

11219

6

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO  
ESTUDIOS DE POSTGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"  
ENSEMANZA E INVESTIGACION DEL HOSPITAL DE INFECTOLOGIA**

**CARGA VIRAL Y GENOTIPO, FACTORES PRE-TRATAMIENTO  
RELACIONADOS CON EL FRACASO TERAPEUTICO EN PACIENTES  
CON HEPATITIS CRONICA POR VIRUS C TRATADOS CON  
INTERFERON Y RIBAVIRINA.**

**T E S I S  
PARA OBTENER LA SUBESPECIALIDAD DE INFECTOLOGIA**

**P R E S E N T A  
DR. ROGELIO NAVARRETE CASTRO**

**ASESOR: DRA. GLORIA MARIA CALDERON RODRIGUEZ  
DR. JOSE LUIS CITAL ZAMORA**

**COLABORADORES  
DRA. TERESA ALVAREZ MUÑOZ  
QBP. MARIA DE LA LUZ MARTINEZ RODRIGUEZ  
DRA. EMMA ROSARIO GONZÁLEZ VEYRAND  
DR. GULLERMO GOMEZ CAMPOS  
DR. GUSTAVO SÁNCHEZ HUERTA  
DRA. ELENA URDEZ HERNANDEZ**

2001-59

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Centro Médico la  
Hospital de infectología



*J. Ernesto Casillas C.*

**DR. J ERNESTO CASILLAS C.**

**DIRECTOR DEL HOSPITAL  
DE INFECTOLOGIA**

JEFATURA DE ENSEÑANZA E  
**DR. MANUEL PACHECO RUELAS**  
INVESTIGACION

**SUBDIRECTOR MEDICO**

*Carlos Hermida Escobedo*

**DR. CARLOS HERMIDA ESCOBEDO**

**JEFE DE ENSEÑANZA  
E INVESTIGACION**

*Elena Urdez Hernández*

**DRA ELENA URDEZ HERNÁNDEZ**

**TITULAR DEL CURSO**

*Gloria María Calderón Rodríguez*

**DRA GLORIA MARIA CALDERON RODRIGUEZ**  
**ASESOR BIOMEDICO**

*José Luis Cital Zamora*

**DR. JOSE LUIS CITAL ZAMORA**  
**ASESOR CLINICO**

*Gustavo Sánchez Huerta*

**DR. GUSTAVO SANCHEZ HUERTA**  
**ASESOR ESTADISTICO**

*Rogelio Navarrete Castro*

**DR. ROGELIO NAVARRETE CASTRO**  
**RESIDENTE**

## DEDICATORIA

**A *Porfirio* y *Julia* mis padres,  
que con su esfuerzo  
han inculcado en mi,  
educación, respeto a los  
demás y confianza en mi  
persona.**

**A *Lupita*, mi esposa  
por su tolerancia, paciencia  
y comprensión**

**A *Yosinbi*, hijo mayor quien  
le a tocado sentir el esfuerzo  
de la residencia.**

**A *Sinhué*, hijo menor que por este  
postgrado no fue posible verle  
nacer.**

**A los *enfermos del Hospital de Infectología CMNR*,  
el mejor regalo de esta profesión, el mejor laboratorio  
clínico que enseña día tras día.**

**A todos los *adscritos y profesores del Hospital de  
infectología CMNR, “Daniel Méndez Hernández”*  
que han permitido explorar la intimidad de su experiencia  
clínica y brindar lo que no se compra ni se vende,  
lo que se brinda sin condición, el don más preciado  
de la medicina: *la enseñanza*.  
Deseo mantengan firme el propósito de enseñar  
cada vez mejor la infectología.**

CONTENIDO	PAG
Resumen	4
Antecedentes	5
Justificación	12
Objetivos	13
Criterios de inclusión	14
Criterios de no inclusión	14
Criterios de exclusión	14
<b>Métodos</b>	
Diseño	15
Tamaño de la muestra	15
Definición de casos y controles	16
Toma de muestras	17
Genotipificación	17
Recolección de la información	17
Análisis estadístico	18
Consideraciones éticas	18
<b>Resultados</b>	
Datos generales	19
Factores pre-tratamiento relacionados a	
Fracaso terapéutico (análisis bivariado de datos crudos)	21
Factores pre-tratamiento interrelacionados al	
Fracaso terapéutico (análisis multivariado en forma secuencial)	23
Factores pre-tratamiento consistentes y su asociación	
Heterogénea relacionada a fracaso terapéutico.	25
(análisis multivariado en forma simultánea y regresión logística)	
Cuadro I	20
Cuadro II	22
Cuadro III	24
Cuadro IV	26
Discusión	28
Bibliografía	31

## RESUMEN

**Carga viral y genotipo, factores pre-tratamiento relacionados con el fracaso terapéutico en pacientes con hepatitis crónica por virus C tratados con interferón  $\alpha$  y ribavirina.** Navarrete CR<sup>1</sup>, CalderonRG<sup>2</sup>, Cital ZJL<sup>1</sup>, Alvarez MT<sup>3</sup>, Martínez RM<sup>2</sup>, González VER<sup>1</sup>, Gómez CG<sup>1</sup>, Sánchez HG<sup>1</sup>, Urdez HE<sup>1</sup>. 1 *Servicio de adultos*, 2 *Unidad de investigación en inmunología e infectología del Hospital de infectología CMN "la Raza" IMSS*, 3 *Unidad de investigación en enfermedades infecciosas y parasitarias, H. Peditaria, CMN siglo XXI, IMSS*.

**Introducción:** La infección por el virus de hepatitis C, es un problema de salud pública. En nuestro país la frecuencia oscila entre 0.47% al 7.5% y no existen trabajos en México que evalúen los factores pre-tratamiento relacionados al fracaso terapéutico.

**Objetivo:** Investigar los factores pre-tratamiento relacionados con fracaso terapéutico en pacientes con hepatitis crónica por virus C tratados con INF $\alpha$ -ribavirina del Hospital de Infectología CMNR "La Raza", IMSS.

**Diseño:** Estudio de casos y controles

**Pacientes:** Se incluyeron en el estudio pacientes mayores de 18 años, ambos sexos, infectados por HVC, que recibieron INF $\alpha$ -Ribavirina durante 48 semanas y con un año post-tratamiento. Se excluyeron los que presentaron co-infección con el virus B,D HIV, que no completaron el esquema por 48 semanas y los que no presentaron evaluación histológica post-tratamiento. Se consideraron como casos los pacientes que presentaron carga viral detectable y no hubo disminución del índice de Knodell dos o más valores un año post-tratamiento y como controles, pacientes que presentaron respuesta virológica e histológica.

**Medición:** Se midió niveles de carga viral, índice de Knodell, niveles de ALT, AST,GGT, edad, sexo y genotipos.

**Análisis estadístico:** Medidas de tendencia central, riesgo relativo (RR) calculado por razón de productos cruzados (RPC), con intervalo de confianza del 95% (IC95%) y valor de  $p < 0.05$ .

**Resultados:** Se estudiaron 26 pacientes, 11 hombres y 16 mujeres. De los 13 casos tuvieron un promedio de edad de 43 años ( rango 26 a 40) y de los 13 controles de 38 años (rango 30 a 44). Los niveles de carga viral, niveles de ALT, AST, GGT, índice de Knodell y genotipos fueron muy homogéneos. En el análisis bivariado los factores relacionados a fracaso terapéutico fueron la presencia de genotipo *1a* (RR 2.0 IC90% 1.02-3.8 p 0.08), co-infección con otro genotipo (RR 2.1 IC95% 2.1-4.05 p 0.05), el género masculino (RR 2.33 IC95% 1.39-3.8 p 0.001), edad mayor a 40 años (RR 2.24 IC95% 1.35-3.7 p 0.001), niveles de ALT >70U/L (RR 1.71 IC95% 1.02-2.8 p 0.03) y CV >100,000 copias /ml (RR 3.2 IC95% 1.95-5.3 p 0.000). Entre estos factores relacionados, en el análisis multivariado y de regresión logística el más consistente fue la CV, siendo más importante en los pacientes con edad >40 años (RR6.6 IC95% 2.38-18.5 p 0.003), tener niveles de ALT >70U/L (RR 6.0 IC95% 2.52-14.2 p 0.000) y un índice de actividad histológica de 7 (RR 11.6 IC95% 1.05-129.6 p 0.04).

**Conclusión:** la carga viral >100,000 copias/ml es el factor pre-tratamiento más consistente relacionado a fracaso terapéutico. Los factores que modifican la predicción de carga viral son la edad, genotipo y niveles de ALT. Es necesario implementar guías de marcadores moleculares como genotipo y CV pre-tratamiento en los pacientes con HVC y realizar protocolos con otra opción terapéutica a los pacientes con fracaso al INF  $\alpha$  y ribavirina.

## ANTECEDENTES

La hepatitis viral es una enfermedad conocida desde la antigüedad. La ictericia epidémica se menciona en el Talmud y se atribuye a Hipócrates la primera descripción de la enfermedad en el siglo IV a.c. Los brotes de ictericia causaron estragos entre las poblaciones durante la Edad Media y la ictericia “de campaña” durante las guerras fue tan importante como la peste en cuanto a producir morbilidad en Europa. Sin embargo, la naturaleza infecciosa de la enfermedad no se reconoció hasta finales del siglo XIX.

En el siglo XX a finales de los años treinta se iniciaron estudios con militares voluntarios que persistieron activos después de la Segunda Guerra Mundial. Estos estudios proporcionaron información acerca de la infecto-contagiosidad, modo de transmisión y propiedades del agente etiológico de hepatitis. Se pensó en ese entonces que la enfermedad era de naturaleza infecciosa y que existían distintos agentes responsables de las epidemias en el personal militar. Posteriormente diferentes investigadores han determinado la etiología de las hepatitis infecciosas: Mc Callum estudió al virus A, Krugman el virus B y Rizzetto en 1977 descubrió el virus Delta. Pero fue hasta que los métodos diagnósticos para identificar a las hepatitis mencionadas estuvieron a disposición general se observó que no explicaban todas las causas de hepatitis vírica dado que muchos pacientes carecían de marcadores para estas infecciones. De ahí surgió la idea de una nueva variante de hepatitis vírica, que se denominó “hepatitis vírica no A no B”.<sup>1,2,3</sup>

Con el advenimiento de la biología molecular Michael Houghton identificó por clonación el virus de hepatitis C. Esto por tratarse de un virus no cultivable

responsable en 1989 del 80 al 90% de los casos de hepatitis no A, no B.<sup>8</sup> De esta manera a final de los años ochenta se identificaron cinco virus como agentes causales de la hepatitis: VHA, VHB, VHC, VHD Y VHE. Actualmente se conocen siete virus hepatotrópicos que producen hepatitis viral el VHA, VHB, VHC, VHD, VHE, VHG y el HTT.<sup>4</sup>

El virus de hepatitis C es un género de la familia Flaviviridae, cuenta con 6 genotipos y alrededor de 40 subtipos, resultado de la heterogeneidad genética.<sup>5</sup> Es un virus RNA de cadena simple (ss RNA) con una envoltura esférica, un diámetro de 50 nm y una longitud de 95kb, cuyo genoma es de aproximadamente 9,400 nucleótidos, contiene varios genes que codifican 3 proteínas virales estructurales: C (nucleocápside), E1 y E2 ( envoltura); siete no estructurales; P71, NS2, NS3, NS4 (a, b) y NS5 (a,b) y las ramas UTR no codificadoras 5'y 3'; integrando así el genoma 5'-C,E1,E2/NS1, NS2, NS3, NS4,NS5-3'.<sup>6</sup>

El gen C traduce la proteína core de la cápside, las proteínas E1 y E2 traducen las glicoproteínas de la membrana, la NS1 equivalente a las E2 cuya actividad se desconoce, NS2 y NS4 (a, b) proteínas de unión a la membrana, la región NS3 que codifica para proteínas con actividad de serin proteasas y helicasa y la NS5A con actividad RNA polimerasa dependiente de RNA.<sup>5,6,7</sup> El HVC presenta una heterogeneidad genética que depende de 2 regiones hipervariables; la región hipervariables 1 (HVR1) de 90 nucleótidos desde 5' hasta el gen E2 y la región hipervariable tipo 2 (HVR2) de 7 AA desde la HVR1 hacia a 3'. De estas regiones hipervariables se derivan los diferentes genotipos de acuerdo al sistema de clasificación propuesto por Simons.<sup>9</sup>

El espectro epidemiológico de la hepatitis por virus C es heterogéneo de acuerdo al grupo de edad, área geográfica, mecanismo de transmisión y grupos de alto riesgo. Para 1980 la incidencia promedio se estimó en 15/100,000 habitantes (rango de 12/100,000 a 18/100,000) la que declinó entre 1989 y 1995 de 16/100,000 a 4/100,000.<sup>10</sup> Este descenso coincidió con una disminución en los casos agudos secundarios a transfusión, lo cual infiere un mejor control con los hemoderivados, pero no en los casos secundarios a uso de drogas.

La casuística mundial para el año 2000 se estimó en 500 millones de casos, con aumento del 100% en comparación con lo reportado en 1992 y el consenso Latino Americano estima 4 millones de casos en EU; 450,000 en Argentina; 2,200,000 en Brazil; 600,000 en Colombia y 2,400,000 casos en México. Bajo estas circunstancias la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido a la hepatitis por virus C como un problema de salud pública.<sup>11,12,13,14</sup>

En la población mexicana la prevalencia difiere de acuerdo al tipo de pacientes estudiados y lugar de estudio. Méndez y colaboradores con un grupo de donadores del banco de sangre del Hospital Médica Sur observa una prevalencia de 0.47%,<sup>69</sup> Hernández y cols., en el Hospital central militar el 0.74%<sup>71</sup> y Guerrero y cols., en el IMSS de Durango el 1.47%.<sup>72</sup> Sin embargo Kato y cols., en el Instituto de Ciencia Médicas y de la Nutrición en pacientes que ingresaron al servicio de urgencias demostraron una prevalencia del 7.8% (IC95% 6.2-9.8),<sup>70</sup>

Otros estudios observan una prevalencia variable dependiendo del grupo específico de estudio, por ejemplo: en la población adulta es del 2.6%, en trabajadores de la salud el 2.1%, en niños sanos 0.9%, en niños hemofílicos 31%, niños multitransfundidos el 12.5%.<sup>74</sup> En el Hospital de Infectología del Centro

Médico Nacional “La Raza” la hepatitis por virus C entre todas las patologías se encuentra ubicada en el tercer lugar como causa de morbilidad. Sin embargo la prevalencia real en nuestro país se desconoce y por ello la importancia de realizar estudios en población abierta y mejorar el registro de las instituciones de salud.

Utilizando un método diagnóstico molecular del virus de hepatitis C se han identificado 6 genotipos distribuidos en diferentes regiones geográficas. En Estados Unidos el 60% corresponde al *1a*, el 20% al *1b*, el genotipo 4 prevalece en África y Egipto en el 90% de los casos. Los genotipos 5 y 6 en el suroeste de Asia y sur de África y el genotipo 3 en Asia y en lugares donde existe tráfico de drogas. En México los estudios reportan a los genotipos *1 (a y b)* como los más frecuentes en más del 50% de los casos.<sup>16,17,18</sup>

Las fuentes de infección que establecen grupos de alto riesgo de infección por el virus de hepatitis C son el uso de drogas IV (7%), transfusión (52.3%), accidentes ocupacionales (6%), hemodiálisis (5%), sexual (2.5%) y en un 32% se desconoce. A pesar de los múltiples estudios epidemiológicos los consensos realizados<sup>14,64</sup> no han podido establecer con certeza la incidencia anual de infección por VC, así como la mortalidad anual por esta causa. Por lo tanto se ha sugerido realizar estudios epidemiológicos en población abierta y establecer en forma obligatoria la notificación de casos en protocolos simples, registros públicos y privados.<sup>15</sup>

El espectro clínico de la hepatitis por virus C es diverso. Del 3% de la población general que se encuentra infectada por el virus de hepatitis C, el 20% presentó hepatitis aguda y de esta el 70% evolucionó a hepatitis crónica. De los casos que expresan manifestaciones clínicas el 80% es anictérica y el 20% manifiesta ictericia que se acompañan de sintomatología inespecífica como náuseas, dolor en

cuadrante superior derecho, mal estado general y los niveles de transaminasas hepáticas relativamente altas.<sup>6,19</sup>

Del 50 al 90% de los casos de hepatitis por virus C que evolucionan a la cronicidad, se observó que esta condicionado por ciertos factores como el genotipo, la vía de transmisión, enfermedad hepática previa, consumo de alcohol y la edad. Sin embargo se ha observado que lo que tiene mayor relevancia es el grado de daño hepático, así como la actividad inflamatoria y grado de cirrosis.<sup>19,21,33</sup> Por otro lado existen manifestaciones extrahepáticas como crioglobulinemia, glomerulonefritis, porfiria cutánea tarda, linfoma maligno de bajo grado, tiroiditis autoinmune, liquen plano, síndrome Sjogren, anemia aplástica, poliarteritis nodosa, eritema nodoso y fibrosis pulmonar que puede presentar cualquier paciente con VHC.<sup>20</sup>

Las complicaciones más severas que presentan los pacientes con hepatitis crónica por virus C son la cirrosis y el hepatocarcinoma (HCC). Se ha reportado que en un 10-20% de los pacientes infectados por virus de hepatitis C desarrollan cirrosis dentro de los primeros cinco años, con evidencia de várices esofágicas, ascitis, cuagulopatía y encefalopatía.<sup>21,22,23</sup> El hepatocarcinoma se ha observado con una tasa entre el 2.1 al 2.5 por 100,000 habitantes y aumenta hasta 23.6 veces en los pacientes con hepatitis por virus C. Sin embargo, en las últimas tres décadas Japón ha tenido un incremento del HCC, no así en Reino Unido, Francia y Estados Unidos. En los países en desarrollo se observa el HCC con poca frecuencia lo que se atribuye al subregistro por un sistema de información poco confiable.<sup>24,25,26,27,28</sup>

Con la finalidad de reducir el riesgo de cirrosis y el desarrollo de HCC se han realizado múltiples ensayos clínicos con diferentes esquemas de tratamiento. Entre

ellos los que ha evaluado la eficacia del interferón alfa (INF $\alpha$ ) por su actividad antiviral sustentado en diferentes puntos: a) activa la endorribonucleasas, capaz de degradar el RNA mensajero del virus e inhibe la proteincinasa (P1) que bloquea la síntesis de las proteínas y la generación de nuevas partículas virales, b) bloquea la síntesis de DNA celular inducido por diferentes factores de crecimiento y la transcripción del RNA viral y c) activa las células natural killer (NK) que destruye las células infectadas por el virus.<sup>29</sup> Sin embargo no todos reciben beneficio del interferón ya que solo entre un 20 al 30% de los pacientes tratados presentan respuesta sostenida durante un año posterior al tratamiento en los pacientes que tienen una infección del virus C con genotipos *1a* y *1b*.<sup>30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40</sup>

El fracaso terapéutico en genotipos *1a,1b* y en menor grado otros genotipos es atribuido a condiciones inherentes al virus. Entre estos se ha propuesto que la mutación del gen estructural que expresa la proteína NS5A, traduce una proteína que inhibe la actividad de la proteincinasa (PKR) al inhibir la síntesis de proteínas por fosforilación del factor de iniciación (eIF2a) en la traducción, explicando la resistencia al interferón en algunos pacientes.<sup>41,42,43,44,45,46,47,48,49</sup> Considerando que la proteína E2; proteína de la envoltura que participa en el reconocimiento de la célula blanco e inhibe a la PKR y al eIF2a en las células de mamíferos y levaduras. La mutación de este gene, expresa una proteína diferente que bloquea el proceso de traducción viral.<sup>41,50</sup> Por lo tanto se considera que la participación del gen NS5A contribuye al desarrollo de resistencia al INF $\alpha$  durante la terapia, mientras que el gen E2 confiere una resistencia intrínseca al INF $\alpha$  en los genotipos *1a*, *1b*.<sup>50,51,52</sup>

Dado que el interferón no ha mostrado ser efectivo en todos los pacientes y considerando que la ribavirina inhibe la síntesis de RNA mensajero viral y la síntesis de ácidos nucleicos demostrando una mejor respuesta terapéutica al

combinar al INF  $\alpha$  más ribavirina, incluyendo pacientes que han tenido fracaso terapéutico a la monoterapia con INF $\alpha$ .<sup>53,54,55,56,57,58,59</sup> Otros factores relacionados con el fracaso pueden ser los altos niveles de carga viral, el daño histológico, los genotipos 1a, 1b, etc.<sup>34,48,60,61,62,63,64</sup> Estos factores, así como la teoría de la mutación genómica en los genes NS5A y E2 actualmente no han sido totalmente esclarecidos lo que motivo estudiarlos en pacientes con terapia combinada y específicamente en portadores de genotipos del VC conocidos como no respondedores.

## **Justificación**

Dado que la hepatitis crónica por virus C se ha convertido en un problema de salud pública, no solo en los grupos de alto riesgo, sino en la población en general, es importante conocer algunas características del virus que pueden ser determinantes para el tratamiento de los pacientes con HVC.

En nuestro país y en el hospital de infectología Centro Médico Nacional "La Raza" no existen estudios que evalúen los factores de predicción de fracaso terapéutico en pacientes con hepatitis crónica por virus C tratados con INF a y ribavirina. Por lo que consideramos fundamental y justificado realizar este trabajo para determinar el marcador que identifique a los pacientes que tienen mayor probabilidad de fracasar con la biterapia antiviral antes de iniciar el tratamiento.

## **Objetivo General**

Investigar los factores pre-tratamiento relacionados con fracaso terapéutico al INF $\alpha$ +ribavirina en pacientes con hepatitis por virus C del Hospital de Infectología CMR “La Raza”.

## **Objetivos específicos**

- 1) Evaluar si el genotipo es un factor que determina el fracaso terapéutico en el tratamiento combinado con interferón y ribavirina en pacientes con Hepatitis crónica por virus C del Hospital de Infectología de CMN “La Raza”
- 2) Evaluar si el grado de actividad inflamatoria, nivel de fibrosis hepática, la carga viral y transaminasemia son indicadores de fracaso terapéutico independientes al genotipo en pacientes infectados de virus de hepatitis C del Hospital de Infectología de CMN “La Raza”.

### **Criterios de inclusión**

1. Pacientes mayores de 18 años
2. Ambos sexos
3. Pacientes con hepatitis crónica por virus C
4. Pacientes de haya recibido  $\alpha$ -interferón y ribavirina por un año.
5. Pacientes que hubiesen tenido un año postratamiento.

### **Criterios de no inclusión**

1. Pacientes que presenten coinfección por virus de hepatitis B
2. Pacientes que presente coinfección por virus de hepatitis D
3. Pacientes que presenten coinfección por virus de inmunodeficiencia humana
4. Pacientes con hepatitis por virus C embarazadas.

### **Criterios de Exclusión.**

1. Pacientes que no completaron esquema terapéutico por un año.
2. Pacientes del sexo femenino con hepatitis crónica por VC que se embarazaron durante el tratamiento.
3. Pacientes en los que no se evaluó el daño histológico al año pos-tratamiento.

### **Criterios de inclusión**

1. Pacientes mayores de 18 años
2. Ambos sexos
3. Pacientes con hepatitis crónica por virus C
4. Pacientes de haya recibido  $\alpha$ -interferón y ribavirina por un año.
5. Pacientes que hubiesen tenido un año postratamiento.

### **Criterios de no inclusión**

1. Pacientes que presenten coinfección por virus de hepatitis B
2. Pacientes que presente coinfección por virus de hepatitis D
3. Pacientes que presenten coinfección por virus de inmunodeficiencia humana
4. Pacientes con hepatitis por virus C embarazadas.

### **Criterios de Exclusión.**

1. Pacientes que no completaron esquema terapéutico por un año.
2. Pacientes del sexo femenino con hepatitis crónica por VC que se embarazaron durante el tratamiento.
3. Pacientes en los que no se evaluó el daño histológico al año pos-tratamiento.

### **Criterios de inclusión**

1. Pacientes mayores de 18 años
2. Ambos sexos
3. Pacientes con hepatitis crónica por virus C
4. Pacientes de haya recibido  $\alpha$ -interferón y ribavirina por un año.
5. Pacientes que hubiesen tenido un año postratamiento.

### **Criterios de no inclusión**

1. Pacientes que presenten coinfección por virus de hepatitis B
2. Pacientes que presente coinfección por virus de hepatitis D
3. Pacientes que presenten coinfección por virus de inmunodeficiencia humana
4. Pacientes con hepatitis por virus C embarazadas.

### **Criterios de Exclusión.**

1. Pacientes que no completaron esquema terapéutico por un año.
2. Pacientes del sexo femenino con hepatitis crónica por VC que se embarazaron durante el tratamiento.
3. Pacientes en los que no se evaluó el daño histológico al año pos-tratamiento.

## **Material y Métodos**

**Diseño:** Estudio de casos y controles

**Tamaño de la muestra:** Se realizó el cálculo del tamaño de la muestra considerando que la presencia de genotipos no respondedores es del 60% en el grupo de pacientes con fracaso terapéutico y del 20% en el grupo con buena respuesta terapéutica, con una confianza del 95% y un poder del 95%.

### **Definición de casos y controles**

**Casos:** Se consideraron como casos a los pacientes con hepatitis crónica por virus C que no presentaron respuesta terapéutica viral e histológica un año posterior al tratamiento con &-interferón y ribavirina.

La determinación de fracaso terapéutico se realizó al comparar el valor de Knodell, carga viral, antes y un año posterior haber terminado el tratamiento antiviral.

**Los pacientes con Fracaso terapéutico (casos) presentaron los siguientes criterios**

- a) **Bioquímico:** Sin modificación o elevación de los niveles altos de transaminasas un año posterior al tratamiento combinado. Sin embargo no fue el criterio definitivo, ya que existe discrepancia entre el daño hepático y el nivel de transaminasas.

- b) **Histopatológico:** Índice de Knodell no menor a 2, igual o mayor daño histológico un año posterior al tratamiento combinado.
- c) **Molecular:** Carga viral con valores igual o mayor al valor antes de iniciar el tratamiento. La carga viral fue determinada por la técnica RT-PCR utilizando el Kit de amplicor HCV monitor V.2. (Amplicor HCV, Roche Molecular Systems, Francia).

**Controles:** Se consideraron como controles los pacientes con hepatitis crónica por virus C que presentaron respuesta terapéutica, virológica e histológica al año posterior al tratamiento con &-interferón y ribavirina.

**Los pacientes con respuesta terapéutica (controles) presentaron los siguientes criterios**

- a) **Bioquímico:** Reducción del nivel de transaminasas hasta parámetros normales. Este no fue el criterio más importante por la discrepancia entre el daño histológico y niveles séricos.
- b) **Histopatológico:** Dos valores menor del índice de Knodell inicial al final del tratamiento
- c) **Molecular:** Carga viral no detectable por RR-PCR.

**Índice de actividad:** Se determinó por estudio histopatológico, de acuerdo al valor de HAI de Knodell.

Escala: 1-3 (Hepatitis crónica mínima); 4-8 (hepatitis crónica leve); 9-12 (hepatitis crónica moderada); 13-18 (hepatitis crónica severa).

**Índice de cronicidad:** Determinado por estudio histopatológico, con índice de Knodell

Escala: 0- Sin fibrosis; 1-2= fibrosis portal ; 3- fibrosis en puente ( portal-portal o portal-central) 4-Cirrosis

### **Toma de Muestras**

A todos los pacientes se les tomó aproximadamente 10 ml de sangre periférica y se procesaron las muestras por centrifugación para obtener plasma, el cual fue conservado -70 grados centígrados hasta su posterior uso.

**Genotipificación.** Las muestras obtenidas se sometieron al ensayo de Inno-Lipa HCV, (Innogenetics, Belgium) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Este ensayo consiste en una prueba de hibridación reversa de los productos de la región no codificada 5' del UTR utilizando oligonucleótidos específicos. Las bandas obtenidas muestran los diferentes patrones de los genotipos reportados.<sup>65,66,91</sup>

### **Recolección de información**

Los datos como edad, sexo, tiempo de evolución entre el diagnóstico e inicio del tratamiento fueron obtenidos de la historia clínica del expediente y dosis acumulada de &-interferón y ribavirina de las notas médicas del médico tratante. Los niveles de carga viral, fueron obtenidos por los reportes de laboratorio Lusara (Shering-Ploug), tomándose en cuenta el resultado antes de iniciar tratamiento. Los niveles de AST, ALT y GGT determinados por los resultados laboratorio en fecha concordante antes de recibir el tratamiento. El daño hepático de acuerdo a la escala de Knodell fue el reportado en la hoja de patología.

**Índice de cronicidad:** Determinado por estudio histopatológico, con índice de Knodell

Escala: 0- Sin fibrosis; 1-2= fibrosis portal ; 3- fibrosis en puente ( portal-portal o portal-central) 4-Cirrosis

### **Toma de Muestras**

A todos los pacientes se les tomó aproximadamente 10 ml de sangre periférica y se procesaron las muestras por centrifugación para obtener plasma, el cual fue conservado -70 grados centígrados hasta su posterior uso.

**Genotipificación.** Las muestras obtenidas se sometieron al ensayo de Inno-Lipa HCV, (Innogenetics, Belgium) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Este ensayo consiste en una prueba de hibridación reversa de los productos de la región no codificada 5' del UTR utilizando oligonucleótidos específicos. Las bandas obtenidas muestran los diferentes patrones de los genotipos reportados.<sup>65,66,91</sup>

### **Recolección de información**

Los datos como edad, sexo, tiempo de evolución entre el diagnóstico e inicio del tratamiento fueron obtenidos de la historia clínica del expediente y dosis acumulada de &-interferón y ribavirina de las notas médicas del médico tratante. Los niveles de carga viral, fueron obtenidos por los reportes de laboratorio Lusara (Shering-Ploug), tomándose en cuenta el resultado antes de iniciar tratamiento. Los niveles de AST, ALT y GGT determinados por los resultados laboratorio en fecha concordante antes de recibir el tratamiento. El daño hepático de acuerdo a la escala de Knodell fue el reportado en la hoja de patología.

## **Análisis estadístico**

La información fue codificada en códigos numéricos en el programa de EPI-INFO. Posteriormente se utilizó el programa estadístico de Nanostat para analizar por frecuencia simples las variables como, sexo, frecuencia de genotipos y frecuencia de coinfección de otros genotipos. Medidas de tendencia central para edad, carga viral, nivel de enzimas hepáticas, HAI y cronicidad (Índice de Knodell).

El análisis de asociación para determinar el factor asociado a fracaso terapéutico con riesgo relativo (RR o OR) fué calculado por razón de productos cruzados (RPC) e intervalos de confianza del 95% (IC95%). Así mismo se evaluó la presencia de distractores epidemiológicos con análisis secuencial con RR no sesgado. En busca de factores modificadores con análisis simultáneo y el análisis multivariado con regresión logística.

Las pruebas de significancia utilizadas fueron la prueba no paramétrica de Mantel-Hanszel, Fisher y  $X_2$  de heterogeneidad para evaluar la confianza de la diferencias entre subgrupos como: grupos de edad, género, genotipos, nivel de daño histológico y nivel de transaminasas.

## **Consideraciones éticas.**

En esta caso no tiene implicaciones éticas dado que es un estudio retrospectivo, en todo caso los pacientes con fracaso terapéutico serán posibles candidatos a otras alternativas terapéuticas en investigación.

## Resultados.

De la Clínica de Hepatitis del Hospital de Infectología Centro Médico Nacional “La Raza” se estudiaron 13 casos y 13 controles de los cuales 11 fueron hombres y 15 mujeres. El promedio de edad entre los casos fue de 43 años ( rango 26 a 46) y de los controles de 38 (rango 30 a 44).

Dentro de los factores estudiados asociados a fracaso terapéutico estudiados antes de iniciar el tratamiento se observaron los siguientes resultados: los niveles de carga viral (CV) en el grupo de pacientes identificados como casos fue en promedio de 2,720,640 copias por ml, muy parecido al promedio de la CV del grupo de pacientes controles 2,531,670; el promedio del índice de actividad de 6.3 (3-4) en los casos y 6.9 (4-12) en los controles; el promedio de los niveles de AST con  $66.07 \pm 42.7$  UI/L, de ALT de  $87 \pm 0.67$  UI/L y GGT de  $60.6 \pm 59.6$  UI/L en los casos comparado con  $64.9 \pm 39.6$  UI,  $69.58 \pm 60.64$  UI/L y  $92.5 \pm 85.94$  UI/L de los controles respectivamente. En el cuadro I se muestra que el índice de actividad promedio, el índice de cronicidad y el genotipo del virus en el grupos de los casos como el de los controles es similar. El grupo de los casos no presentaron fibrosis en un 76.9%, con fibrosis portal en un 15.4% y el 7.7% presentó fibrosis en puente comparado con el 83.3%, 8.3% y 8.3% respectivamente en los pacientes control. Los genotipos encontrados en el grupo de los casos fue del 15.4% 1a, el 61.5% 1b y el 23.1% 2a y en los controles se observó 8.3% 1a, el 66.7% 1b y el 25% 2a. Además se identificó co-infección con otros genotipos en 4/13 de los casos y 2/13 de los controles.

**Cuadro I**  
**Características generales**

	Casos	controles
<b>Edad X (rango )</b>	<b>43 (26-56)</b>	<b>38 (30-44)</b>
<b>Hombres /mujeres</b>	<b>7/6</b>	<b>4/8</b>
<b>AST X±DE</b>	<b>66.07±42.7</b>	<b>64.9±39.4</b>
<b>ALT X±DE</b>	<b>87±67</b>	<b>69.58±60</b>
<b>GGT X±DE</b>	<b>60.6±59.6</b>	<b>92.5±85</b>
<b>Carga viral X±DE</b>	<b>2,720,640±8,216,800</b>	<b>2,531,670±7,162,880</b>
<b>Índice de Actividad X (rango)</b>	<b>6.3 (3-11)</b>	<b>6.9 (4-12)</b>
<b>Cronicidad</b>		
<b>Sin fibrosis</b>	<b>76.9%</b>	<b>83.3%</b>
<b>Fibrosis portal</b>	<b>15.4%</b>	<b>8.3%</b>
<b>Fibrosis en puente</b>	<b>7.7%</b>	<b>8.3%</b>
<b>Genotipos</b>		
<b>1a</b>	<b>2 (15.4%)</b>	<b>1 (8.3%)</b>
<b>1b</b>	<b>8 (61.5%)</b>	<b>8 (66.67%)</b>
<b>2a</b>	<b>3 (23.1%)</b>	<b>3(25.0%)</b>
<b>Coinfección con 2° genotipo</b>		
<b>1a</b>	<b>1 (7.7%)</b>	<b>0 (0.0%)</b>
<b>2c</b>	<b>3(23.1%)</b>	<b>2(16.7%)</b>

**Cuadro I:** Muestra mínima variabilidad en la edad, el género, promedio carga viral, transaminasas, índice de actividad, cronicidad y genotipos.

En el análisis bivariado los factores que mostraron predicción de fracaso terapéutico fueron: La presencia de genotipo *1a* comparado con el genotipo *1b* u otro (RR 2.0 IC90% 1.02-3.8 p 0.08); la co-infección con otro genotipo (RR 2.1 IC95% 2.1-4.05 p,0.05); el sexo masculino (RR 2.33 IC95%1.39-3.8 p 0.001), edad mayor a 40 años (RR 2.24 IC95%1.35-3.7 p 0.001) y los niveles de ALT mayor a 70UI/L (RR 1.71 IC95%1.02-2.8 p 0.03). Pero el factor que mostró mayor asociación a fracaso terapéutico fue el tener más de 100,000 copias/ml, siendo 3.2 veces que si el paciente presenta una CV menor a 100,000 copias /ml antes de iniciar la terapia con interferón y ribavirina (RR 3.20 IC95% 1.91-5.3 p 0.000). Estos valores de predicción se muestran en el cuadro II.

**Cuadro II**  
**Análisis bivariado**

Variable	RR	IC95%	p
CV >100,000 cop/ml	3.2	1.91-5.3	0.0000
Genotipo 1a	2.0	1.02-3.8	0.08
Co-infección con otro genotipo	2.2	2.1-4.05	0.05
Género masculino	2.3	1.39-3.88	0.001
Edad >40 años	2.24	1.35-3.7	0.001
HAI >7	0.9	1.61-0.53	0.70
Fibrosis	1.5	0.79-2.8	0.20
AST >80 UI	1.5	0.80-2.5	0.20
ALT >70UUI	1.71	1.02-2.8	0.03
GGT >80UI	0.6	0.9-0.37	0.07

**Cuadro II :** Este cuadro demuestra como la carga viral presenta mayor fuerza de predicción de fracaso terapéutico que el genotipo, el género, la edad, HAI, índice de cronicidad y niveles de ALT, AST y GGT.

En el análisis bivariado los niveles de carga viral >100,000 copias /ml antes de iniciar el tratamiento con interferón y ribavirina mostró mayor asociación a fracaso terapéutico. Por lo tanto fue fundamental realizar un análisis secuencial para evaluar si esta predicción fue sobrestimada o subestimada por otro factor como genotipo, HAI, índice de fibrosis, nivel de transaminasas, género y edad. En este análisis la relación fue consistente con los niveles de transaminasas AST ( RR 3.12 IC95% 0.56-17.1 p 0.18), ALT ( RR 3.16 IC95% 0.58-17.0 p 0.17) y GGT (RR 3.52 IC95% 0.62-19.7 p 0.15); con el índice de actividad (RR 2.95 IC95% 0.59-14.5 p0.18) y la edad (RR 3.47 IC95%0.61-19.5 p 0.15). Se observó subestimado con la presencia de coinfección con otro genotipo (RR 4.05 IC95% 0.66-24.5 p 0.12) y sobreestimado con el genotipo (RR 2.66 IC95% 0.59-1.89 p 0.19), fibrosis (RR 2.78 IC95%0.55-13.8 p 0.21) y el género (RR 2.7 IC95% 0.48-14.8 p 0.25). En los casos del genotipo la, fibrosis y el género que explicaban parte de la predicción observada en relación a la carga viral no se demostró suficiente confianza al realizar el análisis secuencial, por lo que la carga viral fue consistente. Cuadro III.

### Cuadro III

**Evaluación de distractores epidemiológicos y la consistencia de carga viral >100,000 factor de fracaso terapéutico en pacientes infectados por virus C.**

Variable				
<b>Contraste principal</b>				
<b>CV &gt;100,000 cop/ml (RR 3.2 1.91-5.3 p 0.000)</b>				
	Distractores	RR no sesgado	IC95%	p
	Edad	3.4	0.61-19.5	0.15
	Género	2.7	0.48-14.8	0.25
	Genotipos	2.6	0.59-11.8	0.19
	Co-infección con otro genotipo	4.0	0.66-24.5	0.12
	Cronicidad	2.7	0.55-13.8	0.21
	Actividad	2.9	0.59-14.5	0.18
	AST	3.1	0.56-17.1	0.18
	ALT	3.1	0.58-17.0	0.17
	GGT	3.5	0.62-19.7	0.15

**Cuadro III:** Este cuadro demuestra como los niveles de carga viral, son consistentes como factores de predicción de fracaso terapéutico al analizarlo con los otros factores.

Se sometieron a un análisis simultáneo y de regresión logística a aquellos factores que mostraron predicción en conjunto con los niveles de carga viral. Esto demostró que ciertos factores en ciertos subgrupos tienen una fuerza de predicción mayor. En el caso de los pacientes infectados con virus C que presentaron edad mayor a 40 años los niveles de carga viral  $>100,000$  copias /ml mostraron 6.6 veces mayor predicción de fracaso terapéutico ( RR 6.6 IC95%3.0-14.4 p 0.000) que en los pacientes que tuvieron edad menor a 40 años (RR 2.0 IC95% 1.07-3.7 0.06). La misma observación se obtuvo en los pacientes que tienen un genotipo diferente al 2a (RR 6.0 IC95% 2.38-18.59 p 0.0003), en los pacientes que presentaron niveles de ALT  $>70$ UI/L ( RR 6.0 IC95%2.52-14.2 p 0.000) y 11.6 veces en los pacientes que presentaron un índice de HAI  $<7$  ( RR 11.6 IC95% 1.05-129 p 0.04). Esto demuestra que los pacientes que presentaron genotipo 1a, un índice de actividad  $>7$  explican parte de la predicción, esto es que no es muy fuerte los niveles de CV en presencia de estas condiciones. Cuadro IV.

**Cuadro IV**  
**Análisis multivariado**

Variable	RR	IC95%	p
<b>Factor predictor</b>			
Carga viral >100,000 copias/ml	3.2	1.91-5.3	0.000
<b>Factor que modifica la predicción</b>			
Edad menor a 40 años	2.0	1.07-3.7	0.06
Edad mayor 40 años	6.6	3.0-14.4	0.0000
Genotipo 1a	2.0	1.50-2.65	0.001
Genotipo 1b	1.0		1.0
Genotipo 2a	6.0	2.38-18.5	0.0003
HAI <7	11.6	1.05-129.6	0.04
HAI >7	0.5	1.24-0.20	0.13
ALT <70UI	2.2	1.5-4.26	0.01
ALT >70UI	6.0	2.52-14.2	0.000

Cuadro IV: Demuestra como la edad, el genotipo el índice de actividad y los niveles de ALT modifican la fuerza de predicción de los niveles de carga viral >100,000 copias/ml antes del tratamiento.

De acuerdo a estos resultados y si la presencia de mutación de los genes que expresan la proteína NS5A y E2 del virus no explican la predicción, la carga viral mayor a 100,000 copias/ml es el factor predictor de fracaso terapéutico más importante en los pacientes con hepatitis crónica por VC antes de iniciar el tratamiento, además es el mas sobresaliente en los pacientes que tienen edad mayor a 40 años, que tiene genotipo 2a un HAI <7 y niveles de ALT >70UI/L de pacientes del Hospital de Infectología de CMN “La Raza”.

## Discusión

La hepatitis por el virus de hepatitis C es considerada actualmente un problema de salud pública en el mundo por el incremento en su prevalencia. A pesar de que en algunas áreas como en América Latina no existan estudios de prevalencia en población abierta que indiquen con mayor precisión su distribución actual.<sup>14</sup> En México por ejemplo, los reportes varían de acuerdo al tipo de pacientes y la institución donde se realizan. (ICMNZS,<sup>70</sup> Hospitales privados,<sup>69</sup> Hospital Central Militar,<sup>71</sup> IMSS-Durango<sup>72</sup> y Hospital de Infectología CMN"La Raza").

Debido a que en nuestro país la prevalencia es importante se necesita buscar factores relacionados con fracaso terapéutico que ayuden a buscar alternativas en el tratamiento.

Nuestro estudio es de los pocos en México que han investigado los factores asociados al fracaso terapéutico. Aunque el número de casos y controles es reducido ha sido capaz de ofrecer resultados con significancia estadística. En ambos grupos el genotipo más frecuente es el *1b* existiendo concordancia con la frecuencia observada en otros países como Italia por Chemello,<sup>82</sup> en Francia por Peignoux y Poynard,<sup>83,86</sup> en España por Davis y Esteban<sup>84</sup> y Estados Unidos por McHutchinson. Así mismo el serotipo *1* se ha observado con mayor frecuencia en población mexicana<sup>87</sup>

Identificamos que en nuestro Hospital el factor pre-tratamiento asociado a fracaso terapéutico está relacionado con una carga viral  $>100,000$  lo que difiere con otros trabajos donde los niveles de CV relacionados a respuesta terapéutica son valores  $<2 \times 10^6$ .<sup>85</sup> Sin embargo nuestros resultados no concuerdan con algunos trabajos reportados que evalúan la carga viral debido a que la mayoría de los estudios se

realizan en base a reportes previos y en nuestro estudio evaluamos la carga viral comparando los diferentes niveles hasta identificar una diferencia más consistente. Entre los otros factores asociados a fracaso terapéutico como son la co-infección con otro genotipo, no se ha reportado en ningún otro estudio, lo cual es una aportación de nuestro trabajo.

El género y la edad fueron también factores relacionados al fracaso terapéutico al igual que observado por Poynard, con diferencia de que la edad relacionada es mayor a 45 años comparado con >40 años en los diferentes reportes. Hacemos consideración que el genotipo 1a, el género, la edad y la co-infección con otro genotipo fueron evaluados en un análisis multivariado y simultáneo observándose que estos modifican la predicción de la CV en presencia de estas condiciones y bajo cierto grado específico. Esto es, mayor asociación de la carga viral cuando el paciente presenta >40 años, genotipos diferentes al 1a y un índice de Actividad <7. De esta manera consideramos que aunque exista asociación de la CV y concordancia con otros resultados no es posible establecer en forma general sino evaluando cada uno de los casos bajo estas consideraciones.

En la literatura existen otros factores inherentes al virus que no estudiamos y que han mostrado su relación con el fracaso terapéutico en pacientes tratados con interferón y ribavirina como es la mutación del gen que expresa la proteína NS5A y E2.<sup>88,89,90</sup>

En conclusión, consideramos que no todos los pacientes con hepatitis por virus C tratados con INFa y ribavirina en nuestro Hospital, tienen la certeza de beneficiarse con la terapia combinada y que los factores relacionados a fracaso terapéutico encontrados, se encuentran relacionados al virus. Por lo tanto es muy posible que se encuentre involucrado un factor de mutación del virus y sería necesario

identificarlo para relacionarlo con los factores encontrados. La edad y género factores difíciles de cambiar podrán ayudar a identificar los subgrupos de pacientes que ameritan ser estudiados, dado que la probabilidad de fracasar con el esquema de tratamiento es muy alta. Consideramos por lo tanto necesario, realizar estudios encaminados a identificar mutación genómica del virus y alterativas diferentes al esquema actual como terapia triple.

## Bibliografía

- 1.- Mc Callum FO. Homologous serum hepatitis. *Lancet*, 1947;2:691-2.
- 2.- Krugman S, Giles JP, and Hammond J. Infectious hepatitis: evidence for two distinctive clinical, epidemiological and immunological types of infection. *Journal of the American Medical Association*, 1965;191: 541-6.
- 3.- Rizzetto M, et al. Immunofluorescence detection of a new antigen-antibody system (delta-antidelta) associated with hepatitis B in liver and in serum of HbsAg carriers. *Gut*, 1977; 18: 997-1003.
- 4.- Khuroo MS. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *American Journal of Medicine*, 1980; 68: 818-823.
- 5-David O White Medical. *Virology* 1994, 433-450. New York, Academic Press.
- 6-Thomas A., Shaw-Stiffel. *Chronic Hepatitis. Infectious Diseases 2000; Vol 2: 1297-1331.* London, Chirchill Livingstone.
- 7- Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, Skalka AM. *Molecular Biology, Pathogenesis and contro. Virology 2000:595-628, Washington, ASM PRESS.*
- 8- Hootnagle JH and Suc tralka T. *Natural Institutes of Health consensus Development Conference Panel Statment Management of Hepatitis C. Hepatology 1997; 26 (sup 1):25-105*
- 9- Simons P, Halmes EC, Cha TA, Chan SW, Mc Omish F, Irvine B, Beall E. Clasification of hepatitis C. Virus info six mayor genotypes and a series of subtypes by philogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993;74:2391-2399
- 10- Pourcell R. The hepatitis C virus. Overview: *Hepatology 1997;26(Sup 1):115-145*
- 11- Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology 1997;26:625-655.*
- 12- Stephen DR. *Virol Hepatitis. Infectious Diseases 2000; vol 1 : cap. 2 39.1-39.12.* London Mosby.
- 13- Tomás A, Shaw S. *Chronic hepatitis. Cap 103. Infectious Diseases 2000; vol 2: 1297-1331.* London Fifth Edition Chirchill Livingstone.
- 14- *Consenso Latino Americano de Hepatitis viral por virus C. Octubre 2000.*
- 15- Heintges T, Wands JR, *Hepatitis C Epidemiology and Transmission. Hepatology 1997;26:521-526*

16-Zein NN, Rakela J, Krawitt EL. Hepatitis C virus genotypes in the United States: Epidemiology, pathogenicity and response to interferon therapy. *Ann Intern Med* 1996;125:634-639.

17-Lau JYN, Davis GL, Prescott LE. Distribution of hepatitis C virus genotypes determined by line probe assay in patients with chronic hepatitis C seen at tertiary referral centers in the United States. *Ann Intern Med* 1996;124:868-876

18-Mellor J, Walsh EA, Prescott LE. Survey of type 6 group variants of hepatitis C virus in southeast Asia by using core based genotyping assay. *J Clin Microbiol* 1996;34:417-423.

19- Patrick M. Hepatitis C: the clinical spectrum of the disease. *Journal of Hepatology* 1999;31:(sup 1):9-16

20- Koff RS, Dienstag JL. Extrahepatic manifestations of hepatitis C and association with alcohol liver disease. *Semin Liver Dis* 1995;15:247-267.

21- Fatovich G, Giustina G, Degos F, et al. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis C: A follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 1997;112:463-47)

22- Corrao G, Arcio S. Independent and combined action of hepatitis C virus infection and alcohol consumption on the risk of symptomatic liver cirrhosis. *Hepatology* 1998;27:914-919

23-Ostapowicz G, Watson KJR, Locarnini SA. Role of alcohol in the progression of liver disease caused by hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1998;27:1730-1735

24- Taylor RSD, Foster GR, Arora S, Hargreaves S, Thomas HC. Increase in primary liver cancer in the UK, 1979-1994. *Lancet* 1997;350:1142-3.

25 Castels L, Vargas V, González A, Esteban J, Esteban R, Guardia J. Long interval between HCV infection and the development of hepatocellular carcinoma. *Liver* 1995,15:159-63

26-Donato F, Boffetta P, Puoti M. A metaanalysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1998;75:347-354.

27-Tang L, Tanaka Y, Enomoto N, Marumo F, Sato C. Detection of hepatitis C virus RNA in hepatocellular carcinoma by in situ hybridization. *Cancer* 1995;76:2211-2216.

28- De mitri MS, Poussin K, Baccarini P, Pontisso P, D'errico A, Simon N, et al. HCV associated liver cancer without cirrhosis. *Lancet* 1995;345:413-415.

29-Goodman & Gilman. Interferón. En Bases farmacológicas de la terapéutica. 10ª Edición. Ed. McGrawHill. 1996.

- 30-Centers for Disease Control. Public Health Service inter-agency guidelines for screening donors of blood, plasma, organs, tissues and semen for evidence of hepatitis B and hepatitis C. *MMWR* 1999;40 (RR-4): 1-17.
- 31-Davis GL,MD, Esteban MR, MD, Rustigi V, MD, Hoefs J,MD, Gordon SC,MD, Trepo Ch, MD, Shiffman ML, MD, Seuzem S,MD, Craxi A, MD, Ling M H, PhD and Albrecht J, PhD. Consensus for the International Hepatitis Interventional Therapy Group 1998;339(21):1493-1499.
- 32-Davis GL. Combination therapy with interferon alfa and ribavirin as retreatment of interferon relapse in chronic hepatitis C. *Semin Liver Dis* 1999;19 (suplement 1):49-55
- 33-Davis GL, Esteban MR, Rustgi V, Hoefs J, Gordon SC, Trepo C, Shiffman ML, Zeu Craxi A, Ling MH, Albrecht J. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Intervnetional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998;339(21):1493-9.
- 34-Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M and Scheuer PJ. Classification of Chronic Hepatitis: Diagnosis, Grading and Staging. *Hepatology* 1994;19 (6):1513-1520.
- 35-Bell H, Hellum K, Harthung S, Myrvang B, Ritland S, Maeland A, Von der Lippe B, Bjor Skaug K, Gutigard BG, Raknerud N, Simmonds P. Treatment with interferon-alpha 2a alone or interferon-alpha 2a plus ribavirina in patients with chronic hepatitis C previously treated with interferon -alpha 2a. Construct Group. *Scand J Gastroenterol* 1999;34(2):194-8.
- 36-Davis GL, Esteban MR, Rustgi V, Hoefs J, Gordon SC, Trepo C, Shiffman ML, Zeu Craxi A, Ling MH, Albrecht J. Interferon-alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Intervnetional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998;339(21):1493-9.
- 37-Horike N, Michitaka K, Masumoto T, Okura I, Akbar SM, Onji M. Relationship between the effect of interferon therapy and the change of hepatitis C virus non-structural 5B gene. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14(4):345-51
- 38-Murashima S, Ide T, Miyajima I, Kumashiro R, Ueno T, Sakisaka S, Sata M. Mutations in the NS5A gene predict response to interferon therapy in Japanece patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *Scand J Infect Dis* 1999;31(1):27-32.
- 39-Negro F, Baldi M, Mondardini A, Leandro G, Chaneac M, Manzini P, Abate ML, Zahm F, Dastoli G, Ballaré M, Ryff JC, Verme G and Bonino F. Continuous Versus Intermittent Therapy for Chronic Hepatitis C with Recombinant Interferon Alfa-2<sup>α</sup>. *Gastroenterology* 1994; 107:479-485
- 40-Rispeter K, Lu M, Zibert A, Wiese M, De Oliveira JM, Roggendorf M. The "interferon sensitivity determining region" of hepatitis C virus is a stable sequence element.*J hepatol* 1998;29(3):352-61.

- 41-Gale MJ Jr, Kort MJ, Katze MG . Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a Potential mechanism of interferon resistance. *Clin Diagn Virol* 1998;10(2-3):157-62.
- 42-Ghosh AK, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis c virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80(5):1179-83.
- 43-Gostin LO, Lazzarini R, Jones TS, Flaher MK. Prevention of HIV/AIDS and other blood-borne diseases among infection drug users A. National survey on the regulation of syringes and needles. *JAMA* 1997;277:53-62.
- 44-Hashimoto M, Chayama K, Kobayashi M, Tsubota A, Arase Y, Saitoh S, Suzuki Y, Ikeda MM, Koike H, Kobayashi M, Handa H, Kumada H. Fluctuations of hepatitis C virus load are not related to amino acid substitutions in hypervariable region 1 and interferon sensitivity determining region. *J Med Virol* 1999;58(3):247-55.
- 45-Horike N, Michitaka K, Masumoto T, Okura I, Akbar SM, Onji M. Relationship between the effect of interferon therapy and the change of hepatitis C virus non-structural 5B gene. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14(4):345-51.
- 46-Murashima S, Ide T, Miyajima I, Kumashiro R, Ueno T, Sakisaka S, Sata M. Mutations in the NS5A gene predict response to interferon therapy in Japanese patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *Scand J Infect Dis* 1999;31(1):27-32.
- 47-Soriano V, García SJ, Bravo R, González J, Castro A, Castilla J, Martínez OP, Colmenero M, Carballo E, Suárez D, Rodrigues PFJ, Moreno A, Del Romero J, Pedreira J, González LJ and Hepatitis-HIV Spanish Study Group. Interferon alfa for the Treatment of Chronic Hepatitis C in Patients Infect with Human Immunodeficiency Virus. *Clinical Infectious Diseases* 1996;23:585-91.
- 48-Soriano V, García SJ, Bravo R, Castro A, Odriozola PM, González J, Colmenero M, Carballo E, Suárez D, Llibre JM, Alberdi JC, Pedreira J, and González LJ. The HIV-Hepatitis Spanish Study Group. Efficacy and Safety of &-interferon Treatment for Chronic Hepatitis C in HIV-infected Patients. *Journal of Infection* 1995;31:9-13
- 49-Song J, Fujii M, Wang F, Itoh M, Hota H. The NS5A protein of hepatitis C virus partially inhibits the antiviral activity of interferon. *J of Gen Virol* 1999;80 (4):879-86.
- 50- Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999;285(5424):107-10
- 51-Sato C, Enomoto N. Mutations in the NS5A region of HCV and interferon efficacy. *Gastroenterology* 1998;115(3):796
- 52-Tao Q, Wei L, Chang J, Wang H, Sun Y. Relationship between interferon therapy and variability in nonstructural gene 5b of hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 1998;33(5):684-93.

- 53-Brown JL. Efficacy of combined interferon and ribavirin for treatment of hepatitis C. *The Lancet* 1998;351 (9096):78-79.
- 54-Bell H, Hellum K, Harthung S, Myrvang B, Ritland S, Maeland A, Von der Lippe B, Bjor Skaug K, Gutigard BG, Raknerud N, Simmonds P. Treatment with interferon-alpha 2a alone or interferon-alpha 2a plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C previously treated with interferon -alpha 2a. Construct Group. *Scand J Gastroenterol* 1999;34(2):194-8.
- 55-Davis GL, Esteban MR, Rustgi V, Hoefs J, Gordon SC, Trepo C, Shiffman ML, Zeu Craxi A, Ling MH, Albrecht J. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998;339(21):1493-9.
- 56-McHutchinson JG, MD, Gordon SC, MD, Schiff ER, MD, Shiffman ML, MD, Lee WM, MD, Rustgi VK, MD, Goodman ZD, MD, Ling MH, PhD, Cort S, MD and Albrecht JK, PhD, For the Hepatitis Interventional Therapy Group. *The New England Journal of Medicine* 1998;339(21):1485-1492
- 57-Maddrey WC. Safety of combination interferon alfa-2b/ribavirin therapy in chronic hepatitis C-relapsed and treatment-naïve patients. *Semin Liver Dis* 1999;19 (supplement 1):67-75.
- 58-McHutchinson JG, Poynard T. Combination therapy with interferon plus ribavirin for the initial treatment of chronic hepatitis C. *Semin Liver Dis* 1999;19 (Supplement 1):57-65.
- 59-McHutchinson JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman MH, Cort S, Albrecht JK. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998;339(21):1485-92.
- 60-Carlos Sáiz J, López Labrador FX, Ampurdanés S, Dopazo J, Fornis X, Sánchez Tapias JM and Rodés J. The Prognostic Relevance of the Nonstructural 5A Gene Interferon sensitivity Determining Region Is Different in Infections with Genotype 1b and 3a Isolates of Hepatitis C virus. *Journal of Infectious Diseases* 1998;177:839-47.
- 61-Camma C, Giunta M, Pinzello G, Morabito A, Verderio P and Pagliaro L. Chronic Hepatitis C and Interferon Alpha: Conventional and Cumulative Meta-analyses of Randomized Controlled Trials. *The American Journal of Gastroenterology* 1999;94(3):581-595.
- 62-Mariott E, Navas S, Del Romero J, García S, Castillo I, Quiroga JA and Carreño V. Treatment With Recombinant &-Interferon of Chronic Hepatitis C in anti-HIV-Positive Patients. *Journal of Medical Virology* 1993;40:107-111.
- 63-Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau Ch, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo Ch, Albrecht J, for the International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *The Lancet* 1998; 352(9138):1426-1432.

- 64-Reichard O, Norkrans G, Frydén A, Braconier JH, Sonnerborg A. Ola Weiland for the Swdsh Study Group 1998;351 (9096):83-87.
- 65- Rispeter K, Lu M, Zibert A, Wiese M, De Oliveira JM, Roggendorf M. The "interferon sensitivity determining region" of hepatitis C virus is a stable sequence element. *J hepatol* 1998;29(3):352-61.
- 66-Stuyver L, Rossau R, Wyseur A Duhamel M, Vanderborght B, Van Heuverswyn H, Maeretens G.. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J of Gen Virol* 1993; 74:1093-1102
- 67-Sato C, Enomoto N. Mutations in the NS5A region of HCV and interferon efficacy. *Gastroenterology* 1998;115(3):796
- 68-Song J, Fujii M, Wang F, Itoh M, Hota H. The NS5A protein of hepatitis C virus partially inhibits the antiviral activity of interferon. *J of Gen Virol* 1999;80 (4):879-86.
69. Méndez SMN, Baptista GH, Sánchez GRH, Bordes AJ, Uribe EM. Prevalencia de hepatitis B y C en donadores de sangre en un hospital de tercer nivel de la ciudad de México. *Salud Publica Mex* 1999;41475-478.
70. Kato MM, Ponce de Leòn S, Sifuentes OJ, Sigfrido RF, Calva MJ, Infante SL, Morales VF, Ponce de Leòn S. Bloodborne viral Infections in Patients Attending an Emergency Room in México City: Estimate of seroconversion Probability in Healthcare Workers After an Occupational Exposure. *Infection Control And Hospital Epidemiology* 2000; 21:600-602
71. Hernández PRF, Frias SJA, Del Angel GO. Seroprevalencia de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C en donadores de sangre del Hospital Central Militar. *Salud Pública Mex* 1994;36:538-540.
72. Guerrero RJF, Castañeda A, Rodríguez MM. Prevalencia y factores de riesgo asociados a hepatitis C en donadores de sangre en el municipio de Durango, México. *Salud Pública de México* 1996;38:94-100.
73. Ramírez MJ, Cervantes BR, Zarate MF, Mata RN, Tello M, Navarrete N, Sosa de Martínez C. Hepatitis C virus antibodies in a Mexican population. *The Pediatric Infectious Diseases Journal* 1998;17 (2):169-170
74. McHutchinson JG,MD, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling Mei-Hsiu, Cort S, Albrecht JK adn For The Hepatitis Intervntional Therapy Groups. Terferon alfa-2b alone or in comobination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *The New England Journal of Medicine* 1998; 339(21):1465-1492.

75- Davis GL, Esteban R, Rustgi V, Hoefs J, Gordon SC, Trepo Ch, Shiffman ML, Zeuzem S, Craxi A, Ling MH, Albrecht J, For the hepatitis interventional therapy Group. *N Engl J Med* 1998;339:1493-9.

76-Camps J, Crisóstomo JC, García GM, Riezu BJ, Civeira MP, Prieto J. Prediction of the response of chronic hepatitis C to interferon alfa: a statistical analysis of pretreatment variables. *Gut* 1993;34:1714-1717.

77- Orito E, Mizokami M, Suzuki K, Ohba K, Ohno T, Mori M, Hayashi K, Kato K, Lino Sh, Lau JYN. Loss of Serum HCV RNA at Week 4 of Interferon –a Therapy Is Associated With More Favorable Long-Term Response in Patients with Chronic Hepatitis C. *Journal of Medical virology* 1995;46:109-115.

78- Izopet J, Payen JL, Alric L, Sandres K, Chariet JP, Venel JP, Duffaut M, Pascal LP, Puel J. Baseline Level and Early Suppression of Serum HCV RNA for Predicting Sustained Complete Response to Alpha-Interferon Therapy. *J Med Virol* 1998;54:86-91

79-Toyoda H, Kumada T, Nakano S, Takeda I, Sugiyama K, Kiriyama S, Sone Y, Miyata A. Significance of early measurement of serum hepatitis C virus RNA in predicting response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *European Journal of Gastroenterology, Hepatology* 1997;9:245-249

80- Peignoux MM, Marcellin P, Pouteau M, Castelnau C, Boyer N, Poliquin M, Degott C, Descombes I, Breton VL, Milotova V, Benhamou JP, Erlinger S. Pretreatment Serum Hepatitis C virus RNA Levels and Hepatitis C virus Genotype Are the Main and Independent Prognostic Factors of Sustained Response to Interferon Alfa Therapy in Chronic Hepatitis C. *Hepatology* 1995;22:1050-1056

81- Gavier B, Martínez GMA, Riezu BJI, Lasarte JJ, García N, Civeira MP, Prieto J. Viremia After One Month of Interferon Therapy Predicts Treatment Outcome in Patients With Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology* 1997; 113:1647-1653

82. Chemello L, Bonetti P, Cavalletto L, Talato F, Donadon V, Casarin P, Belussi F, Frezza M, Noventa F, Pontisso P, Benvegno L, Casarin C, Alberti A, The Triveneto Viral Hepatitis Group. Randomized Trial Comparing Three Different Regimens of Alpha-2<sup>a</sup>-Interferon in Chronic Hepatitis C. *Hepatology* 1995;22:700-706

83- Peignoux MM, Boyer N, Pouteau M, Castelnau C, Giuily N, Duchatelle V, Auperin A, Degott C, Benhamou JP, Erlinger S, Marcellin P. Predictors of sustained response to alpha interferon therapy in chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology* 1998;29:214-223.)

84- Davis GL, Esteban MR, Rustgi V, Hoefs J, Gordon S, Trepo Ch, Shiffman ML, Zeuzem S, Craxi A, Ling MH, Albrecht J, For The International Hepatitis Interventional Therapy Group. Interferon Alfa-2b Alone or in combination with Ribavirin for the Treatment of Relapse of Chronic Hepatitis C. *N Engl J Med* 1998;339:1493-9

85 -McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK. For the Hepatitis Interventional Therapy Group. Interferon alfa-2b Alone or in Combination with Ribavirin As Initial Treatment For Chronic Hepatitis C. *The New England Journal of Medicine* 1998;339(21):1485-1492.

86 -Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau Ch, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeucem S, Trepo Ch, Albrecht J. For the International Hepatitis Interventional Therapy Group. *The Lancet* 1998;352(9138):1426-1432.

87- Alvarez MMT, Vences AMA, Damasio SL, Castillo RFP, Torres J, Muñoz O. Marcadores serológicos de hepatitis C (VHC), carga viral y serotipos en donadores sanos de sangre y su grupo familiar. *Enfermedades infecciosas y Microbiología* 1999;19:S41

88- Ibarrola N, Moreno MJA, Sáiz M, García MC, Sobrino F, García BL, Iacono OL, Moreno OR, Martínez SE. Response to Retreatment With Interferon-a Plus Ribavirin in chronic Hepatitis C Patients Is Independent of The NS5A Gene Nucleotide Sequence. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2487-2495.

89 Sarrazin Ch, Berg T, Lee JH, Teuber G, Dietrich CF, Roth WK, Seuzem S. Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy. *Journal Hepatology* 1999;30:1004-1013

90- Duverlie G, Khorsi H, Castelain S, Jaillon O, Izoper J, Lunel F, Eb F, Penin F and Wychowski C. Sequence analysis of the NS5A protein of European hepatitis C virus 1b isolates and relation to interferon sensitivity. *Journal of General Virology* 1998;79:1373-1381.

91-Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, Duhamel M, Vanderborcht B, Van Heuverswyn H and Maesters G. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol* 1993;74:1093-1102.