente trabajo hemos observado que los pacientes portadores del alelo C en la región promotora del gen de la IL-6 en posición -174, presentan mayor riesgo de desarrollar un rechazo agudo en los 3 primeros meses posteriores al trasplante que aquellos pacientes homocigotos para el alelo G. Se ha especulado que la IL-6 es una citocina involucrada en el rechazo agudo en el trasplante de órgano sólido en base a los elevados niveles séricos encontrados de la misma en aquellos pacientes que desarrollan rechazo agudo sobre el injerto (228;229). Esta observación ha dado pie al estudio de los polimorfismos de esta citocina como posible marcador que permita predecir el riesgo de rechazo agudo y así modular la inmunosupresión para evitar esta complicación y evitar el exceso de inmunosupresión en aquellos pacientes con menor riesgo de desarrollar algún episodio de rechazo. En trasplante de riñón (185) y pulmón (184) se ha encontrado una asociación entre los genotipos portadores del alelo G y el riesgo de padecer rechazo agudo; sin embargo, esta observación no se ha podido trasladar al campo del trasplante hepático (187;189;199), probablemente porque los estudios que analizan esta posible relación son muy heterogéneos en cuanto a la población estudiada (raza), a la etiología responsable del trasplante hepático, a las distintas pautas de inmunosupresión utilizadas y al escaso número de pacientes analizados en estos estudios. Así, el hecho de que nuestros resultados con respecto a la relación entre el polimorfismo de la IL-6 y el rechazo en el trasplante hepático sea contradictorio con respecto a los obtenidos en el trasplante de otros órganos sólidos, podría indicar que el mecanismo inmunológico de rechazo es diferente en cada órgano.

IV. APLICABILIDAD PRÁCTICA DE LOS RESULTADOS

En caso de que los resultados de este estudio se confirmaran en otra cohorte de pacientes, se habría identificado un nuevo marcador genético-inmunológico fácil de determinar mediante métodos poco invasivos, que nos permitiría identificar antes del trasplante, a un subgrupo de pacientes con mayor riesgo de desarrollar recidiva viral grave, con las consiguientes repercusiones pronósticas, preventivas y terapéuticas. Entre las medidas preventivas se encontraría la limitación, en este subgrupo de pacientes, de la utilización de injertos procedentes de donantes mayores de 40 años y evitar en lo posible el exceso de inmunosupresión. Entre las medidas terapéuticas estarían el inicio precoz del tratamiento antiviral y la prolongación en la duración del mismo. Así mismo, disponer de un marcador predictor de rechazo agudo, permitiría adecuar la intensidad de la inmunosupresión al riesgo inmunológico de cada paciente y de este modo, evitar o minimizar los efectos adversos derivados del tratamiento inmunosupresor y su repercusión sobre la gravedad de la recidiva viral.

Para validar los hallazgos de este estudio, se ha iniciado un estudio retrospectivo en otra cohorte de pacientes españoles trasplantados por VHC procedentes de otro centro.

Conclusiones

Las conclusiones derivadas de los resultados de esta Tesis Doctoral se agrupan en dos bloques:

I. Conclusiones relacionadas con la evolución clínica de los pacientes:

1. El porcentaje de pacientes que desarrollan recidiva grave del VHC después del trasplante hepático en nuestra serie (33.8%) es similar al descrito en la literatura.
2. Se confirma que la edad del donante mayor de 40 años es un factor de riesgo de la recidiva grave del VHC.
3. Se confirma que el tratamiento antiviral con interferon pegilado y ribavirina es mal tolerado en los pacientes trasplantados, debiendo interrumpirse en la tercera parte de los pacientes por efectos secundarios.
4. En los pacientes que completan el periodo de tratamiento antiviral, la tasa de respuesta viral sostenida (58.3%) es similar a la descrita en pacientes no trasplantados, confirmándose que la respuesta es mayor en los pacientes infectados por genotipo 3 del VHC que en los infectados por genotipo 1.
5. El riesgo de rechazo es menor cuando se utiliza tacrolimus en el régimen inmunosupresor inicial que cuando se utiliza ciclosporina.

II. Conclusiones relacionadas con la distribución de los polimorfismos genéticos de las citocinas:

1. Los pacientes con trasplante hepático por cirrosis por VHC incluidos en este estudio tienen mayor frecuencia de genotipos que condicionan una baja producción de citocinas antiinflamatorias (IL-10) y una alta producción de mediadores profibróticos (TGFbeta), que las descritas en la literatura en la población española sana.
2. Los pacientes homocigotos para el alelo T del polimorfismo del IL-1R 1970 tienen mayor riesgo de recidiva grave del VHC que los portadores de otros genotipos.
3. Los pacientes homocigotos para el alelo G en la posición -174 en el promotor del gen de la IL-6 tienen menor riesgo de rechazo agudo.

Bibliografía

1. Wasley A, Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis* 2000; 20(1):1-16.
2. NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002. *NIH Consens State Sci Statements* 2002; 19(3):1-46.
3. Bruguera M, Forns X. Hepatitis C in Spain. *Med Clin (Barc)* 2006; 127(3):113-117.
4. Memon MI, Memon MA. Hepatitis C: an epidemiological review. *J Viral Hepat* 2002; 9(2):84-100.
5. Cruz JM, Piera L, Bragg-Gresham JL, Feldman H, Port FK. Results of the international hemodialysis study DOPPS in Spain and Europe. *Nefrología* 2003; 23(5):437-443.
6. Alter MJ. The epidemiology of acute and chronic hepatitis C. *Clin Liver Dis* 1997; 1(3):559-vii.
7. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep* 1998; 47(RR-19):1-39.
8. Bruguera M. [Sporadic hepatitis C: relative significance of non-apparent vertical, sexual, and parenteral transmission of the hepatitis C virus]. *Med Clin (Barc)* 1998; 111(17):658-659.
9. Registro Español de Trasplante Hepático. Novena memoria de resultados. 1984-2006. www.ont.es. 2008.
10. Armstrong GL, Alter MJ, McQuillan GM, Margolis HS. The past incidence of hepatitis C virus infection: implications for the future burden of chronic liver disease in the United States. *Hepatology* 2000; 31(3):777-782.
11. Wong JB, McQuillan GM, McHutchison JG, Poynard T. Estimating future hepatitis C morbidity, mortality, and costs in the United States. *Am J Public Health* 2000; 90(10):1562-1569.
12. Tan SL, He Y, Huang Y, Gale M, Jr. Strategies for hepatitis C therapeutic intervention: now and next. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4(5):465-470.
13. Feld JJ, Hoofnagle JH. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 2005; 436(7053):967-972.
14. Wright TL, Donegan E, Hsu HH, Ferrell L, Lake JR, Kim M et al. Recurrent and acquired hepatitis C viral infection in liver transplant recipients. *Gastroenterology* 1992; 103(1):317-322.
15. Feray C, Samuel D, Thiers V, Gigou M, Pichon F, Bismuth A et al. Reinfection of liver graft by hepatitis C virus after liver transplantation. *J Clin Invest* 1992; 89(4):1361-1365.
16. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of the hepatitis C virus. *Princess Takamatsu Symp* 1995; 25:75-91.
17. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994; 19(5):1321-1324.
18. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004; 39(1):5-19.
19. Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(11):4942-4946.

20. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006; 24(6):677-688.
21. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005; 6(11):1123-1132.
22. Hu Y, Shahidi A, Park S, Guilfoyle D, Hirshfield I. Detection of extrahepatic hepatitis C virus replication by a novel, highly sensitive, single-tube nested polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 2003; 119(1):95-100.
23. Laskus T, Radkowski M, Piasek A, Nowicki M, Horban A, Cianciara J et al. Hepatitis C virus in lymphoid cells of patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1: evidence of active replication in monocytes/macrophages and lymphocytes. *J Infect Dis* 2000; 181(2):442-448.
24. Gremion C, Cerny A. Hepatitis C virus and the immune system: a concise review 300. *Rev Med Virol* 2005; 15(4):235-268.
25. Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2001; 194(10):1395-1406.
26. Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R, Jr., Ikeda M, Lemon SM et al. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 2003; 300(5622):1145-1148.
27. Joo M, Hahn YS, Kwon M, Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW. Hepatitis C virus core protein suppresses NF-kappaB activation and cyclooxygenase-2 expression by direct interaction with IkappaB kinase beta. *J Virol* 2005; 79(12):7648-7657.
28. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999; 285(5424):107-110.
29. Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, Nuti S, D'Oro U et al. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med* 2002; 195(1):35-41.
30. Ward S, Lauer G, Isba R, Walker B, Klenerman P. Cellular immune responses against hepatitis C virus: the evidence base 2002. *Clin Exp Immunol* 2002; 128(2):195-203.
31. Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han JH, Hanson HL, Ghayeb J et al. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 2003; 302(5645):659-662.
32. Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C et al. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(24):15661-15668.
33. Urbani S, Amadei B, Fisicaro P, Tola D, Orlandini A, Sacchelli L et al. Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. *Hepatology* 2006; 44(1):126-139.
34. Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, Hall JE, Mason TJ, Saracco G et al. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(8):3468-3472.
35. Higashi Y, Kakumu S, Yoshioka K, Wakita T, Mizokami M, Ohba K et al. Dynamics of genome change in the E2/NS1 region of hepatitis C virus in vivo. *Virology* 1993; 197(2):659-668.

36. Taniguchi S, Okamoto H, Sakamoto M, Kojima M, Tsuda F, Tanaka T et al. A structurally flexible and antigenically variable N-terminal domain of the hepatitis C virus E2/NS1 protein: implication for an escape from antibody. *Virology* 1993; 195(1):297-301.
37. Racanelli V, Rehermann B. Hepatitis C virus infection: when silence is deception. *Trends Immunol* 2003; 24(8):456-464.
38. Gale M, Jr., Foy EM. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 2005; 436(7053):939-945.
39. Erickson AL, Kimura Y, Igarashi S, Eichelberger J, Houghton M, Sidney J et al. The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 2001; 15(6):883-895.
40. Shimizu YK, Hijikata M, Iwamoto A, Alter HJ, Purcell RH, Yoshikura H. Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. *J Virol* 1994; 68(3):1494-1500.
41. Welsh RM. Assessing CD8 T cell number and dysfunction in the presence of antigen. *J Exp Med* 2001; 193(5):F19-F22.
42. Crispe IN. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(1):51-62.
43. He XS, Rehermann B, Lopez-Labrador FX, Boisvert J, Cheung R, Mumm J et al. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(10):5692-5697.
44. Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328(25):1828-1835.
45. Wright TL, Combs C, Kim M, Ferrell L, Bacchetti P, Ascher N et al. Interferon-alpha therapy for hepatitis C virus infection after liver transplantation. *Hepatology* 1994; 20(4 Pt 1):773-779.
46. Sallie R, Cohen AT, Tibbs CJ, Portmann BC, Rayner A, O'Grady JG et al. Recurrence of hepatitis C following orthotopic liver transplantation: a polymerase chain reaction and histological study. *J Hepatol* 1994; 21(4):536-542.
47. Shuhart MC, Bronner MP, Gretch DR, Thomassen LV, Wartelle CF, Tateyama H et al. Histological and clinical outcome after liver transplantation for hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26(6):1646-1652.
48. Wiesner RH, Sorrell M, Villamil F. Report of the first International Liver Transplantation Society expert panel consensus conference on liver transplantation and hepatitis C. *Liver Transpl* 2003; 9(11):S1-S9.
49. Berenguer M. Recurrent allograft disease: viral hepatitis. *Acta Gastroenterol Belg* 2005; 68(3):337-346.
50. Gane EJ, Naoumov NV, Qian KP, Mondelli MU, Maertens G, Portmann BC et al. A longitudinal analysis of hepatitis C virus replication following liver transplantation. *Gastroenterology* 1996; 110(1):167-177.
51. Lerat H, Berby F, Trabaud MA, Vidalin O, Major M, Trepo C et al. Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *J Clin Invest* 1996; 97(3):845-851.
52. Moldvay J, Deny P, Pol S, Brechot C, Lamas E. Detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of infected patients by in situ hybridization. *Blood* 1994; 83(1):269-273.

53. Dahari H, Feliu A, Garcia-Retortillo M, Fornis X, Neumann AU. Second hepatitis C replication compartment indicated by viral dynamics during liver transplantation. *J Hepatol* 2005; 42(4):491-498.
54. Garcia-Retortillo M, Fornis X, Feliu A, Moitinho E, Costa J, Navasa M et al. Hepatitis C virus kinetics during and immediately after liver transplantation. *Hepatology* 2002; 35(3):680-687.
55. Powers KA, Ribeiro RM, Patel K, Pianko S, Nyberg L, Pockros P et al. Kinetics of hepatitis C virus reinfection after liver transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12(2):207-216.
56. Fukumoto T, Berg T, Ku Y, Bechstein WO, Knoop M, Lemmens HP et al. Viral dynamics of hepatitis C early after orthotopic liver transplantation: evidence for rapid turnover of serum virions. *Hepatology* 1996; 24(6):1351-1354.
57. Prieto M, Berenguer M, Rayon JM, Cordoba J, Arguello L, Carrasco D et al. High incidence of allograft cirrhosis in hepatitis C virus genotype 1b infection following transplantation: relationship with rejection episodes. *Hepatology* 1999; 29(1):250-256.
58. Feray C, Caccamo L, Alexander GJ, Ducot B, Gugenheim J, Casanovas T et al. European collaborative study on factors influencing outcome after liver transplantation for hepatitis C. European Concerted Action on Viral Hepatitis (EUROHEP) Group. *Gastroenterology* 1999; 117(3):619-625.
59. Berenguer M, Ferrell L, Watson J, Prieto M, Kim M, Rayon M et al. HCV-related fibrosis progression following liver transplantation: increase in recent years. *J Hepatol* 2000; 32(4):673-684.
60. Prieto M, Berenguer M, Rimola A, Loinaz C, Barrios C, Clemente G et al. Liver transplantation in hepatitis C. A Spanish multi-centre experience. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; 10(9):771-776.
61. Schluger LK, Sheiner PA, Thung SN, Lau JY, Min A, Wolf DC et al. Severe recurrent cholestatic hepatitis C following orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1996; 23(5):971-976.
62. Kimball P, Baker M, Fisher RA. Allograft TNFbeta and IL16 polymorphisms influence HCV recurrence and severity after liver transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12(2):247-252.
63. Forman LM, Lewis JD, Berlin JA, Feldman HI, Lucey MR. The association between hepatitis C infection and survival after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology* 2002; 122(4):889-896.
64. Berenguer M. Natural history of recurrent hepatitis C. *Liver Transpl* 2002; 8(10 Suppl 1):S14-S18.
65. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med* 1992; 327(27):1899-1905.
66. Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo QL. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 1991; 14(2):381-388.
67. Feray C, Gigou M, Samuel D, Paradis V, Wilber J, David MF et al. The course of hepatitis C virus infection after liver transplantation. *Hepatology* 1994; 20(5):1137-1143.
68. Weinstein JS, Poterucha JJ, Zein N, Wiesner RH, Persing DH, Rakela J. Epidemiology and natural history of hepatitis C infections in liver transplant recipients. *J Hepatol* 1995; 22(1 Suppl):154-159.
69. Gane EJ, Portmann BC, Naoumov NV, Smith HM, Underhill JA, Donaldson PT et al. Long-term outcome of hepatitis C infection after liver transplantation. *N Engl J Med* 1996; 334(13):815-820.
70. Boker KH, Dalley G, Bahr MJ, Maschek H, Tillmann HL, Trautwein C et al. Long-term outcome of hepatitis C virus infection after liver transplantation. *Hepatology* 1997; 25(1):203-210.

71. Aguilera V, Berenguer M. Hepatitis C and fibrosis. *Rev Esp Enferm Dig* 2004; 96(6):402-408.
72. Berenguer M, Lopez-Labrador FX, Wright TL. Hepatitis C and liver transplantation. *J Hepatol* 2001; 35(5):666-678.
73. Berenguer M, Prieto M, Rayon JM, Mora J, Pastor M, Ortiz V et al. Natural history of clinically compensated hepatitis C virus-related graft cirrhosis after liver transplantation. *Hepatology* 2000; 32(4 Pt 1):852-858.
74. Feray C, Samuel D, Gigou M, Paradis V, David MF, Lemonnier C et al. An open trial of interferon alfa recombinant for hepatitis C after liver transplantation: antiviral effects and risk of rejection. *Hepatology* 1995; 22(4 Pt 1):1084-1089.
75. Singh N, Gayowski T, Wannstedt CF, Marino IR, Wagener MM. Interferon-alpha therapy for hepatitis C virus recurrence after liver transplantation: long-term response with maintenance therapy. *Clin Transplant* 1996; 10(4):348-351.
76. Vargas V, Charco R, Castells L, Esteban R, Margarit C. Alpha-interferon for acute hepatitis C in liver transplant patients. *Transplant Proc* 1995; 27(1):1222-1223.
77. Boillot O, Berger F, Rasolofoa E, Mion F, Chevallier P, Gille D et al. Effectiveness of early alpha-interferon therapy for hepatitis C virus infection recurrence after liver transplantation. *Transpl Int* 1996; 9 Suppl 1:S202-S203.
78. Bizollon T, Palazzo U, Ducerf C, Chevallier M, Elliott M, Baulieux J et al. Pilot study of the combination of interferon alfa and ribavirin as therapy of recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Hepatology* 1997; 26(2):500-504.
79. Rosen HR, Madden JP, Martin P. A model to predict survival following liver retransplantation. *Hepatology* 1999; 29(2):365-370.
80. Sheiner PA, Schluger LK, Emre S, Thung SN, Lau JY, Guy SR et al. Retransplantation for recurrent hepatitis C. *Liver Transpl Surg* 1997; 3(2):130-136.
81. Rosen HR, Martin P. Hepatitis C infection in patients undergoing liver retransplantation. *Transplantation* 1998; 66(12):1612-1616.
82. Feray C, Gigou M, Samuel D, Paradis V, Mishiro S, Maertens G et al. Influence of the genotypes of hepatitis C virus on the severity of recurrent liver disease after liver transplantation. *Gastroenterology* 1995; 108(4):1088-1096.
83. Vargas HE, Laskus T, Wang LF, Radkowski M, Poutous A, Lee R et al. The influence of hepatitis C virus genotypes on the outcome of liver transplantation. *Liver Transpl Surg* 1998; 4(1):22-27.
84. Charlton M, Seaberg E, Wiesner R, Everhart J, Zetterman R, Lake J et al. Predictors of patient and graft survival following liver transplantation for hepatitis C. *Hepatology* 1998; 28(3):823-830.
85. Sreekumar R, Gonzalez-Koch A, Maor-Kendler Y, Batts K, Moreno-Luna L, Poterucha J et al. Early identification of recipients with progressive histologic recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Hepatology* 2000; 32(5):1125-1130.
86. Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992; 66(5):3225-3229.
87. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995; 15(1):41-63.

88. Gonzalez-Peralta RP, Qian K, She JY, Davis GL, Ohno T, Mizokami M et al. Clinical implications of viral quasispecies heterogeneity in chronic hepatitis C. *J Med Virol* 1996; 49(3):242-247.
89. Kumagai N, Kaneko F, Tsunematsu S, Tsuchimoto K, Tada S, Saito H et al. Complexity of the HVR-1 quasispecies and disease activity in patients with hepatitis C. *Eur J Clin Invest* 2007; 37(7):566-572.
90. Martell M, Esteban JI, Quer J, Vargas V, Esteban R, Guardia J et al. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in patients undergoing orthotopic liver transplantation. *J Virol* 1994; 68(5):3425-3436.
91. Doughty AL, Painter DM, McCaughan GW. Post-transplant quasispecies pattern remains stable over time in patients with recurrent cholestatic hepatitis due to hepatitis C virus. *J Hepatol* 2000; 32(1):126-134.
92. Lyra AC, Fan X, Lang DM, Yusim K, Ramrakhiani S, Brunt EM et al. Evolution of hepatitis C viral quasispecies after liver transplantation. *Gastroenterology* 2002; 123(5):1485-1493.
93. Belli LS, Burroughs AK, Burra P, Alberti AB, Samonakis D, Camma C et al. Liver transplantation for HCV cirrhosis: improved survival in recent years and increased severity of recurrent disease in female recipients: results of a long term retrospective study. *Liver Transpl* 2007; 13(5):733-740.
94. Dixon LR, Crawford JM. Early histologic changes in fibrosing cholestatic hepatitis C. *Liver Transpl* 2007; 13(2):219-226.
95. Berenguer M, Prieto M, San Juan F, Rayon JM, Martinez F, Carrasco D et al. Contribution of donor age to the recent decrease in patient survival among HCV-infected liver transplant recipients. *Hepatology* 2002; 36(1):202-210.
96. Alonso O, Loinaz C, Moreno E, Jimenez C, Abradelo M, Gomez R et al. Advanced donor age increases the risk of severe recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Transpl Int* 2005; 18(8):902-907.
97. Burak KW, Kremers WK, Batts KP, Wiesner RH, Rosen CB, Razonable RR et al. Impact of cytomegalovirus infection, year of transplantation, and donor age on outcomes after liver transplantation for hepatitis C. *Liver Transpl* 2002; 8(4):362-369.
98. Garcia-Retortillo M, Forns X, Llovet JM, Navasa M, Feliu A, Massaguer A et al. Hepatitis C recurrence is more severe after living donor compared to cadaveric liver transplantation. *Hepatology* 2004; 40(3):699-707.
99. Shiffman ML, Stravitz RT, Contos MJ, Mills AS, Sterling RK, Luketic VA et al. Histologic recurrence of chronic hepatitis C virus in patients after living donor and deceased donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2004; 10(10):1248-1255.
100. Guo L, Orrego M, Rodriguez-Luna H, Balan V, Byrne T, Chopra K et al. Living donor liver transplantation for hepatitis C-related cirrhosis: no difference in histological recurrence when compared to deceased donor liver transplantation recipients. *Liver Transpl* 2006; 12(4):560-565.
101. Schmeding M, Neumann UP, Puhl G, Bahra M, Neuhaus R, Neuhaus P. Hepatitis C recurrence and fibrosis progression are not increased after living donor liver transplantation: a single-center study of 289 patients. *Liver Transpl* 2007; 13(5):687-692.
102. Kimball P, Stravitz T. DR antigens influence graft outcome and HCV recurrence after liver transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37(2):1099-1100.
103. Toniutto P, Fabris C, Bortolotti N, Minisini R, Avellini C, Fumo E et al. Evaluation of donor hepatic iron concentration as a factor of early fibrotic progression after liver transplantation. *J Hepatol* 2004; 41(2):307-311.

104. Belli LS, Burra P, Poli F, Battista AA, Silini E, Zavaglia C et al. HLA-DRB1 donor-recipient mismatch affects the outcome of hepatitis C disease recurrence after liver transplantation. *Gastroenterology* 2006; 130(3):695-702.
105. Zamboni F, Franchello A, David E, Rocca G, Ricchiuti A, Lavezzo B et al. Effect of macrovesicular steatosis and other donor and recipient characteristics on the outcome of liver transplantation. *Clin Transplant* 2001; 15(1):53-57.
106. Ghobrial RM, Farmer DG, Baquerizo A, Colquhoun S, Rosen HR, Yersiz H et al. Orthotopic liver transplantation for hepatitis C: outcome, effect of immunosuppression, and causes of retransplantation during an 8-year single-center experience. *Ann Surg* 1999; 229(6):824-831.
107. Martin P, Busuttill RW, Goldstein RM, Crippin JS, Klintmalm GB, Fitzsimmons WE et al. Impact of tacrolimus versus cyclosporine in hepatitis C virus-infected liver transplant recipients on recurrent hepatitis: a prospective, randomized trial. *Liver Transpl* 2004; 10(10):1258-1262.
108. Samonakis DN, Triantos CK, Thalheimer U, Quaglia A, Leandro G, Teixeira R et al. Immunosuppression and donor age with respect to severity of HCV recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl* 2005; 11(4):386-395.
109. Nakagawa M, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Kanazawa N, Koyama T et al. Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313(1):42-47.
110. Firpi RJ, Zhu H, Morelli G, Abdelmalek MF, Soldevila-Pico C, Machicao VI et al. Cyclosporine suppresses hepatitis C virus in vitro and increases the chance of a sustained virological response after liver transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12(1):51-57.
111. Berenguer M, Aguilera V, Prieto M, San Juan F, Rayon JM, Benlloch S et al. Effect of calcineurin inhibitors on survival and histologic disease severity in HCV-infected liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2006; 12(5):762-767.
112. McCaughan GW, Zekry A. Mechanisms of HCV reinfection and allograft damage after liver transplantation. *J Hepatol* 2004; 40(3):368-374.
113. Zekry A, Gleeson M, Guney S, McCaughan GW. A prospective cross-over study comparing the effect of mycophenolate versus azathioprine on allograft function and viral load in liver transplant recipients with recurrent chronic HCV infection. *Liver Transpl* 2004; 10(1):52-57.
114. Jain A, Kashyap R, Demetris AJ, Eghstesad B, Pokharna R, Fung JJ. A prospective randomized trial of mycophenolate mofetil in liver transplant recipients with hepatitis C. *Liver Transpl* 2002; 8(1):40-46.
115. Berenguer M, Crippin J, Gish R, Bass N, Bostrom A, Netto G et al. A model to predict severe HCV-related disease following liver transplantation. *Hepatology* 2003; 38(1):34-41.
116. Nelson DR, Soldevila-Pico C, Reed A, Abdelmalek MF, Hemming AW, Van der Werf WJ et al. Anti-interleukin-2 receptor therapy in combination with mycophenolate mofetil is associated with more severe hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl* 2001; 7(12):1064-1070.
117. Everson GT. Impact of immunosuppressive therapy on recurrence of hepatitis C. *Liver Transpl* 2002; 8(10 Suppl 1):S19-S27.
118. Sheiner PA, Schwartz ME, Mor E, Schluger LK, Theise N, Kishikawa K et al. Severe or multiple rejection episodes are associated with early recurrence of hepatitis C after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1995; 21(1):30-34.
119. Lake JR. The role of immunosuppression in recurrence of hepatitis C. *Liver Transpl* 2003; 9(11):S63-S66.

120. Humar A, Kumar D, Raboud J, Caliendo AM, Moussa G, Levy G et al. Interactions between cytomegalovirus, human herpesvirus-6, and the recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Am J Transplant* 2002; 2(5):461-466.
121. Watt KD, Lyden ER, Gulizia JM, McCashland TM. Recurrent hepatitis C posttransplant: early preservation injury may predict poor outcome. *Liver Transpl* 2006; 12(1):134-139.
122. Baron PW, Sindram D, Higdon D, Howell DN, Gottfried MR, Tuttle-Newhall JE et al. Prolonged rewarming time during allograft implantation predisposes to recurrent hepatitis C infection after liver transplantation. *Liver Transpl* 2000; 6(4):407-412.
123. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:411-452.
124. Bradham CA, Plumpe J, Manns MP, Brenner DA, Trautwein C. Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am J Physiol* 1998; 275(3 Pt 1):G387-G392.
125. Yee LJ, Tang J, Herrera J, Kaslow RA, Van Leeuwen DJ. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection. *Genes Immun* 2000; 1(6):386-390.
126. Dai CY, Chuang WL, Lee LP, Chen SC, Hou NJ, Lin ZY et al. Associations of tumour necrosis factor alpha promoter polymorphisms at position -308 and -238 with clinical characteristics of chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2006; 13(11):770-774.
127. Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C et al. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000; 31(4):828-833.
128. Dai CY, Chuang WL, Chang WY, Chen SC, Lee LP, Hsieh MY et al. Tumor necrosis factor- alpha promoter polymorphism at position -308 predicts response to combination therapy in hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2006; 193(1):98-101.
129. Hohler T, Kruger A, Gerken G, Schneider PM, Meyer zum Buschenfelde KH, Rittner C. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism at position -238 is associated with chronic active hepatitis C infection. *J Med Virol* 1998; 54(3):173-177.
130. Barrett S, Collins M, Kenny C, Ryan E, Keane CO, Crowe J. Polymorphisms in tumour necrosis factor- alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma, and outcome of hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 2003; 71(2):212-218.
131. Rosen HR, McHutchison JG, Conrad AJ, Lentz JJ, Marousek G, Rose SL et al. Tumor necrosis factor genetic polymorphisms and response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2002; 97(3):714-720.
132. Schiemann U, Glas J, Torok P, Simperl C, Martin K, Konig A et al. Response to combination therapy with interferon alfa-2a and ribavirin in chronic hepatitis C according to a TNF-alpha promoter polymorphism. *Digestion* 2003; 68(1):1-4.
133. Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:683-765.
134. Tsai SL, Liaw YF, Chen MH, Huang CY, Kuo GC. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 1997; 25(2):449-458.
135. Blackburn SD, Wherry EJ. IL-10, T cell exhaustion and viral persistence. *Trends Microbiol* 2007; 15(4):143-146.

136. Lechmann M, Woitas RP, Langhans B, Kaiser R, Ihlenfeldt HG, Jung G et al. Decreased frequency of HCV core-specific peripheral blood mononuclear cells with type 1 cytokine secretion in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1999; 31(6):971-978.
137. Woitas RP, Lechmann M, Jung G, Kaiser R, Sauerbruch T, Spengler U. CD30 induction and cytokine profiles in hepatitis C virus core-specific peripheral blood T lymphocytes. *J Immunol* 1997; 159(2):1012-1018.
138. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997; 24(1):1-8.
139. Suarez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutierrez C. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. *Transplantation* 2003; 75(5):711-717.
140. Paladino N, Fainboim H, Theiler G, Schroder T, Munoz AE, Flores AC et al. Gender susceptibility to chronic hepatitis C virus infection associated with interleukin 10 promoter polymorphism. *J Virol* 2006; 80(18):9144-9150.
141. Knapp S, Hennig BJ, Frodsham AJ, Zhang L, Hellier S, Wright M et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection. *Immunogenetics* 2003; 55(6):362-369.
142. Mangia A, Santoro R, Piattelli M, Paziienza V, Grifa G, Iacobellis A et al. IL-10 haplotypes as possible predictors of spontaneous clearance of HCV infection. *Cytokine* 2004; 25(3):103-109.
143. Minton EJ, Smillie D, Smith P, Shipley S, McKendrick MW, Gleeson DC et al. Clearance of hepatitis C virus is not associated with single nucleotide polymorphisms in the IL-1, -6, or -10 genes. *Hum Immunol* 2005; 66(2):127-132.
144. Nelson DR, Tu Z, Soldevila-Pico C, Abdelmalek M, Zhu H, Xu YL et al. Long-term interleukin 10 therapy in chronic hepatitis C patients has a proviral and anti-inflammatory effect. *Hepatology* 2003; 38(4):859-868.
145. Kuzushita N, Hayashi N, Katayama K, Kanto T, Oshita M, Hagiwara H et al. High levels of serum interleukin-10 are associated with a poor response to interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32(2):169-174.
146. Cramp ME, Rossol S, Chokshi S, Carucci P, Williams R, Naoumov NV. Hepatitis C virus-specific T-cell reactivity during interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2000; 118(2):346-355.
147. Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, Bansal A, Shorthouse C, Powell EE. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology* 1999; 30(2):526-530.
148. Yee LJ, Tang J, Gibson AW, Kimberly R, Van Leeuwen DJ, Kaslow RA. Interleukin 10 polymorphisms as predictors of sustained response in antiviral therapy for chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 2001; 33(3):708-712.
149. Vidigal PG, Germer JJ, Zein NN. Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta1 genes in chronic hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin. *J Hepatol* 2002; 36(2):271-277.
150. Constantini PK, Wawrzynowicz-Syczewska M, Clare M, Boron-Kaczmarek A, McFarlane IG, Cramp ME et al. Interleukin-1, interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms in hepatitis C virus infection: an investigation of the relationships with spontaneous viral clearance and response to alpha-interferon therapy. *Liver* 2002; 22(5):404-412.

151. Frese M, Schwarzle V, Barth K, Krieger N, Lohmann V, Mihm S et al. Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology* 2002; 35(3):694-703.
152. Woollard DJ, Grakoui A, Shoukry NH, Murthy KK, Campbell KJ, Walker CM. Characterization of HCV-specific Patr class II restricted CD4+ T cell responses in an acutely infected chimpanzee. *Hepatology* 2003; 38(5):1297-1306.
153. Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol* 2000; 61(9):863-866.
154. Cramp ME, Carucci P, Rossol S, Chokshi S, Maertens G, Williams R et al. Hepatitis C virus (HCV) specific immune responses in anti-HCV positive patients without hepatitis C viraemia. *Gut* 1999; 44(3):424-429.
155. Dai CY, Chuang WL, Hsieh MY, Lee LP, Hou NJ, Chen SC et al. Polymorphism of interferon-gamma gene at position +874 and clinical characteristics of chronic hepatitis C. *Transl Res* 2006; 148(3):128-133.
156. Falletti E, Fabris C, Toniutto P, Fontanini E, Cussigh A, Caldato M et al. Genetic polymorphisms of inflammatory cytokines and liver fibrosis progression due to recurrent hepatitis C. *J Interferon Cytokine Res* 2007; 27(3):239-246.
157. Dai CY, Chuang WL, Chang WY, Chen SC, Lee LP, Hsieh MY et al. Polymorphisms in the interferon-gamma gene at position +874 in patients with chronic hepatitis C treated with high-dose interferon-alpha and ribavirin. *Antiviral Res* 2005; 67(2):93-97.
158. Hibi M, Nakajima K, Hirano T. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J Mol Med* 1996; 74(1):1-12.
159. Akira S. IL-6-regulated transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29(12):1401-1418.
160. Ramadori G, Christ B. Cytokines and the hepatic acute-phase response. *Semin Liver Dis* 1999; 19(2):141-155.
161. Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V et al. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 1996; 274(5291):1379-1383.
162. Sakamoto T, Liu Z, Murase N, Ezure T, Yokomuro S, Poli V et al. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology* 1999; 29(2):403-411.
163. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102(7):1369-1376.
164. Nattermann J, Vogel M, Berg T, Danta M, Axel B, Mayr C et al. Effect of the interleukin-6 C174G gene polymorphism on treatment of acute and chronic hepatitis C in human immunodeficiency virus coinfecting patients. *Hepatology* 2007; 46(4):1016-1025.
165. Seegers D, Zwiers A, Strober W, Pena AS, Bouma G. A TaqI polymorphism in the 3'UTR of the IL-12 p40 gene correlates with increased IL-12 secretion. *Genes Immun* 2002; 3(7):419-423.
166. Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, Garcia VE, Brandon R, Callis KP et al. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet* 2007; 80(2):273-290.

167. Wellcome trust case control consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007; 447(7145):661-678.
168. Houldsworth A, Metzner M, Rossol S, Shaw S, Kaminski E, Demaine AG et al. Polymorphisms in the IL-12B gene and outcome of HCV infection. *J Interferon Cytokine Res* 2005; 25(5):271-276.
169. Yin LM, Zhu WF, Wei L, Xu XY, Sun DG, Wang YB et al. Association of interleukin-12 p40 gene 3'-untranslated region polymorphism and outcome of HCV infection. *World J Gastroenterol* 2004; 10(16):2330-2333.
170. Mueller T, Mas-Marques A, Sarrazin C, Wiese M, Halangk J, Witt H et al. Influence of interleukin 12B (IL12B) polymorphisms on spontaneous and treatment-induced recovery from hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2004; 41(4):652-658.
171. Branton MH, Kopp JB. TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect* 1999; 1(15):1349-1365.
172. Gressner AM, Polzar B, Lahme B, Mannherz HG. Induction of rat liver parenchymal cell apoptosis by hepatic myofibroblasts via transforming growth factor beta. *Hepatology* 1996; 23(3):571-581.
173. Cambien F, Ricard S, Troesch A, Mallet C, Generenaz L, Evans A et al. Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. *Hypertension* 1996; 28(5):881-887.
174. Awad MR, El Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation* 1998; 66(8):1014-1020.
175. Gewaltig J, Mangasser-Stephan K, Gartung C, Biesterfeld S, Gressner AM. Association of polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2002; 316(1-2):83-94.
176. Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20(5 Suppl 27):S1-13.
177. Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest* 1992; 22(6):396-402.
178. Tountas NA, Casini-Raggi V, Yang H, di Giovine FS, Vecchi M, Kam L et al. Functional and ethnic association of allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1999; 117(4):806-813.
179. Dominici R, Cattaneo M, Malferrari G, Archi D, Mariani C, Grimaldi LM et al. Cloning and functional analysis of the allelic polymorphism in the transcription regulatory region of interleukin-1 alpha. *Immunogenetics* 2002; 54(2):82-86.
180. Mansfield JC, Holden H, Tarlow JK, di Giovine FS, McDowell TL, Wilson AG et al. Novel genetic association between ulcerative colitis and the anti-inflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist. *Gastroenterology* 1994; 106(3):637-642.
181. Buchs N, di Giovine FS, Silvestri T, Vannier E, Duff GW, Miossec P. IL-1B and IL-1Ra gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. *Genes Immun* 2001; 2(4):222-228.
182. Alayli G, Aydin F, Coban AY, Sullu Y, Canturk F, Bek Y et al. T helper 1 type cytokines polymorphisms: association with susceptibility to Behcet's disease. *Clin Rheumatol* 2007; 26(8):1299-1305.

183. Turner D, Grant SC, Yonan N, Sheldon S, Dyer PA, Sinnott PJ et al. Cytokine gene polymorphism and heart transplant rejection. *Transplantation* 1997; 64(5):776-779.
184. Lu KC, Jaramillo A, Lecha RL, Schuessler RB, Aloush A, Trulock EP et al. Interleukin-6 and interferon-gamma gene polymorphisms in the development of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Transplantation* 2002; 74(9):1297-1302.
185. Marshall SE, McLaren AJ, Haldar NA, Bunce M, Morris PJ, Welsh KI. The impact of recipient cytokine genotype on acute rejection after renal transplantation. *Transplantation* 2000; 70(10):1485-1491.
186. Nikolova PN, Ivanova MI, Mihailova SM, Myhailova AP, Baltadjieva DN, Simeonov PL et al. Cytokine gene polymorphism in kidney transplantation--impact of TGF-beta 1, TNF-alpha and IL-6 on graft outcome. *Transpl Immunol* 2008; 18(4):344-348.
187. Tambur AR, Ortegell JW, Ben Ari Z, Shabtai E, Klein T, Michowiz R et al. Role of cytokine gene polymorphism in hepatitis C recurrence and allograft rejection among liver transplant recipients. *Transplantation* 2001; 71(10):1475-1480.
188. Ben Ari Z, Pappo O, Druzd T, Sulkes J, Klein T, Samra Z et al. Role of cytokine gene polymorphism and hepatic transforming growth factor beta1 expression in recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Cytokine* 2004; 27(1):7-14.
189. Mas VR, Fisher RA, Maluf DG, Archer KJ, Contos MJ, Mills SA et al. Polymorphisms in cytokines and growth factor genes and their association with acute rejection and recurrence of hepatitis C virus disease in liver transplantation. *Clin Genet* 2004; 65(3):191-201.
190. Reviron D, Dussol B, Andre M, Brunet P, Mercier P, Berland Y. TNF-alpha and IL-6 gene polymorphism and rejection in kidney transplantation recipients. *Transplant Proc* 2001; 33(1-2):350-351.
191. Stegall MD, Everson G, Schroter G, Bilir B, Karrer F, Kam I. Metabolic complications after liver transplantation. Diabetes, hypercholesterolemia, hypertension, and obesity. *Transplantation* 1995; 60(9):1057-1060.
192. Flechner SM, Kobashigawa J, Klintmalm G. Calcineurin inhibitor-sparing regimens in solid organ transplantation: focus on improving renal function and nephrotoxicity. *Clin Transplant* 2008; 22(1):1-15.
193. Penn I. Occurrence of cancers in immunosuppressed organ transplant recipients 149. *Clin Transpl* 1994;99-109.
194. Bathgate AJ, Pravica V, Perrey C, Therapondos G, Plevris JN, Hayes PC et al. The effect of polymorphisms in tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, and transforming growth factor-beta1 genes in acute hepatic allograft rejection. *Transplantation* 2000; 69(7):1514-1517.
195. Fernandes H, Koneru B, Fernandes N, Hameed M, Cohen MC, Raveche E et al. Investigation of promoter polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genes in liver transplant patients. *Transplantation* 2002; 73(12):1886-1891.
196. Warle MC, Farhan A, Metselaar HJ, Hop WC, Perrey C, Zondervan PE et al. Cytokine gene polymorphisms and acute human liver graft rejection. *Liver Transpl* 2002; 8(7):603-611.
197. Warle MC, Metselaar HJ, Hop WC, Tilanus HW. Cytokine gene polymorphisms and acute liver graft rejection: a meta-analysis. *Liver Transpl* 2005; 11(1):19-26.
198. Jazrawi SF, Zaman A, Muhammad Z, Rabkin JM, Corless CL, Olyaei A et al. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms and the risk of rejection after liver transplantation: a case control analysis of 210 donor-recipient pairs. *Liver Transpl* 2003; 9(4):377-382.

199. Karasu Z, Ulukaya S, Ayanoglu HO, Basturk B, Ulukaya E, Akyildiz M et al. Cytokine gene polymorphism and early graft rejection in liver transplant recipients. *Transplant Proc* 2004; 36(9):2791-2795.
200. Jonsson JR, Hong C, Purdie DM, Hawley C, Isbel N, Butler M et al. Role of cytokine gene polymorphisms in acute rejection and renal impairment after liver transplantation. *Liver Transpl* 2001; 7(3):255-263.
201. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1(5):431-435.
202. Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology* 1997; 25(3):658-663.
203. Blin N, Stafford DW. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 1976; 3(9):2303-2308.
204. The European Liver Transplant Registry Report. [www eltr org](http://www.eltr.org) 1994.
205. Auguet T, Vidal F, Lopez-Dupla M, Broch M, Gutierrez C, Olona M et al. A study on the TNF-alpha system in Caucasian Spanish patients with alcoholic liver disease. *Drug Alcohol Depend* 2008; 92(1-3):91-99.
206. Pastor IJ, Laso FJ, Romero A, Gonzalez-Sarmiento R. -238 G>A polymorphism of tumor necrosis factor alpha gene (TNFA) is associated with alcoholic liver cirrhosis in alcoholic Spanish men. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29(11):1928-1931.
207. Garcia-Gonzalez MA, Lanas A, Quintero E, Nicolas D, Parra-Blanco A, Strunk M et al. Gastric cancer susceptibility is not linked to pro-and anti-inflammatory cytokine gene polymorphisms in whites: a Nationwide Multicenter Study in Spain. *Am J Gastroenterol* 2007; 102(9):1878-1892.
208. Landi S, Moreno V, Gioia-Patricola L, Guino E, Navarro M, de Oca J et al. Association of common polymorphisms in inflammatory genes interleukin (IL)6, IL8, tumor necrosis factor alpha, NFKB1, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma with colorectal cancer. *Cancer Res* 2003; 63(13):3560-3566.
209. Martinez A, Pascual M, Pascual-Salcedo D, Balsa A, Martin J, de la Concha EG. Genetic polymorphisms in Spanish rheumatoid arthritis patients: an association and linkage study. *Genes Immun* 2003; 4(2):117-121.
210. Ortiz J, Fernandez-Arquero M, Urcelay E, Lopez-Mejias R, Ferreira A, Fontan G et al. Interleukin-10 polymorphisms in Spanish IgA deficiency patients: a case-control and family study. *BMC Med Genet* 2006; 7:56.
211. Nunez C, Alecsandru D, Varade J, Polanco I, Maluenda C, Fernandez-Arquero M et al. Interleukin-10 haplotypes in Celiac Disease in the Spanish population. *BMC Med Genet* 2006; 7:32.
212. Rueda B, Roibas B, Martin J, Gonzalez-Gay MA. Influence of interleukin 10 promoter polymorphisms in susceptibility to giant cell arteritis in Northwestern Spain. *J Rheumatol* 2007; 34(7):1535-1539.
213. Hodak E, Akerman L, David M, Tambur AR, Kfir B, Maron L et al. Cytokine gene polymorphisms in patch-stage mycosis fungoides. *Acta Derm Venereol* 2005; 85(2):109-112.
214. Nelson DR, Lauwers GY, Lau JY, Davis GL. Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterology* 2000; 118(4):655-660.

215. Hamada H, Yatsuhashi H, Yano K, Arisawa K, Nakao K, Yano M . Interleukin-10 promoter polymorphisms and liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C in Japan. *J Hepatol* 2003; 39(3):457-458.
216. Hoffmann SC, Stanley EM, Cox ED, DiMercurio BS, Koziol DE, Harlan DM et al. Ethnicity greatly influences cytokine gene polymorphism distribution. *Am J Transplant* 2002; 2(6):560-567.
217. Delaney NL, Esquenazi V, Lucas DP, Zachary AA, Leffell MS. TNF-alpha, TGF-beta, IL-10, IL-6, and INF-gamma alleles among African Americans and Cuban Americans. Report of the ASHI Minority Workshops: Part IV. *Hum Immunol* 2004; 65(12):1413-1419.
218. McDowell TL, Symons JA, Ploski R, Forre O, Duff GW. A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and a novel interleukin-1 alpha polymorphism. *Arthritis Rheum* 1995; 38(2):221-228.
219. Direskeneli H. Behcet's disease: infectious aetiology, new autoantigens, and HLA-B51. *Ann Rheum Dis* 2001; 60(11):996-1002.
220. Kamoun M, Chelbi H, Houman MH, Lacheb J, Hamzaoui K. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in Tunisian patients with Behcet's disease. *Hum Immunol* 2007; 68(3):201-205.
221. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P et al. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000; 191(9):1499-1512.
222. Szabo G, Dolganiuc A. Subversion of plasmacytoid and myeloid dendritic cell functions in chronic HCV infection. *Immunobiology* 2005; 210(2-4):237-247.
223. Dolganiuc A, Oak S, Kodys K, Golenbock DT, Finberg RW, Kurt-Jones E et al. Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation. *Gastroenterology* 2004; 127(5):1513-1524.
224. Machida K, Cheng KT, Sung VM, Levine AM, Fong S, Lai MM. Hepatitis C virus induces toll-like receptor 4 expression, leading to enhanced production of beta interferon and interleukin-6. *J Virol* 2006; 80(2):866-874.
225. Eid AJ, Brown RA, Paya CV, Razonable RR. Association between toll-like receptor polymorphisms and the outcome of liver transplantation for chronic hepatitis C virus. *Transplantation* 2007; 84(4):511-516.
226. A comparison of tacrolimus (FK 506) and cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation. The U.S. Multicenter FK506 Liver Study Group. *N Engl J Med* 1994; 331(17):1110-1115.
227. Randomised trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporin in prevention of liver allograft rejection. European FK506 Multicentre Liver Study Group. *Lancet* 1994; 344(8920):423-428.
228. Perez-Villa F, Benito B, Llancaqueo M, Cuppoletti A, Roig E. Elevated levels of serum interleukin-6 are associated with low grade cellular rejection in patients with heart transplantation. *Transplant Proc* 2006; 38(9):3012-3015.
229. Abdallah AN, Billes MA, Attia Y, Doutremepuich C, Cassaigne A, Iron A. Evaluation of plasma levels of tumour necrosis factor alpha and interleukin-6 as rejection markers in a cohort of 142 heart-grafted patients followed by endomyocardial biopsy. *Eur Heart J* 1997; 18(6):1024-1029.

Anexo

Los resultados de este trabajo se han presentado parcialmente en los siguientes congresos:

Presentación de panel en Congresos Nacionales

- Citores MJ, **Baños I**, Rosado S, Castejón R, Noblejas A, Durán P, Vargas JA, Cuervas-Mons V. Los polimorfismos genéticos de IL-6, IL1-2 y TNFalfa se relacionan con la recidiva grave de la hepatitis C en pacientes con trasplante hepático. X Congreso de la Sociedad Ibérica de Citometría. Barcelona, junio de 2007.
- **Baños I**, Citores MJ, Rosado S, Castejón R, Noblejas A, Durán P, Vargas JA, Cuervas-Mons V. Los polimorfismos genéticos de las citocinas influyen en la gravedad de la recidiva de la hepatitis C y en la respuesta al tratamiento antiviral en pacientes trasplantados de hígado por cirrosis por virus de la hepatitis C (VHC). I Congreso de la Sociedad Madrileña de Trasplantes, Madrid, noviembre 2007.

Comunicaciones orales en Congresos nacionales

- Citores MJ, Castejón R, **Baños I**, Rosado S, Noblejas A, Durán P, Vargas JA, Cuervas-Mons V. Los polimorfismos genéticos de IL-1R y de IL-6 se relacionan con la gravedad de la recidiva del virus de la hepatitis C (VHC) y con el rechazo agudo del injerto después del trasplante hepático. II Jornada de Inmunosupresión Clínica y Experimental en Trasplantes (ICET), Barcelona, enero 2008.
- **Baños I**, Citores MJ, Rosado S, Castejón R, Noblejas A, Durán P, Vargas JA, Cuervas-Mons V. Los polimorfismos genéticos de IL1R y de IL6 se relacionan con la gravedad de la recidiva del virus de la hepatitis C (VHC) y con el rechazo agudo del injerto después del trasplante hepático. XXXIII Congreso de la Asociación Española para el estudio del hígado, Madrid, febrero de 2008.

Presentación de panel en Congresos Internacionales

- **Baños I**, Citores MJ, Rosado S, Castejón R, Noblejas A, Durán P, Vargas JA, Cuervas-Mons V. The genetic polymorphisms of IL-1R and IL-6 are associated with variable severity of hepatitis C virus (HCV) recurrence and with graft rejection after liver transplantation (LT). American Transplant Congress, Toronto, Junio de 2008

Comunicación oral en Congresos Internacionales

- **Baños I**, Citores MJ, Rosado S, Castejón R, Noblejas A, Durán P, Vargas JA, Cuervas-Mons V. The genetic polymorphisms of IL-1R and IL-6 are associated with variable severity of hepatitis c virus (HCV) recurrence and with graft rejection after liver transplantation (LT). International Congress of International Liver Transplantation Society, Paris, julio de 2008.