



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN**

**“RELACIÓN ENTRE EL GENOTIPO DE IL-28B Y EL ÉXITO DEL
TRATAMIENTO ANTIVIRAL EN PACIENTES CON HEPATITIS C”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTA:

ALI BERENICE POSADA REYES

ASESOR: DR. SALVADOR FONSECA CORONADO

COASESORA: M. EN C. KARINA RUIZ TOVAR

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2014



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



ATN: L.A. ARACELI HERBÉZ CHERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Relación entre el genotipo del IL-28B y el éxito del tratamiento antiviral en pacientes con Hepatitis C

Que presenta la pasante: Ali Berenice Posada Reyes
Con número de cuenta: 410009033 para obtener el Título de: Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENCIÓN
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Febrero de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Dr. Andrés Romero Rojas	
SECRETARIO	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
1er. SUPLENTE	M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa	
2do. SUPLENTE	M. en C. Alejandro Gutiérrez García	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HHA/mmgm

DEDICATORIAS

- ❖ A Mis padres: Delfino Posada y Lupita Reyes, a quienes agradezco todo el Amor y la dedicación que me han brindado, que han hecho que busque el éxito y nunca me dé por vencida; gracias por todo el apoyo, comprensión, paciencia y cariño que nunca han faltado en casa y que han hecho lo que soy. Espero algún día llegar a ser como ustedes y ofrecerles tan solo un poco de lo que me han dado: ¡Esto es Por y Para Ustedes; los Amo!
- ❖ A Mi Hermanito Chinito gracias por estar siempre a mi lado compartiendo todos los momentos de la hermosa familia que tenemos, Nunca olvides: todo se puede lograr en esta Vida.
- ❖ A Mis Abuelitos Ofelia, Eusebio Reyes † y Elena, Adalberto Posada; quienes la felicidad y ternura incondicionales me han otorgado y desde luego me llena de alegría el saber que ustedes han sido una de las piezas claves para mi desarrollo, muchas gracias por darme lo más valioso que tengo.
- ❖ A Mí tía Ofe que me ha proporcionado herramientas claves para recorrer y acompañándome en este largo camino.
- ❖ A Mis amigas Irais, Adriana, Heidi, Denise, Karina y Perla que nunca me han dejado sola y me han demostrado el verdadero valor de la amistad.
- ❖ A Dios, a quien hoy rindo mi mente, mis deseos, mi trabajo, mi vida agradeciendo todas las oportunidades y pido que me ilumine con sabiduría y humildad.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ Al Dr. Salvador Fonseca Coronado y la M. en C. Karina Ruiz Tovar por aceptar dirigir mi trabajo de Tesis, quienes su dedicación, paciencia, sencillez y enseñanzas siempre estuvo presente a lo largo de todo el proyecto.
- ❖ A mis compañeros del Laboratorio que integran este equipo de trabajo que con sus consejos y apoyo formaron parte de mi desarrollo profesional y personal.
- ❖ A Mi amiga Karla Gabriela Ortega Sánchez de la Licenciatura en Ciencias Y Técnicas Estadísticas de la Universidad Veracruzana, por todas sus recomendaciones y su disponibilidad hicieron posible este proyecto.
- ❖ A mis profesores quienes sus enseñanzas a lo largo de toda la carrera hicieron que mi interés hacia el conocimiento y la ciencia acrecentará.
- ❖ A los profesores que integran el colegio de Inmunología; especialmente al profesor Ángel Germán; quienes sus observaciones ayudaron a mejorar el proyecto.
- ❖ A la FESC UNAM mi casa de estudios que me dio la oportunidad de desarrollarme en el ámbito profesional y colaborar en el personal.

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Inmunología de Enfermedades Infecciosas de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM bajo la dirección del Dr. Salvador Fonseca Coronado.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto Salud-2012-C01-181585 “Análisis de la Dinámica y Evolución Intrahospedero de las Variantes Virales Resistentes a los Fármacos de Nueva Generación contra el Virus de la Hepatitis C” y por La Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México a través del Programa PAPIIT TA200112 “Desarrollo de un modelo predictivo de Respuesta a la terapia con Interferón-Ribavirina en Pacientes Infeccionados con el Virus de Hepatitis C”.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	ii
ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	iv
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 HEPATITIS C	1
1.2 AGENTE ETIOLÓGICO	2
1.3 EPIDEMIOLOGÍA	6
1.4 TRANSMISIÓN DEL HCV	7
1.5 PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA HEPATITIS C	7
1.6 DIAGNÓSTICO	8
1.7 VARIABILIDAD GENÉTICA DEL HCV	9
1.8 TRATAMIENTO	13
1.9 FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL ÉXITO AL TRATAMIENTO	15
1.10 POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO	17
1.11 MÉTODOS DE GENOTIPIFICACIÓN	18
1.11.1 MICROARREGLOS	19
1.11.2 SECUENCIACIÓN	19

1.11.3 PCR EN TIEMPO REAL	20
1.11.4 SONDAS TAQMAN	20
2. JUSTIFICACIÓN	22
3. HIPÓTESIS	23
4. OBJETIVO GENERAL	23
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES	23
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	24
6. METODOLOGÍA	25
6.1 Población de Estudio	25
6.2 Extracción de DNA y Genotipificación de SNP's en la región promotora de IL-28B	25
6.3 Análisis Estadístico	26
7. RESULTADOS	27
7.1 Determinación de Frecuencias Genotípicas en Población Abierta	27
7.1.1 Frecuencias Alélicas en Población Abierta	29
7.2 Determinación de Frecuencias Genotípicas en Pacientes Infectados con HCV	30
7.2.1 Tipos de Respuesta al tratamiento en Pacientes infectados con HCV	31
7.2.1.1 Asociación del SNP rs 8099917 con el tipo de respuesta al tratamiento	31

7.2.1.1.1	Análisis Estadístico del SNP rs 8099917	32
7.2.1.2	Asociación del SNP rs 12979860 con el tipo de respuesta al tratamiento	33
7.2.1.2.1	Análisis Estadístico del SNP rs 12979860	34
7.3	Asociación entre los SNP rs12979860 y rs 8099917 y la carga viral	35
7.4	Distribución de los Genotipos Virales en la Población con HCV	38
8.	DISCUSIÓN	39
9.	CONCLUSIONES	48
10.	PERSPECTIVAS	48
11.	REFERENCIAS	49
12.	Anexo I (Carta de Consentimiento Informado)	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del HCV	2
Figura 2. Estructura del genoma del HCV	3
Figura 3. Distribución de los genotipos de HCV en la República Mexicana	6
Figura 4. Evaluación inicial y manejo del paciente con sospecha de Infección por HCV	12
Figura 5. Factores que influyen en la respuesta al tratamiento contra HCV	16
Figura 6. Funcionamiento de Sondas Taqman	21
Figura 7. Gráfica de Dispersión de Puntos para la Genotipificación del SNP rs 12979860	27
Figura 8. Frecuencia genotípica en población abierta del SNP rs 8099917	28
Figura 9. Frecuencia genotípica en población abierta del SNP rs 12979860	28
Figura 10. Frecuencia alélica en población abierta para el SNP rs 8099917	29
Figura 11. Frecuencia alélica en población abierta para el SNP rs12979860	29
Figura 12. Frecuencia genotípica del SNP rs8099917 en pacientes con HCV	30
Figura 13. Frecuencia genotípica del SNP rs 12979860 en pacientes con HCV	31
Figura 14. Tipos de Respuesta al tratamiento en Pacientes con HCV	31
Figura 15. Asociación del Genotipo de rs8099917 con el tipo de respuesta al tratamiento en 42 pacientes con RVS y 52 NR por medio de qPCR	32

Figura 16. Asociación del Genotipo de rs12979860 con el tipo de respuesta al tratamiento en 42 pacientes con RVS y 52 NR por medio de qPCR	34
Figura 17. Asociación entre el genotipo TT, la carga viral de los pacientes y las semanas del tratamiento con el SNP rs 8099917	35
Figura 18. Asociación entre el genotipo TG, la carga viral de los pacientes y las semanas del tratamiento con el SNP rs8099917	35
Figura 19. Asociación entre el genotipo GG, la carga viral de los pacientes y las semanas del tratamiento con el SNP rs8099917	36
Figura 20. Asociación entre el genotipo CC, la carga de los pacientes y las semanas del tratamiento con el SNP rs 12979860	36
Figura 21. Asociación entre el genotipo CT, la carga viral de los pacientes y las semanas del tratamiento con el SNP rs 12979860	37
Figura 22. Asociación entre el genotipo TT, la carga viral de los pacientes y las semanas del tratamiento con el SNP rs 12979860	37
Figura 23. Genotipos virales circulantes entre la población estudiada	38
Figura 24. Descripción general de la respuesta inmune antiviral para HCV	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales vías de transmisión para el HCV	7
Tabla 2. Análisis estadístico del SNP rs 8099917	33
Tabla 3. Análisis estadístico del SNP rs 12979860	35
Tabla 4. Asociación en diversas poblaciones de los SNP's rs12979860 y rs 8099917 con SVR en pacientes Infectados con HCV	42

ABREVIATURAS

DAAs	Antivirales Específicos de Acción Directa (<i>specific direct- acting antiviral agent</i>).
DNA	Acido Desoxirribonucleico.
GWAS	Estudios de asociación del genoma completo (<i>Genome Wide Association Studies</i>).
ELISA	Ensayo Inmuno enzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).
FRET	Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>).
HCV	Virus de la Hepatitis C (<i>Hepatitis C virus</i>).
HVR	Región Hipervariable (<i>Hypervariable region</i>).
IFN α	Interferón Alfa.
IL	Interleucina.
IRES	Sitio Interno de entrada de ribosoma (<i>Internal Ribosome Entry Site</i>).
IRF- 3	Proteína del Factor Regulador 3 del Interferón (<i>Protein of interferon regulatory factor -3</i>).
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social.
ISDR	Región determinante de Sensibilidad de Interferón (<i>interferón sensitivity determining región</i>).
ISG	Genes Estimulados por Interferón (<i>interferon stimulated genes</i>).
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado.
JAK	Cinasa Janus (<i>Janus Kinase</i>).
LIPA	Ensayo de Sonda Lineal (<i>Lipe Line Probe Assay</i>).
NR	No respondedores al tratamiento con HCV.
OMS	Organización Mundial de la Salud.

OR	Razón de momios (<i>Odds ratio</i>)
ORF	Marco de Lectura Abierto (<i>Open Reading Frame</i>).
PEG- IFN	Interferón Pegilado.
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real.
RBV	Ribavirina.
RIG- I	Gen inducible 1 por ácido retinoico (<i>Retinoic acid- inducible gene I</i>).
RDP	Difosfato.
RMP	Monofostato.
RNA	Ácido Ribonucléico.
RTP	Trifosfato.
RT- PCR	Retrotranscripción reacción en cadena de la polimerasa.
STAT	Traductor de la Señal y activador de la transcripción (<i>Signal transducers and activators of transcription</i>).
SRBI	Receptor Scavenger clase B tipo1 (<i>scavenger receptor class B type I</i>).
SNP	Polimorfismo de nucleótido único (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>).
SVR	Respuesta virológica sostenida (<i>Sustained Virological Response</i>).
UTR	Región no traducida (<i>Untranslated Region</i>).

RESUMEN

La hepatitis C es una enfermedad de curso crónico producida por el virus del mismo nombre (HCV); se ha reportado la existencia de dos polimorfismos de nucleótido único (SNP) presentes en regiones cercanas a los genes de IL-28B (rs12979860 CC y rs8099917 TT) asociados con el desarrollo de respuesta virológica sostenida (SVR) y, por lo tanto, al éxito del tratamiento antiviral estándar (PEG-IFN y Ribavirina), estos SNP presentan diferentes niveles de expresión de acuerdo a la etnia.

En este trabajo se realizó la genotipificación de los SNP rs 12979860 y rs 8099917 en 113 donadores sanos y 93 pacientes infectados con HCV y diagnosticados con hepatitis C, provenientes del Servicio de Gastroenterología del Hospital Regional “Lic. Adolfo López Mateos”, ISSSTE y del Servicio de Gastroenterología del Hospital de Especiales, Centro Médico Nacional “La Raza”, IMSS; para ello, el DNA de ambos grupos se purificó a partir de sangre total mediante columnas de afinidad y los SNP fueron identificados por genotipificación con sondas TaqMan por PCR en tiempo real, posteriormente se realizó el análisis estadístico para establecer la existencia de asociaciones de determinados genotipos con SVR.

En la población infectada estudiada, más del 70% presentó infección por el genotipo 1, que es el que menor respuesta presenta al tratamiento estándar; el porcentaje de pacientes No Respondedores al tratamiento fue de 55% y los que presentaron SVR fue del 45%; para el SNP rs8099917 los genotipos TT, TG y GG se presentaron en un 26, 52 y 22%, respectivamente, encontrando una asociación entre el genotipo TT y SVR: (**p=0.0033**) con un OR de 0.234 (95%CI=0.0853-0.6411) en tanto que para el rs12979860 la asociación con SVR fue con el genotipo CC: (**p=0.005**), OR 0.08 (95%CI=0.0172-0.3858), con una distribución genotípica CC, CT y TT de 17, 57 y 26%, respectivamente. Los resultados demuestran que los SNP's rs8099917 y rs12979860 son un factor predictivo de respuesta a la terapia estándar contra HCV en pacientes del área metropolitana de México.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 HEPATITIS C

La hepatitis viral en el ser humano es una patología caracterizada por necrosis hepatocelular e inflamación del hígado, causada por distintos virus hepatotrópos la cual se presenta de forma aguda o crónica dependiendo del agente viral infectante (Cordeiro y cols., 2008).

En la década de 1940, ya habían sido descritas dos tipos de hepatitis, la A y la B, pero no fue hasta la década del 70 que se logró identificar la causa y distinguirlos clínica y serológicamente. En 1974 se reportó que cerca del 25% de los pacientes sometidos a cirugía desarrollaron una hepatitis post-transfusional y el 18% de ellos dieron negativo a los marcadores de ambos virus y con características clínicas diferentes, la cual se denominó hepatitis no A no-B. Fue hasta 15 años después que George Kuo, Qui- Lim Choo y Michael Houghton lograron identificar el agente causal responsable de la hepatitis no-A no-B al cual nombraron como hepatitis C (Gómez - Álvarez, 2003).

La hepatitis C es una enfermedad contagiosa causada por la infección con el virus del mismo nombre; el cuadro clínico de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) puede ir desde un padecimiento leve que dura unas cuantas semanas hasta una afección crónica que con lleva el riesgo de sufrir cirrosis hepática o cáncer del hígado 20 o 30 años después de haber adquirido la infección; lo anterior convierte a la hepatitis C en un serio problema de salud pública en la actualidad (Te y cols., 2010; Wilkins y cols., 2010).

1.2 AGENTE ETIOLÓGICO

El Virus de la hepatitis C (HCV) es un virus envuelto miembro del género *Hepacivirus* que pertenece de la familia *Flaviviridae* (figura 1).

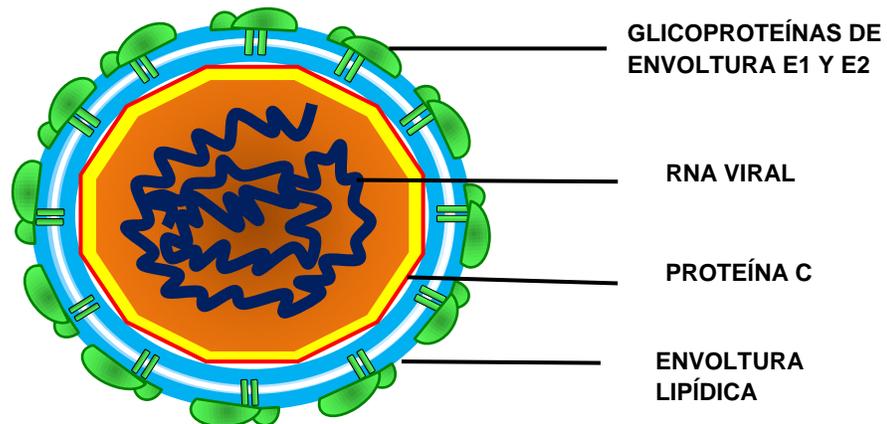


Figura 1. Estructura del HCV.

El genoma viral está constituido por una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva de aproximadamente 9,600 nucleótidos de longitud, el cual codifica para un único marco de lectura abierto (*Open Reading Frame*, ORF) que da lugar a una poliproteína de 3,006 a 3,037 aminoácidos a partir de la cual se producen las distintas proteínas funcionales tanto estructurales como no estructurales por acción de proteasas celulares y de codificación viral (Lindenbach y Rice, 2013).

La zona próxima al extremo 5' contiene las regiones que codifican para las proteínas estructurales que se denominan: core, E1 y E2; mientras que la región que codifica para las proteínas no estructurales denominadas p7, NS2, NS3, NS4A, NS5A y NS5B, se encuentran situados adyacentes al extremo 3'.

Los extremos 5' y 3' son secuencias no codificantes (*Untranslated Region*, UTR) que flanquean la ORF. La porción 5'UTR se inicia con una región de 341 bases que precede el codón de inicio de la poliproteína (figura 2); esta secuencia muy bien conservada, contiene lugares importantes para la traducción, replicación y

ensamblaje del genoma, cuya principal función es permitir la unión del ribosoma de la célula hospedera al RNA viral en la estructura conocida como IRES (*Internal Ribosome Entry Site*). La región codificadora del HCV termina en un codón final seguido por la región no codificadora 3'UTR de 27-51 bases y se ha descrito que esta región participa de manera significativa en mejorar las señales de traducción e iniciación de la síntesis de RNA viral (Bartenschlager y cols., 2013).

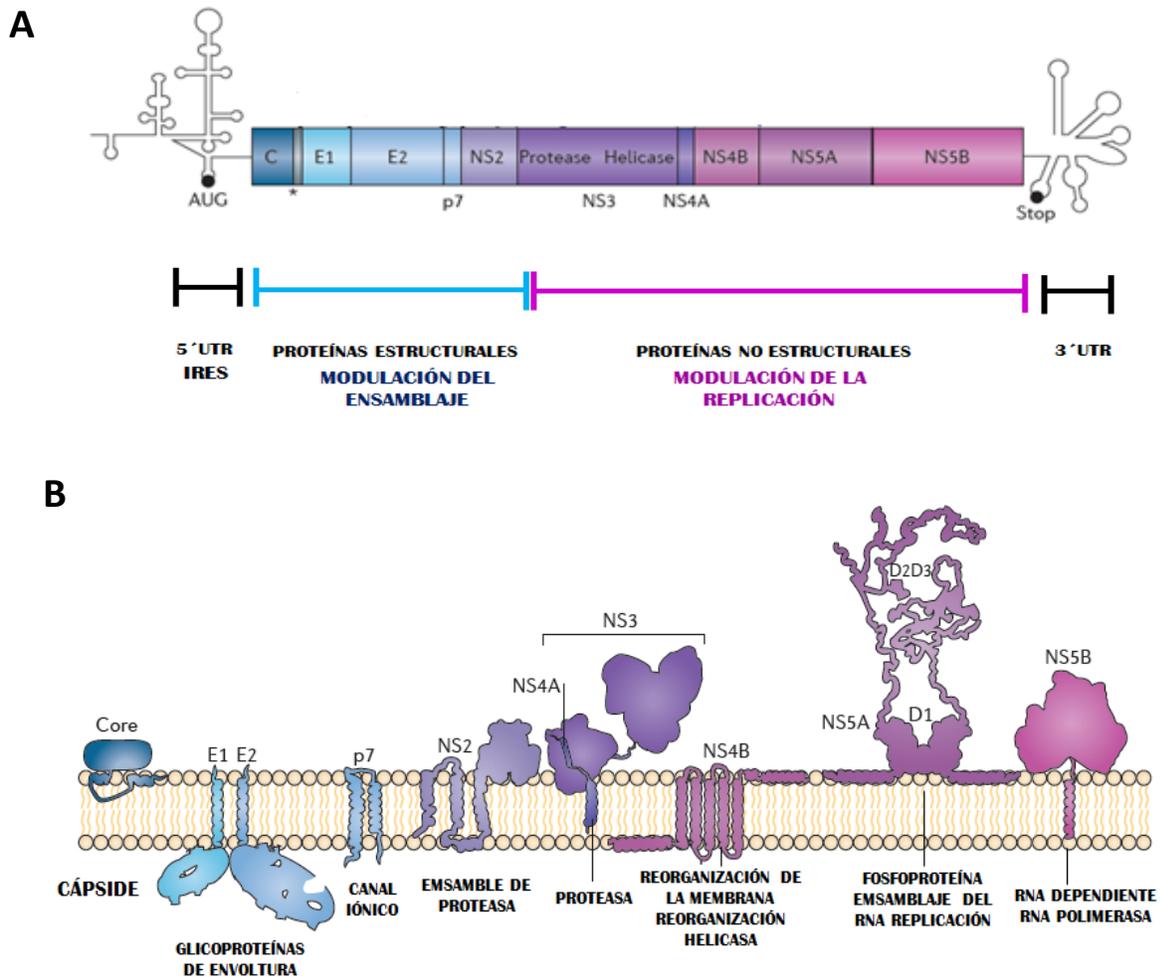


Figura 2. Estructura del genoma de HCV. (A) Poliproteína Viral; (B) Procesamiento de la poliproteína en el retículo endoplásmico (RE) (Bartenschlager y cols., 2013).

En la actualidad se han detallado las funciones de las proteínas codificadas del HCV como se describe a continuación:

La proteína C es una proteína de unión a RNA encargada de la formación de la nucleocápside viral y es procesada a partir de la poliproteína por acción de peptidasas del hospedero (McLauchlan y cols., 2002); las proteínas E1 y E2 también son procesadas por peptidasas del hospedero y forman un heterodímero que se expresa en la superficie de la membrana viral y sirve como proteína de unión a los diversos receptores identificados hasta el momento, entre los que se encuentran: CD81, SRBI (*Scavenger receptor class B type I*), heparan sulfato y las lectinas de unión a manosa DC-SIGN (CD209) y L-SIGN (CD209-L) (Pileri y cols., 1998; Scarselli y cols., 2002; Barth y cols., 2003; Lozach y cols., 2003); el polipéptido P7 se encuentra codificado entre las proteínas estructurales y las no estructurales, es cortado de la poliproteína también por acción de peptidasas del hospedero, se desconoce su función pero en sistemas de membranas artificiales funciona como canal iónico y se ha demostrado que es esencial para la infectividad del HCV en chimpancés (Griffin y cols., 2004; Sakai y cols., 2003).

La NS2 es una glicoproteína de membrana de la cual se desconoce su función como proteína madura, sin embargo, antes de ser cortada de la poliproteína, NS2 funciona como proteasa en la separación de NS2/NS3 (Pallaoro y cols., 2001).

La proteína NS3 tiene un papel dual como serina proteasa (dominio amino-terminal) y como RNA helicasa viral (dominio carboxi-terminal), la actividad de proteasa es incrementada por el cofactor NS4A permitiendo su completo plegamiento y reconstituyendo su dominio catalítico (Bartenschlager y cols., 2013), el complejo NS3/4A es responsable del procesamiento de la poliproteína a partir de la proteína NS3 que resulta esencial para la generación de los componentes del complejo de replicación viral, lo que la ha convertido en un blanco muy estudiado para el desarrollo de fármacos anti-HCV (De Francesco y Migliaccio, 2005).

El complejo NS3/4A participa también como mecanismo de evasión de la respuesta inmune innata al llevar a cabo la proteólisis de la molécula IRF-3

(*Protein of interferon regulatory factor-3*) lo que bloquea la señalización mediada por el receptor de reconocimiento de patrones RIG-I (*Retinoic acid-inducible gene 1*) (Meylan y cols., 2005).

La proteína NS4B es altamente hidrofóbica y contiene cuatro dominios transmembranales, por lo que es detectada en asociación con membranas del retículo endoplásmico sugiriendo que una de sus funciones es inducir la formación de estructuras que soporten la replicación del RNA viral (Einav y cols., 2004); la proteína NS5A es un componente del complejo de replicación viral compuesta por tres dominios y se ha descrito que participa en la regulación de la replicación por unión a las regiones 3' tanto de la cadena positiva como de la negativa del HCV y también contiene una región implicada en la resistencia al interferón conocida como ISDR (*Interferon sensitivity-determining región*), lo que la ha convertido también en un blanco para la generación de moléculas con actividad antiviral (Gale y cols., 1998; Sarrazin y cols., 2002; Huang y cols., 2005); la proteína NS5B funciona como RNA polimerasa dependiente de RNA y se encuentra en asociación con membranas derivadas del retículo endoplásmico, la estructura de la proteína permite un plegamiento en tres subdominios, en uno de ellos se encuentra la actividad enzimática, en tanto que los otros dos modulan la interacción con el RNA (Bartenschlager y cols., 2013) .

1.3 EPIDEMIOLOGIA

En el plano mundial la OMS considera que existen alrededor de 170 millones de individuos infectados con Hepatitis C y en México, de acuerdo con los datos de los bancos de sangre, se estima una prevalencia de 0.47 % a 1.2% ubicándolo en un nivel epidemiológico intermedio; las edades de mayor incidencia en la República Mexicana oscilan de los 41 a 50 años siendo el género Femenino el que presentan mayor porcentaje de infección (Vera de León y Cols., 2005).

El genotipo 1 viral es el más frecuente en México, este tipo de virus tiene mayor resistencia al tratamiento por lo que es de vital importancia realizar estudios epidemiológicos constantes con el fin de identificar las frecuencias de este genotipo viral en el país. En la figura 3 se muestra la distribución de los genótipos en diversas regiones geográficas (Méndez y Cols., 2010; Sánchez y Cols., 2007).

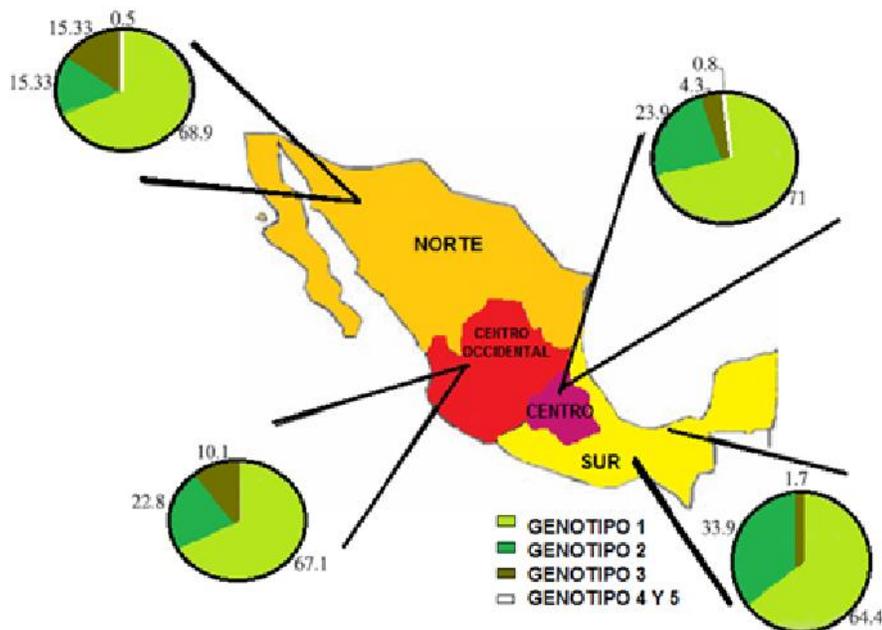


Figura 3. Distribución de los genotipos de HCV en la República Mexicana
Adaptado de (Sánchez- Ávila y Cols., 2007)

1.7 TRANSMISIÓN DEL HCV

La principal vía de transmisión a nivel mundial es la transfusión de sangre infectada, seguido del uso de drogas intravenosas, de objetos punzocortantes contaminados, y en menor porcentaje la hemodiálisis, contacto sexual, tatuajes, perforaciones corporales, exposición ocupacional y transmisión materno fetal (línea vertical) la cual está en función de la carga viral de la madre infectada, la tabla 1 resume las principales vías (Vera y cols., 2005; Diago y Planas, 2004).

PRINCIPALES VIAS DE TRANSMISIÓN PARA EL HCV		
DEMOSTRADAS MUY EFICIENTES	DEMOSTRADAS MUY SOSPECHOSAS POCO EFICIENTES	SOSPECHOSAS NO PROBADAS
<ul style="list-style-type: none">• TRANSFUSIONES DE SANGRE• DROGADICCIÓN• TRASPLANTE DE ÓRGANOS	<ul style="list-style-type: none">• PINCHAZO ACCIDENTAL• LÍNEA VERTICAL• CONTACTO SEXUAL• TATUAJES	<ul style="list-style-type: none">• ACUPUNTURA• PIERCING• COCAINA INTRANASAL

Tabla 1. Principales vías de transmisión para el HCV (Diago y Planas, 2004).

1.5 PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA HEPATITIS C

La infección por HCV es infrecuentemente diagnosticada en la fase aguda. Las manifestaciones clínicas ocurren usualmente de 7 a 8 semanas después de la infección y hasta 2 a 26 semanas más tarde; no obstante, la mayoría de las personas permanecen asintomáticas presentando solamente en algunos casos sintomatología mínima o leve cuyo principal signo clínico es la ictericia acompañada de dolor abdominal, fatiga, fiebre y náuseas. Se ha descrito la presencia de hepatitis fulminante en este periodo pero es muy rara; en la mayoría de los casos (74 a 86%, aproximadamente) la infección se torna crónica y solo es determinada cuando se presenta un cuadro clínico de cirrosis cuyo desarrollo puede ser de hasta 30 años (Franciscus, 2009).

La enfermedad crónica resulta de una infección aguda en la que no se logra eliminar al virus. En la mayoría de los casos, la inflamación crónica resulta en hepatitis con diversos grados de fibrosis, la cual puede estar acompañada sólo de fatiga o bien haber complicaciones posteriores más severas como la muerte en pacientes con cirrosis, en la que se ha estimado que se desarrolla en un 15 a 20% de estos pacientes. El tiempo de cada una de las fases de la enfermedad es muy variable pero se calcula que un tercio de los pacientes desarrolla cirrosis después de 20 años (Díaz y cols., 2003).

1.6 DIAGNÓSTICO

Existen dos formas a través de las cuales se llega al diagnóstico de HCV: la determinación de anticuerpos y posteriormente la detección de RNA viral.

La determinación de anticuerpos puede hacerse por inmunoensayos enzimáticos (ELISA) o por Western blot (RIBA, recombinant immunoblot assay) la cual presenta una mayor especificidad (Cassanova y Cassanovas, 2005).

En la detección de RNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR), es posible detectarlo de una a dos semanas posterior a la exposición al virus. Esta prueba permite el establecimiento del diagnóstico definitivo.

Una vez que se ha realizado la identificación de anticuerpos y confirmado la presencia de RNA viral, se debe conocer el genotipo infectante y la carga viral, para este propósito existen diversos métodos de genotipificación por RT-PCR (Díaz y cols., 2003).

En la Carga viral por COBAS AMPLICOR ® (ROCHE) se mide el número de partículas de RNA; expresado en UI/mL (“Unidades Internacionales por mililitro de sangre”). La prueba se emplea antes, durante y al finalizar el tratamiento; cuya

efectividad presentara una reducción del 99% visualizando la respuesta favorable o por el contrario el fracaso del mismo (Márquez y cols., 2008).

La determinación del genotipo se realiza por el ensayo de sondas conocido por sus siglas LiPA (*Line Probe Assay*), en esta prueba se analizan las variaciones en la región 5' UTR del genoma de viral y la región central de los seis genotipos; caracterizándolo por ser un método rápido, sensible y preciso; además de contribuir a ser una herramienta básica para la elección del tratamiento (Verbeeck y cols., 2008).

1.7 VARIABILIDAD GENÉTICA DE HCV

Una de las características más importantes del HCV es su sorprendente variabilidad genética, debido a una enorme velocidad de replicación viral y a la ausencia de enzimas que corrijan las mutaciones (Steinhauer y cols., 1992; Cuevas y cols., 2009).

La comparación de secuencias nucleotídicas de variantes virales colectadas en diferentes regiones geográficas del mundo ha demostrado la existencia de por lo menos seis genotipos virales, los cuales varían entre un 30-35% a lo largo del genoma completo (Simmonds y cols., 2004; Cristina, 2005).

Cada uno de los seis genotipos del HCV se divide en subgenotipos, genéticamente más cercanos, que difieren aproximadamente entre un 20-25% a nivel del genoma completo (Simmonds y cols., 2005). La evolución del virus a nivel intra-hospedero da origen a una colección de diferentes variantes virales que se encuentran genéticamente relacionadas (denominadas cuasiespecies), las cuales evolucionan en un ambiente que permite la acumulación de sustituciones nucleotídicas con una enorme frecuencia, la cual ha sido calculada entre 1.4×10^3 y 1.9×10^3 sustituciones por nucleótido por año (Ogata y cols., 1991; Okamoto y cols., 1992) contribuyendo así a definir la enorme diversidad de la población viral.

Esta capacidad del HCV de acumular sustituciones nucleotídicas le confiere, en un número importante de casos, escapar de la respuesta inmune y del tratamiento antiviral (Neumann y cols., 1998).

Basado en las metodologías convencionales y nuevas metodologías de secuenciación, se han definido las regiones genéticas virales que presentan una mayor variabilidad, así, se ha descrito que la región codificante para la proteína E2 presenta la mayor heterogeneidad nucleotídica sobre todo en las regiones denominadas HVR (*Hypervariable region*) 1 y 2, las cuales están asociadas con la patogenicidad al ser las proteínas involucradas en el reconocimiento de los receptores en las células blanco (Nasu y cols., 2011).

Otra región que presenta alto grado de variabilidad es la denominada ISDR presente en la región NS5A y la cual ha sido asociada con diferentes grados de sensibilidad a la terapia convencional con interferón pegilado y ribavirina (IFN-RBV) dependiendo de las mutaciones virales presentes (Enomoto y cols., 1996).

La región que se ha descrito con la menor variabilidad es la que codifica para la proteína C, sin embargo, un estudio ha demostrado que las sustituciones de aminoácidos presentes en esta región pueden ser utilizados como predictores de la respuesta al tratamiento con IFN-RBV (Akuta y col., 2007).

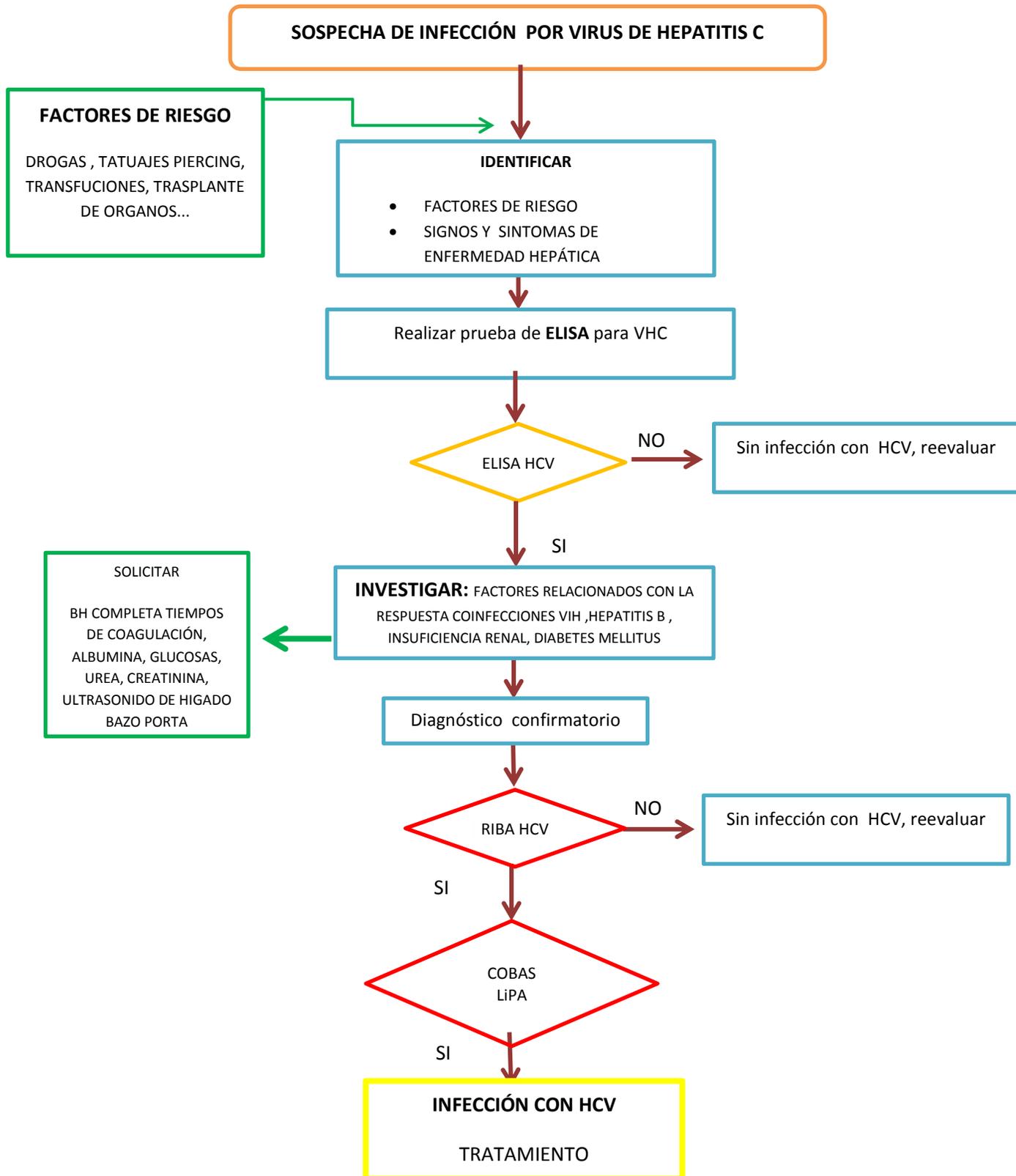
La región de la proteasa viral, también presenta un grado relativamente alto de variabilidad genética. La comparación de secuencias de la región correspondiente al gen de la proteasa y pertenecientes al mismo genotipo, pueden mostrar variaciones de hasta el 6% a nivel de la secuencia nucleotídica y hasta un 4% a nivel de aminoácidos.

En general, las secuencias consenso a nivel de aminoácidos de esta región tienden a ser más conservadas en aislados pertenecientes al genotipo 1, sin embargo, otros genotipos tales como el 3 muestran una mayor divergencia

genética incurriendo en cambios fenotípicos que en ciertas ocasiones ocurren en el sitio activo de la enzima. Así, se puede inferir que el gen codificante para la proteasa viral tiende a estar altamente conservado entre aislados pertenecientes al mismo tipo (Fusco - Chung 2012).

A continuación se presenta el algoritmo para casos de infección con HCV

Figura 4. Evaluación inicial y manejo del paciente con sospecha de infección por HCV (Diago - Planas, 2004).



1.8 TRATAMIENTO

Hasta el momento no existe una vacuna eficiente para prevenir la hepatitis C debido principalmente a la alta variabilidad genómica del HCV (Bartenschlager y cols., 2013).

Aunque la respuesta inmunológica es decisiva en la eliminación de agentes infecciosos, la mayoría de los agentes patógenos cuentan con mecanismos de evasión que restringen la eficiencia inmunológica. Esto puede dar lugar a la muerte del sujeto infectado, pero con mayor frecuencia al establecimiento de infecciones crónicas. Es aquí donde la inmunomodulación puede contribuir a resolver el problema al administrar fármacos que puedan estimular, complementar o restituir los elementos inductores o efectores de la respuesta que están siendo abatidos por la infección. Los avances de la inmunología actual han provisto de conocimientos básicos que explican cada vez mejor los mecanismos y procesos inducidos por los patrones moleculares asociados a patógenos, en la respuesta innata, y los mediados por antígenos, en la respuesta adaptativa. Así, ya es posible combinar agentes terapéuticos con actividad antiviral o antimicrobiana con elementos de la respuesta inmunológica con muy buenos resultados.

En la actualidad, el tratamiento estándar para controlar la infección por HCV es la terapia combinada de Interferón Pegilado α (PEG-IFN) y Ribavirina (RBV). El PEG-IFN presenta la ventaja de tener una reducida excreción renal con respecto a la del IFN solo, al tiempo que se incrementa su vida media. Por otro lado la RBV, como análogo sintético de la guanosina, tiene propiedades antivirales a nivel de RNA, mediante la inhibición de la síntesis de RNA y consecuentemente de la replicación viral (Angelico y cols., 2008).

La eliminación del virus por este tratamiento se conoce como Respuesta virológica Sostenida (*Sustained Virological Response*, SVR) que se define como la ausencia de RNA viral detectable en suero 24 semanas después de concluir el tratamiento (Hernández- Martínez, 2013).

La SVR está estrechamente asociada con un riesgo disminuido para el desarrollo de cáncer hepático. No obstante, los estudios clínicos y epidemiológicos han señalado que la efectividad real de este tratamiento depende del genotipo viral infectante, con resultados del 76-82% en sujetos afectados por los genotipos 2 y 3, en tanto que con el genotipo 1 (que desafortunadamente es el más común en México) disminuye al 42-46% (Bosques y cols., 2003; Jiménez y cols., 2010).

La Ribavirina es un análogo de guanósina que se fosforila intracelularmente para formar monofosfato (RMP), difosfato (RDP) y trifosfato (RTP), la incorporación de RTP por la RNA polimerasa lleva a la terminación e inhibición de la replicación, por lo que es considerado como un inhibidor de las polimerasas virales, al mismo tiempo que se incorpora a los IRES del genoma viral, inhibiendo la producción de la progenie de HCV (Mangoni y cols., 2011).

Los interferones son proteínas naturales que estimulan el sistema inmunológico para combatir infecciones virales y tumores. Existen tres tipos de IFN producidos por el organismo en respuesta a una infección viral: los interferones tipo I que incluyen al IFN α y IFN β ; el interferón tipo II incluye solo al IFN γ ; y el interferón tipo III incluye al IFN λ con tres isoformas que implican a los genes IFN λ 1 (IL29), IFN λ 2 (IL28A) e IFN λ 3 (IL-28B), los interferones tipo III están relacionados con los miembros de la IL-10 y la IL-22 que se ha demostrado que confieren hepatoprotección, además de inducir una cascada de transducción de señales muy parecida a la que inducen los IFNs tipo I, por tanto tienen actividades biológicas similares, ya que ambos tipos de IFNs tienen la habilidad intrínseca de inducir una respuesta antiviral (Balagopal y cols., 2010).

Existen dos presentaciones comerciales de IFN el PEG-IFN α 2a y PEG-IFN α 2b y se prescriben dependiendo del tipo de genotipo viral, generalmente en individuos con los genotipos 1 y 4 la terapia se establece con PEG-IFN α 2a y se les considera como grupo A. Por otro lado, aquellos pacientes que presente el genotipo viral 2 y 3, son administrados con PEG-IFN α 2b y se establecen como grupo B (Graells, 2013).

Desafortunadamente este tratamiento tiene varias contraindicaciones y numerosos efectos secundarios, el grupo A llega a presentar depresión severa, prurito, hipertiroidismo y dermatitis; mientras que el grupo B cursa generalmente con fatiga, mialgia, depresión severa, náusea, alopecia, irritabilidad, hipertiroidismo, falta de apetito y dermatitis; además que en ambos grupos se presentan de forma frecuente anomalías en sangre como neutropenia, trombocitopenia y anemia (Bartenschlager y cols., 2013).

Por lo tanto, se requieren terapias antivirales más eficaces, idealmente independientes de PEG -IFN α y Ribavirina. Un paso importante en este sentido ha sido la reciente aprobación de dos Agentes específicos del HCV de antivirales de acción directa DAAs (*Specific direct-acting antiviral agents*) los inhibidores de la proteasa Telaprevir (VX-950) y Boceprevir, pero estos fármacos todavía se dan en combinación con PEG-IFN α y Ribavirina y también son propensos a la selección para resistencia a los medicamentos. En la actualidad están por aprobarse DAAs más eficaces, aumentando la posibilidad de un tratamiento libre de IFN (Bartenschlager y cols., 2013; Hernández-Martínez, 2013; Fonseca-Coronado y cols., 2012).

1.9 FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL ÉXITO AL TRATAMIENTO

Existen factores que no dependen de la terapia y pueden predisponer en la respuesta al tratamiento como son determinadas características genéticas relacionadas con el paciente y con el propio virus que influyen de manera positiva o negativa en el tratamiento.

Entre los factores relacionados con el virus, la existencia de los 6 genotipos virales y de más de 100 subgenotipos que generan la gran variabilidad genética viral, representan una limitante para un tratamiento exitoso; así, el genotipo 1 es el que menos responde al tratamiento; por otro lado, la presencia de cargas virales elevadas (mayor a 600000 UI/ml) son un factor de predicción igualmente negativo (Hernández- Martínez, 2013).

Hasta 2009, no se contaba con ningún indicador que pudiera predecir la respuesta al tratamiento antes de iniciar la terapia, situación que ha cambiado tras la identificación de la asociación de factores genéticos propios del paciente como son dos Polimorfismos de Nucleótido Único (SNP) cercanos a la región promotora del gen que codifica para IL-28B que han sido asociados con el éxito del tratamiento.

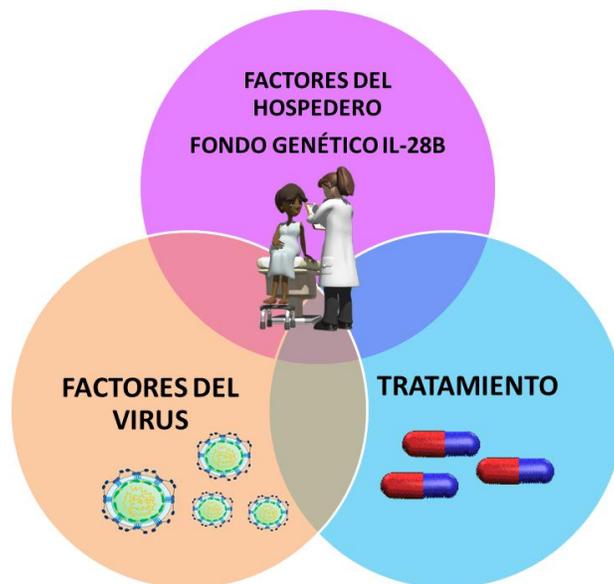


Figura 5. Factores que influyen en la respuesta al tratamiento contra HCV.

1.10 POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO

Tanto el Proyecto del Genoma Humano y el Hap Map (encargado de estudiar las variaciones genéticas exhaustivamente) sentaron las bases para los llamados GWAS (*Genome-wide association study*) que son investigaciones encaminadas a estudiar la asociación entre una variante genética y un genotipo particular.

En el 2009 estudios de GWAS en diferentes cohortes de pacientes describieron varios SNP que se asociaban con SVR en pacientes con Hepatitis C y se localizaban en el cromosoma 19 (19q13), en las inmediaciones de los genes que codificaban para la familia de INF- λ , cercanas al gen de IL-28B, las cuales expresan potentes citocinas antivirales endógenas que, al igual que el IFN tipo 1 comparten la vía de señalización JAK/STAT e inhiben o controlan la replicación del HCV.

Los SNP con una asociación más fuerte que se detectaron cerca del gen de IL-28B se denominaron rs12979860 y rs8099917; están separados por 4.378 bases y en fuerte desequilibrio de ligamiento (*Linkage disequilibrium*), es decir, tienen la propiedad de no segregar de forma independiente ya que poseen una frecuencia de recombinación menor del 50 % debido a que los 2 loci implicados se encuentran en el mismo cromosoma, lo que imposibilita su transferencia a la progenie de manera aleatoria (Lens y cols., 2010) .

Los dos alelos más estrechamente asociados con SVR son los SNP's rs12979860 (C) y rs8099917 (T), que presentan una distribución variada dependiendo del grupo étnico y resulta importante tomar en cuenta las frecuencias de este locus para el establecimiento de las asociaciones con SVR. Así, el alelo rs12979860 (C) está ampliamente distribuido en la población asiática, es común en individuos europeos y latinos, y raro en sujetos africanos especialmente en la región al sur del Sahara. Puesto que la distribución de este alelo correlaciona con los porcentajes de SVR en pacientes bajo tratamiento, los pacientes de origen

africano muestran las proporciones más reducidas de respuesta antiviral, mientras que las frecuencias de SVR observadas en europeos e hispanos son intermedias y altas en pacientes asiáticos. (Pearlman y cols., 2011; Donlin y cols., 2010).

En el caso del SNP rs8099917 el alelo asociado con SVR es el alelo T. A pesar de la gran información acerca de los mecanismos de acción de los IFN lambda, se desconoce cómo es que los SNP localizados en la región promotora de IL-28B afectan o modulan la señalización de estos IFN. Aunque es posible que estos polimorfismos modulen la transcripción de la IL-28B, es más probable que estén ligados al desequilibrio con uno o más SNP presentes en la región del promotor.

Alternativamente, estos SNP podrían estar modificando los sitios de unión a ciertos factores de transcripción. Así, a pesar de que se ha descrito la participación de la IL-28B en la replicación del HCV, todavía se desconoce el papel de los otros IFN lambda (IL28A y 29) en dicha infección por lo que la cuantificación de sus niveles de expresión y las diferencias en pacientes bajo tratamiento puede constituir un elemento indicativo de la capacidad de eliminación del agente y, junto con la carga viral y la genotipificación contribuir al modelo de predicción del éxito del tratamiento (Ge y cols., 2009; Suppiah y cols., 2009; Rauch y cols., 2010 Tanaka y cols., 2009),

1.11 METODOS DE GENOTIPIFICACIÓN

Los métodos actuales de determinación de SNP incluyen PCR en diversas modalidades y secuenciación de DNA. Los métodos genotípicos se han convertido en elementos esenciales en los análisis epidemiológicos, siendo poderosas herramientas que complementan las estrategias utilizadas para combatir la dispersión de las enfermedades infecciosas y una herramienta muy eficaz en el tratamiento (Vilchez y Alonso, 2009).

1.11.1 MICROARREGLOS

Los Microarreglos (*Microarray*) son placas de vidrio, compuestas por pozos, en los que se encuentran secuencias de genes que se inmovilizan. El material genético puede ser DNA, DNA complementario (DNAc) u oligonucleótidos que funcionan como sondas y se hibridarán con ácidos nucleicos complementarios provenientes de la muestra en estudio; previamente marcados con material fluorescente detectado mediante un escáner de fluorescencia. Cuando se utilizan los microarreglos para detectar polimorfismos en una secuencia del DNA se aísla el mRNA de ambas muestras y se retrotranscriben a los correspondientes cDNA, en presencia de un dNTP marcado con un fluoróforo, y los de la otra con un fluoróforo distinto, que emita fluorescencia de diferente color. A continuación las dos poblaciones de cDNA se mezclan en proporción 1:1, y el conjunto se desnaturaliza e hibrida con el microarreglo. Acabando la fase de hibridación el microarreglo es irradiado con dos longitudes de onda diferentes, lo que permite la obtención de una imagen específica para cada muestra. (Lastra- Manrique, 2005).

1.11.2 SECUENCIACIÓN

La secuenciación del DNA consiste en determinar el orden de las bases A, C, G y T en un fragmento de DNA. La secuenciación más utilizada hasta la fecha se realiza por el método descrito por Sanger de 1977, que permite obtener la secuencia de un fragmento determinado de DNA, un gen o parte de éste. Sin embargo, la alta demanda de secuenciación ha llevado al desarrollo de tecnologías de secuenciación masiva denominada como secuenciación de siguiente generación (*Next Generation Sequencing*, NGS) la cual tiene la capacidad de secuenciar otros genomas presentes en el organismo de un individuo, como genomas tumorales o polimorfismos, detectar genomas virales, como los del virus de la inmunodeficiencia humana y hepatitis, simplemente añadiendo los genomas de estos virus al genoma de referencia utilizado (Jiménez y cols., 2012).

1.11.3 PCR TIEMPO REAL

En los últimos años, la PCR en tiempo real “Real Time PCR” ha surgido como una metodología robusta y extensamente utilizada para la investigación biológica ya que puede identificar y cuantificar cantidades muy pequeñas de Ácidos Nucleicos (DNA y RNA) en forma específica.

En la PCR en tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea dentro del mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida y registrada en un lector de fluorescencia que incorporan los termocicladores, es proporcional a la cantidad de DNA formado (Lejona y cols.,2006).

1.11.4 SONDAS TAQMAN

Estas sondas están marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un apagador. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente por resonancia (*Fluorescence resonance energy transfer*, FRET) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas Taqman que son oligonucleótidos de unión específica al DNA blanco marcados con un fluorocromo donador (reportero) en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un apagador (quencher) en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador (Lejona y cols.,2006).

Se constituye de una sonda oligonucleótida con un fluorocromo reportero (HEX o FAM) unido al extremo 5' y un apagador (TAMRA) en el extremo 3'; mientras la sonda está intacta, la proximidad del apagador reduce enormemente la fluorescencia que emite el fluorocromo reportero por medio de la transferencia de

energía de resonancia de fluorescencia (FRET) a través del espacio; si la secuencia está presente se rompe por la actividad de la 5' exonucleasa de la Taq polimerasa durante la extensión, por lo que separa el fluorocromo reportero del apagador, esto aumenta la señal del fluorocromo reportero; el quitar la sonda de la cadena de la molécula blanco permite que la extensión del iniciador o primer continúe hasta el final de la cadena molde. En cada ciclo se separa más moléculas de fluorocromo reportero de sus respectivas sondas, lo que produce el aumento de la intensidad de la fluorescencia que es proporcional a la cantidad de amplicón producido. En la figura 6 se ilustra el proceso de amplificación por sondas Taqman.

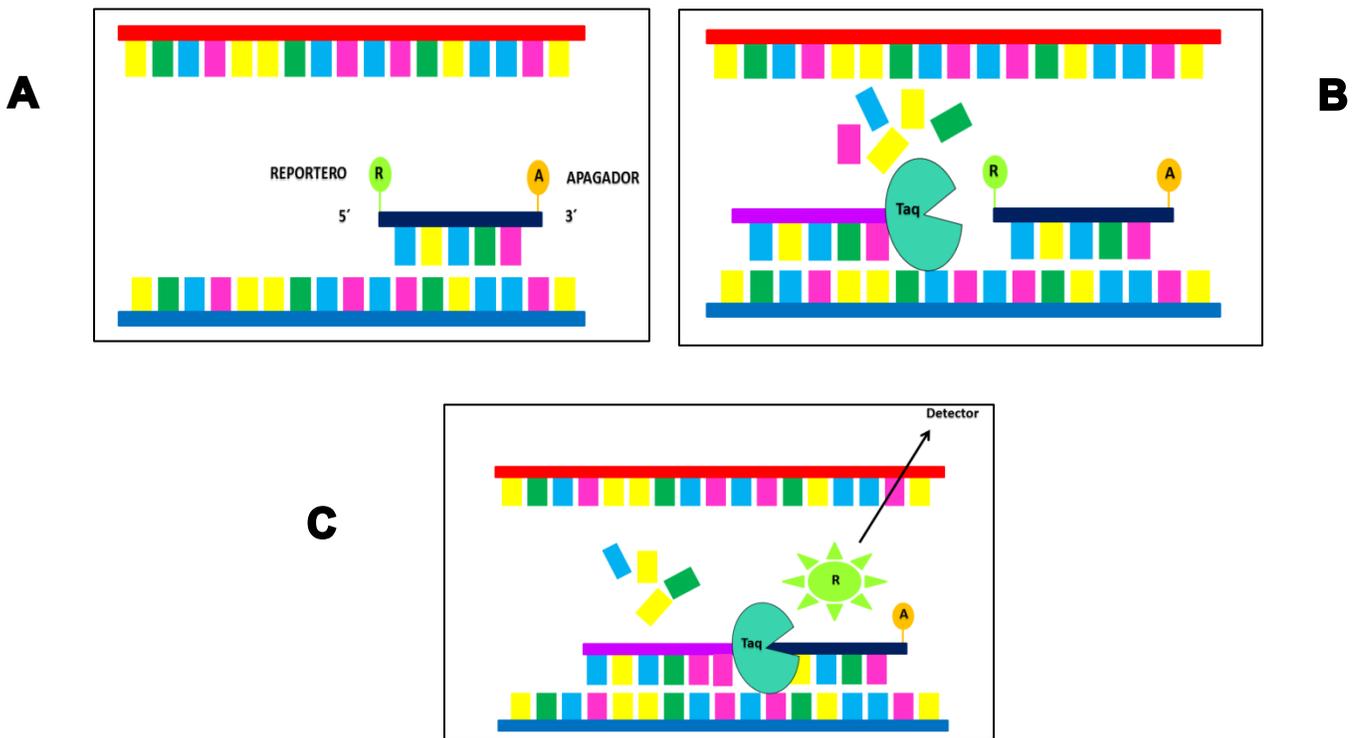


Figura 6. Funcionamiento de las sondas Taqman.

- A) Se construye una sonda con fluorocromos reportero y un apagador.
- B) La secuencia se rompe por la actividad de la 5' exonucleasa de la Taq polimerasa; al encontrar la sonda marcada con los fluorocromos.
- C) Separa el fluorocromo reportero del apagador, lo que aumenta la señal del fluorocromo reportero y es transmitida al detector.

2. JUSTIFICACIÓN

Los SNP rs12979860 y rs8099917 localizados en la cercanía de la región promotora del gen codificante para IL-28B, se han establecido en diversas poblaciones como un factor predictivo de respuesta a la terapia estándar contra el HCV (IFN α/β y ribavirina), lo que permite la modificación del esquema de tratamiento para disminuir la presencia de efectos adversos, o bien, clasificar a los pacientes para que puedan ser candidatos a la terapia con agentes antivirales de nueva generación.

Por lo anterior, en este trabajo se determinará la asociación entre el genotipo de los SNP presentes en la región promotora de IL-28B y el éxito del tratamiento antiviral con IFN α y ribavirina en pacientes mexicanos con hepatitis C, ya que hasta el momento solo existen un reporte previo en nuestro País.

3. HIPÓTESIS

El éxito del tratamiento antiviral con IFN α y ribavirina, en pacientes con Hepatitis C en población mexicana, están asociados a los genotipos TT para el SNP rs8099917 y CC para el SNP rs12979860 .

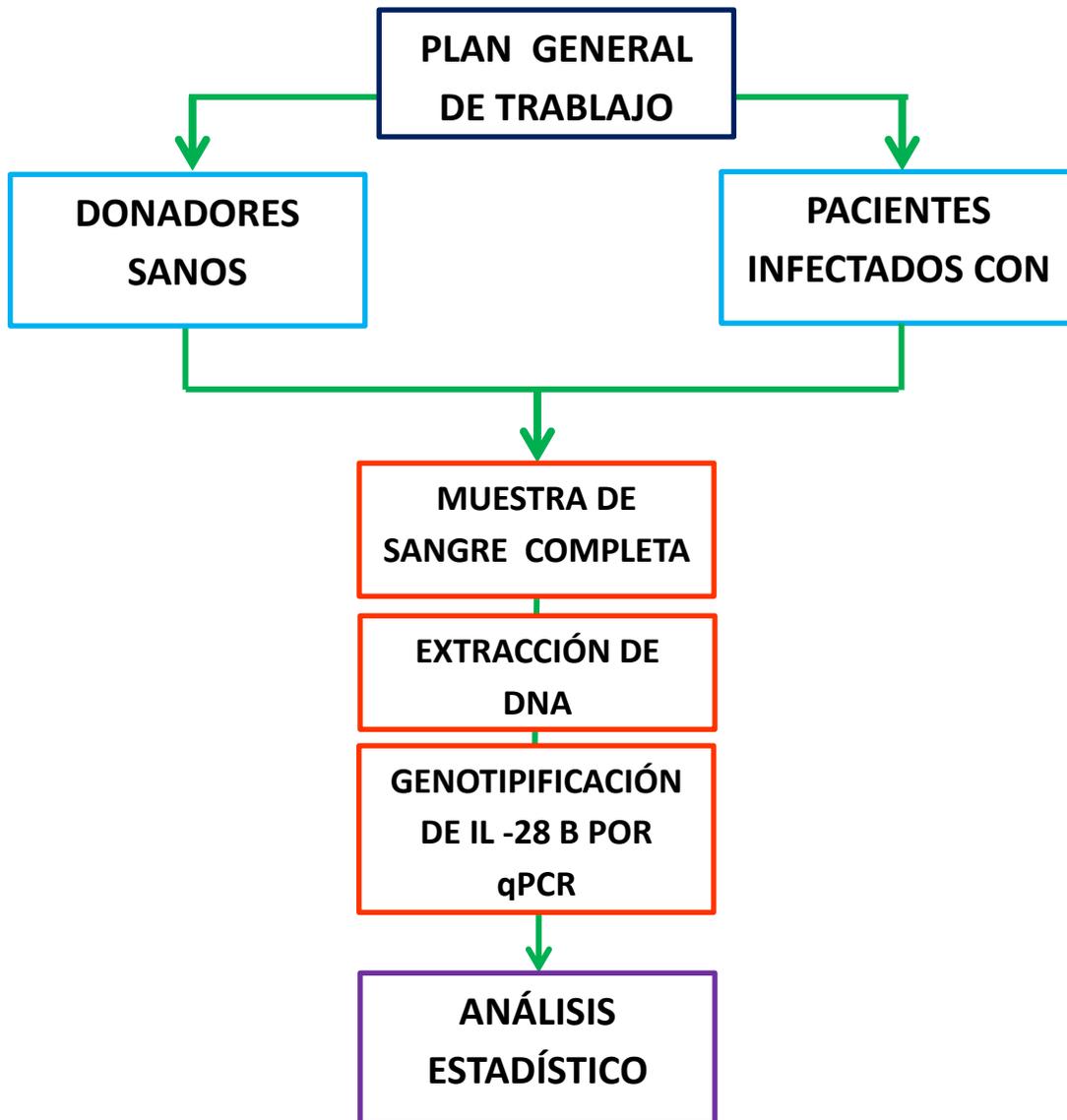
4. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la relación entre polimorfismos de nucleótido único (SNP) presentes en la región promotora de IL-28B y el éxito del tratamiento antiviral con IFN α y ribavirina en pacientes con hepatitis C.

4.1 Objetivos particulares

- Determinar el genotipo de los SNP rs12979860 y rs8099917 en pacientes con hepatitis C bajo tratamiento antiviral, en pacientes sin tratamiento y en un grupo de donadores sanos de población mexicana mediante PCR en tiempo real.
- Establecer la asociación entre los SNP rs12979860 y rs8099917 y el éxito del tratamiento antiviral con IFN α y ribavirina en pacientes con hepatitis C.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6. METODOLOGÍA

6.1 Población de Estudio

Los donadores sanos pertenecientes a personas que aceptaron participar en el estudio, que no presentaran HCV ni otras enfermedades infecciosas o inmunodeficiencias corresponden a 113 donadores.

De acuerdo a los criterios de inclusión se seleccionaron 93 pacientes mexicanos con diagnóstico de infección de HCV confirmado por la presencia de anticuerpos anti- HCV y provenientes del Servicio de Gastroenterología del Hospital Regional “Lic. Adolfo López Mateos” del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajados del Estado (ISSTE) y del Servicio Gastroenterología Hospital de Especiales, Centro Médico Nacional “La Raza”, IMSS. Los criterios de inclusión abarcaron que el paciente aceptara participar en el estudio, que no tuviera otras enfermedades infecciosas o inmunodeficiencias y que contará con la siguiente información: tiempo de infección, historial clínico, monitoreo de carga viral, inicio de tratamiento antiviral y genotipo viral infectante.

6.2 Extracción de DNA y Genotipificación de SNP's en la región promotora de IL-28B

El DNA de muestras de sangre total fue aislado mediante el empleo del equipo comercial QIAamp® DNA Blood Mini Kit (250) (Quiagen). El DNA purificado fue utilizado como molde para la amplificación específica de los SNPs rs8099917 y rs12979860 en el gen de IL-28B. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador de tiempo real PCR thermocycler Stratagene Mx 3000P-02 Utilizando el método TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied biosystems) para lo cual se utilizaron las siguientes sondas:

SNP rs8099917

TTTTGTTTTCTTTCTGTGAGCAAT[G/T]TCACCCAAATTGGAACCATGCTGTA

SNP rs12979860

CCGCGCAGTTCCCACCTGCTGTGCA[C/T]GTGAAAGGGCTTTGTAAA

La reacción de PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: pre-PCR por 10 min por 95°C, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 92°C por 15 s y alineación / extensión 60°C por 1 s, el análisis de los SNP se llevó a cabo utilizando el TaqMan Genotyper Software.

6.3 Análisis Estadístico

Las distribuciones genotípicas SNP se encuentran representadas en números (porcentajes). Se realizó una prueba de los SNPs para determinar si seguían las proporciones del equilibrio de Hardy-Weinberg, donde se comparan las frecuencias observadas y las esperadas de homocigotos y heterocigotos. Las distribuciones genotípicas para cada SNP se representaron en porcentajes. Se aplicó la prueba χ^2 con una significancia estadística al 95% y se realizó regresión logística para obtener los valores de razón de momios (Odds ratio OR) los cuales fueron calculados con un intervalo de confianza del 95%; éste OR al ser mayor a un valor de 1 indica riesgo de no responder al tratamiento y al ser menor 1 indica una asociación con protección, en este caso, con una respuesta favorable al tratamiento.

7. RESULTADOS

7.1 Determinación de Frecuencias Genotípicas en Población Abierta

Se seleccionaron individuos que fueron aceptados como donadores residentes del D.F. y Área Metropolitana. Se analizaron 113 muestras de donadores sanos, considerados como población abierta, a los cuales se les determinó el genotipo para los SNP rs12979860 y el rs8099917 por PCR en tiempo real (Figura 7).

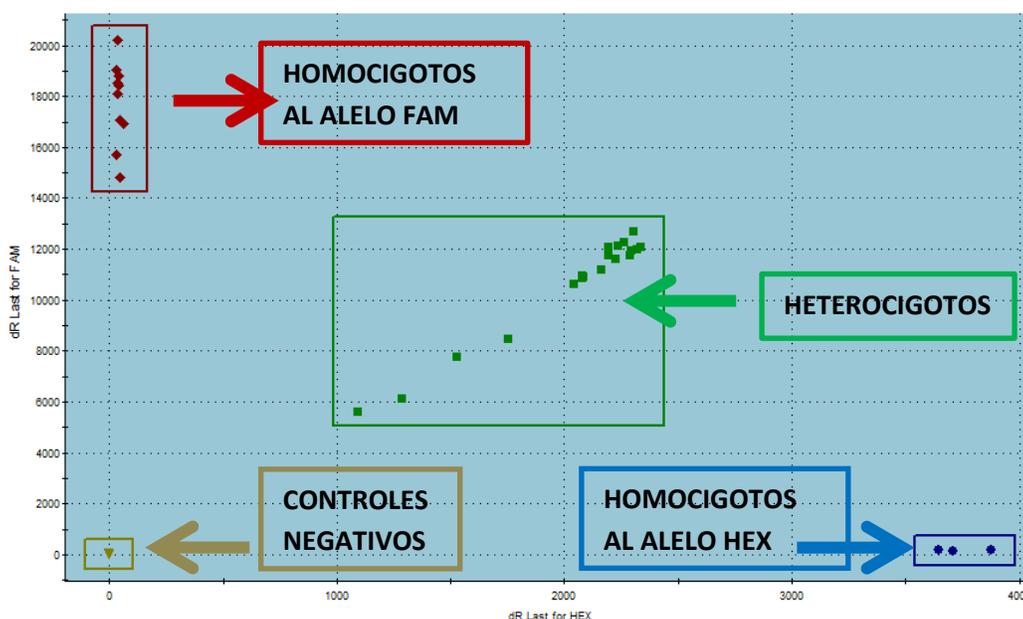


Figura 7. Gráfica de Dispersión de Puntos para la genotipificación del SNP rs12979860. Se muestran los resultados representativos de la genotipificación del SNP rs12979860 determinados por qPCR, donde se visualiza la aparición de los tres genotipos: Homocigotos CC, Heterocigotos CT y el Homocigoto TT. El alelo T que está marcado con el fluorocromo FAM y el alelo C que está marcado con el fluorocromo HEX. Así mismo se indican los controles negativos (color dorado) que requiere la reacción.

La frecuencia del rs8099917 en población abierta muestra la presencia del genotipo TT con un 28%, 51% para genotipo TG y 21% para el genotipo GG (Figura 8).

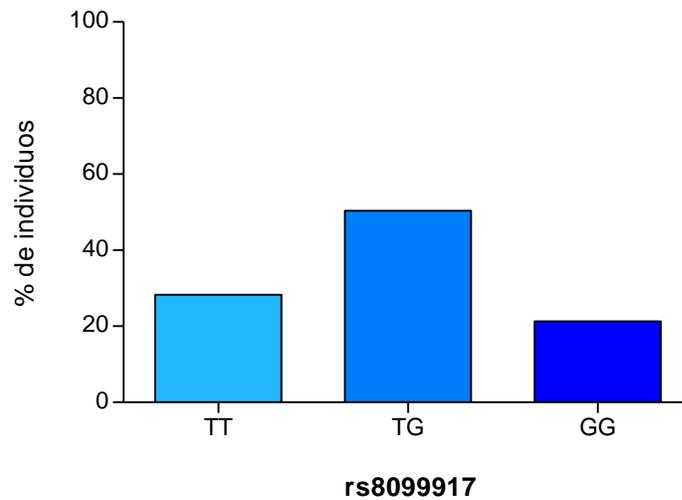


Figura 8. Frecuencia genotípica en población abierta del SNP rs8099917. n=113.

Para el SNP rs12979860, la frecuencia del genotipo CC fue de 21%, de 55% para el genotipo CT y del 24% para el genotipo TT (Figura 9).

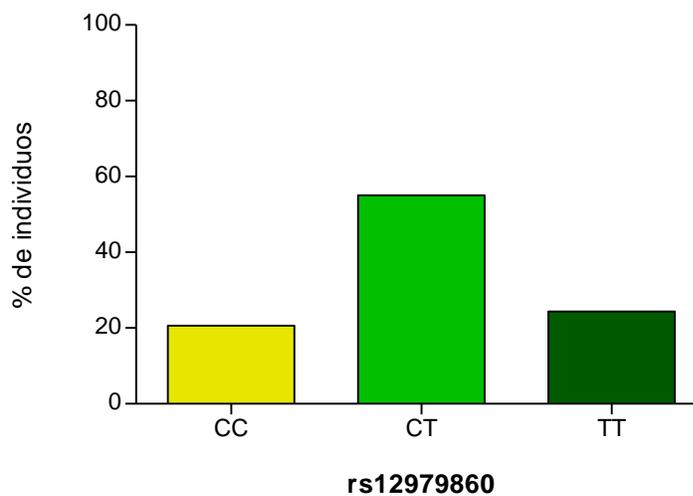


Figura 9. Frecuencia genotípica en población abierta n=113.

7.1.1 Frecuencias Alélicas en Población Abierta

La frecuencia alélica para el SNP rs8099917 en población abierta mostró la presencia del alelo T en el 52% de los individuos, mientras que para el alelo G fue del 48% (Figura 10).

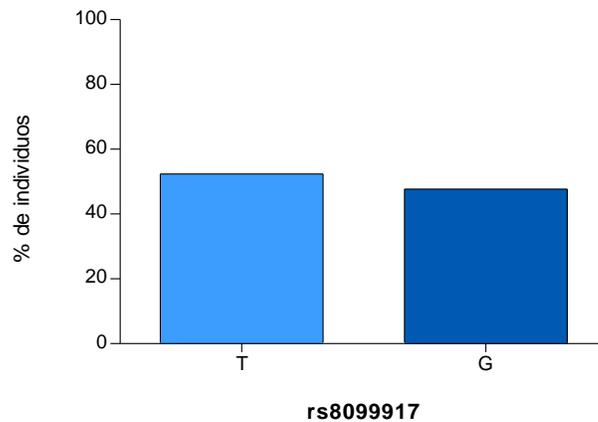


Figura 10. Frecuencia alélica en población abierta para el SNP rs8099917. n=113.

Para el SNP rs12979860, la frecuencia alélica en la población abierta fue de 49% para el alelo C y de 51% para el alelo T (Figura 11).

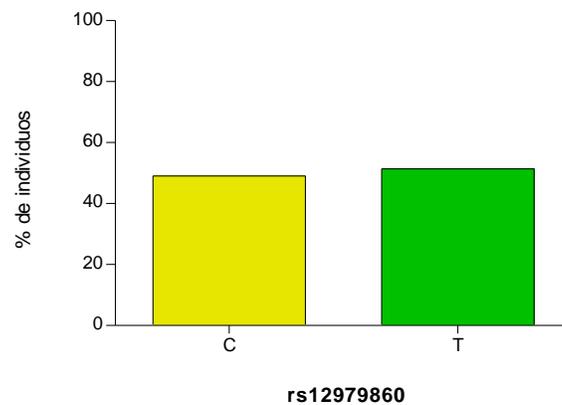


Figura 11. Frecuencia alélica en población abierta para el SNP rs12979860. n=113.

7.2 Determinación de Frecuencias Genotípicas de Pacientes Infeccionados con HCV

Se obtuvieron 93 muestras de sangre completa de pacientes con diagnóstico confirmado de infección por virus de la hepatitis C y que se encontraban en diferentes etapas del tratamiento dual con interferón-ribavirina. A partir de cada muestra se purificó el DNA y se realizó la genotipificación de los polimorfismos rs12979860 y rs8099917 en el gen IL28B.

En el caso del SNP rs8099917, el genotipo homocigoto para el alelo T tuvo una frecuencia de 26%, para el heterocigoto TG fue de 52% y 22% para el homocigoto de G (Figura 12).

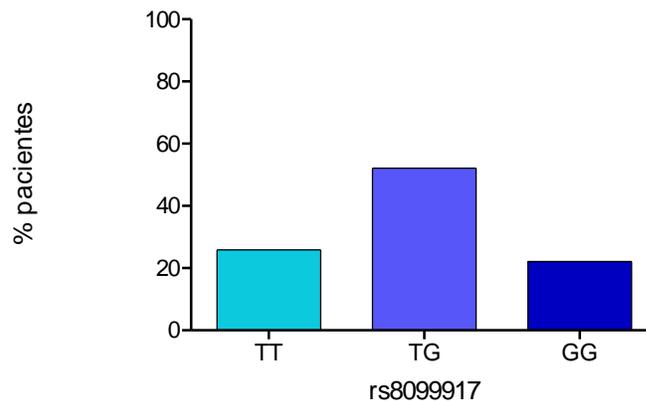


Figura 12. Frecuencia genotípica del SNP rs8099917 en pacientes con HCV. n=93.

En el polimorfismo rs12979860 el genotipo homocigoto de C presentó una frecuencia de 17%, de 57% para el heterocigoto CT y 26% para el homocigoto de T (Figura 13).

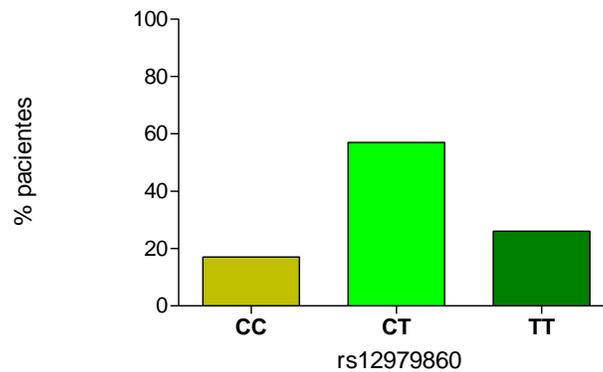


Figura 13. Frecuencia genotípica del SNP rs12979860 en pacientes con HCV. n=93.

7.2.1 Tipos de Respuesta al tratamiento en pacientes infectados con HCV

Los pacientes seleccionados presentaron dos tipos de respuesta al tratamiento: (1) los que lograron una Respuesta favorable al tratamiento es decir SVR (45%) y (2) los No Respondedores (NR, 55%) (Figura 14).

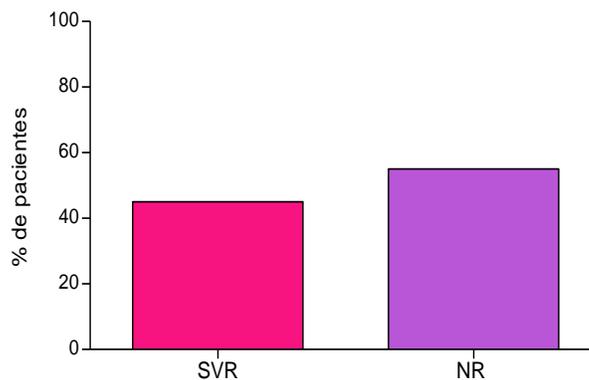


Figura 14. Tipos de Respuesta al Tratamiento en pacientes con HCV.

7.2.1.1 Asociación del SNP rs 8099917 con el tipo de respuesta al tratamiento

Posteriormente se realizó un análisis del genotipo para cada polimorfismo de los pacientes de acuerdo a su tipo de respuesta al tratamiento.

Se encontró que para el caso del SNP rs8099917, los pacientes con SVR presentaron una frecuencia de 40% para el homocigoto TT, 43% para el heterocigoto TG y 17% para el homocigoto GG. En el caso de los NR se obtuvo una frecuencia genotípica de 14% para el homocigoto TT, 59% para el heterocigoto TG y 27% para el homocigoto GG. (Figura 15)

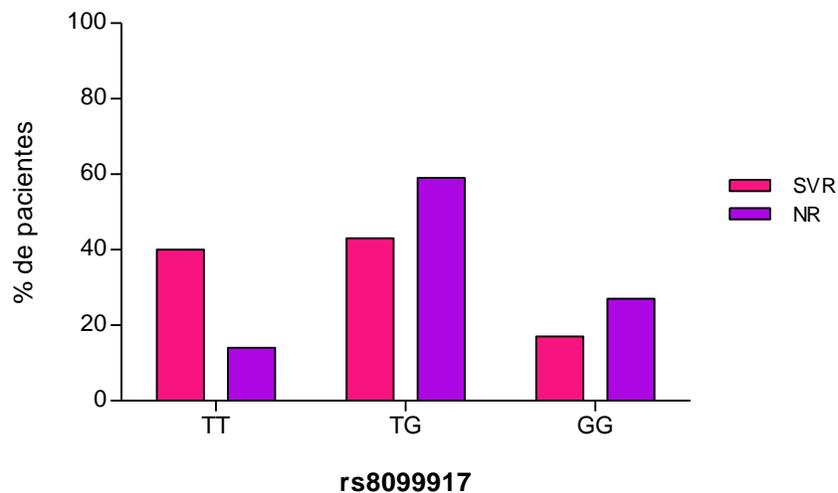


Figura 15. Asociación del genotipo de rs8099917 con el tipo de respuesta al tratamiento en 42 pacientes con SVR y 52 NR por medio de qPCR.

7.2.1.1.1 Análisis Estadístico del SNP rs 8099917

Se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos utilizando la prueba de Chi cuadrada con un intervalo de confianza del 95% (Tabla 2), se observa que al comparar el genotipo TT contra GG + TG **se encontró asociación estadísticamente significativa, entre la Respuesta Viroológica Sostenida (SVR) y el genotipo TT (p= 0.0033)** y en cuanto a la regresión logística la

prueba de Odds Ratio indicó una OR menor a uno y por lo tanto una asociación a protección (OR = 0.234). (Tabla 2)

En el genotipo GG contra él TT+ TG no se encontró asociación entre el genotipo y la RVS (p=0.808) y cabe mencionar que en la regresión logística se obtuvo un OR mayor a 1 por lo que existe riesgo mayor de no responder al tratamiento si se tiene el genotipo GG (OR= 1.136) . (Tabla 2)

DISTRIBUCION GENOTIPICA DEL SNP rs8099917 EN PACIENTES CON SVR Y NR					
GENOTIPO	NR (%)	SVR (%)	P	OR	CI (95%)
TT	7(14)	17(40)	0.0033	0.234	.0853-0.6411
GG+TG	44(86)	25(59)			
GG	14(27)	7(17)	0.808	1.136	0.4050-3.189
TT+TG	37(72)	35(83)			

Tabla 2 Análisis estadístico del SNP rs8099917. Se muestra un análisis mediante la prueba de Chi Cuadrada de las distribuciones genotípicas presentadas por los pacientes con HCV y su asociación con el éxito al tratamiento.

7.2.1.2 Asociación del SNP rs 12979860 con el tipo de respuesta al tratamiento

En cuanto al rs12979860 también se realizó un análisis para cada polimorfismo de los pacientes de acuerdo a su tipo de respuesta al tratamiento.

Se encontró en los pacientes que presentaron SVR una frecuencia de 33% para el homocigoto CC , 50% en el heterocigoto CT y 17 % homocigoto TT .

En el caso de los NR se obtuvo una frecuencia genotípica de 4% para el homocigoto CC, 63% para el heterocigoto CT y 33 % para el homocigoto TT (Figura 16).

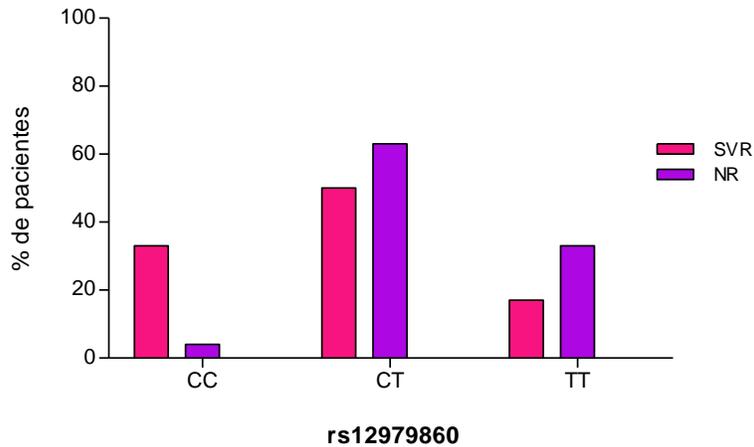


Figura 16. Asociación del genotipo de rs12979860 con el tipo de respuesta al tratamiento en 42 pacientes con RVS y 52 con NR por medio de qPCR.

7.2.1.2.1 Análisis Estadístico del SNP rs 12979860

En el análisis estadístico de rs12979860 utilizando la prueba de Chi cuadrada con un intervalo de confianza del 95% (Tabla 3) se observó que al comparar el genotipo CC contra TT + CT **se encontró asociación estadísticamente significativa, entre la Respuesta Viroológica Sostenida (SVR) y el genotipo CC (p= 0.0005) y en cuanto a la regresión logística la prueba de Odds Ratio indica una OR menor a uno y por lo tanto asociación a protección (OR = 0.08)** (Tabla 3).

Por el contrario, al comparar el genotipo TT contra él CC+ CT no se encontró asociación entre el genotipo y la SVR (p= 0.0676) y cabe mencionar que en la regresión logística se obtiene un OR mayor a 1 por lo que existe **riesgo mayor de no responder al tratamiento si se tiene el genotipo TT (OR= 2.5)**. (Tabla 3)

DISTRIBUCION GENOTIPICA DEL SNP rs12979860 EN PACIENTES CON RVS Y NR					
GENOTIPO	NR (%)	SVR (%)	P	OR	CI (95%)
CC	2(4)	14(33)	0.0005	0.08	0.0172-0.3858
TT+TC	49(96)	28(67)			
TT	17(33)	7(17)	0.0676	2.5	.9206-6.789
CC+TC	34(67)	35(83)			

Tabla 3 Análisis estadístico del SNP rs12979860. Se muestra un análisis mediante la prueba de Chi Cuadrada de las distribuciones genotípicas presentadas por los pacientes con HCV y su asociación con el éxito al tratamiento.

7.3 Asociación entre los SNP rs 12979860 y rs 8099917 y la carga viral

Con los resultados de genotipificación se procedió al análisis del éxito del tratamiento antiviral con Interferón y Ribavirina mediante la relación de la carga viral en los pacientes durante el tratamiento.

Para rs 8099917 se observó que en los pacientes con el GENOTIPO HOMOCIGOTO TT la tendencia general fue una disminución de la carga viral a límites por debajo de 1.8 log después de la semana 12 de tratamiento (Figura 17).

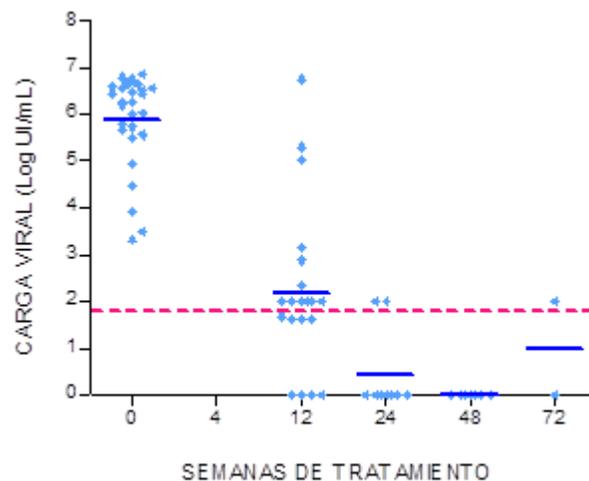


Figura 17. Asociación entre el genotipo TT, la carga viral de los pacientes y las semanas del tratamiento con el SNP rs8099917.

En cuanto a los HETEROCIGOTOS TG (FIGURA 18) Y HOMOCIGOTOS GG (Figura 19) para rs 8099917 se observa que una mayor cantidad de casos presentan límites de detección por arriba de 1.8 log en comparación con los que presentan el genotipo TT.

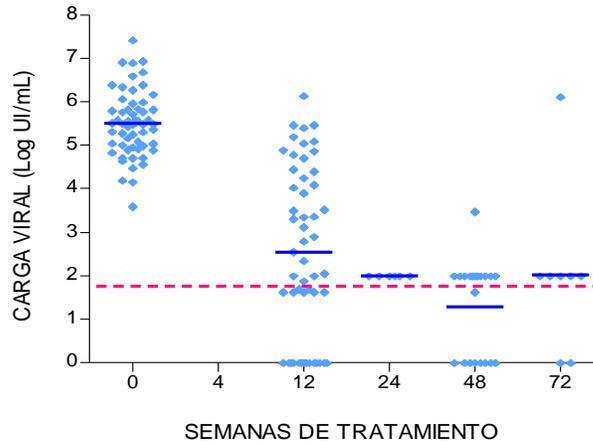


Figura 18. Asociación entre el genotipo TG, la carga viral de los pacientes y las semanas del tratamiento con el SNP rs8099917.

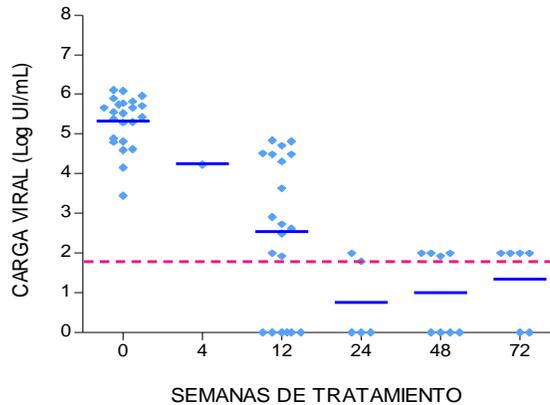


Figura 19. Asociación entre el genotipo GG, la carga viral de los pacientes y las semanas del tratamiento con el SNP rs8099917.

Para rs 12979860 se observó que en los pacientes con el GENOTIPO HOMOCIGOTO CC la tendencia general fue una disminución de la carga viral a

límites por debajo de 1.8 log después de la semana 12 de tratamiento (Figura 20).

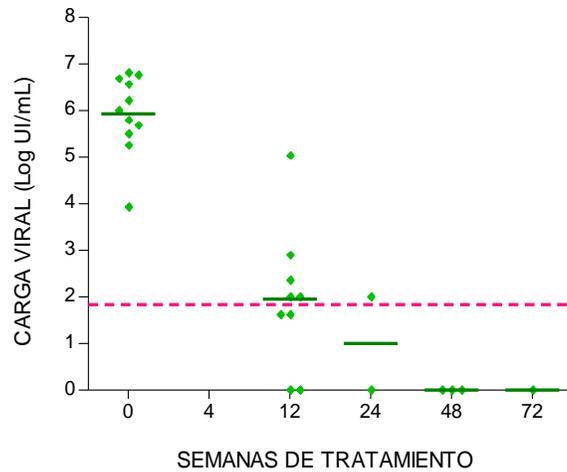


Figura 20. Asociación entre el genotipo CC, la carga viral de los pacientes y las semanas del tratamiento para el SNP rs 12979860.

En los HETEROCIGOTOS CT (FIGURA 21) Y HOMOCIGOTOS TT (Figura 22) para rs12979860, se observa que una mayor cantidad de casos presentan límites de detección por arriba de 1.8 log en comparación con los que presentan el Genotipo CC.

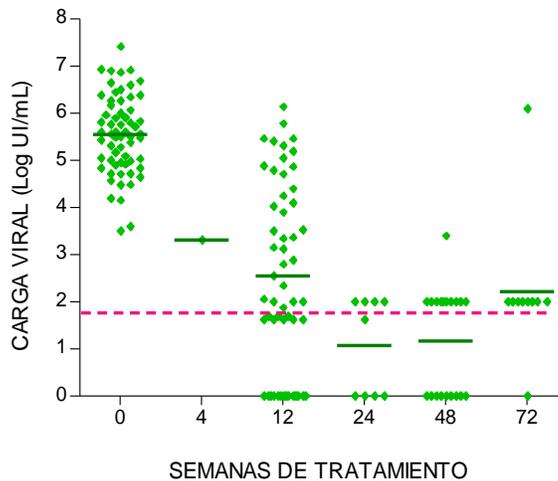


Figura 21. Asociación entre el genotipo CT, la carga viral de los pacientes y las semanas del tratamiento para el SNP rs 12979860.

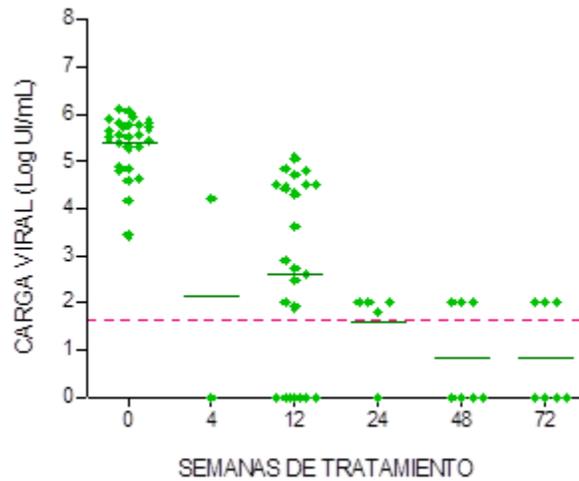


Figura 22. Asociación entre el genotipo TT, la carga viral de los pacientes y las semanas del tratamiento para el SNP rs12979860.

7.4 Distribución de los Genotipos Virales en la población con HCV

En la población de estudio se determinó el genotipo viral infectante, en un 76% de los casos el genotipo identificado fue el 1.

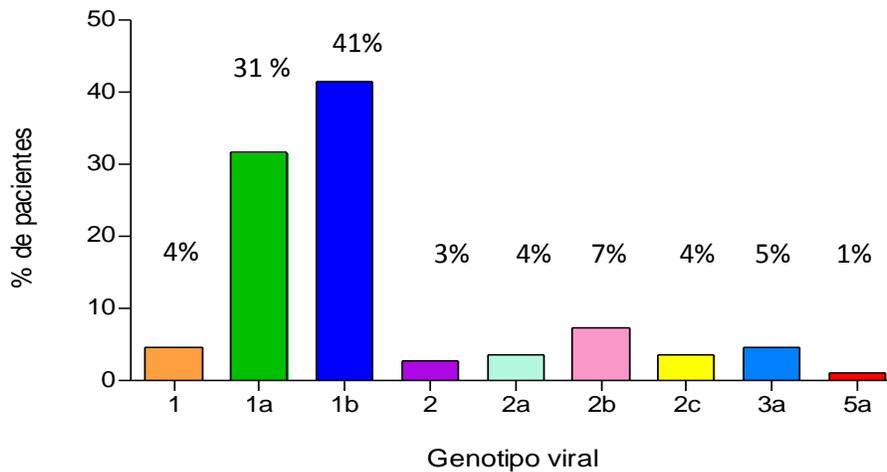


Figura 23. Genotipos virales circulantes entre la población estudiada.

8. DISCUSIÓN

El tratamiento estándar para la infección con Hepatitis C según el National Institutes of Health (NIH) es una combinación de interferón (IFN)- α (2A o 2B) pegilado y ribavirina, el tratamiento, por sí solo, es caro, el IFN – α 2 A (Roche o Schering plough) tiene un costo por mes de aproximadamente \$11,344.89; mientras que el IFN- α 2 B (Roche o Schering plough) de \$10,948.72 y la Ribavirina de \$2,160.93 (Schering); es decir que por un año de tratamiento de IFN α 2A + Ribavirina se tiene un costo aproximado de **\$162,069.83 por paciente** (Graells, 2013), con los potenciales efectos secundarios que se presentan y que en general afectan a el 70 % de los pacientes los cuales sufren neutropenias y trombocitopenias, mientras que alrededor del 60% presenta problemas psiquiátricos, mialgias y cefaleas y el 30% de los pacientes sufre insomnio y anorexia por la administración de este tratamiento (Ascione y cols., 2010), lo anterior representa un gran riesgo con la baja probabilidad de éxito en el caso de pacientes con el genotipo 1, que es el más común en nuestro País.

Por lo anterior, la identificación de marcadores moleculares de respuesta al tratamiento es un reto muy importante. Recientemente se están realizando diversos estudios clínicos para identificar y estratificar a los pacientes con mayor predisposición a responder al tratamiento así como el desarrollo de nuevos y mejores agentes terapéuticos. Los trabajos de investigación en este campo se centran en ver la variabilidad en “**genes candidatos**” que codifican elementos clave en la respuesta inmune antiviral (Graells, 2013).

En el presente trabajo para la genotipificación de los SNP rs12979860 (C/T) y rs 8099917 (G/T) presentes en la región promotora de IL28B primero se realizó la obtención de DNA en cada muestra (donadores sanos y población infectada de HCV) el criterio de pureza que se utilizó fue la relación de A260 / A280 la cual respetó el intervalo de 1.6 a 2.0 establecido para la obtención de DNA puro, libre de proteínas.

La determinación de los 3 genotipos para los dos SNP's (rs1279860 CC, CT, TT; rs8099917 GG, TG, TT) en población abierta presentaron un equilibrio de Hardy-Weinberg; es decir cumplen con los siguientes postulados:

- El tamaño de la población es suficientemente grande.
- El apareamiento es al azar.
- Varones y mujeres tienen frecuencias alélicas similares.
- No hay mutación, migración ni selección.

Lo que permitió continuar con el estudio y seguir con los pacientes Infectados con HCV; cabe mencionar que ambas poblaciones presentaron una distribución genotípica y alélica de manera muy similar; por lo que **no se encuentra asociado el tipo de genotipo de los SNP con susceptibilidad a la enfermedad.**

Sin embargo los pacientes seleccionados presentaron dos tipos de respuesta al tratamiento: (1) los que lograron una SVR (45%) y (2) los No Respondedores (NR, 55%) (Figura 14).

Esto es de vital importancia ya que el porcentaje mayoritario de los NR indica que **el tratamiento no se está siendo efectivo para todos los pacientes en población de origen mexicano.**

Una vez determinado lo anterior, se realizó un análisis del genotipo para cada polimorfismo en los pacientes de acuerdo a su tipo de respuesta al tratamiento.

En el análisis estadístico para el SNP rs 8099917 utilizando la prueba de Chi cuadrada (Tabla 2), se observa que al comparar el genotipo TT contra GG + TG **se encontró asociación estadísticamente significativa, entre la Respuesta Viroológica Sostenida (SVR) y el genotipo TT (p= 0.0033) y en la**

prueba de Odds Ratio **indicó una OR menor a uno y por lo tanto una asociación a protección (OR = 0.234)** .

Mientras que de igual manera en el análisis estadístico para el SNP rs 12979860 (Tabla 3) se observó que al comparar el genotipo CC contra TT + CT **se encontró asociación estadísticamente significativa, entre la Respuesta Viroológica Sostenida (SVR) y el genotipo CC (p= 0.0005) y en la prueba de Odds Ratio indica una OR menor a uno y por lo tanto asociación a protección (OR = 0.08).**

Por lo tanto Los SNP rs8099917 TT y rs12979860 CC están asociados con la respuesta favorable a la terapia estándar contra HCV en pacientes mexicanos.

Lo anterior se integra de manera similar a lo observado en otras poblaciones a nivel mundial donde ambos genotipos **rs12979860 CC** y **rs8099917 TT** tienen la misma asociación (Tabla 4), sin embargo, presentan una distribución variada dependiendo del grupo étnico. Así, el genotipo rs12979860 CC está ampliamente distribuido en la población asiática, es común en individuos europeos y latinos, y raro en sujetos africanos (Ge y cols., 2009). Puesto que la distribución de este alelo correlaciona con los porcentajes de SVR en pacientes bajo tratamiento, los pacientes de origen africano muestran las proporciones más reducidas de respuesta antiviral, mientras que las frecuencias de SVR observadas en europeos e hispanos son intermedias y altas en pacientes asiáticos (Pearlman, 2011; Donlin y cols., 2010).

Asimismo en el 2012 se publicó un artículo realizado en el Instituto Nacional de Salud Pública de Cuernavaca, Morelos (Gómez y cols., 2012); en el que se evaluaron a 83 pacientes Mexicanos infectados con HCV y se relacionaron con tres SNP's: rs 8099917, rs 12979860 y el rs 8103142 los tres identificados como predictores de RVS; sus resultados definieron que el 70% de la población no respondieron al tratamiento y solo se encontró una asociación

estadísticamente significativa en el SNP rs 12979860 genotipo CC y la respuesta favorable al tratamiento, es decir, SVR (OR = 4,83 IC 95 % = 1,12 a 20,8 **p = 0,033**) además de ser el genotipo 1 el más frecuente en la población infectada, en comparación con dicho estudio **este trabajo presenta una asociación estadísticamente significativa entre ambos genotipos rs 12979869 CC y rs 8099917 TT y la respuesta favorable al tratamiento en los pacientes infectados con HCV.** Lo anterior sugiere probables diferencias étnicas dentro de las poblaciones de estudio o también diferencias a nivel de detección metodológica.

Población	P value		N	Autores
	rs12979860	rs8099917		
Europea Africana	1.06x10 ⁻²⁵		871	(Ge y cols., 2009)
Africana Americana	2.06x10 ⁻³		191	(Ge y cols., 2009)
Hispana	4.39x10 ⁻³		75	(Ge y cols., 2009)
Japonesa		1.11x10 ⁻²⁷	142	(Tanaka y cols., 2009)
Australiana		9.25x10 ⁻⁹	293	(Suppiah y cols., 2009)
Suiza		3.11x10 ⁻⁸	1362	(Rauch y cols., 2010)
Mexicana	0.033	NSS	83	(Martínez y cols., 2012)
Mexicana	0.0005	0.0033	93	2014

*NSS No estadísticamente significativo

Tabla 4. Asociación en diversas poblaciones de los SNP's rs12979860 y rs 8099917 con SVR en pacientes infectados con HCV.

Posteriormente, con los resultados de genotipificación se procedió al análisis del éxito del tratamiento antiviral con Interferón y Ribavirina mediante la relación de la carga viral en los pacientes durante el tratamiento.

Como se mencionó, la SVR se define como la ausencia de RNA viral detectable en suero 24 semanas después de concluir el tratamiento, esta carga se puede representar como el log de la carga viral dada en UI/mL. Debido a los límites de

detección de los sistemas de cuantificación, se establece que cargas virales por debajo de 1.8 log son representativas de ausencia de RNA viral. En ese sentido, se realizó una evaluación de las cargas virales de los pacientes a las 4, 12, 24, 48 y 72 semanas de tratamiento para ver su asociación con los genotipos de IL-28B.

Para rs 8099917 se observó que en los pacientes con el GENOTIPO HOMOCIGOTO TT (asociado a SVR) la tendencia general fue una disminución de la carga viral a límites por debajo de 1.8 log después de la semana 12 de tratamiento; este resultado correlaciona con los porcentajes de SVR en este grupo de pacientes. (Figura 17)

En cuanto a los HETEROCIGOTOS TG (FIGURA 18) Y HOMOCIGOTOS GG (Figura 19) para rs 8099917 se observa que una mayor cantidad de casos presentan límites de detección por arriba de 1.8 log en comparación con los que presentan el genotipo TT. En este grupo de pacientes se encuentran incluidos todos los que no presentaron una SVR.

Para rs12979860 se observó que en los pacientes con el GENOTIPO HOMOCIGOTO CC (asociado a SVR) la tendencia general fue una disminución de la carga viral a límites por debajo de 1.8 log después de la semana 12 de tratamiento; este resultado correlaciona con los porcentajes de SVR en este grupo de pacientes (Figura 20).

En los HETEROCIGOTOS CT (FIGURA 21) Y HOMOCIGOTOS TT (Figura 22) para rs12979860, se observa que una mayor cantidad de casos presentan límites de detección por arriba de 1.8 log en comparación con los que presentan el genotipo CC. En este grupo de pacientes se encuentran incluidos todos los que no presentaron una SVR.

Todos estas asociaciones en conjunto permite presentar evidencia de que los pacientes con los genotipos TT para el caso del SNP rs8099917 y CC para el SNP rs12979860 presentan mejor respuesta al tratamiento con IFN-PEG y

Ribavirina, la cual correlaciona con cargas virales que disminuyen de forma más rápida en pacientes con éstos genotipos, lo que permite inferir que existe una mejor activación de los IFNs tipo III (IL-28B) que potencian la respuesta antiviral que se produce contra el HCV.

En la respuesta antiviral participan receptores presentes en la membrana y receptores citoplasmáticos capaces de identificar ácidos nucleicos virales y/o proteínas virales; estos incluyen miembros de la familia de receptores tipo toll (TLRs) y otros receptores como RIG-I y MDA-5 los cuales dan lugar a la activación mediada por la cinasa de TBK1 que fosforila al factor regulador 3 de interferón (IRF3) y al IRF7 y desencadena su translocación al núcleo. Esta señalización es similar a la que se produce también por la vía TLR3 –TRIF. El efecto de la señalización de estas vías es la inducción transcripcional de los interferones tipo I y III que se secretan desde la célula y actúan de forma autócrina o parácrina para promover la señalización de moléculas con actividad antiviral (Bartenschlager y cols., 2013).

La unión del IFN a sus receptores, desencadena la señalización de las cinasas JAK1 y TYK2 que conducen a la fosforilación y posterior dimerización de STAT1 y STAT2 que se asocian con IRF9 para formar el complejo ISGF3 transcripcionalmente activo, lo que resulta en la transcripción de numerosos genes estimulados por interferón (ISGs). Colectivamente, estos genes facilitan tanto la eliminación del virus de las células infectadas como la protección a las células no infectadas vecinas de la progenie viral entrante. Se ha descrito que en pacientes que responden favorablemente al tratamiento se induce un aumento de la expresión de un amplio número de genes que participan en la activación de la vía del interferón como ISG15, IFI6, IFI44L, IFI27, MX1, OASL, IRF7, IFIT3, IFITM1, EIF2AK2, HERC5 y APOBEC3A; también se ha observado una sobreexpresión de otros genes involucrados en procesos inmunes (EPSTI1), en adhesión celular (NEXN), en la regulación de la transcripción (HES4) y en otras funciones (GYPB y MT2A), figura 24. Por el contrario, en pacientes que no responden favorablemente al tratamiento se induce la sobreexpresión de un menor número de ISGs (ISG15,

IFI44L, IFI27, IRF7); además, en los no respondedores se observa también un aumento de la expresión de un gen que presenta efecto inhibitorio en la ruta del interferón (USP18) (Jímenez y cols., 2011, Bartenschlager y cols., 2013).

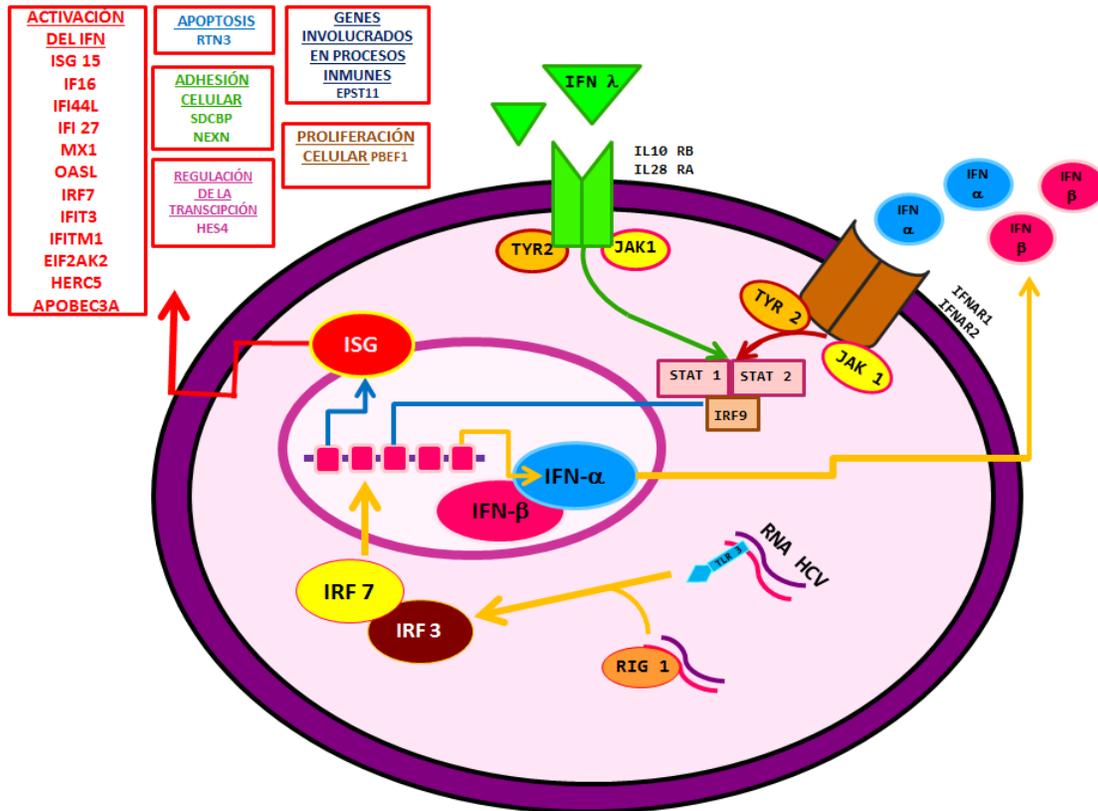


Figura 24. Descripción general de la respuesta inmune antiviral para el HCV
Adaptado de (Bartenschlager y cols., 2013).

Una hipótesis atractiva es la posibilidad de que los polimorfismos cercanos al gen de IL28B modulen, al menos en parte, esta respuesta endógena de los genes estimulados por IFN (Lens y cols., 2011; Torres y cols., 2011).

Recientemente se describió que la expresión de los ISG estaba aumentada de forma significativa en el tejido hepático de individuos que son portadores del polimorfismo de IL28B desfavorable. La lista de genes sobre regulados en pacientes portadores de genotipo rs12979860 desfavorables (CT/TT) versus

favorables (CC) apunta claramente al sistema dependiente del IFN (entre los más destacados están MX1 y OAS; proteínas que inhiben la replicación del HCV *in vitro* e *in vivo* y que dependen de IFN). Lo que no se ha descrito aún es si estas diferencias en la expresión de proteínas tan relevantes dependen directamente de un efecto solo del IFN- λ 3, por lo que el papel de cada uno de estos componentes de la respuesta antiviral y su impacto en infección por hepatitis C es aún no del todo conocido (Lens y cols., 2011).

Por otra parte en la población de estudio se determinó el genotipo viral infectante; los genotipos 1a y 1b en conjunto representan arriba del 70% de todos los casos; esto es importante ya que estos genotipos virales son los que presentan menores porcentajes de éxito al tratamiento; en los pacientes analizados , el conocer el genotipo viral, llevar el seguimiento de las cargas virales y saber el genotipo de SNP de IL-28B proporciona elementos de decisión para continuar el tratamiento o suspenderlo.

En la actualidad, se cuenta con nuevos agentes antivirales de acción directa (DAAs) capaces de inhibir específicamente la función de ciertas proteínas virales indispensables para la replicación viral, entre ellos los dos aprobados por la Federal Drug Administration de los Estados Unidos de Norteamérica en 2011, el telaprevir y boceprevir, ambos inhibidores de la proteasa viral NS3/4A y se espera que en breve se aprueben también inhibidores de la polimerasa viral como el Filibuvir (Thompson - McHutchison, 2009). Sin embargo, debido a que se ha descrito que la administración con DAAs da lugar a la selección de variantes virales resistentes al DAAs (Fonseca y cols., 2012; Zeuzem y col., 2011), el papel del PEG-IFN y la RBV sigue siendo fundamental en la terapia por lo que los nuevos esquemas de tratamiento incorporan un inhibidor de proteasa como terapia triple, cuyo costo aproximado se calcula que sea de **\$400, 000 por un año de tratamiento** por paciente; sobre todo necesario en los casos donde la terapia tradicional no es eficiente en la eliminación del HCV. Así, la administración de IFN y RBV evita en muchas instancias el desarrollo de mutantes resistentes,

circunstancia que puede ocurrir en la mayoría de los casos en los que se administran los DAAs sin PEG-IFN.

Existen múltiples factores que influyen en la decisión del tratamiento específico para el paciente como la edad, el grado de fibrosis o bien factores propios del tratamiento; pero en particular en el conocer el genotipo Viral , la carga viral del paciente y el Genotipo de IL28B representan una de las herramientas más importantes para permitir una respuesta favorable al tratamiento logrando una Respuesta Viroológica Sostenida y desde luego mejorar la calidad de vida del paciente.

9. CONCLUSIONES

- Se identificó la frecuencia de los polimorfismos rs8099917 y rs12979860 en una muestra representativa de la población del área metropolitana y del Estado de México.
- Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los genotipos TT para rs8099917 y CC para rs12979860 y la respuesta virológica sostenida (SVR) en los pacientes analizados.
- Los SNP rs8099917 y rs12979860 demostraron ser un factor predictivo de respuesta a la terapia estándar contra HCV en pacientes del área metropolitana de México.

10. PERSPECTIVAS

- Continuar con la evaluación de los genotipos de pacientes infectados y establecer la asociación en pacientes infectados con Hepatitis C en la República Mexicana.
- Implementar un sistema de evaluación donde antes de someter a tratamiento al paciente se conozca el genotipo de los SNP de IL 28B, siendo herramienta de gran utilidad para saber si el paciente es candidato a una terapia doble con IFN- PEG y Ribavirina o bien candidato a terapia triple con los inhibidores de proteasa.
- Cuantificar la expresión de la proteína de IL-28B antes, durante y después del tratamiento en los pacientes infectados con Hepatitis C.

11. REFERENCIAS

Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, et al. Predictive factors of early and sustained responses to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b: amino acid substitutions in the core region and low-density lipoprotein cholesterol levels. *J Hepatol* 2007;46: 403–10.

Angelico M, Koehler-Horst B, Piccolo P, Angelico F, Gentile S, Francioso S, et al. Peginterferon alpha-2a and ribavirin versus peginterferon alpha-2a monotherapy in early virological responders and peginterferon alpha-2a and ribavirin versus peginterferon alpha-2a, ribavirin and amantadine triple therapy in early virological nonresponders: the SMIEC II trial in naïve patients with chronic hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2008;20:680-7.

Balagopal A, Thomas DL, Thio CL. IL-28B and the control of hepatitis C virus infection, *Gastroenterology*. 2010; 139:1865-1876.

Barth H, Schafer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H, et al. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem*. 2003; 278: 41003-40012

Bartenschlager, R. Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral therapy. *Eds. Springer, Germany*. 2013; 144- 168.

Bosques F, Trejo R, Campollo O, Cortez C, Dehesa M, Maldonado H, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for treating chronic hepatitis C virus infection: analysis of Mexican patients included in a multicenter international clinical trial. *Ann Hepatol*. 2003;2:135-9.

Casanova A, Cassanovas T. Hepatitis por el virus de la Hepatitis C. Servicios de microbiología y gastroenterología, ciudad sanitaria y universidad de Bellvite, Hospitalet de Llobregat, Barcelona. 2005.

Cordeiro N., R. Taroco, H Chiparelli. Virus de las hepatitis. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. 2008; 477-513.

Cristina J. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus in the Latin American region. *J Clin Virol*. 2005;34 Suppl 2:S1-7

Cuevas J, González F, Moya A, Sanjuán R. Effect of ribavirin on the mutation rate and spectrum of hepatitis C virus in vivo. *J Virol*. 2009;83:5760-4.

De Francesco R, Migliaccio G. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *J Nature*. 2005; 436: 953-960.

Diago M., Planas R. Manual de la Hepatitis C: aspectos biológicos, clínicos y terapéuticos. Eds Medica Panamericana, Madrid. 2004; 8-140.

Díaz de León F, Santos E, Millan V, Perez H, Torre C. La hepatitis C. Jefe de la Coordinación de Cirugía General del HG Gonzalo Castañeda ISSSTE. Medicos Residentes. *Rev. Fac Med UNAM*. 2003; 46: 202-204.

Donlin J, Cannon N, Aurora L, Li J, Wahed A, Di Bisceglie A et al. Contribution of genome-wide HCV genetic differences to outcome of interferon-based therapy in Caucasian American and African American patients. 2010. *PLoS One* 5:e9032.

Einav S, Elazar M, Danieli T, Glenn JS. A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J Virol* 2004; 78: 11288-11295

Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med*. 1996; 334:77–81.

Franciscus, A. Progresion de la enfermedad: ¿Qué es la cirrosis? 2009.

Fonseca-Coronado S, Escobar- Gutiérrez A, Ruiz –Tovar K, Cruz- Rivera MY, Rivera- Osorio P, Vazquez- Pichardo M, Carpio- Pedroza JC, Ruíz-Pacheco JC, Cazares F, Vaughan G. Specific Detection of Naturally Occurring Hepatitis C Virus Mutants with Resistance to Telaprevir and Boceprevir (Protease Inhibitors) among Treatment-Naïve Infected Individuals. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(2):281-287.

Fonseca-Coronado S, Vaughan G, Cruz- Rivera MY, Carpio-Pedroza JC, Escobar-Gutierrez A. IL-28B genotyping, SNPs rs12979860 and rs8099917, by MELT- MAMA PCR analysis; a useful tool for prediction of therapy response in hepatitis C patients. *J Clin Microbiol*. 2011; 49(7):2706- 2710.

Fusco DN, Chung RT. Novel therapies for hepatitis C: insights from the structure of the virus. *Annu Rev Med*. 2012;63:373-87.

Graells M . Hepatitis C e Interleukina 28B (IL28B). Estudio de coste/beneficio de su determinación y frecuencia de polimorfismos en nuestro entorno. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital General Universitario de Alicante. España. 2013; 14:71-99.

Ge D, Fellay J, Thompson A, Simon J, Shianna K, Urban T, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *J Nature*. 2009; 461:399-401. 20

Gómez I, Álvarez M. Biología y métodos diagnósticos de la hepatitis C. Laboratorio de Síntesis de Péptidos, Centro de Inmunoensayo. Departamento de

Control de Calidad Analítico, Centro de Inmunoensayo, Habana, Cuba *Rev Biomed.* 2003; 14:253-268.

Gómez L, Chávez N, Burguete A, Aguilar N, Madrid V, Román M, Orbe C, Misael U, Méndez N. IL28 B polymorphisms predict the response to chronic hepatitis C virus infection treatment in a Mexican population. *Rev Annals of Hepatology.* 2012; 11: 876- 881.

Griffin S, Harvey R, Clarke D, Barclay W, Harris M, Rowlands D. A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J Gen Virol* 2004; 85: 451-461

Huang L, Hwang J, Sharma SD, Hargittai MR, Chen Y, Arnold JJ, et al. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J Biol Chem* 2005; 280: 36417-36428.

Hernández J y Martínez F. ¿Qué debo saber sobre el tratamiento de la hepatitis C? Associació Catalana de Malalts d'Hepatitis (ASSCAT), Grupo de Trabajo sobre tratamientos del VIH (gTt- VIH) y Federación Nacional de Enfermos y trasplantados Hepáticos (FNETH) (Barcelona). 2013.

Jímenez M, Almansa R, Fuente C, Caro A, Ruiz L, Sánchez G, González J, Aller R, Alcaide N, Largo P, Ortiz R, Bermejo J. Perfiles de expresión génica en las primeras doce semanas en pacientes con Hepatitis C crónica. *Rev EL SEVIER.* (Valladolid). 2011; 29: 573-580.

Jímenez E, Gobernado I, Sánchez A. Secuenciación de Genoma completo: un salto cualitativo en los estudios genéticos. *Rev de Neurología (Madrid).* 2012. 54:692-698.

Jiménez R, Castañeda G. Characteristics of hepatitis C treatment with pegylated interferons and ribavirin. *Ann Hepatol.* 2010;9 Suppl:61-4.

Lastra G, Manrique C. Microarreglos: herramienta para el conocimiento de las enfermedades. *Rev Col de Reumatol.* 2005 12: 263-267.

Lens S, Coto M, Pérez S y Forns, X. Genética y tratamiento de la hepatitis C: ¿hacia un tratamiento personalizado? *Rev Gastroenterología Hepatología* 2011; 5: 352-360.

Lejona S, Benetti M, Fay F, Fay O. Avances en el Diagnóstico Molecular: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Laboratorio CIBIC. Centro de Diagnóstico Médico de Alta Complejidad, Rosario, Argentina. *Fundacion Dr. J.R. VILLAVICENCIO* 2006; 14:033-037.

Lindenbach Brett D. and Rice Charles M. The inns and out of hepatitis C virus entry and assembly. *Nature*. 2013; 11:688-700.

Lozach P, Lortat H, de Lacroix, de Lavalette A, Staropoli I, Foung S, et al. DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* 2003; 278: 20358-20366.

Márquez MG, Santoscoy FA, Montoya H. Frecuencia y distribución de genotipos del virus de la hepatitis C en población mexicana seleccionada. *Rev Mex Patol Clin*. 2008; 55: 79.87.

Mangoni E, Domenico I, Umberto M. Early viral kinetics and response to treatment in a hepatitis C virus Genotype 5 infected patient. 2011; 16: 14-47.

Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, et al. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 2005; 437: 1167-1172

Mendez R, Salas F, López P, Cisneros L, Castañeda G. Distribution of HCV genotypes and HCV RNA viral load in different regions of Mexico. *J ANNALS of Hepatology* 2010 9: 33-39.

McLauchlan J, Lemberg M, Hope G, Martoglio B. Intra-membrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J EMBO* 2002; 21: 3980-3988

Nasu A, Marusawa H, Ueda Y, Nishijima N, Takahashi K, Osaki Y, et al. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus in association with antiviral therapy determined by ultra-deep sequencing. *Plos One*. 2011; 6:e24907

Neumann A, Lam N, Dahari H, Gretch D, Wiley T, et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 1998;282:103–07.

Ogata N, Alter H, Miller R, Purcell R. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3392–96.

Okamoto H, Kojima M, Okada S, Yoshizawa H, Iizuka H, et al. Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology*. 1992;190:894–99.

Pallaoro M, Lahm A, Biasiol G, Brunetti M, Nardella C, Orsatti L, et al. Characterization of the hepatitis C virus NS2/3 processing reaction by using a purified precursor protein. *J Virol* 2001; 75: 9939-9946

Pearlman B. The IL-28 genotype: how it will affect the care of patients with hepatitis C virus infection. *Curr Gastroenterol Rep*. 2011; 13:78-86.

Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; 282: 938-41

Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Mueller T, et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology*. 2010;138:1338-45

Sakai A, Claire M, Faulk K, Govindarajan S, Emerson S, Purcell R, et al. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 11646-11651

Sanchez J, Gonzalez E, Vazquez V, Suarez S, Uribe, M. Geographical distribution of HCV genotypes in Mexico. *Rev Hepatology*. 2007; 6:156-160.

Santos G, Sosa F, Vallejo V, Meléndez D, Reyes J. Prevalence of Hepatitis C virus in Mexican population: A systematic review. *Rev ELSEVIER*. Mex. 2008; 56:281.290.

Sarrazin C, Herrmann E, Bruch K, Zeuzem S. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein and interferon resistance: a new model for testing the reliability of mutational analyses. *J Virol*. 2002;76:11079-90. 21

Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 2002; 21: 5017-5025

Simmonds P, Bukh J, Combet C, Dele´age G, Enomoto N, Feinstone S, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005; 42:962–73.

Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene* 1992; 122: 281–288.

Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet*. 2009;41:1100-4.

Tanaka Y, Nishida M, Sugiyama M, Kurosaki K, Matsuura N, Sakamoto, M, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*. 2009; 41:1105-9.

Thompson A, McHutchison J. Antiviral resistance and specifically targeted therapy for HCV (STAT-C). *J Viral Hepat*. 2009;16:377–87.

Torres C, Venegas M y Brahm J. Interferones lambdas (IFNs) en infección con virus hepatitis C. Chile. *Rev Hosp Clin Univ Chile*. 2011; 22: 238- 243.

Vilchez Glenda y Alonso Gullermina. Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Rev. Venezolana de Microbiología*. 2009; 29:6-12.

Vera de León L. Juárez A, Navarro J, Díaz M, Mendez J, Chirino R. Panorama epidemiológico y situacional de la hepatitis Cen México. *Rev gastroenterol. Mex*. 2005; 70:25-32.

Verbeeck J, Stanley M, Shieh J, Celis L, Huyck E, Wollants E, Farrior A, Sablon E, Jankowski M, Schaper C, Johnson P, Van Ranst M, Van Brussel M . Evaluation of Versant Hepatitis C Virus Genotype Assay (LiPA) 2.0 *Rev Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 46: 1901-1906.

Wilkins T, Malcolm JK, Raina D, Schade RR. Hepatitis C: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician*. 2010;81:1351-7.

Zeuzem S, Andreone P, Pol S, Lawitz E, Diago M, Roberts S, et al. REALIZE Study Team. Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N Engl J Med*. 2011;364:2417-28.

Anexo I

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por este medio le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación “**Desarrollo de un modelo predictivo de respuesta a la terapia con Interferon- Ribavirina en pacientes infectados con el virus de la Hepatitis C**” que de acuerdo con los lineamientos escritos en la declaración de Helsinki y la Ley General de Salud en México, se considera como un estudio de riesgo mínimo y que requiere de esta carta de consentimiento informado con la aceptación de las personas participantes. Se me explicó que este proyecto se refiere al virus responsable de la **Hepatitis C**. El objetivo buscar diferencias en los virus y su relación con la enfermedad que se está produciendo y analizar otros factores del paciente que ayuden a explicar cómo se produce la enfermedad y a predecir de mejor forma la respuesta al tratamiento. Se me aseguró que puede preguntar todo lo relacionado al estudio y a mi participación.

Se me informó que para este estudio es necesario que yo conteste varias preguntas en no más de 15 minutos y permita que se me tome una muestra inicial de 5 mL de sangre y otra adicional del mismo volumen en cada consulta programada por los médicos tratantes, mismas que serán tomadas por una persona capacitada y que no se espera causen molestia alguna. He sido informado (a) nque tengo toda la libertad de retirar mi consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello se modifique la calidad de la atención médica que requiere mi enfermedad. Mi participación en este permitirá conocer las variedades de los virus de la Hepatitis C que hay en México y que se identifiquen los factores que permitan predecir las mejores alternativas para su tratamiento.

Autorizo la publicación de los resultados de mi estudio y se me asegura que estrictamente se mantendrá el secreto profesional en todo momento, por lo que nadie sabrá mi nombre ni mi dirección.

Con fecha _____ aseguro haber comprendido lo anterior y una vez que se me aclaran todas las dudas que tuve sobre mi participación en el proyecto, **acepto participar.**

Nombre y firma de la persona o responsable legal

Nombre y firma del testigo 1 _____

Nombre y firma del testigo 2 _____

Nombre y Firma de quien toma la muestra _____

Este documento se extiende por duplicado un ejemplar en poder de la persona que esta donando la muestra y la otra en poder del investigador.