

Análisis de las frecuencias génicas de dos SNPs en el gen de Interleucina-28B (IL28B) en una muestra con hepatitis C y controles.



Licenciada Carolina Beloso

Biodiversidad y Genética

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Orientadora: Dra. Adriana Mimbacas

Miembros del tribunal:

Presidenta: Dra. Mónica Sans

Vocal: Dra. Mónica Cappetta

Vocal: Dr. Víctor Raggio



Agradecimientos

A PEDECIBA, CSIC y laboratorio Roche que financiaron este proyecto.

A mi tutora la Dra. Adriana Mimbacas, por enseñarme y darme confianza siempre en estos 9 años que trabajamos juntas.

A los médicos, enfermeras y personal del Hospital Pasteur, en especial a la Dra. Mercedes Perendones y el Dr. Gastón Nieto.

A todos los pacientes que participaron en este trabajo, sin ellos no es posible realizar este tipo de estudio.

A todos mis compañeros del Departamento de Biodiversidad y Genética del IIBCE, por sus consejos, cariño y aguante.

A todos mis compañeros de La Española por el apoyo, sobretodo en esta última etapa.

A mis amigos de la vida por estar siempre, con ellos todo es más fácil.

Por último, a mi familia por apoyarme incondicionalmente desde hace años en este camino y siempre con mucho amor.

Índice:

1	Índice de Abreviaturas	1
2	Resumen.....	3
3	Introducción	5
3.1	Virus de la hepatitis C.....	5
3.2	Replicación viral del virus de la hepatitis C. (Minassian, Rivero y Oubiña, 2014).....	6
3.3	Vías de transmisión del virus.	8
3.4	Genotipos virales y prevalencia de la hepatitis C.....	9
3.5	Historia natural de la enfermedad	12
3.5.1	Hepatitis aguda	12
3.5.2	Hepatitis crónica.....	13
3.6	Respuesta Viral y Tratamiento de la Hepatitis C en nuestro país.	14
3.6.1	Tipos de respuesta viral.....	14
3.6.2	Protocolo terapéutico actual.....	15
3.7	Importancia de la genética del huésped.	16
4	Hipótesis y Objetivos generales	19
4.1	Hipótesis.....	19
4.2	Objetivos generales y específicos.	19
4.2.1	Objetivo General	19
4.2.2	Objetivos Específicos.....	19
5	Materiales y Métodos	20
5.1	Población.....	20
5.1.1	Pacientes con hepatitis C	20
5.1.2	Controles sin hepatitis C.....	21
5.2	Análisis del ADN	21
5.2.1	Extracción del ADN	21
5.2.2	Diseño de cebadores y sondas Taqman®.	22
5.2.3	Genotipificación de los SNP.	23
5.2.4	Confirmación mediante secuenciación.....	24
5.3	Análisis estadístico:	24
6	Resultados	26
6.1	Características de la población con hepatitis C.....	26
6.2	Genotipificación de los SNPs en casos y controles.	28
6.3	Tratamiento.....	31

7	Discusión	36
7.1	Características de la población con hepatitis C.....	36
7.2	Genotipificación de los SNPs en casos y controles.	39
7.3	Tratamiento: factores del huésped y virales.....	40
7.4	SNPs en el gen de IL28B y el tratamiento.	43
8	Conclusiones.....	45
9	Perspectivas	46
10	Bibliografía	47
11	Anexos.....	55
11.1	Extracción de ADN por el método de Fenol-Cloroformo	55
11.2	Funcionamiento de sondas Taqman®	56

1 Índice de Abreviaturas

AIMs: marcadores informativos de ancestralidad

CD81: tetraspanina humana

CHC: carcinoma hepatocelular

CLDN: proteína Claudina

GAG: glicosaminoglicanos

IFN-Peg: Interferón Pegylado

IMC: Índice de masa corporal

LDL-R: receptor para LDL

Log10 CV: Logaritmo en base 10 de la carga viral

MSP: Ministerio de Salud Pública

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORF: marco abierto de lectura

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

RE: retículo endoplasmático

RBV: Ribavirina

RVP: respuesta virológica precoz

RVS: respuesta virológica rápida

SNP: polimorfismo de un solo nucleótido

SR-BI: receptor basurero (*scavenger*)

TGP ó ALT: alanina amino transferasa

TGO ó AST: aspartato amino transferasa

UTR: regiones no codificantes

VHC: virus de la hepatitis C

IRES: Sitio interno de entrada al ribosomo.

2 Resumen

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es la causa más importante de enfermedad crónica hepática y muerte por hepatopatía en el mundo por lo que supone un problema de salud pública de primer orden a escala mundial.

Según la Organización Mundial de la Salud, el 2.2% de la población mundial, aproximadamente 170 millones de personas, pueden presentar infección crónica por el VHC, estando la gran mayoría de ellos asintomáticos hasta etapas avanzadas de la enfermedad.

En nuestro país no existe un conocimiento epidemiológico real de esta afección, ya que el reporte del Ministerio de Salud Pública lo incluye junto a la hepatitis B y otras.

El tratamiento de esta infección es aprobado, financiado y controlado por el Fondo Nacional de Recursos (FNR). Los fármacos que suministra el FNR para combatir la enfermedad (Interferón pegilado y Ribavirina) no están exentos de múltiples e incluso severos efectos adversos. Esto ha llevado a reconocer factores asociados que permitan predecir el éxito terapéutico. En este sentido, estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han identificado polimorfismos de nucleótido simple (SNP_s) en el gen IL-28B (codifica IFN-lambda-3) que están fuertemente asociados con la respuesta al tratamiento y el aclaramiento viral espontáneo. El genotipo CC en el polimorfismo rs12979860 ha demostrado ser la variable con mayor peso pre-tratamiento para predecir el éxito terapéutico. El otro SNP relacionado es el rs8099917 donde los pacientes con presencia de alelo T lograban un aclaramiento viral espontáneo.

Por todo lo expuesto anteriormente, este trabajo tiene como objetivo general determinar las frecuencias alélicas de dos polimorfismos en el gen de IL28B, así como las características clínicas y epidemiológicas en una población portadora de hepatitis C y controles sin la enfermedad.

Nuestros resultados mostraron que las frecuencias génicas para uno de los SNPs estudiados presentaban diferencias estadísticamente significativas entre la población con Hepatitis C y la población sin la enfermedad. Como factores del virus y huésped que pueden influenciar a la hora de implementar el tratamiento, el genotipo

3 y el estadio de fibrosis a nivel hepático son factores que parecerían que inciden en la muestra estudiada de este trabajo y que tiene repercusiones a la hora del tratamiento.

3 Introducción

3.1 Virus de la hepatitis C.

Las hepatopatías son causa frecuente de morbimortalidad. Múltiples etiologías son responsables de las mismas, reconociéndose como las principales las causas tóxicas, metabólicas, tumorales, autoinmunes e infecciosas. En cuanto a estas últimas los microorganismos que con mayor frecuencia generan enfermedad hepática son los virus. La infección por el virus de la Hepatitis C (VHC) es la causa más importante de enfermedad crónica hepática y muerte por hepatopatías en el mundo por lo que supone un problema de salud pública de primer orden a escala mundial.

En 1975 se reconoció por primera vez un causante de hepatitis no-A no-B transmitido a través de la sangre. Años más tarde, en 1989, se publicaron los hallazgos que permitieron identificar al agente etiológico que se denominó VHC (Kuo *et al.*, 1989).

El VHC pertenece a la familia Flaviviridae y se encuentra incluido en el género Hepacivirus, mide entre 55-65nm con un core interno de 30-35nm y alrededor de su envoltura viral se observan espículas de 6nm. Tiene un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva de aproximadamente 9600 bases. Como se observa en la figura 1 posee un marco abierto de lectura (ORF) que se encuentra flanqueado por dos regiones no codificantes (5'UTR y 3'UTR) importantes para la traducción y replicación del mismo. Superpuesto a la región 5'UTR y extendiéndose unas pocas bases en la región codificante del core se encuentra un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) que permite la traducción cap-independiente de una poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos, que es clivada tanto por proteasas celulares como virales en al menos cuatro proteínas estructurales y seis no estructurales (Minassian, Rivero y Oubiña, 2014).

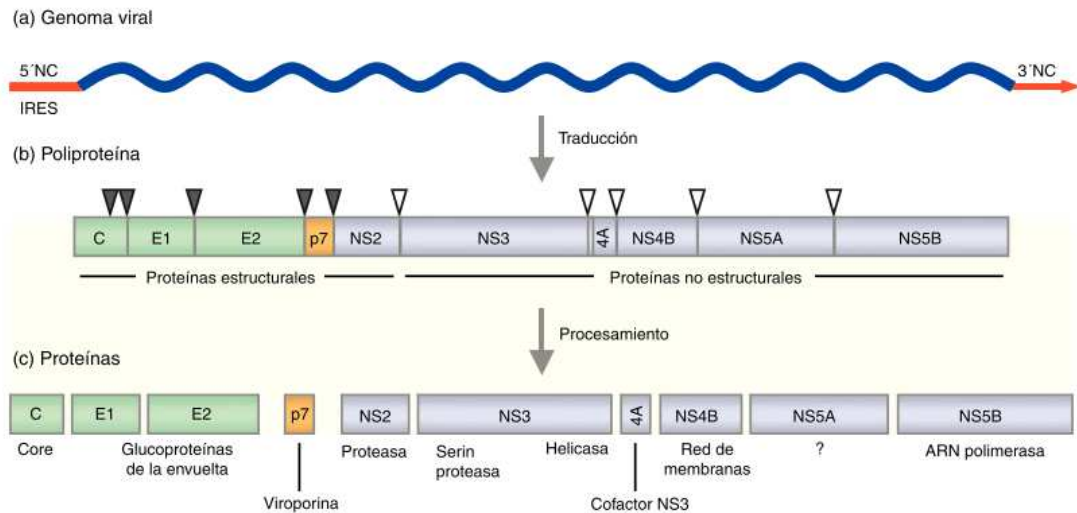


Figura 1: Esquema de la organización genómica del VHC y de las proteínas virales. a) Genoma viral representado en forma lineal: regiones no traducidas 5' y 3' (anaranjado) y marco abierto de lectura (azul). b) Organización de la poliproteína: proteínas estructurales (verde) y no estructurales (gris claro). Los triángulos con fondo negro indican los sitios de corte de las peptidasas celulares para dar lugar a las proteínas estructurales. Los triángulos con fondo blanco se refieren a los sitios de corte de las proteasas virales para dar lugar a las proteínas no estructurales. c) Proteínas virales y sus funciones. (Koutsoudakis, Forns y Pérez-del-Pulgar, 2013).

3.2 Replicación viral del virus de la hepatitis C. (Minassian, Rivero y Oubiña, 2014)

El ciclo de transmisión del virus se da en el hombre, único hospedador susceptible. El hígado es el principal sitio de replicación del VHC. Las partículas virales circulan libres o asociadas a lipoproteínas que interactúan con los receptores de superficies específicos como: tetraspanina humana (CD81), receptor para LDL (LDL-R), receptor basurero (*scavenger*) (SR-BI), ciertos receptores glicosaminoglicanos (GAG) y las proteína Claudina (CLDN); y son probablemente internalizados por endocitosis como se muestra en los puntos 1 y 2 de la Figura 2.

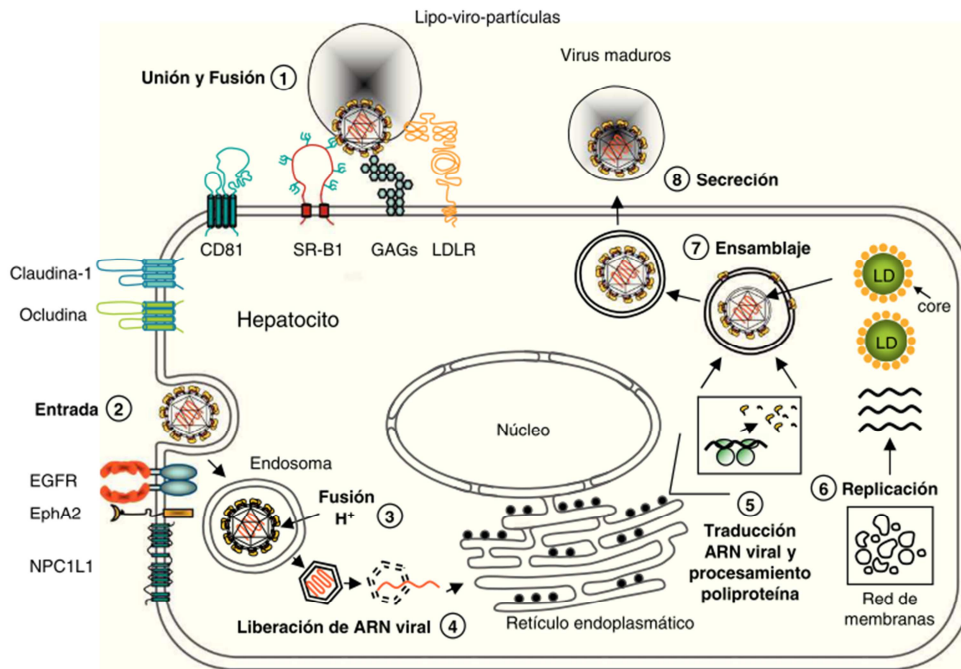


Figura 2: Representación gráfica del ciclo de vida del virus de la hepatitis C. (Koutsoudakis, Forns y Pérez-del-Pulgar, 2013).

La liberación del ARN viral se da por el bajo pH del compartimiento endocítico que hace que éste libere el ARN viral en el citoplasma de la célula recientemente infectada y una vez allí se da la desencapsidación (puntos 3 y 4 de la Figura 2). La traducción del genoma del VHC depende de IRES y se desarrolla en áreas cercanas al retículo endoplásmico (RE) rugoso (punto 5, Figura 2). El IRES se une a la subunidad ribosomal 40S, este complejo luego recluta el factor de iniciación eucariótico eIF3 y al complejo Met-tRNA-eIF2-GTP formando el complejo activo 80S. Iniciada la traducción del genoma viral se produce una poliproteína que es luego clivada originando las 10 proteínas virales.

Como se muestra en el punto 6 de la Figura 2, la replicación del ARN del virus ocurre en asociación con membranas citoplasmáticas alteradas, debe formarse un complejo replicativo compuesto por proteínas virales y ARN viral asociadas a membranas intercelulares alteradas y diversos factores celulares.

La formación de vesículas membranosas que se acumulan constituyen una red membranosa que es inducida por NS4B, probablemente en forma sinérgica con NS5A, la cual interactúa con factores celulares como la proteína VAP-A (*Vesicle-associated membrane protein-Associated Protein*) y su isoforma VAP-B, así como de la proteína

FBL2 (*F Box multiple rich Leucine domains*) cuya prenilación es requerida para la replicación viral. VAP es una proteína localizada en RE/Golgi involucrada en el tráfico intracelular de vesículas, e implicada en direccionar a las proteínas no estructurales virales hacia membranas ricas en colesterol, donde ocurre la replicación del VHC. La participación de FBL2 está relacionada con el metabolismo lipídico celular habiéndose observado que dicho proceso modula la replicación viral, al permitir la interacción de FBL2 con NS5A, complejo que es indispensable para la replicación del genoma del VHC. NS5B en cooperación con proteínas virales como NS3/4A y NS5A y factores celulares se une al extremo 3' de la cadena (+) de ARN para iniciar la síntesis de *nov*o. Las cadenas (-) de ARN generadas sirven de templado para la producción de cadenas (+). Estos ARNs con polaridad del mensajero, pueden ser luego utilizados para la traducción, en una nueva ronda de replicación o ser empaquetados en partículas virales.

La formación de las partículas virales puede ser iniciada por la interacción de la proteína core con el genoma de ARN. La encapsidación genómica ocurre en el RE. Probablemente las nucleocápsides virales adquieren su envoltura por brotación a través de las membranas del RE y del cis-golgi donde maduran. Los viriones son liberados por exocitosis a través de la vía secretoria desde la célula al espacio pericelular (punto 8, Figura 2).

3.3 Vías de transmisión del virus.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (World Health Organization, 2017), las prácticas inseguras de atención en la salud (incluidas las inyecciones inseguras) y el uso de drogas inyectables siguen siendo las principales formas de transmisión de la enfermedad. La región del Mediterráneo Oriental (62,5 por 100.000) y la Región de Europa (61,8 por 100.000) son las áreas con más altas tasas de infección. En la región del Mediterráneo Oriental, la causa más común es a través de las inyecciones inseguras en la salud (Khan *et al.*, 2000; Mohsen *et al.*, 2015). En la región Europa, el uso de drogas inyectables representa una proporción sustancial de las nuevas infecciones (Mitruka *et al.*, 2015). En Estados Unidos luego de muchos años de disminución, la incidencia de la infección por VHC se duplicó entre los años 2010 y

2014 debido al uso de drogas inyectables (Buckley and Strom, 2016). El número de casos notificados de hepatitis C aguda entre las personas que informaron el uso de drogas inyectables aumentó, especialmente en las zonas rurales (Suryaprasad *et al.*, 2014; Zibbell *et al.*, 2015).

El riesgo de transmisión del VHC de una madre embarazada a su hijo es de 4-8% y de 10,8-25% si la mujer está coinfectada por el VIH (Reyes *et al.*, 2016). La infección por transmisión sexual ocurre con poca frecuencia en las parejas heterosexuales, monógamas pero es más común en las personas infectadas por VIH (World Health Organization, 2017). El uso de drogas intranasales con dispositivos de inhalación compartidos, otros modos de transmisión sanguínea como la punción accidental en trabajadores de la salud, procedimientos cosméticos no seguros (tatuajes, piercings) y circuncisión son otras vías descritas de transmisión.

3.4 Genotipos virales y prevalencia de la hepatitis C

El VHC es un virus fundamentalmente hepatotropo aunque puede infectar otras células como son los monocitos, linfocitos y células secretoras (Shimizu *et al.*, 1996; Arrieta *et al.*, 2001; Caussin-Schwemling, Schmitt and Stoll-Keller, 2001; Wong *et al.*, 2001). Se conforma de 7 genotipos y por lo menos 67 subtipos (Smith *et al.*, 2014). Como se observa en la Figura 3, a nivel mundial la prevalencia de estos genotipos y subtipos es geográficamente diferente (Gower *et al.*, 2014; Messina *et al.*, 2015). Actualmente, según los principales genotipos virales: el genotipo 1 es el más frecuente, seguido por el genotipo 3, genotipo 2 y por último el 4 (Li y Lo, 2015). Sin embargo, entre el 1 y el 4% de los pacientes presentan más de un genotipo (Strader *et al.*, 2004).

Introducción

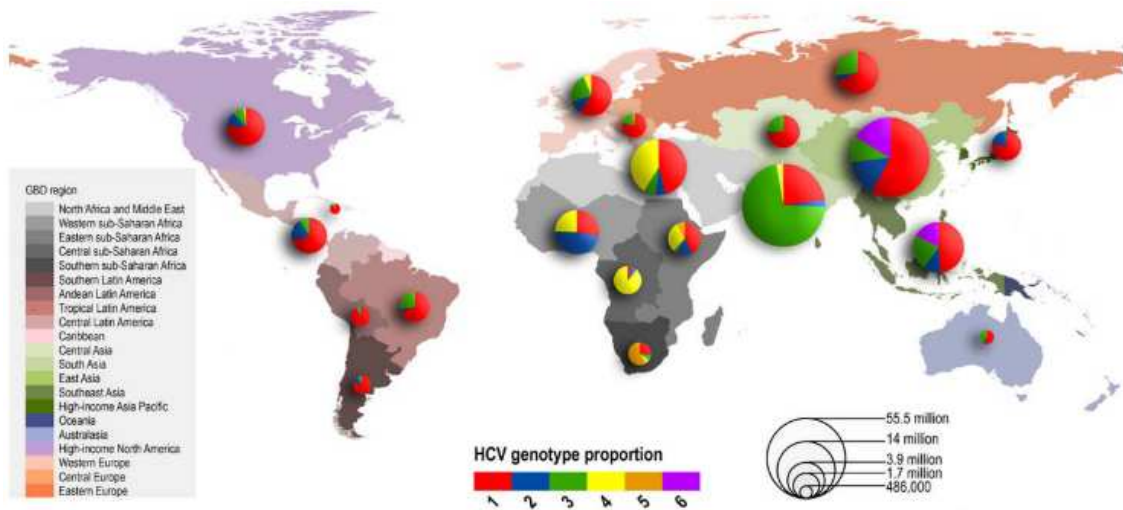


Figura 3: Prevalencia relativa de los genotipos del VHC 1, 2, 3, 4,5, y 6 por región GBD. El tamaño de los gráficos circulares es proporcional al número de casos seroprevalentes según lo estimado por (Mohd Hanafiah *et al.*, 2013). Tomado de (Messina *et al.*, 2015)

Según la OMS, el 3% de la población mundial, aproximadamente 170 millones de personas, pueden presentar infección crónica por el VHC, estando la gran mayoría de ellos asintomáticos hasta etapas avanzadas de la enfermedad (World Health Organization, 2018). En su último informe mundial de hepatitis notificaron que en el año 2015 hubo 1.75 millones de nuevas infecciones por este virus. (World Health Organization, 2017).

En países de Latino América como Argentina, Brasil, México, Perú y Venezuela se han realizado estudios epidemiológicos de la enfermedad y como observamos en la Figura 4 podemos observar la prevalencia de la enfermedad y los diferentes genotipos virales.

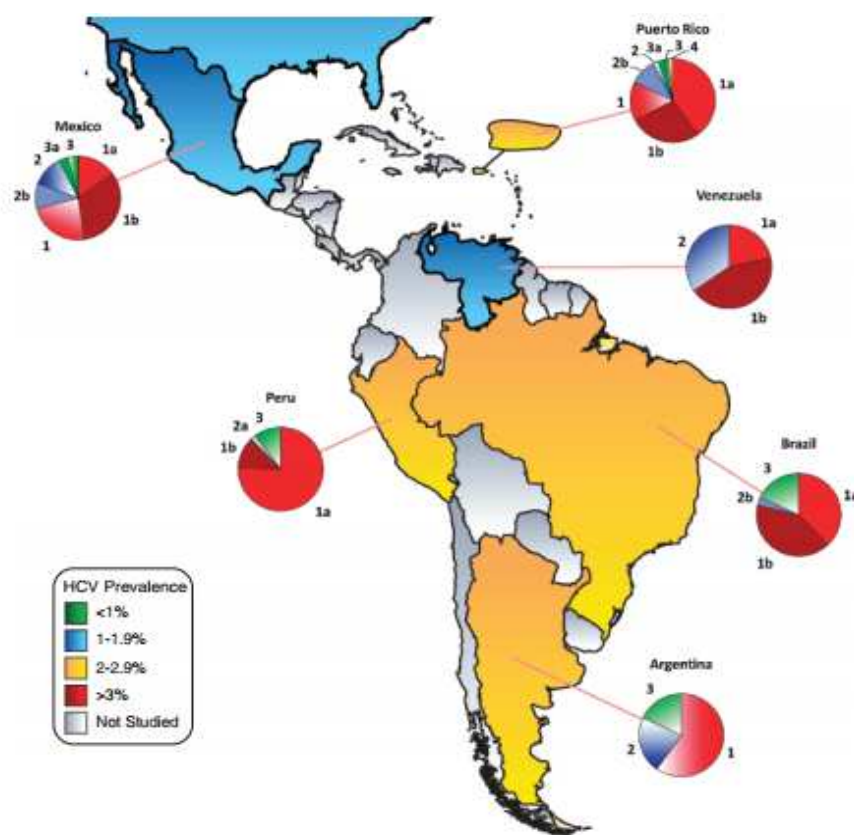


Figura 4: Prevalencia de hepatitis C y distribución de genotipos y subtipos en diferentes países de Latino América. Tomada de (Kershenovich *et al.*, 2011)

En nuestro país no existe un conocimiento epidemiológico real de esta afección, ya que el reporte del Ministerio de Salud Pública (MSP) lo incluye junto a la hepatitis B y otras (Ministerio de Salud Pública, 2010). Además si bien es una enfermedad de notificación obligatoria al MSP, existe poca adherencia médica a realizar dicha notificación.

En un trabajo realizado por Szabo y colaboradores (Szabo *et al.*, 2012) se estimó que la prevalencia de la hepatitis C en el Uruguay estaría entre 1-2%, aproximadamente 52000 individuos. Los autores para establecer la prevalencia, extrapolaron los datos de estimaciones de la enfermedad en donantes de sangre, más los datos de prevalencia que existen en población general de países como Argentina, Brasil y México.

3.5 Historia natural de la enfermedad

La infección por el VHC puede dar lugar a distintos cuadros clínicos según se trate de una infección aguda o crónica.

3.5.1 Hepatitis aguda

Luego de la exposición con el virus se inicia un periodo de incubación que oscila entre las 2 y 24 semanas. Al tratarse de una enfermedad asintomática, sólo el 20-30% de los infectados desarrollará una hepatitis aguda sintomática presentando ictericia y aumento de la transaminasa hepática TGP ó ALT (alanina amino transferasa). Un estudio reciente ha demostrado que el 52% de los casos de hepatitis aguda sintomática por VHC se resolvieron espontáneamente, circunstancia que no se produjo en los casos asintomáticos (Gerlach *et al.*, 2003).

En la hepatitis aguda por el VHC clínicamente manifiesta se distinguen cuatro períodos: incubación, pródromos, estado y convalecencia:

-*Período de incubación*: es el intervalo entre la exposición al virus y la aparición de los primeros síntomas. Es variable y oscila entre las 2 y 12 semanas, con una mediana de 7 semanas, acortándose cuanto mayor sea la cantidad de viriones del inóculo.

-*Período prodrómico*: comprende el tiempo en el cual el paciente presenta síntomas antes de la aparición de ictericia. Su duración es variable o puede no estar presente.

-*Fase de estado*: periodo en el que el paciente comienza con síntomas. La ictericia aparece en no más del 20-25% de los casos y es de intensidad y duración variables, oscilando desde una leve coloración amarillenta de escleróticas hasta un intenso color amarillo verdoso de piel y mucosas, acompañado de orinas colúricas y heces hipocólicas.

-*Periodo de convalecencia*: disminuye de forma gradual la ictericia, se recupera el apetito y se normaliza el color de la orina y de las heces.

El diagnóstico de hepatitis aguda suele establecerse por criterios clínicos y analíticos. No existen tests diagnósticos capaces de distinguir entre infección aguda o exacerbación aguda de hepatitis crónica C.

Entre la primera y la segunda semana de la exposición al virus es posible detectarlo en suero, mientras existe replicación (durante unas semanas en los casos de hepatitis autolimitada e indefinidamente en los casos de evolución a la cronicidad). El virus se detecta mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR), siendo el primer marcador de infección (Hino *et al.*, 1994).

La persistencia de un resultado positivo durante más de 6 meses tras la manifestación clínica debe inducir una fuerte sospecha de evolución a la cronicidad (Hoofnagle, 2002). Tras la infección aguda, sólo una pequeña proporción de sujetos, alrededor del 15-20%, consigue eliminar el virus y, por tanto, curar la infección aunque en estudios transversales la tasa de curación espontánea es más alta, alrededor del 45-50% (Shakil *et al.*, 1995; Wiese *et al.*, 2000) por lo que la tasa de recuperación espontánea de la infección aguda por el VHC puede establecerse entre el 15% y el 45%. El periodo de tiempo en que se considera que la infección se hace crónica se ha establecido tradicionalmente en 6 meses, aunque excepcionalmente la curación puede producirse hasta 1 año después del contacto inicial. El paso o no a la cronicidad depende de la interacción de múltiples factores inherentes tanto al propio virus (variabilidad genética y carga viral), al huésped (predisposiciones genéticas, edad, sexo, el estado inmunológico), así como factores externos (consumo de alcohol, tabaco y contaminantes ambientales) (Gordon *et al.*, 1993; Benhamou *et al.*, 1999; Berenguer *et al.*, 2000; Alberti and Benvegnu, 2003).

3.5.2 Hepatitis crónica

Se define como una enfermedad inflamatoria crónica del hígado de más de 6 meses de duración cuyo sustrato morfológico se caracteriza por la asociación de fenómenos inflamatorios, necrosis celular y, en muchos casos, fibrosis.

La mayoría de los pacientes con hepatitis C crónica se encuentran asintomáticos o con pocos síntomas. Entre los más comunes se encuentra la fatiga, cuya intensidad no se relaciona en forma necesaria con la gravedad de la enfermedad hepática subyacente, dolor en el cuadrante superior derecho del abdomen, dispepsia y náuseas. Se detecta

positividad en la determinación de ARN del VHC en sangre, como expresión de la replicación del virus en el hígado.

La hepatitis C crónica puede evolucionar a una cirrosis e incluso a un carcinoma hepatocelular (CHC) (Hoofnagle, 2002). Se ha establecido que el 50 a 85% de los sujetos que sufren una infección por el VHC desarrollarán la fase crónica de la misma y de éstos, el 20% desarrollaran una cirrosis hepática a los 30 años de la infección. La tasa de riesgo de desarrollar un hepatocarcinoma una vez establecida la cirrosis es del 3% anual (Hoofnagle, 2002).

3.6 Respuesta Viral y Tratamiento de la Hepatitis C en nuestro país.

3.6.1 Tipos de respuesta viral

Respuesta virológica precoz (RVP): negativización del ARN del VHC o descenso de al menos $\geq 2\log_{10}$ respecto al basal en la semana 12 de tratamiento.

Respuesta virológica rápida: negativización del ARN del VHC en la semana 4 del tratamiento.

Respuesta virológica lenta: ARN del VHC positivo en la semana 4 y 12, y negativo en la semana 24.

Fracaso virológico primario: si el ARN del VHC no experimenta un descenso $\geq 2\log_{10}$ en la semana 12 de tratamiento o si es detectable a cualquier concentración en la semana 24 de tratamiento.

Respuesta virológica sostenida (RVS): negativización del ARN del VHC en sangre periférica 6 meses (24 semanas) después de concluir el tratamiento.

Respuesta bioquímica sostenida: persistencia de transaminasas normales 6 meses después de finalizado el tratamiento.

Recidiva virológica: Viremia indetectable durante el tratamiento, y reaparición antes de transcurridas 24 semanas de finalizado el mismo.

Recaída durante el tratamiento (Breakthrough): reaparición de viremia detectable antes de finalizar el tratamiento tras su negativización en algún momento del mismo.

Cabe señalar que estos criterios son aplicables en su totalidad a los genotipos 1 y 4 que deben recibir tratamiento durante 48 semanas. Los genotipos 2 y 3 se tratan durante 24 semanas y no está establecido por las guías clínicas que se deban realizar controles de viremia durante el tratamiento, ya que prácticamente todos los enfermos con estos genotipos la negativizan. Sí son de aplicación los criterios de respuesta virológica sostenida o de recidiva.

3.6.2 Protocolo terapéutico actual.

La infección por el VHC genera una importante morbi-mortalidad a largo plazo, siendo la primera causa de trasplante hepático en Europa y Estados Unidos (Hoofnagle, 2002). Estos hechos determinan la necesidad de unas opciones terapéuticas eficaces que controlen, e incluso prevengan, esta infección.

El objetivo del tratamiento antiviral en la hepatitis C crónica es conseguir la erradicación de la infección en las primeras fases de la enfermedad mediante la desaparición de la viremia, con el fin de prevenir las complicaciones de la infección por el VHC, es decir, el desarrollo de cirrosis hepática y de carcinoma hepatocelular.

En nuestro país el Fondo Nacional de Recursos (FNR) es quién plantea las pautas del tratamiento para la hepatitis C (casos agudos o crónicos), aprueba y realiza la financiación de las drogas a suministrar. El tratamiento se basa en la combinación de Interferón Pegylado (IFN-Peg) y Ribavirina (RBV), quienes inducen una importante inhibición de la replicación viral, impiden la infección de nuevas células y estimulan la respuesta inmune celular (Manns *et al.*, 2001; McHutchison *et al.*, 2002; Hadziyannis *et al.*, 2004; Sánchez–Tapias *et al.*, 2006).

Existen distintos factores que se asocian a una mayor probabilidad de respuesta para el tratamiento con estos fármacos, entre los que se incluyen los genotipos 2 y 3, una carga viral baja, un bajo grado de inflamación y fibrosis en la biopsia hepática, y un bajo índice de masa corporal (McHutchison *et al.*, 2000; Poynard *et al.*, 2000; Bressler *et al.*, 2003; Hadziyannis *et al.*, 2004; Zeuzem *et al.*, 2004).

En pacientes con VHC genotipo 1, se ha señalado que el tratamiento con 180µg de IFN-Peg alfa 2a y RBV a dosis máximas (1.000-1.200 mg/día ajustada al peso) durante 48 semanas consigue una RVS del 52%, tasa que disminuye si se disminuye el tiempo o la dosis de RBV (Hadziyannis *et al.*, 2004; Witthöft *et al.*, 2007).

El tratamiento debe interrumpirse si la viremia no ha disminuido $\geq 2\log_{10}$ en la semana 12 o si logrado este objetivo, no es indetectable en la semana 24 (Strader *et al.*, 2004). El genotipo 4 precisa también tratamiento durante 48 semanas y a dosis máximas, ajustadas al peso, de RBV para alcanzar una RVS del 79% (Hadziyannis *et al.*, 2004).

Los pacientes con genotipos 2 y 3 tratados con 180 µg de IFN-Peg alfa 2a y 800mg de RBV durante 24 semanas presentan una RVS del 82%. El 10-14% de los sujetos tratados con IFN-Peg y RBV desarrollaran efectos secundarios que hacen necesaria la interrupción del tratamiento según los distintos ensayos clínicos.

Sin embargo, a pesar de todas las guías terapéuticas anteriormente citadas, los pacientes no responden de la misma manera a los tratamientos o padecen efectos secundarios muy severos que llevan al abandono de los mismos. Se ha planteado que una solución a este problema estaría íntimamente relacionada con ciertos polimorfismos en genes claves como veremos a continuación.

3.7 Importancia de la genética del huésped.

En los últimos años se está viendo que además de los factores anteriormente expuestos en relación con la respuesta al tratamiento existen polimorfismos íntimamente asociados con el mismo. Este es el caso de los polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) encontrados en el gen de la Interleucina 28b (IL28B).

La familia de interferones lambda (IFN-λ) formada por IFN- λ1 y el INF- λ2 (codificados respectivamente por los genes IL29 e IL28A) y el IFN- λ3 (codificado por el gen IL28B) son potentes citosinas antivirales endógenas que, al igual que el IFN tipo 1 inhiben o controlan la replicación del VHC a través de la vía del Jak/STAT (Balagopal *et al.*, 2010).

Se han identificado en estudios de asociación del genoma completo (GWAS) SNPs asociados significativamente con la región genética codificada por la IL28B, los cuáles influyen fuertemente en el resultado al tratamiento (Ge *et al.*, 2009; Suppiah *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2009; Rauch *et al.*, 2010) y en la resolución espontánea de la enfermedad (Thomas *et al.*, 2009).

Concretamente, los SNPs candidatos son el rs12979860 y rs809917, que se encuentran en el cromosoma 19, separados por 4.378 bases y en fuerte desequilibrio de ligamiento como se observa en la Figura 5.

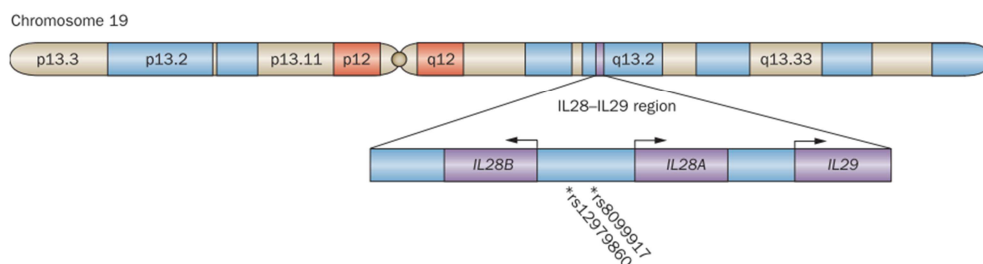


Figura 5: Esquema del cromosoma 19 y la región donde se encuentra la IL28-IL29 y los SNPs. Tomado de (Hayes *et al.*, 2012)

Ge y colaboradores (Ge *et al.*, 2009) realizaron un GWAS con pacientes diagnosticados con hepatitis C que recibieron tratamiento combinado de IFN-Peg y RBV durante 48 semanas, encontrando que en el SNP rs12979860 (C/T) el alelo C (mayoritario) presentaba el doble de posibilidades de presentar una RVS que aquellos que poseían el alelo T ó minoritario.

Paralelamente al estudio de Ge y colaboradores, en otro estudio de GWAS se encontró también que, el SNP rs809917 (G/T) fue el que mejor se asoció con la respuesta al tratamiento. En particular algunos autores encontraron en poblaciones con hepatitis C que el alelo T (mayoritario) presentó una mayor frecuencia de aclaramiento viral espontáneo. Además, en la población que recibió el tratamiento con IFN-Peg y RBV, se observó que quienes presentaban el genotipo GG ó GT tenían una mayor tasa de falla al tratamiento (Suppiah *et al.*, 2009; Rauch *et al.*, 2010).

En definitiva, los estudios realizados en GWAS han demostrado que existe cierta asociación entre los genotipos de estos SNPs y la respuesta al tratamiento que

tendrán los pacientes con hepatitis C. En países desarrollados ya se han llevado a cabo los estudios poblacionales con estos SNPs, lo que ha permitido utilizarlos como herramienta para definir el tratamiento.

Al comienzo de esta tesis, no existían trabajos publicados con estos SNPs en población uruguaya. Por lo cuál, uno de los objetivos de este trabajo fue analizar estos SNPs para ver si es posible, como sucede en otros países, influir en la toma de decisión del médico clínico para establecer el tipo de tratamiento.

4 Hipótesis y Objetivos generales

4.1 Hipótesis

Entre las muestras con y sin hepatitis C existen diferencias en las frecuencias alélicas de los SNPs (rs12979860 y rs809917) en el gen de la Interleucina-28B que se encuentran relacionados con la respuesta al tratamiento de la enfermedad.

4.2 Objetivos generales y específicos.

4.2.1 Objetivo General

Determinar las frecuencias alélicas de dos polimorfismos en el gen de IL28B, así como las características clínicas y epidemiológicas en una muestra con hepatitis C y controles sin la enfermedad.

4.2.2 Objetivos Específicos

- 1- Describir las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes con hepatitis C (grupos etarios, sexo)
- 2- Especificar qué tipo de presentación clínica de la enfermedad y genotipos virales tiene nuestra muestra.
- 3- Diseñar los cebadores y sondas Taqman® para los SNPs rs12979860 y rs8099917 que se encuentran en el gen de IL28B y poner a punto la técnica.
- 4- Genotipar los polimorfismos rs12979860 y rs8099917 en la población con hepatitis C y controles sin la enfermedad.
- 5- Relacionar los genotipos de los polimorfismos de IL28B con la respuesta virológica sostenida (6 meses luego de finalizado) en el grupo de pacientes tratados.

5 Materiales y Métodos

5.1 Población

La población estudiada consistió de dos grupos diferentes, una muestra de pacientes con hepatitis C y una muestra control sin la enfermedad a los efectos de realizar un análisis epidemiológico de casos-contrroles. La muestra con hepatitis C proviene de la Unidad Docente Asistencial (UDA) de Hepatología del Hospital Pasteur de Montevideo, Clínica Médica 2, Facultad de Medicina y la población sin hepatitis C proviene del Departamento de Hemoterapia del mismo hospital.

5.1.1 Pacientes con hepatitis C

Todos los pacientes con hepatitis C se atendieron en la Policlínica de Hepatología del Hospital Pasteur. Este Hospital es una institución de salud que pertenece a la red de hospitales de tercer nivel de ASSE. Cada individuo fue informado del estudio y firmó el consentimiento informado que previamente fue aprobado por los Comité de ética del Hospital Pasteur e Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).

Para este trabajo, fueron incluidos todos los pacientes derivados de diferentes servicios del Hospital y que pasaron a asistirse entre los años 2015-2017 en la Policlínica de Hepatología que funciona en el Hospital Pasteur – Servicio Facultad de Medicina (UdelaR) y Administración de los Servicios de Salud del Estado (ASSE). Los pacientes eran portadores de VHC confirmado, en su etapa aguda, crónica o cirrótica y que cumplían con los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión: Pacientes mayores de 18 años y menores de 60 años que demostraban adherencia al control médico y eventual tratamiento. La asignación de los pacientes al protocolo terapéutico se realizó siguiendo las normativas fijadas por el Fondo Nacional de Recursos (FNR).

Criterios de exclusión: Para el inicio de tratamiento se consideraron los criterios de exclusión pautados a nivel nacional por el FNR, a saber: pacientes con hepatopatía descompensada o hepatocarcinoma, drogo-dependencia, alcoholismo activo, enfermedad psiquiátrica severa, trasplantes de órganos a excepción de hígado o médula ósea, presencia de co-morbididades severas, mala calidad de vida y/o pobre expectativa de vida previa por otras situaciones, embarazo o falta de anticoncepción segura. No dar el consentimiento escrito para el ingreso al estudio.

5.1.2 Controles sin hepatitis C

La muestra sin hepatitis C provino del Departamento de Hemoterapia del Hospital Pasteur, donde asisten individuos voluntariamente a donar sangre. Antes de la extracción de la muestra, los médicos asistentes realizaron un exhaustivo cuestionario a cada donante, que incluye información sobre enfermedades crónicas o infecciosas y toma de cualquier medicamento. Además se controla presión arterial, talla y peso. Una vez realizada la extracción de sangre a cada individuo se le realizan pruebas de laboratorio para descartar enfermedades infecciosas dentro de las que se incluyen VIH y hepatitis A / B / C. De toda la muestra obtenida se seleccionaron aquellos individuos con $IMC \leq 25 \text{ Kg/m}^2$, a los efectos de evitar que la presencia de obesidad no actuara como variable confusora.

5.2 Análisis del ADN

5.2.1 Extracción del ADN

En el laboratorio del IIBCE se recibió la sangre de los pacientes diagnosticados con hepatitis C. A partir de esa muestra se realizó extracción de ADN genómico mediante el método Fenol-cloroformo (véase protocolo en el Anexo 1) a partir de 5 ml de sangre periférica. Luego se midió la concentración y pureza de ADN (absorbancia 260/280 nm y 260/230nm) con el espectrofotómetro UV/visible (NanodropTM 2000).

La población sin la enfermedad es parte de un proyecto anterior del laboratorio, por lo cual el ADN ya se encontraba extraído aunque aclaramos que se utilizó el mismo método que el descrito para los pacientes.

5.2.2 Diseño de cebadores y sondas Taqman®.

El diseño de cebadores y sondas específicas para la genotipificación de los SNPs rs809917 y rs12979860 en el gen de IL28B se realizó mediante la utilización del *Software* Beacon Designer™ 7. Este software permite mediante la observación de la secuencia determinar el cebador *forward* (F) y el *reverse* (R) que deben contener la secuencia en donde se encuentra el SNP. Una vez diseñados los cebadores el mismo software diseña la mejor sonda Taqman® para esa secuencia amplificada y en donde se encuentra el SNP. Algunos de los parámetros que utiliza el software para el diseño de cebadores y sondas son los siguientes:

- Criterio de TM (temperatura de *melting*): TM de cebadores alrededor de 58-60°C y TM de la sonda Taqman® 8-10°C mayor a la TM de los cebadores.
- Longitud de los cebadores: 15-30 pb
- Contenido de GC: alrededor de 30-80%
- Tamaño del amplicón: No debe exceder los 400pb (ideal 50-150 bases)

En la tabla 1 se muestran los cebadores y sondas Taqman® diseñadas para cada uno de los SNPs.

Tabla 1: Cebadores y Sondas Taqman® diseñadas en el software Beacon Designer™ 7.

Cebadores y Sondas (5'---3')	rs 12979860	rs 809917
Cebador <i>Forward</i>	TGCCTGTCGTGTACTGAACCA	GTTCTCCTTTTGTTC
Cebador <i>Reverse</i>	GAGCGCGGAGTGCAATTC	CCCACCTCAAATTATCCTA
Sondas	VIC-TCCCCGAAGGCGTGA-NFQ	VIC-TCTGTGAGCAATGTCACCCAAATT-NFQ
	FAM-CCCGAAGGCGCGA-NFQ	FAM-TCTGTGAGCAATTTCACCCAAATT-NFQ

VIC/FAM: Fluoroforos comerciales, NFQ: *Non fluorescence Quencher*.

5.2.3 Genotipificación de los SNP.

Todas las muestras fueron genotipificadas por duplicado mediante PCR en tiempo Real con el uso de sondas Taqman® (véase funcionamiento en el Anexo 2) y utilizando controles negativos en todos los experimentos. Se utilizó el equipo Rotor Gene 6000 con un software de análisis de las series 1.7 (Corbett Research, Division de Corbett Life Science) para la asignación de los diferentes genotipos de los SNPs.

La reacción de PCR para cada uno de los SNP analizados se llevó a cabo en un volumen final de 25µl conteniendo: 12.5µL de mix SensiFAST™ Probe No-ROX (Bioline®), 1 µL de cada uno de los cebadores, 0.2µl de cada una de las sondas, 9.1 µl de agua y 1µl de ADN a 100ng/µl. En el RotorGene 6000 se usó un programa de dos pasos: 1 ciclo de activación de la enzima a 95°C por 5 minutos y 40 ciclos a: 95°C 10 segundos (desnaturalización), 60°C (para el rs12979860), 58°C (para el rs809917) durante 40 segundos (annealing/extensión) y adquisición de fluorescencia en los canales verde (470nm/510nm, emisión y detección, respectivamente) y amarillo (530nm/555nm, emisión y detección, respectivamente).

5.2.4 Confirmación mediante secuenciación.

Para confirmar la amplificación del fragmento esperado se mandaron a secuenciar (Macrogen, Corea) 10 muestras al azar para cada SNP a partir de las corridas realizadas en el Real time PCR con el uso de sondas Taqman® contemplando la presencia de los tres genotipos posibles. Las mismas fueron alineadas con el programa MEGA 5.05.

5.3 Análisis estadístico:

Se utilizó el paquete estadístico SPSS v.10.0 (SPSS Inc. Chicago) para el análisis de las diferentes variables. Se realizó el test estadístico de Shapiro-Wilk para muestras de $N < 50$, para analizar la normalidad de las variables en estudio y por ende el tipo de análisis correcto a realizar (paramétrico o no paramétrico). Para las variables que presentaron distribución normal se realizó una prueba t de Student ó análisis de varianza (ANOVA) (para el caso de tres variables categóricas) y en aquellas que se rechazó la hipótesis de distribución normal se aplicó el test de Mann-Whitney ó el de Kruskal-Wallis (para 3 ó más grupos). Las variables cuantitativas (edad, Índice de masa corporal (IMC), logaritmo en base 10 de la carga viral (\log_{10} CV), aspartato amino transferasa (TGO), alanina amino transferasa (TGP) y ferritina fueron proporcionadas por los médicos tratantes y se miden en el laboratorio de análisis clínico del Hospital Pasteur. Las variables cuantitativas como el genotipo viral de cada paciente se realizan en laboratorios externos al hospital (según licitación) y la variable presentación de la enfermedad (hepatitis aguda, crónica o cirrosis) es determinada por los médicos tratantes según datos histológicos.

Para el análisis de variables categóricas se utilizó test de chi cuadrado con p corregido por Bonferroni. El cálculo de Odds Ratio (OR) se realizó con el programa Epi Info 7.

El análisis de los polimorfismos fue realizado con la herramienta online SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>). El estadístico sigue una distribución chi-cuadrado con grados de libertad igual al número de parámetros adicionales en el modelo más complejo y el menor valor de criterio de información Akaike (AIC) y bayesiano (BIC). Se consideró en todos los casos una diferencia estadística significativa con $p < 0.05$ y un intervalo de confianza (IC) del 95%.

6 Resultados

6.1 Características de la población con hepatitis C.

Un total de 22 pacientes (6 mujeres y 16 hombres) diagnosticados con hepatitis C fueron captados entre los años 2015 y 2017, se asistían en la Policlínica de hepatología del Hospital Pasteur. Las principales variables clínicas y epidemiológicas de esta muestra se observan en la Tabla 2.

Tabla 2: Variables clínicas y epidemiológicas de la población con hepatitis C.

Variables	Media	Desv. Tip.	Rango
Edad	40,11	12,14	19-66
IMC (Kg/m ²)	23,81	3,26	18,07-35,99
Log10 CV	6,41	1,03	5-8,4
TGO (U/l)	86,45	67,99	20-264
TGP (U/l)	114,68	91,642	16-362
Ferritina (ng/ml)	331,73	200,94	61-874

Desv. Típ: desvío estándar; IMC: Índice de masa corporal, Log10 CV: Logaritmo en base 10 de la carga viral; TGO: aspartato amino transferasa; TGP: alanina amino transferasa.

En nuestra muestra, según los genotipos virales, se encontró una alta frecuencia de individuos con Genotipo 1 y el resto con 3 (Figura 6 A). Dentro de los 14 pacientes con genotipo viral 1: 10 tenían subtipo 1a y 4 subtipo 1b y para el genotipo viral 3: 1 es subtipo 3a y en los otros 3 no se pudo establecer el subtipo.

Según la forma de presentación de la enfermedad (hepatitis aguda, crónica ó cirrosis), la mayoría de los individuos en nuestro trabajo presentaban un estado avanzado de la enfermedad, con un alto porcentaje en estadio de cirrosis hepática (Figura 6 B).

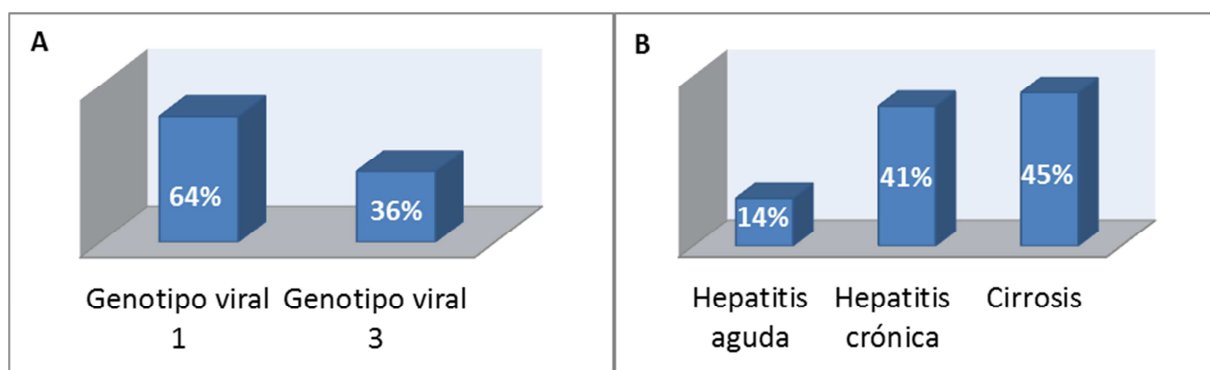


Figura 6: Gráficos de barra. A) Porcentaje (%) de individuos en la muestra con hepatitis C (N=22) según los genotipos virales encontrados. B) Porcentaje (%) de individuos en la muestra con hepatitis C (N=22) según la forma de presentación de la enfermedad.

En la tabla 3 se observa las mismas variables clínicas y epidemiológicas anteriores pero analizadas según la presentación de la enfermedad. De la prueba ANOVA, resultó que las variables IMC y LOG_{10} CV fueron estadísticamente significativas según esta clasificación y fueron graficadas (Figura 7).

Tabla 3: Variables clínicas y epidemiológicas según la presentación de la enfermedad.

Variables	Presentación de la enfermedad	Media \pm Desv. Típ.	p valor
Edad	Hepatitis Aguda	51 \pm 5,57	0,12
	Hepatitis Crónica	41,33 \pm 6,02	
	Cirrosis	45,30 \pm 7,66	
IMC (Kg/m ²)	Hepatitis Aguda	31,60 \pm 4,63	0,02*
	Hepatitis Crónica	23,13 \pm 3,08	
	Cirrosis	25,75 \pm 4,91	
Log_{10} CV	Hepatitis Aguda	2,70 \pm 2,08	0,00*
	Hepatitis Crónica	6,29 \pm 0,78	
	Cirrosis	6,51 \pm 1,24	
TGO (UI/l)	Hepatitis Aguda	46 \pm 22,51	0,38
	Hepatitis Crónica	78,22 \pm 77,19	
	Cirrosis	106 \pm 65,89	

Resultados

TGP (UI/l)	Hepatitis Aguda	80,67 ± 52,94	0,76
	Hepatitis Crónica	112,78 ± 86,20	
	Cirrosis	126,60 ± 108,73	
Ferritina (ng/ml)	Hepatitis Aguda	341,67 ± 139,16	0,06
	Hepatitis Crónica	212,78 ± 154,54	
	Cirrosis	435,80 ± 206,07	

Desv. Típ: desvío estándar; IMC: Índice de masa corporal, Log₁₀ CV antes: Logaritmo en base 10 de la carga viral antes del tratamiento; TGO: aspartato amino transferasa; TGP: alanina amino transferasa. **p* valor ≤ 0.05 por test ANOVA.

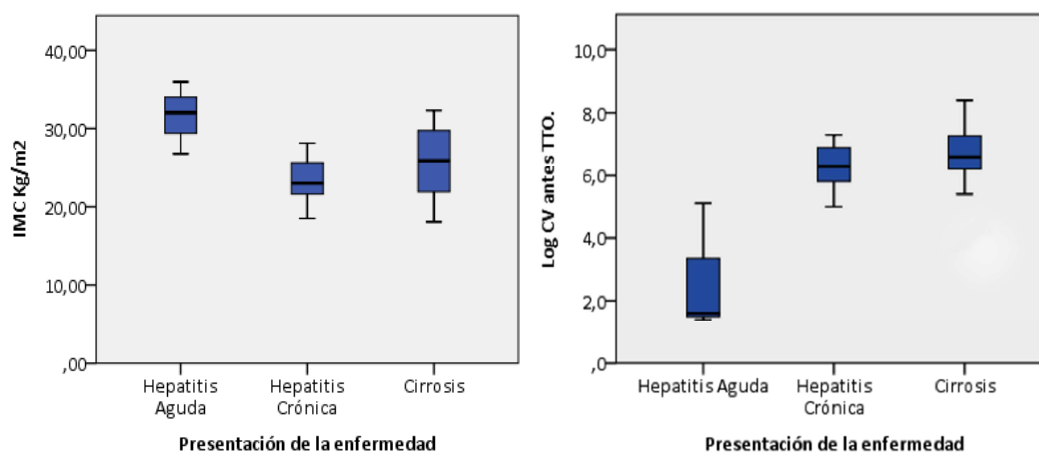


Figura 7: Diagrama de cajas de las medias y desvío estándar para las variables IMC (Kg/m²) y logaritmo en base 10 de la carga viral antes del tratamiento (Log CV antes del TGO) en función de la presentación de la enfermedad.

6.2 Genotipificación de los SNPs en casos y controles.

Luego de el diseño de los cebadores y sondas Taqman[®] para cada uno de los SNPs, además de la puesta a punto de la técnica, se realizó la genotipificación de los SNPs rs12979860 y rs809917 en los 22 pacientes con hepatitis C y 44 controles sin la enfermedad. Se secuenciaron de forma aleatoria, para cada uno de los SNPs, los productos amplificados de algunos individuos para confirmar los genotipos. En las

Resultados

figuras 8 y 9 se observa un cromatograma de una secuencia correspondiente a un heterocigoto y un ejemplo del alineamiento en el programa Mega, respectivamente.

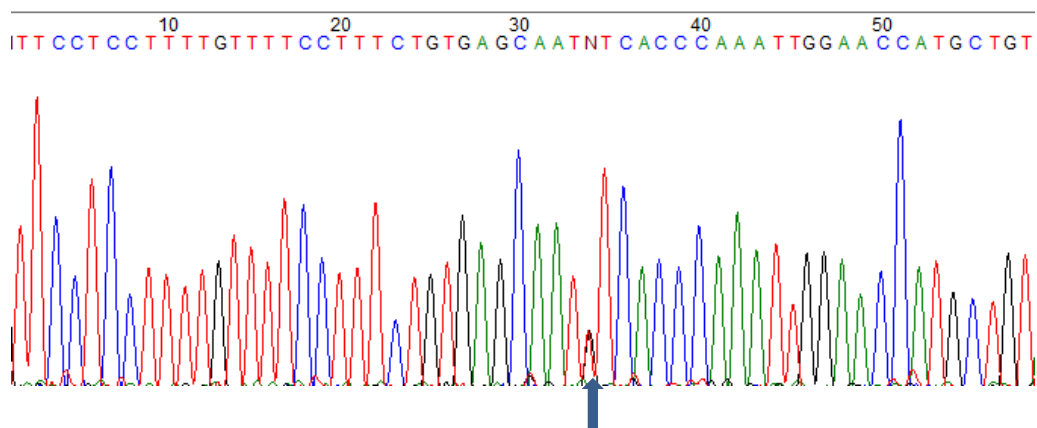


Figura 8: Porción de un cromatograma obtenido para cada muestra luego de la secuenciación. La flecha muestra que es un heterocigoto para el rs809917 T>G.

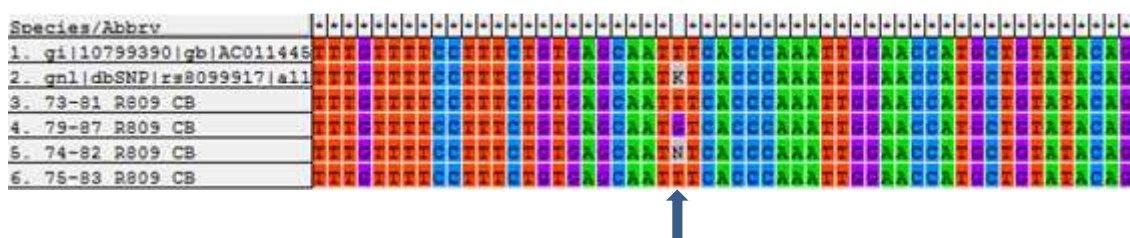


Figura 9: Alineamiento en el programa Mega entre el gen de IL28b (1), la secuencia del rs809917 (2) y las secuencias de cuatro pacientes (3,4,5 y 6). La flecha muestra el cambio del rs809917 T>G.

Como ya fue descripto en el grupo con hepatitis C, hay 6 mujeres y 16 hombres y en los controles 15 y 29, respectivamente. No existieron diferencias estadísticamente significativas en la variable sexo al aplicar el test chi cuadrado entre ambos grupos.

El mejor modelo de herencia elegido para cada uno de los SNPs según los resultados en el programa SNPStats son, para el rs12979860: modelo dominante C/C y C/T + T/T con un valor de AIC de 84,3, BIC de 88,7 y un p valor=0,05. Para el rs809917: modelo dominante T/T y G/T + G/G con un valor de AIC de 87,7, BIC de 92,1 y un p valor =0,6. Los genotipos se presentan bajo estos modelos, para cada uno de los SNP en las Figuras 10 y 11.

Resultados

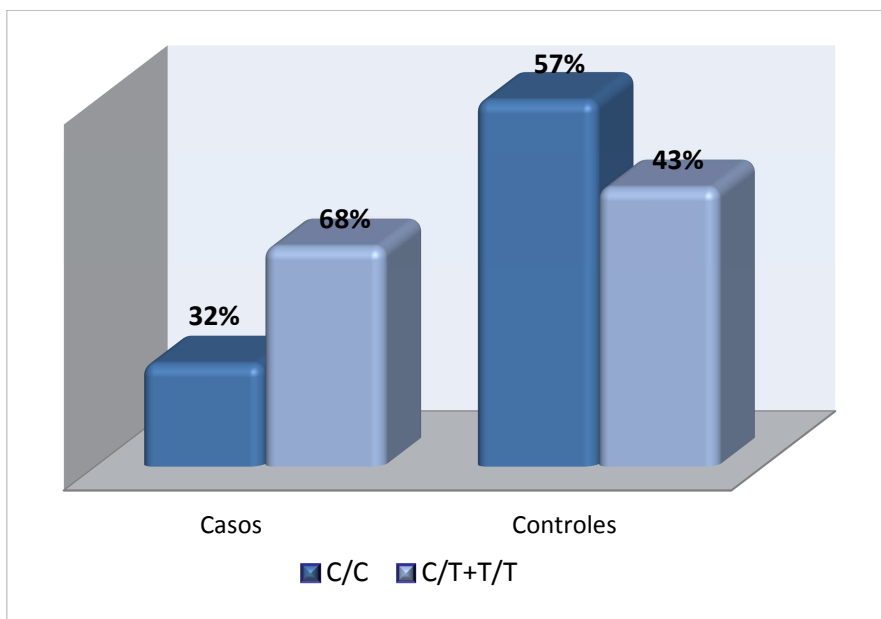


Figura 10: Porcentaje de genotipos agrupados en C/C y C/T + T/T para el rs12979860 en casos y controles.

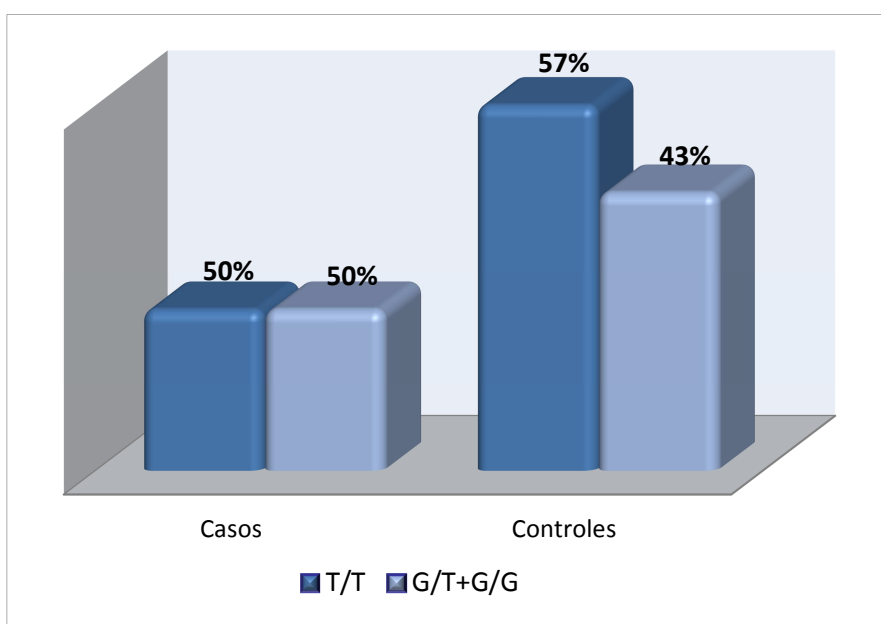


Figura 11: Porcentaje de genotipos agrupados en T/T y G/T + G/G para el rs809917 en casos y controles.

Las diferencias genotípicas entre casos y controles no presentaron diferencias significativas y se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=5.26$, 2GL, $p=0,45$). Al analizar las frecuencias alélicas de los SNPs entre casos y controles (Tabla 4) se

Resultados

observó que el alelo T del SNP rs12979860 presenta un Odds Ratio= 2,5 con un IC_{95%} de 1,16-5,37 y un *p* valor= 0,03.

Tabla 4: Frecuencias alélicas de los SNPs en los casos y controles

	Alelos	Casos	Controles
rs12979860	C	24 (55%)	66 (75%)
	T	20 (45%)	22 (25%)
rs809917	T	30 (68%)	67 (76%)
	G	14 (32%)	21 (24%)

6.3 Tratamiento

De los 22 pacientes con hepatitis C, 14 pacientes fueron los aceptados por el FNR para su tratamiento con INF-Peg y RBV por lo cual fue con los que se siguió trabajando.

Esta muestra se clasificó según el tratamiento, si se obtuvo RVS (responden) ó no se obtuvo RVS (no responden). Según esta clasificación, obtuvimos 9 pacientes (3 mujeres/6 hombres) que respondieron al tratamiento y 5 pacientes (1 mujer/4 hombres) que no respondieron al mismo. Se realizó la comparación de la relación de sexos en ambas muestras mediante un test de chi-cuadrado, no observándose diferencias significativas.

Las mismas características epidemiológicas y clínicas que veníamos trabajando, las analizamos según si respondían ó no al tratamiento como se muestra en la Tabla 5. Para ninguna de las variables se encuentra significancia estadística en el test de T ó U de Mann-Whitney, según corresponda.

Tabla 5: Características epidemiológicas y clínicas de la población tratada según la respuesta al tratamiento.

Variable	Respuesta al Tratamiento	media \pm Desv. tip.	p valor
Edad	Responde	44,11 \pm 7,62	ns ^(a)
	No responde	46 \pm 7,58	ns ^(a)
IMC (kg/m ²)	Responde	23,50 \pm 4,47	ns ^(a)
	No responde	24,55 \pm 5,14	ns ^(a)
TGO (UI/l)	Responde	79,67 \pm 76,00	ns ^(a)
	No responde	132,80 \pm 82,42	ns ^(a)
TGP (UI/l)	Responde	135,67 \pm 116,58	ns ^(a)
	No responde	148,80 \pm 80,90	ns ^(a)
Ferritina (ng/ml)	Responde	356,11 \pm 257,90	ns ^(a)
	No responde	351,40 \pm 169,23	ns ^(a)
Log ₁₀ CV	Responde	6,40 \pm 1,08	ns ^(a)
	No responde	6,90 \pm 0,34	ns ^(b)

IMC: Índice de masa corporal; TGO: aspartato amino transferasa; TGP: alanina amino transferasa; Log₁₀CV: Logaritmo en base 10 de la carga viral antes del tratamiento. ^(a): test de T-student; ^(b): Test U de Mann-Whitney.

La población tratada tiene una distribución de genotipos virales y de subtipos virales de genotipo 1 según se muestra en la Figura 12. De los 5 pacientes que no respondieron, 3 tenían genotipo viral 3 y 2 genotipo 1.

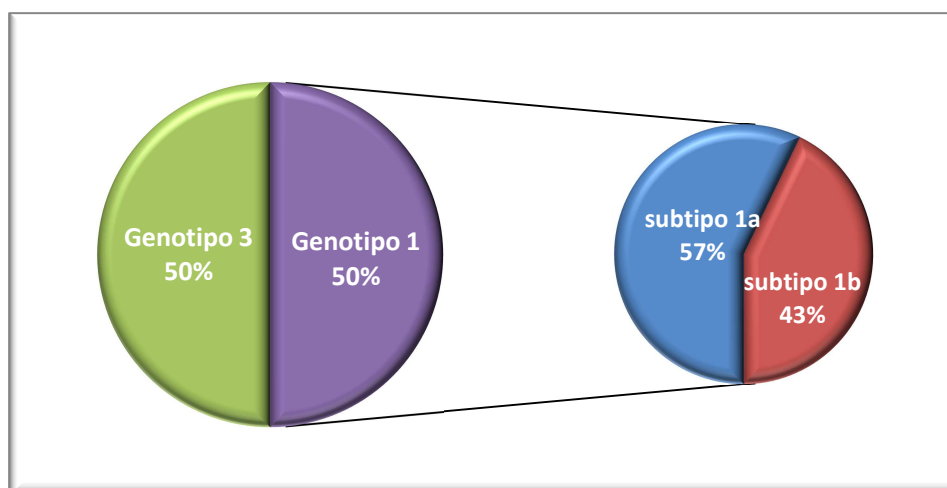


Figura 12: Distribución de los genotipos y subtipos virales del genotipo 1 encontrados en la población tratada.

Respecto a la presentación de la enfermedad en esta muestra tratada se encontró que en etapa de hepatitis aguda hay 1 paciente, 7 con hepatitis crónica y 6 se encontraban en estadio de cirrosis. Esta clasificación en función de la respuesta al tratamiento se observa en la tabla 6.

Tabla 6: Presentación de la enfermedad según la respuesta al tratamiento.

	Responden	No responden
Hepatitis aguda	1	0
Hepatitis crónica	6	1
Cirrosis	2	4

Para analizar la distribución genotípica, según los modelos de herencia dominante para cada SNP y entre el grupo de pacientes que responde y no responde al tratamiento, se realizó un test chi-cuadrado que no evidenció diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, así como tampoco, para los alelos de los SNPs y la respuesta al tratamiento como se observa en la Figura 13.

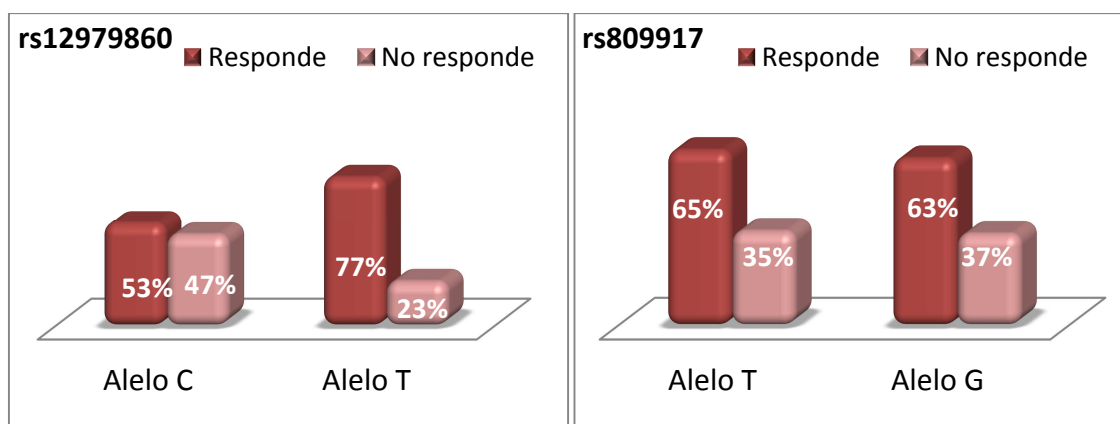


Figura 13: Gráficos de barras de la distribución de los alelos del rs12979860 y rs809917, según la respuesta o no al tratamiento. $p \geq 0,05$ en ambos casos.

En las Figuras 14 y 15 se muestran los genotipos encontrados para cada uno de los SNPs y la respuesta viral sostenida que tuvo o no el paciente al tratamiento con INF-Peg y RBV.

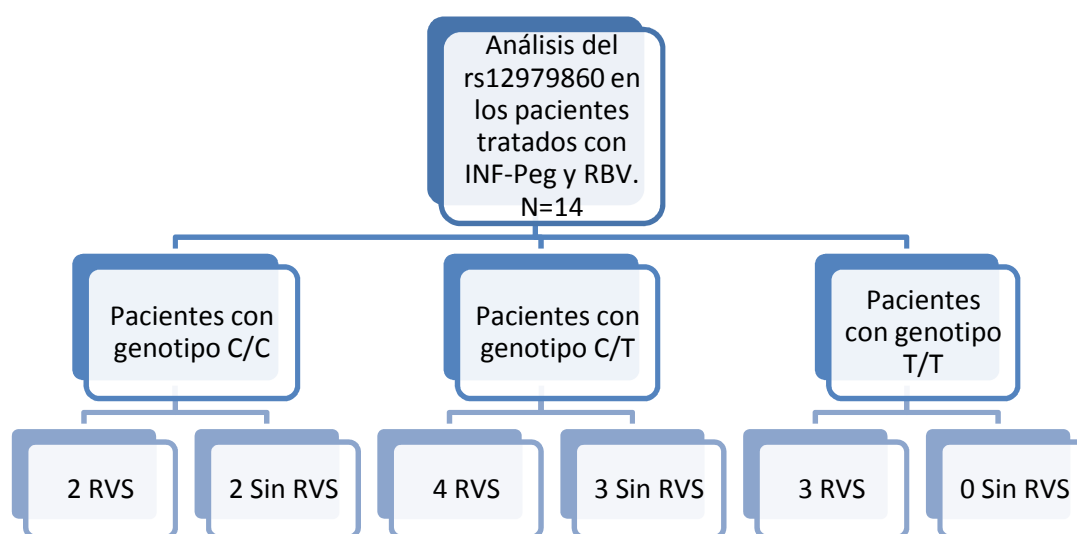


Figura 14: Organigrama de los genotipos encontrados para el rs12979860 según la respuesta viral sostenida (RVS) en la población tratada con INF-Peg y RBV.

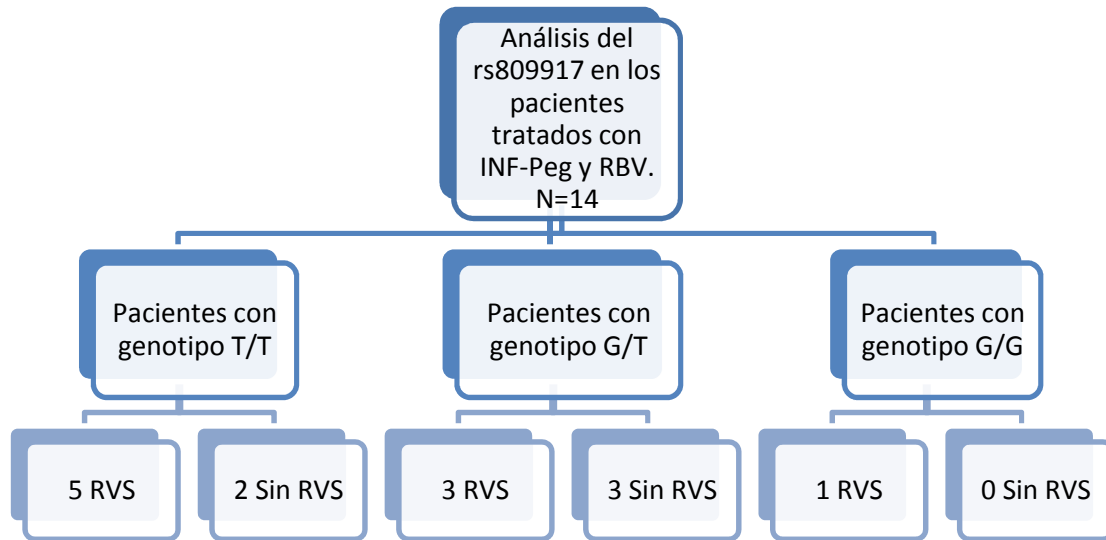


Figura 15: Organigrama de los genotipos encontrados para el rs809917 según la respuesta viral sostenida (RVS) en la población tratada con INF-Peg y RBV.

7 Discusión

La Hepatitis C es un importante problema de salud pública, ya que es una de las principales causas de enfermedad hepática crónica en el mundo. La progresión a la infección crónica ocurre en la mayoría de los individuos infectados por el VHC, lo que puede resultar en cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (Hoofnagle, 2002; Ghany *et al.*, 2009) causando que cada año mueran unas 399.000 personas debido a la enfermedad (World Health Organization, 2018). Es importante comprender los factores del huésped y del virus que pueden estar involucrados en el avance de la enfermedad, así como, el rol que puedan tener en la respuesta ó no a los fármacos suministrados.

7.1 Características de la población con hepatitis C

En este trabajo se captaron 22 pacientes con hepatitis C en el transcurso de los 3 años que duró el estudio. Al analizar este número de casos en relación al total de los pacientes asistidos en igual período de tiempo en la policlínica de Hepatología del Hospital Pasteur, encontramos que la Hepatitis C es la tercera causa etiológica de enfermedad hepática, por detrás de la patología alcohólica y la enfermedad de hígado graso no alcohólica (datos aportados por la Policlínica de hepatología del Hospital Pasteur).

No se han realizado aún en Uruguay estudios de la prevalencia de esta enfermedad. A esto se suma que las notificaciones anuales del Ministerio de Salud Pública (MSP) reportan de manera conjunta esta hepatitis con la hepatitis B y otras. A pesar de esto, pudimos contactarnos con el MSP y solicitamos información sobre los casos de hepatitis C notificados, obteniendo una respuesta favorable. Entre los años 2015 y 2017 se notificaron en todo el país 708 casos con hepatitis C, distribuidos según el sexo en 263 mujeres y 445 hombres (datos aportados por el Departamento de Vigilancia. División de Epidemiología del MSP). Con estos datos, podemos estimar que

en este trabajo para ese mismo periodo, captamos el 3.11% de todos los casos notificados del país, lo cuál resulta en un porcentaje bajo pero sabiendo que se trata de una muestra de una sola Policlínica del país.

En nuestra población con hepatitis C encontramos mayor proporción de hombres que de mujeres (16 vs 6, respectivamente), esta diferencia en el sexo existe en todos los trabajos en los que se trabaja con la enfermedad (Grebely *et al.*, 2015) y es coherente con el informe brindado por el MSP donde también fueron notificados en los tres años más hombres que mujeres (445 vs 263 ,respectivamente).

Respecto a la edad de la muestra con hepatitis C, presentó una media de presentación de la enfermedad de 40 años (rango de 19-66 años). Estos datos son similares a reportes internacionales. La prevalencia específica por edad de la infección por el VHC muestra un aumento progresivo con la edad superior a 35 años, con una prevalencia máxima entre los 55 y los 65 años (Mohd Hanafiah *et al.*, 2013). La edad, puede relacionarse pensando en cuando se adquirió la infección y el periodo de varios años en que la enfermedad es asintomática. Sobre este punto, se plantea que la vía de adquisición es sanguínea muy vinculada al uso de drogas intravenosas ó previo a la década del 1990 cuándo no se realizaban *screening* de hepatitis C en la sangre de los donantes (World Health Organization, 2016). Sabiendo que la enfermedad tiene un período de latencia de hasta 20 años hasta al momento del diagnóstico, nos hace plantear que esta población era adolescente y/o adulto joven al momento de la adquisición del virus.

Según la distribución de genotipos virales presentes en nuestra muestra con VHC encontramos que el 64% tenía genotipo 1 y el 36% genotipo 3. A nivel mundial el genotipo viral más común es el 1 (46%) seguido por el 3 (22%), luego el 2 y por último, el menos común, el genotipo 4 (Gower *et al.*, 2014). En particular, existen dos trabajos con población uruguaya y hepatitis C. Uno de Castells y colaboradores (Castells *et al.*, 2015) en el cuál en 153 pacientes infectados con VHC encontraron que un 74% de las muestras tenía genotipo 1 y un 26% genotipo 3. El otro trabajo, fue publicado recientemente y en 78 pacientes el 57,7% tenía genotipo 1 y el 15,4% genotipo 3 (Echeverría *et al.*, 2018). Observando estos datos, si bien el genotipo viral 1 es

mayoritario en este trabajo y en los dos comentados, en nuestro trabajo hay un alto porcentaje de genotipo 3 (36%) que no se encuentra globalmente (22%) ni tampoco al comparar con los trabajos realizados a nivel local (26% y 15,4%).

Analizando estas diferencias en los genotipos virales, creemos que puede deberse a que la población de este trabajo es de un N menor (22 pacientes) al de los otros trabajos a nivel local citados anteriormente o también a que fue tomada de un solo Hospital que abarca a cierta parte de la población.

La infección por el virus de la hepatitis C puede dar lugar a diferentes cuadros clínicos según se trate de una infección aguda, crónica ó en estado de cirrosis como fue detallado en la introducción. En nuestro estudio, más del 85% de la población se encontraba con hepatitis crónica ó cirrosis lo cual nos indica el estado avanzado de la enfermedad, lo que conlleva a un mayor daño a nivel hepático. Una de las razones por las cuales se da el avance de la enfermedad sin ser diagnosticada es que la infección por el VHC (como mencionamos anteriormente) es asintomática y los síntomas no se pueden utilizar como indicadores específicos de la infección (Li and Lo, 2015).

En nuestro trabajo, encontramos dos variables IMC y la carga viral que presentaron diferencias estadísticamente significativas según la presentación de la enfermedad, lo cual significa que son variables diferentes en alguna de las categorías de presentación de la enfermedad. Para el caso del IMC, se sabe que la obesidad es un factor de progresión a cirrosis sin importar el genotipo viral (Albillos Martínez *et al.*, 2017) y la esteatosis es más frecuente en pacientes con infección por VHC que en la población general (Asselah *et al.*, 2006; Leandro *et al.*, 2006; Machado and Cortez-pinto, 2009).

Para el caso de la carga viral, los pacientes que tienen hepatitis aguda presentan menores valores de carga viral (media \log_{10} de 2.70), mientras que los que presentan hepatitis crónica o cirrosis tienen valores mas altos (medias \log_{10} entre 6-6, 5 respectivamente).

7.2 Genotipificación de los SNPs en casos y controles.

El proyecto del genoma humano y el Hapmap sentaron las bases para la realización de estudios de GWAS en el cual se estudian asociaciones entre diferentes variantes genéticas y un fenotipo particular. De este tipo de estudios se desprenden diferentes variables significativas que luego es importante validar en un estudio poblacional. Desde el año 2009, diversos estudios de GWAS (Ge *et al.*, 2009; Suppiah *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2009) encontraron asociaciones genéticas entre las variantes de los SNP rs12979860 y 809917 ubicados en el gen de IL28B y la respuesta de los pacientes al tratamiento, en particular con el tratamiento con los fármacos INF-Peg y RBV. Si bien existen muchos trabajos a nivel mundial en los cuales, aún en día, se continúa trabajando con estos polimorfismos y la infección por hepatitis C, es importante resaltar que al momento de comenzar esta tesis no existían trabajos publicados en donde utilicen estos SNP en una población con hepatitis C. También es importante destacar que antes de ver la asociación que puede existir o no entre estos SNP y la respuesta al tratamiento con dichos fármacos, resulta interesante observar cual es la frecuencia que tienen los genotipos y alelos de cada uno en la población con hepatitis C y en los controles sin la infección.

En nuestro trabajo se realizó la genotipificación de la población con hepatitis C y los controles teniendo en cuenta una proporción en la cual hay el doble de controles que de casos. La genotipificación se realizó mediante PCR en tiempo real con el uso de sondas Taqman diseñadas por nosotros. Esta técnica es de muy alta sensibilidad y especificidad y permite, luego de haber puesto a punto la técnica, genotipificar muchas muestras a la vez y en forma rápida.

A nivel de los genotipos y según el modelo de herencia propuesto que fue el dominante para ambos SNPs no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las muestras para ninguno de los dos SNPs. A pesar de esto, si observamos la figura 10 donde se representan los porcentajes genotípicos según el modelo en el rs12979860 para casos y controles, observamos que el genotipo C/C es mayoritario en los controles (57% vs 32%) y los genotipos C/T+T/T es mayor en los

casos (68% vs 43%). Para el caso del rs809917 como se ve en la figura 11, el porcentaje de genotipo T/T es similar (50% vs 57%) entre casos y controles y lo mismo sucede con los genotipos G/T+G/G, 50% vs 43%.

Cuando analizamos las frecuencias alélicas de nuestras poblaciones como se observa en la tabla 4, solo en el caso del alelo T del SNP rs12979860 encontramos asociación estadísticamente significativa ($OR= 2,5$, $IC_{95\%}(1,16-5,37)$, $p=0,03$) entre casos y controles. En nuestro trabajo, como en el de Liermann y colaboradores (Liermann Garcia *et al.*, 2013) el alto porcentaje del alelo C (75%) que encontramos en los controles nos puede hablar de un posible rol protector de este alelo en la población no infectada. A su vez en pacientes con la enfermedad se observa que es el alelo favorable para la respuesta al tratamiento con INF-Peg y RBV como veremos más adelante. Igualmente, la alta proporción de alelo C es coherente ya que según la base de datos del NCBI para este SNP el alelo mayoritario es el C en muchas poblaciones analizadas (National Center for Biotechnology Information, 2018) y esto se ve reflejado ampliamente en nuestros resultados.

7.3 Tratamiento: factores del huésped y virales.

En Uruguay el tratamiento para la hepatitis C es aprobado y financiado por el Fondo Nacional de Recursos (FNR). Durante mucho tiempo y hasta el año 2016 los fármacos utilizados para el tratamiento eran INF-Peg y RBV. La normativa que fue realizada en el año 2005 y fue actualizada en una primera instancia en el año 2012, 2017 y su última versión con nuevos fármacos en el 2018 (Fondo Nacional de Recursos, 2012, 2018b). En esta última actualización en el protocolo de tratamiento se cambiaron los fármacos que se utilizaban comenzándose a tratar a los pacientes con antivirales directos como son el Sofosbuvir, Velpatasvir, Paritaprevir– Ritonavir y Ombitasvir. Este cambio de protocolo fue realizado en el último año de esta tesis, donde se comenzaron a utilizar estos fármacos dejando de lado el INF-Peg y RBV. Por tanto, de los 22 pacientes que fueron captados con hepatitis C contamos con 14 tratados con INF-Peg y RBV y sólo 2 con los antivirales directos que no analizaremos en

este trabajo. La cantidad de pacientes tratados representa un 13,1% de todos los tratados (N=122) en el mismo periodo de tiempo de esta tesis por el FNR según publica en su sitio de internet (Fondo Nacional de Recursos, 2018). Si bien, como dijimos anteriormente, la cantidad de pacientes con hepatitis C que obtuvimos en comparación con lo notificado por el MSP resultó en una muestra pequeña, si pudimos lograr captar un porcentaje alto de los pacientes que se trataron la infección en ese periodo de tiempo en todo el país.

Dentro de los pacientes tratados (N=14), 9 tuvieron una respuesta virológica sostenida, ó sea luego de 6 meses de concluir el tratamiento no se encontró ARN del VHC en sangre periférica. Es importante resaltar, que en la infección por hepatitis C uno de los parámetros más importantes a la hora de realizar la decisión del tratamiento se toma en base al estadio de fibrosis en el que se encuentra el hígado (Fondo Nacional de Recursos, 2012; Reyes *et al.*, 2016). Las diferencias en la velocidad de progresión de la fibrosis se atribuyen fundamentalmente a factores propios de la enfermedad como son los factores del huésped, factores ambientales o comorbilidades, y contrariamente a lo esperable, los factores del virus no jugarían un rol fundamental (Albillos Martínez *et al.*, 2017; Schuppan, Surabattula and Wang, 2018).

Los factores que pueden influir en el tratamiento contra la hepatitis C con estos fármacos (INF-Peg y RBV) los podemos dividir, como lo hacen la mayoría de los trabajos (Zhu and Chen, 2013; Gatselis *et al.*, 2014), en dos categorías: los factores del virus y los del huésped. En nuestro trabajo, como factores del huésped que pueden influir fueron analizadas las diferentes variables como se muestra en la tabla 5. Si bien es una muestra pequeña, ninguna de las variables presentó diferencias estadísticamente significativas pero encontramos una leve tendencia en donde algunas de las medias de los valores son más altos en el grupo de pacientes que no respondió al tratamiento como es el caso de las variables edad, índice de masa corporal (IMC) y las transaminasas hepáticas TGO y TGP.

En el caso de la variable edad, es uno de los factores del huésped que está relacionado, ya que a partir de los 40 años la posibilidad de la RVS disminuye (Mauss *et*

al., 2011). Además, la edad en cuando fue adquirida la infección predice la progresión de la fibrosis hepática, a menor edad al momento de la infección menor progresión (Reyes *et al.*, 2016).

Respecto al IMC, la obesidad genera mayor inflamación en muchas enfermedades hepáticas, la hepatitis C no es una excepción, y está relacionado con el aumento de la progresión de la fibrosis (Ortiz *et al.*, 2002). Además, al momento de comenzar el tratamiento un menor IMC del paciente se vio que está asociado con una mayor RVS sin importar el genotipo viral (Manns *et al.*, 2001; Fried *et al.*, 2002; Berg *et al.*, 2006; Shiffman *et al.*, 2007).

Las transaminasas hepáticas elevadas aumentan la inflamación y también se asocian a la progresión de la fibrosis pero los niveles normales de éstas no descartan que haya fibrosis o no (Mathurin *et al.*, 1998; Ghany *et al.*, 2003; Massard *et al.*, 2006).

Como factores propios del virus que pueden estar relacionados con el tratamiento está la carga viral al momento de comenzar el tratamiento y el genotipo del virus en la infección. Respecto a la carga viral, es uno de los requisitos al momento de presentar la solicitud al FNR y luego de 6 meses del tratamiento, según se indica en sus pautas (Fondo Nacional de Recursos, 2012). En nuestro trabajo las diferencias encontradas entre la población que responde y no responde son pequeñas pero, nuevamente la media de los valores es mayor en el grupo de los no respondedores.

El genotipo viral es un fuerte predictor de respuesta virológica sostenida en el tratamiento con INF-Peg y RBV, así como, cuando se usan los fármacos antivirales directos (Lavanchy, 2011; AEEH; SEIMC, 2017). Como ya vimos existe una distribución geográfica muy diferente de los genotipos virales y como se comentó anteriormente llama la atención la cantidad de genotipos virales tipo 3 que hay en nuestra población infectada. Para el caso de la población tratada, el 50% tenía genotipo 1 y el otro 50% genotipo 3 y dentro de los no respondedores al tratamiento: 3 tienen genotipo viral 3 y 2 genotipo viral 1. Las infecciones del VHC por el genotipo 3 no están descritas como las más difíciles de tratar, de hecho en las guías del FNR (Fondo Nacional de Recursos, 2012) se suministraban los fármacos durante 24 semanas y no 48 como era el caso para el tratamiento de infecciones con genotipo 1. Cuando se comenzó a utilizar estos

fármacos para el tratamiento, en general para el genotipo 1 la RVS era de un 50% mientras que para los otros genotipos se lograba hasta un 80% de RVS (Manns *et al.*, 2001).

Sin embargo, existen publicaciones (Kanwal *et al.*, 2014; Negro, 2014) que asocian al genotipo 3 con mayor progresión de la fibrosis hepática en comparación con el genotipo 1. Observando la tabla 6, si bien son muy pocos individuos, de los 5 pacientes que no respondieron al tratamiento, 4 de ellos se encontraban en una etapa muy avanzada de la enfermedad como es la cirrosis, por lo que, esto puede ser uno de los factores que explica la falla de este grupo al tratamiento realizado.

7.4 SNPs en el gen de IL28B y el tratamiento.

A nivel mundial cuando se comenzó a tratar a los pacientes con hepatitis C, con los fármacos INF-Peg y RBV, se comenzaron a estudiar cuales eran los factores que podrían estar implicados en la respuesta a la terapia antiviral. Uno de los principales factores del huésped y que en muchas poblaciones explicaban, en parte, esta respuesta fueron los SNPs rs1297860 (C/T) y rs809917 (G/T) en el gen de IL28B que codifica para el interferón lambda 3.

Como ya se comentó en la introducción, para el caso del rs12919860, el alelo C está asociado con el doble de posibilidades de tener una RVS y también con mayor probabilidad de una resolución espontánea (aclaramiento viral) de la hepatitis C aguda (Thomas *et al.* 2009; Patel *et al.* 2010; Ge *et al.* 2009). Para el rs 809917, el alelo T fue asociado como respondedor al tratamiento (Suppiah *et al.*, 2009; Rauch *et al.*, 2010). En ambos casos, estos son los alelos mayoritarios (más frecuentes) en todas las poblaciones analizadas en el NCBI (National Center for Biothechnology Information, 2018).

En este trabajo, no encontramos diferencias en nuestra población respecto a los genotipos y la respuesta al tratamiento, como tampoco entre la frecuencia de los alelos y la respuesta. Analizando ambos SNPs, encontramos que los pacientes que

tuvieron RVS para el caso del rs 12979860, el 22,2% tenía el genotipo favorable (C/C) y en el caso del rs 809917 el 55,6% tenía el genotipo favorable (T/T). Nuestros resultados son muy parecidos al trabajo publicado recientemente con una población uruguaya tratada con los mismos fármacos, en una muestra mayor (N=78) en donde tampoco encontraron asociación estadística de estos con la respuesta (Echeverría *et al.*, 2018).

Analizando lo que sucede por alelos, en el caso del rs12979860 vemos que el alelo C está presente en un porcentaje parecido (53% vs 47%) según si responde o no responde, respectivamente. Pero en el caso del alelo T, sorpresivamente el mayor porcentaje (77%) fueron pacientes respondedores al tratamiento. Respecto de los genotipos para el rs12979860, observando el organigrama de la figura 14, los únicos 3 pacientes con genotipo desfavorable T/T respondieron al tratamiento.

Todos estos datos genéticos en conjunto confirman que en la población infectada con VHC estudiada en este trabajo, los SNPs rs12979860 y rs809917 no están asociados con la respuesta al tratamiento con estos fármacos. Es importante resaltar que para realizar las pruebas estadísticas la muestra obtenida es pequeña y aún más cuándo trabajamos solo con la población tratada y a su vez esta es dividida en subgrupos según si responde o no al tratamiento.

Por otro lado, como ya fue comentado, la asociación estadística de estos SNPs, se ha visto en varios trabajos que utilizan poblaciones de diferentes etnias. En particular se conoce que existe poca eficacia en pacientes afroamericanos e hispanos (Yan *et al.*, 2008). Además, en un trabajo de Thomas y colaboradores (Thomas *et al.*, 2000) se observó que individuos caucásicos tenían 5 veces más probabilidades de recuperarse espontáneamente de una infección aguda por el VHC que pacientes afroamericanos.

La población uruguaya presenta un origen tríhibrido (europeo, africano, amerindio) con mayor proporción de origen caucásico pero con un alto grado de mezcla étnica (Hidalgo *et al.*, 2005) y un significativo aporte amerindio de origen materno (Bonilla *et al.*, 2004; Gascue *et al.*, 2005). Precisamente, la presencia de una gran mezcla étnica en nuestra población podría ser uno de los factores que generan variabilidad en los resultados de genotipificación encontrados.

8 Conclusiones

En este trabajo, además de analizar las características clínicas y epidemiológicas de una población con hepatitis C, se genotipificaron y analizaron los dos polimorfismos (rs12979860 y 809917) que a nivel internacional están más fuertemente asociados a la respuesta al tratamiento utilizando los fármacos INF-Peg y RBV.

Encontramos que en nuestra población infectada la mayoría de nuestros pacientes se encuentran en estadio de cirrosis. Este número elevado, refleja lo tardío que es el diagnóstico y supone para el paciente un pronóstico más ominoso y un mayor costo económico para los sistemas sanitarios ya que son pacientes que presentan mayores complicaciones y requieren hospitalización frecuente.

La distribución de los genotipos virales encontrados en esta tesis, en donde encontramos más pacientes infectados con el genotipo 3 de lo que se esperaba llama la atención. Incluso en la población tratada, encontramos más pacientes con genotipo viral 3 que no respondieron al tratamiento que con genotipo 1.

Respecto a los SNPs estudiados, si bien no encontramos asociación de estos con el tratamiento, resultó novedoso probar su posible uso con la respuesta al tratamiento, ya que existen pocos estudios de estos en el Uruguay y en el mundo se utilizan de forma rutinaria desde hace años como factores del huésped que pueden influir en la respuesta.

En conclusión, como factores del virus y huésped que pueden influenciar a la hora de implementar el tratamiento, el genotipo 3 y el estadio de fibrosis a nivel hepático son factores que parecerían que inciden en la población estudiada de este trabajo y que tiene repercusiones a la hora del tratamiento.

9 Perspectivas

Este trabajo fue realizado en un solo centro de salud de Montevideo, y si bien el número de pacientes captados que fueron tratados con los fármacos fue correcto sin dudas creemos que ampliar la muestra con pacientes de otros centros de salud e incluyendo el interior del país sería de un gran valor epidemiológico y estadístico.

Tipificar las muestras que se vayan tratando con los nuevos fármacos (antivirales directos), aprovechando la técnica molecular que se puso a punto para estos SNPs.

Analizar esta población mediante un panel de marcadores informativos de ancestralidad (AIMs) para estimar la ancestralidad de la población y asociarla con la enfermedad y su tratamiento.

Por último, dado que en este trabajo se encontró un número elevado de pacientes en estadio de cirrosis, lo que genera mayores complicaciones y probablemente menor tasa de respuesta al tratamiento; consideramos formar un equipo multidisciplinario para poder realizar un *screening* en la población general que permita realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad. A nivel internacional se han realizado en diversos centros asistenciales este tipo de *screening*, en particular en hombres y mujeres nacidos entre los años 1946-1964, generación llamada "*baby boomers*". Si bien genera un alto costo sanitario realizar este tipo de *screening*, el mismo es menos oneroso que tratar la enfermedad y sus complicaciones asociadas que se presentan por el avance silencioso de la misma.

10 Bibliografía

AEEH; SEIMC (2017) *Guías AEEH/SEIMC de manejo de la Hepatitis C*,
Www.Aeeh.Es.

Alberti, A. and Benvegnu, L. (2003) 'Management of hepatitis C', *Acta Biochimica Polonica*, 38(2), pp. S104–S118. doi: 10.1016/S.

Albillos Martínez, A. *et al.* (2017) *Consenso de recomendaciones para el diagnóstico precoz, la prevención y la atención clínica de la hepatitis C en Atención Primaria.*, AEEH.

Arrieta, J. J. *et al.* (2001) 'In situ detection of hepatitis C virus RNA in salivary glands.', *The American journal of pathology*. American Society for Investigative Pathology, 158(1), pp. 259–64. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63964-8.

Asselah, T. *et al.* (2006) 'Steatosis in chronic hepatitis C: Why does it really matter?', *Gut*, 55(1), pp. 123–130. doi: 10.1136/gut.2005.069757.

Balogopal, A. *et al.* (2010) 'IL28B and the Control of Hepatitis C Virus Infection', *Gastroenterology*, 139(6), pp. 1865–1876. doi: 10.1053/j.gastro.2010.10.004.IL28B.

Beloso, C. (2014) *Enfermedad de hígado graso no alcohólico: análisis del SNP -493 G/T en el gen PMTT mediante sondas Taqman®*.

Benhamou, Y. *et al.* (1999) 'Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients', *Hepatology*, 30(4), pp. 1054–1058. doi: 10.1002/hep.510300409.

Berenguer, M. *et al.* (2000) 'HCV-related fibrosis progression following liver transplantation: increase in recent years.', *Journal of hepatology*, 32(4), pp. 673–84.

Berg, T. *et al.* (2006) 'Extended Treatment Duration for Hepatitis C Virus Type 1: Comparing 48 Versus 72 Weeks of Peginterferon-Alfa-2a Plus Ribavirin', *Gastroenterology*, 130(4), pp. 1086–1097. doi: 10.1053/j.gastro.2006.02.015.

Bonilla, C. *et al.* (2004) 'Substantial Native American female contribution to the population of Tacuarembó, Uruguay, reveals past episodes of sex-biased gene flow', *American Journal of Human Biology*, 16(3), pp. 289–297. doi: 10.1002/ajhb.20025.

Bressler, B. *et al.* (2003) 'High body mass index is an independent risk factor for nonresponse to antiviral treatment in chronic hepatitis C', *Hepatology*, 38(3), pp. 639–644. doi: 10.1053/jhep.2003.50350.

Buckley, G. J. and Strom, B. L. (eds) (2016) *Eliminating the Public Health Problem of Hepatitis B and C in the United States*. Washington, D.C.: National Academies Press. doi: 10.17226/23407.

Castells, M. *et al.* (2015) 'Epidemic history of major genotypes of hepatitis C virus in Uruguay', *Infection, Genetics and Evolution*. Elsevier B.V., 32, pp. 231–238. doi: 10.1016/j.meegid.2015.03.021.

Caussin-Schwemling, C., Schmitt, C. and Stoll-Keller, F. (2001) 'Study of the infection of human blood derived monocyte/macrophages with hepatitis C virus in vitro.', *Journal of medical virology*, 65(1), pp. 14–22.

Echeverría, N. *et al.* (2018) 'IL28B gene polymorphism rs12979860, but not rs8099917, contributes to the occurrence of chronic HCV infection in Uruguayan patients', *Virology Journal*. Virology Journal, 15(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s12985-018-0946-2.

Fondo Nacional de Recursos (2012) 'TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS C CON INTERFERON PEGYLADO MÁS RIBAVIRINA', in *Fondo Nacional de Recursos, Uruguay*, pp. 1–18.

Fondo Nacional de Recursos (2018a) *Estadísticas e Informes.*, Fondo Nacional de Recursos. Available at: <http://www.fnr.gub.uy/estadisticas> (Accessed: 21 April 2019).

Fondo Nacional de Recursos (2018b) *Tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis c*. Available at: http://www.fnr.gub.uy/sites/default/files/normativas/medicamentos/n_trat_hepatitis_c.pdf.

Fried, M. W. *et al.* (2002) 'Peginterferon Alfa-2a plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C Virus Infection', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 347(13), pp. 975–982. doi: 10.1056/NEJMoa020047.

Gascue, C. *et al.* (2005) 'Frequencies of the four major Amerindian mtDNA haplogroups in the population of Montevideo, Uruguay.', *Human biology*, 77(6), pp. 873–8.

Gatselis, N. K. *et al.* (2014) 'Individualization of chronic hepatitis C treatment according to the host characteristics', *World Journal of Gastroenterology*, 20(11), pp. 2839–2853. doi: 10.3748/wjg.v20.i11.2839.

Ge, D. *et al.* (2009) 'Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-

induced viral clearance.', *Nature*. Nature Publishing Group, 461(7262), pp. 399–401. doi: 10.1038/nature08309.

Gerlach, J. T. *et al.* (2003) 'Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance.', *Gastroenterology*, 125(1), pp. 80–8.

Ghany, M. G. *et al.* (2003) 'Progression of fibrosis in chronic hepatitis C', *Gastroenterology*, 124(1), pp. 97–104. doi: 10.1053/gast.2003.50018.

Ghany, M. G. *et al.* (2009) 'Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: An update', *Hepatology*, 49(4), pp. 1335–1374. doi: 10.1002/hep.22759.

Gordon, S. C. *et al.* (1993) 'The pathology of hepatitis C as a function of mode of transmission: Blood transfusion vs. Intravenous drug use', *Hepatology*, 18(6), pp. 1338–1343. doi: 10.1002/hep.1840180609.

Gower, E. *et al.* (2014) 'Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection', *Journal of Hepatology*. European Association for the Study of the Liver, 61(1), pp. S45–S57. doi: 10.1016/j.jhep.2014.07.027.

Grebely, J. *et al.* (2015) 'The effects of female sex, viral genotype and IL28B genotype on spontaneous clearance of acute hepatitis C virus infection.', *Hepatology*, 59(1), pp. 109–120. doi: 10.1002/hep.26639.

Hadziyannis, S. J. *et al.* (2004) 'Peginterferon- α 2a and Ribavirin Combination Therapy in Chronic Hepatitis C', *Annals of Internal Medicine*. American College of Physicians, 140(5), p. 346. doi: 10.7326/0003-4819-140-5-200403020-00010.

Hayes, C. N. *et al.* (2012) 'Genetics of IL28B and HCV-response to infection and treatment', *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group, 9(7), pp. 406–417. doi: 10.1038/nrgastro.2012.101.

Hidalgo, P. C. *et al.* (2005) 'Genetic Admixture Estimate in the Uruguayan Population Based on the Loci LDLR , GYPA , HBG , GC and D7S8', *International Journal of Human Genetics*, 5(3), pp. 217–222.

Hino, K. *et al.* (1994) 'Clinical course of acute hepatitis C and changes in HCV markers', *Digestive Diseases and Sciences*. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 39(1), pp. 19–27. doi: 10.1007/BF02090055.

Hoofnagle, J. H. (2002) 'Course and outcome of hepatitis C', *Hepatology*, 36(5B), pp. s21–s29. doi: 10.1053/jhep.2002.36227.

Kanwal, F. *et al.* (2014) 'HCV genotype 3 is associated with an increased risk of

cirrhosis and hepatocellular cancer in a national sample of U.S. Veterans with HCV', *Hepatology*, 60(1), pp. 98–105. doi: 10.1002/hep.27095.

Kershenovich, D. *et al.* (2011) 'Trends and projections of hepatitis C virus epidemiology in Latin America', *Liver International*, 2, pp. 18–29. doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02538.x.

Khan, A. J. *et al.* (2000) 'Unsafe injections and the transmission of hepatitis B and C in a periurban community in Pakistan.', *Bulletin of the World Health Organization*, 78(8), pp. 956–63.

Koutsoudakis, G., Forns, X. and Pérez-del-Pulgar, S. (2013) 'Biología molecular aplicada del virus de la hepatitis C', *Gastroenterología y Hepatología*, 36(4), pp. 280–293. doi: 10.1016/j.gastrohep.2012.11.005.

Kuo, G. *et al.* (1989) 'An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis.', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 244(4902), pp. 362–4. doi: 10.1126/science.2496467.

Lavanchy, D. (2011) 'Evolving epidemiology of hepatitis C virus', *Clinical Microbiology and Infection*. European Society of Clinical Infectious Diseases, 17(2), pp. 107–115. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03432.x.

Leandro, G. *et al.* (2006) 'Relationship Between Steatosis, Inflammation, and Fibrosis in Chronic Hepatitis C: A Meta-Analysis of Individual Patient Data', *Gastroenterology*, 130(6), pp. 1636–1642. doi: 10.1053/j.gastro.2006.03.014.

Li, H.-C. and Lo, S.-Y. (2015) 'Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and treatment', *World Journal of Hepatology*, 7(10), p. 1377. doi: 10.4254/wjh.v7.i10.1377.

Liermann Garcia, R. *et al.* (2013) 'Interleukin 28B-related polymorphisms: A pathway for understanding hepatitis C virus infection?', *World Journal of Gastroenterology*, 19(42), pp. 7399–7404. doi: 10.3748/wjg.v19.i42.7399.

Machado, M. V and Cortez-pinto, H. (2009) 'Insulin resistance and steatosis in chronic hepatitis C', *Annals of Hepatology*, 8(1), pp. S67–S75.

Manns, M. P. *et al.* (2001) 'Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial.', *Lancet (London, England)*. Elsevier, 358(9286), pp. 958–65. doi: 10.1016/S0140-6736(01)06102-5.

Massard, J. *et al.* (2006) 'Natural history and predictors of disease severity in

chronic hepatitis C', *Journal of Hepatology*, 44, pp. S19–S24. doi: 10.1016/j.jhep.2005.11.009.

Mathurin, P. *et al.* (1998) 'Slow progression rate of fibrosis in hepatitis C virus patients with persistently normal alanine transaminase activity', *Hepatology*, 27(3), pp. 868–872. doi: 10.1002/hep.510270333.

Mauss, S. *et al.* (2011) 'Estimating the likelihood of sustained virological response in chronic hepatitis C therapy', *Journal of Viral Hepatitis*, 18(4), pp. e81–e90. doi: 10.1111/j.1365-2893.2010.01372.x.

McHutchison, J. G. *et al.* (2000) 'The impact of interferon plus ribavirin on response to therapy in black patients with chronic hepatitis C. The International Hepatitis Interventional Therapy Group.', *Gastroenterology*, 119(5), pp. 1317–23.

McHutchison, J. G. *et al.* (2002) 'Adherence to combination therapy enhances sustained response in genotype-1-infected patients with chronic hepatitis C', *Gastroenterology*, 123(4), pp. 1061–1069. doi: 10.1053/gast.2002.35950.

Messina, J. P. *et al.* (2015) 'Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes', *Hepatology*, 61(1), pp. 77–87. doi: 10.1002/hep.27259.

Minassian, M. L., Rivero, C. W. and Oubiña, J. R. (2014) 'Hepatitis C', in Mestre, E. O. (ed.) *Virología Médica*, pp. 504–529.

Ministerio de salud Pública (2010) *Ministerio de Salud Pública. Enfermedades de Notificación Obligatoria, División Epidemiología. Departamento de Vigilancia en Salud*. Available at: www.msp.org.uy (Accessed: 1 February 2014).

Mitruka, K. *et al.* (2015) 'World Hepatitis Day — July 28 , 2015 Launch of a Nationwide Hepatitis C Elimination Program —', *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 64(28), pp. 753–7.

Mohd Hanafiah, K. *et al.* (2013) 'Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence.', *Hepatology*, 57(4), pp. 1333–1342. doi: 10.1002/hep.26141.

Mohsen, A. *et al.* (2015) 'Hepatitis C virus acquisition among Egyptians: analysis of a 10-year surveillance of acute hepatitis C', *Tropical Medicine & International Health*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 20(1), pp. 89–97. doi: 10.1111/tmi.12410.

National Center for Biotechnology Information (2018) *Short Genetics Variation*, NCB. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs12979860> (Accessed: 19 April

2019).

National Center for Biothechnology Information (2018) *Short Genetics Variation, NCBI*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs809917> (Accessed: 20 April 2019).

Negro, F. (2014) 'Facts and fictions of HCV and comorbidities: Steatosis, diabetes mellitus, and cardiovascular diseases', *Journal of Hepatology*, 61(1), pp. S69–S78. doi: 10.1016/j.jhep.2014.08.003.

Ortiz, V. *et al.* (2002) 'Contribution of obesity to hepatitis C-related fibrosis progression', *The American Journal of Gastroenterology*, 97(9), pp. 2408–2414. doi: 10.1111/j.1572-0241.2002.05995.x.

Patel, K. *et al.* (2010) 'A Polymorphism Near IL28B Is Associated With Spontaneous Clearance of Acute Hepatitis C Virus and Jaundice', *Gastroenterology*. Elsevier Inc., 139(5), pp. 1586-1592.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2010.07.005.

Poynard, T. *et al.* (2000) 'Is an "a la carte" combination interferon alfa-2b plus ribavirin regimen possible for the first line treatment in patients with chronic hepatitis C?', *Hepatology*, 31(1), pp. 211–218. doi: 10.1002/hep.510310131.

Rauch, A. *et al.* (2010) 'Genetic Variation in IL28B Is Associated With Chronic Hepatitis C and Treatment Failure: A Genome-Wide Association Study', *Gastroenterology*. Elsevier Inc., 138(4), pp. 1338-1345.e7. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.056.

Reyes, N. *et al.* (2016) 'Semana Médica del Hospital Maciel 2016. Curso de actualización para Graduados', *Rev. urg. med. interna*, 3, pp. 1–136.

Sánchez–Tapias, J. M. *et al.* (2006) 'Peginterferon-Alfa2a Plus Ribavirin for 48 Versus 72 Weeks in Patients With Detectable Hepatitis C Virus RNA at Week 4 of Treatment', *Gastroenterology*, 131(2), pp. 451–460. doi: 10.1053/j.gastro.2006.05.016.

Schuppan, D., Surabattula, R. and Wang, X. Y. (2018) 'Determinants of fibrosis progression and regression in NASH', *Journal of Hepatology*. European Association for the Study of the Liver, 68(2), pp. 238–250. doi: 10.1016/j.jhep.2017.11.012.

Shakil, A. O. *et al.* (1995) 'Volunteer Blood Donors with Antibody to Hepatitis C Virus: Clinical, Biochemical, Virologic, and Histologic Features', *Annals of Internal Medicine*. American College of Physicians, 123(5), p. 330. doi: 10.7326/0003-4819-123-5-199509010-00002.

Shiffman, M. L. *et al.* (2007) 'Peginterferon Alfa-2a and Ribavirin for 16 or 24 Weeks in HCV Genotype 2 or 3', *New England Journal of Medicine*, 357(2), pp. 124–134. doi: 10.1056/NEJMoa066403.

Shimizu, Y. K. *et al.* (1996) 'Hepatitis C virus: Detection of intracellular virus particles by electron microscop', *Hepatology*, 23(2), pp. 205–209. doi: 10.1002/hep.510230202.

Smith, D. B. *et al.* (2014) 'Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource', *Hepatology*, 59(1), pp. 318–327. doi: 10.1002/hep.26744.

Strader, D. B. *et al.* (2004) 'Diagnosis, Management, and Treatment of Hepatitis C', *Hepatology*, 39(4), pp. 1147–1171. doi: 10.1002/hep.20119.

Suppiah, V. *et al.* (2009) 'IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- α and ribavirin therapy', *Nature Genetics*, 41(10), pp. 1100–1104. doi: 10.1038/ng.447.

Suryaprasad, A. G. *et al.* (2014) 'Emerging Epidemic of Hepatitis C Virus Infections Among Young Nonurban Persons Who Inject Drugs in the United States, 2006–2012', *Clinical Infectious Diseases*, 59(10), pp. 1411–1419. doi: 10.1093/cid/ciu643.

Szabo, S. M. *et al.* (2012) 'The epidemiologic burden of hepatitis C virus infection in Latin America.', *Annals of hepatology*, 11(5), pp. 623–35. doi: 10.1093/icsidreview/siw005.

Tanaka, Y. *et al.* (2009) 'Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C.', *Nature genetics*. Nature Publishing Group, 41(10), pp. 1105–1109. doi: 10.1038/ng.449.

Thomas, D. L. *et al.* (2000) 'The Natural History of Hepatitis C Virus Infection', *American Medical Association*. American Medical Association, 284(4), pp. 450–456. doi: 10.1001/jama.284.4.450.

Thomas, D. L. *et al.* (2009) 'Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus', *Nature*, 461(7265), pp. 798–801. doi: 10.1038/nature08463.Genetic.

Wiese, M. *et al.* (2000) 'Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C(genotype 1b) single-source outbreak in germany: A 20-year multicenter study', *Hepatology*, 32(1), pp. 91–96. doi: 10.1053/jhep.2000.8169.

Witthöft, T. *et al.* (2007) 'Safety, tolerability and efficacy of peginterferon alpha-2a and ribavirin in chronic hepatitis C in clinical practice: The German Open Safety Trial', *Journal of Viral Hepatitis*, 14(11), pp. 788–796. doi: 10.1111/j.1365-2893.2007.00871.x.

Wong, D. K. H. *et al.* (2001) 'Detection of Diverse Hepatitis C Virus (HCV)-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Peripheral Blood of Infected Persons by Screening for Responses to All Translated Proteins of HCV', *Journal of Virology*, 75(3), pp. 1229–1235. doi: 10.1128/JVI.75.3.1229-1235.2001.

World Health Organization (2016) *GUIDELINES FOR THE SCREENING, CARE AND TREATMENT OF PERSONS WITH CHRONIC HEPATITIS C INFECTION*. Available at: www.who.int (Accessed: 15 April 2019).

World Health Organization (2017) *Global hepatitis report 2017*. doi: ISBN 978-92-4-156545-5.

World Health Organization (2018) *Hepatitis C*. Available at: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c> (Accessed: 15 August 2018).

Yan, K. K. *et al.* (2008) 'Treatment responses in Asians and Caucasians with chronic hepatitis C infection', *World Journal of Gastroenterology*, 14(21), pp. 3416–3420. doi: 10.3748/wjg.14.3416.

Zeuzem, S. *et al.* (2004) 'Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3', *Journal of Hepatology*, 40(6), pp. 993–999. doi: 10.1016/j.jhep.2004.02.007.

Zhu, Y. and Chen, S. (2013) 'Antiviral treatment of hepatitis c virus infection and factors affecting efficacy', *World Journal of Gastroenterology*, 19(47), pp. 8963–8973. doi: 10.3748/wjg.v19.i47.8963.

Zibbell, J. E. *et al.* (2015) 'Increases in hepatitis C virus infection related to injection drug use among persons aged ≤ 30 years - Kentucky, Tennessee, Virginia, and West Virginia, 2006-2012.', *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 64(17), pp. 453–8.

11 Anexos

11.1 Extracción de ADN por el método de Fenol-Cloroformo

Lisado de glóbulos blancos:

- Colocar 10 ml de sangre periférica extraídos mediante una jeringa con EDTA en tubos de rosca estériles de 50 ml.
- Agregar 3 volúmenes de Buffer de lisis: NH_4Cl 155 mM, KHCO_3 10 mM (pH 7.4), EDTA 1 mM (pH 8), SSC 1X a partir de 20X (NaCl 3 M, Citrato de Sodio 0.3 M).
- Dejar 15 minutos en hielo, agitando cada dos minutos.
- Centrifugar 10 minutos a 1000 rpm.
- Eliminar el sobrenadante.
- Lavar el pellet con SSC 1X.
- Resuspender el pellet en 5 ml buffer SE: NaCl 75 mM, EDTA 24 mM (pH 8).
- Agregar 500 μl de SDS 10% y 50 μl de Proteinasa K.
- Colocar en baño con agitación a 50 rpm a 50°C toda la noche.

Extracción con Fenol-Cloroformo:

- Agregar 1 volumen de fenol.
- Mezclar 15 minutos hasta obtener una emulsión completa.
- Centrifugar 10 minutos a 200 rpm.
- Transferir la fase acuosa a otro tubo de polipropileno de 15 ml con tapa.
- Agregar 1 volumen de cloroformo alcohol isoamílico (24:1).
- Agitar durante 10 minutos.

Anexos

- Centrifugar 5 minutos a 2000 rpm.

- Extraer la fase acuosa.

Precipitación:

- Agregar 0.3 volúmenes de acetato de sodio 2M (pH 5.5).

- Agregar 2 volúmenes de etanol (100%).

- Mezclar por inversión hasta que se forme el precipitado.

- Recuperar el ADN precipitado en un tubo estéril de 5 ml con tapa.

- Lavar el ADN con 3 ml de etanol 70%.

- Secar el precipitado al aire.

- Resuspender en 1 ml de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM).

- Dejar en baño con agitación a 50°C toda la noche.

11.2 Funcionamiento de sondas Taqman®

Las sondas Taqman® o de hidrolisis contienen un fluoróforo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y en el extremo 3' un aceptor que absorbe la fluorescencia liberada por el donador.

Para todas las reacciones de PCR en tiempo real se utilizó el SensiFAST™ Probe No-ROX (Bioline®). Junto con la MIX, se pone en un mismo tubo de reacción las dos sondas, los primers y el ADN blanco (Figura 3, panel 1). Cuando la sonda se encuentra intacta la fluorescencia emitida por el fluoróforo donador es absorbida por el aceptor. En la fase de desnaturalización del ADN blanco la sonda y los primers se hibridan con su cadena complementaria. Luego en la fase de síntesis, la ADN polimerasa gracias a su actividad 5' exonucleasa hidroliza el extremo 5' de la sonda provocando la liberación del fluoróforo que al quedar alejado del aceptor emite fluorescencia que es captada por el canal del PCR Real Time que corresponda según la longitud de onda captada (Figura 1, panel 2 y 3.). De esta manera observamos que un aumento en la señal de

uno de los donadores indicará homocigotidad para ese nucleótido de interés, mientras que si se reporta señal en ambos donadores nos indicara heterocigotidad.

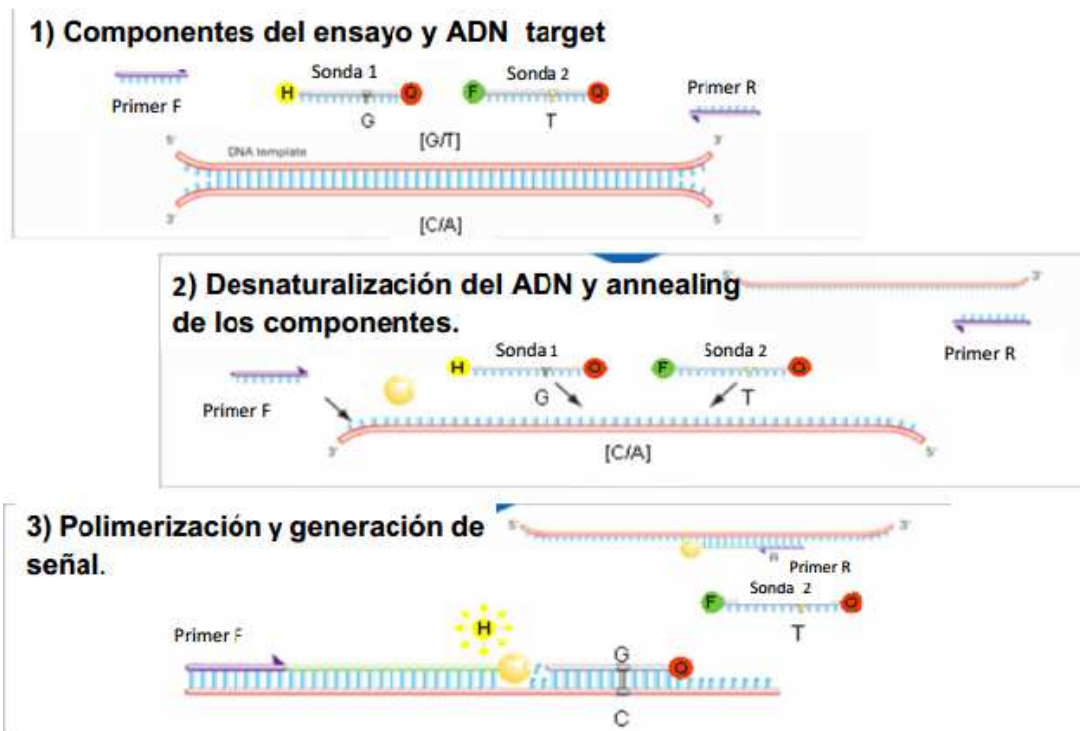


Figura 1: Paneles 1, 2 y 3. Genotipificación mediante PCR en tiempo real con la utilización de sondas Taqman®. (Beloso, 2014)