

**UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL ESTADO DE PUEBLA.
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE POSGRADOS.
INVESTIGACIÓN Y CONSULTORÍA.**



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
COORDINACIÓN DE UMAES
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
CENTRO MÉDICO NACIONAL
GRAL. DE DIV. MANUEL ÁVILA CAMACHO**



TÍTULO DE LA TESIS

**ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO DEL GEN *IL28B* Y LA RESPUESTA VIRAL
SOSTENIDA EN PACIENTES CON INFECCIÓN CRÓNICA POR VHC CON
FACTORES PREDICTIVOS DE MAL PRONÓSTICO.**

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA ESPECIALIDAD EN

GASTROENTEROLOGÍA

PRESENTA

DR. VÍCTOR HUGO GARCÍA Y GARCÍA.

DIRECTORES

DR. DANIEL ERASMO MELENDEZ MENA.

DRA. FRANCISCA SOSA JURADO.

DR. GERARDO SANTOS LÓPEZ.

Puebla Pue.

2014

Número de registro nacional:



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyla**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de textos, imágenes, gráficas, 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 de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AUTORIZACIÓN DE LA TESIS

Los Doctores Daniel Erasmo Meléndez Mena, Francisca Sosa Jurado y Gerardo Santos López, directores de la tesis titulada: **ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DEL GEN *IL28B* Y LA RESPUESTA VIROLÓGICA SOSTENIDA EN PACIENTES CON INFECCIÓN CRÓNICA POR VHC CON FACTORES PREDICTIVOS DE MAL PRONÓSTICO**, del Doctor Víctor Hugo García Y García, hacemos constar que hemos revisado el contenido científico y la estructura metodológica, por lo que autorizamos su impresión.

A T E N T A M E N T E

Puebla Pue. a 8 de Octubre del 2013

DIRECTORES DE LA TESIS


A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop followed by a series of smaller loops and a final downward stroke.

Dr. Daniel Erasmo Meléndez Mena


A handwritten signature in black ink, featuring a large, stylized 'F' followed by a series of loops and a final downward stroke.

Dra. Francisca Sosa Jurado


A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a final downward stroke, with a large 'X' mark drawn over it.

Dr. Gerardo Santos López

AGRADECIMIENTOS.

A mis padres y hermanos, por mantenerse a mi lado siempre.

A Adriana y Alex, los motivos que me impulsaron día a día.

A mis Profesores y compañeros, que creen en la formación de una nueva escuela de Gastroenterología descentralizada, de un alto nivel académico, asistencial y de investigación.

ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO DEL GEN *IL28B* Y LA RESPUESTA VIRAL SOSTENIDA EN PACIENTES CON INFECCIÓN CRÓNICA POR VHC CON FACTORES PREDICTIVOS DE MAL PRONÓSTICO.

García Y García Víctor Hugo¹, Francisca Sosa Jurado², Gerardo Santos López², Daniel Erasmo Meléndez Mena¹.

¹ Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional "Gral. Div. Manuel Ávila Camacho", IMSS-Puebla.

² Centro de Investigación Biomédica de Oriente, IMSS-Metepec.

*Correspondencia: daniel_melendez@yahoo.com

Introducción: La infección por el Virus de la Hepatitis C (VHC) es un problema de salud en México. Existen factores que predicen la respuesta al tratamiento como es el genotipo viral, carga viral (CV), edad, obesidad, fibrosis, cirrosis y recientemente se ha documentado al polimorfismo (PNS) del gen *IL28B* como el factor predictivo más fuerte de Respuesta Viral Sostenida (RVS).

Objetivo: Asociar el PNS del gen *IL28B* con la RVS en pacientes que reciban tratamiento estándar y que cuenten con factores predictivos de mal pronóstico.

Material y métodos: Es un estudio observacional, longitudinal, prospectivo, ambilectivo, unicéntrico y homodémico. El estudio se realizó en el CMN MAC IMSS Puebla, de Marzo 2012 a Agosto 2013, en 24 pacientes mexicanos con VHC, genotipo 1, CV mayor a 400,000 UI/ml y que han recibido tratamiento combinado PegIFN alfa2a y Ribavirina. Se genotipificó el PNS del gen *IL28B* y se determinó su asociación estadística con la RVS.

Resultados: La mayoría del grupo fueron mujeres (66.6%, n=16). Con una edad media de 52.5 años $\pm$ 4.9. La CV basal en promedio fue 1,219,000 UI/ml $\pm$ 322,887 UI/ml. La frecuencia de pacientes con RVR fue de 12.5% (n=3), la RVT se presentó en 45.8% (n=11); mientras que la RVS se reportó en 20.8% (n=5). La determinación del PNS del gen *IL28B* fue del 100% (n=24) para la variante alélica T/T. Al realizar el análisis multivariado se reportó a la RVR como el único factor predictivo de RVS con relación estadísticamente significativa (P=0.005).

Conclusión: Los pacientes con infección crónica por VHC, genotipo 1, con CV basales altas, presentan la variante T/T del PNS rs12979860 del gen *IL28B* al 100%. Este grupo de pacientes tienen poca probabilidad de alcanzar la RVR; sin embargo, aquellos que la obtengan, tendrán la certeza de alcanzar la curación virológica al 100%.

CONTENIDO.

1. MARCO TEÓRICO.....	6
1.1 Antecedentes generales	6
1.2 Antecedentes específicos.....	15
2. JUSTIFICACIÓN.....	17
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
4. PREGUNTA CIENTÍFICA.....	19
5. HIPÓTESIS.....	20
5.1.H 0.....	20
5.2.H 1.....	20
6. OBJETIVOS.....	21
6.1 General	21
6.2 Específicos	21
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
7.1 Diseño del estudio	22
7.2 Ubicación espaciotemporal	22
7.3 Estrategia de trabajo.....	22
7.4 Marco muestral.....	23
7.4.1 Población fuente	23
7.4.2 Sujetos de estudio	23
7.4.3 Criterios de selección.....	23
7.5 Diseño y tipo de muestreo	24
7.6 Tamaño de la muestra	24
7.7 Variables y escala de medición	25
7.8 Definición de variables.....	25
7.9 Métodos de recolección de datos	27
7.10 Técnica y procedimiento	27
7.11 Análisis de datos.....	28
8. LOGÍSTICA	29
8.1 Recursos Humanos.....	29
8.2 Recursos Materiales	30

8.3 Recursos Financieros.....	30
8.4 Consideraciones éticas	30
9. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	31
10.- DIAGRAMA DE FLUJO.....	32
11.- RESULTADOS.....	33
12.- DISCUSIÓN.....	41
13.-CONCLUSIONES.....	45
14.- BIBLIOGRAFÍA.....	46
15.- ANEXOS.....	49
16.- CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	50

1. MARCO TEORICO.

1.1 ANTECEDENTES GENERALES.

EPIDEMIOLOGÍA

La infección por el virus de la Hepatitis C (VHC) es la principal causa de hepatopatía crónica a nivel mundial. Su impacto a largo plazo es altamente variable, desde cambios mínimos, fibrosis, cirrosis hasta carcinoma hepatocelular (CHC) (1). A nivel mundial, se considera que existen entre 130 y 210 millones de personas infectadas. La prevalencia varía de acuerdo al área geográfica; en Europa se estima entre 0.4 a 3%; Egipto tiene la mayor prevalencia con 9%. Antes de 1990, la principal ruta de infección era por transfusión sanguínea. Gracias al tamizaje en productos sanguíneos, esta vía de transmisión está prácticamente erradicada. Actualmente el uso de drogas intravenosas e intranasales es la vía primaria de infección. Se conocen 6 genotipos, siendo el genotipo 1 el más frecuente a nivel mundial. El subtipo 1b en Europa y el 1a en los EUA (1). En 2007, el Instituto Nacional de Salud Pública, publicó un estudio realizado en 43,479 viviendas, obteniendo 21,271 sueros de mayores de 20 años y se encontró una prevalencia del anticuerpo contra el VHC de 1.4% y la presencia de RNA del virus fue positiva en 0.49%. El genotipo más frecuente en México es el 1 con 72.2% (1b 40.1% y 1a 17.8%), genotipo 2 con 18% y genotipo 3 con 9.8% (2).

HISTORIA NATURAL

La infección es asintomática en 50-90% de los casos. La falla en la erradicación espontánea ocurre en 50-90% de los pacientes. En Europa, la infección por VHC es responsable del 10% de los casos de hepatitis aguda. La infección crónica, y su asociación con fibrosis, parece ser independiente del genotipo y de la carga viral (1). Excepcionalmente, la infección resuelve de

1. MARCO TEORICO.

1.1 ANTECEDENTES GENERALES.

EPIDEMIOLOGÍA

La infección por el virus de la Hepatitis C (VHC) es la principal causa de hepatopatía crónica a nivel mundial. Su impacto a largo plazo es altamente variable, desde cambios mínimos, fibrosis, cirrosis hasta carcinoma hepatocelular (CHC) (1). A nivel mundial, se considera que existen entre 130 y 210 millones de personas infectadas. La prevalencia varía de acuerdo al área geográfica; en Europa se estima entre 0.4 a 3%; Egipto tiene la mayor prevalencia con 9%. Antes de 1990, la principal ruta de infección era por transfusión sanguínea. Gracias al tamizaje en productos sanguíneos, esta vía de transmisión está prácticamente erradicada. Actualmente el uso de drogas intravenosas e intranasales es la vía primaria de infección. Se conocen 6 genotipos, siendo el genotipo 1 el más frecuente a nivel mundial. El subtipo 1b en Europa y el 1a en los EUA (1). En 2007, el Instituto Nacional de Salud Pública, publicó un estudio realizado en 43,479 viviendas, obteniendo 21,271 sueros de mayores de 20 años y se encontró una prevalencia del anticuerpo contra el VHC de 1.4% y la presencia de RNA del virus fue positiva en 0.49%. El genotipo más frecuente en México es el 1 con 72.2% (1b 40.1% y 1a 17.8%), genotipo 2 con 18% y genotipo 3 con 9.8% (2).

HISTORIA NATURAL

La infección es asintomática en 50-90% de los casos. La falla en la erradicación espontánea ocurre en 50-90% de los pacientes. En Europa, la infección por VHC es responsable del 10% de los casos de hepatitis aguda. La infección crónica, y su asociación con fibrosis, parece ser independiente del genotipo y de la carga viral (1). Excepcionalmente, la infección resuelve de

forma espontánea, sobre todo en niños y mujeres jóvenes. La progresión de la enfermedad se ve acelerada ante la presencia de co-factores como el consumo de alcohol, co-infecciones con VIH u otros virus hepatótrofos, diabetes mellitus y mayor edad de adquisición. De 10-40% desarrollarán cirrosis en un periodo de 20 a 35 años. El riesgo de descompensación hepática en cirrosis asociada a VHC es de 30% en 10 años. La muerte relacionada a complicaciones de cirrosis tiene una incidencia aproximada de 4% por año y de CHC de 1-5% por año. La probabilidad de muerte por CHC es de 33% en el primer año. Las manifestaciones extrahepáticas más frecuentes son la crioglobulinemia, liquen plano, porfiria cutánea tarda, sialoadenitis linfocítica y la glomerulonefritis membranosa (1).

HERRAMIENTAS DIAGNÓSTICAS.

El diagnóstico está basado en la presencia de anticuerpos anti-VHC detectados por ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de tercera generación, y RNA de VHC detectado por ensayos moleculares, siendo el más aceptado la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR); ésta puede detectar cantidades mínimas de carga viral, generalmente valores menores a 50 UI/ml. El método de ELISA tiene una especificidad mayor al 99% (1,3,4). Por otra parte, a todos los pacientes positivos para VHC, se debe determinar el genotipo, realizar valoraciones acerca del daño hepático, siendo la biopsia hepática el método de referencia. Actualmente existen métodos no invasivos como una alternativa, sin embargo, estos tienen poca eficacia para identificar fibrosis moderada. Recientemente, se habla sobre factores genéticos del hospedero, como parte de la valoración inicial, dado que existen polimorfismos localizados en el gen de la IL28B, que están asociados a respuesta viral sostenida así como resolución espontánea en pacientes con infección aguda por VHC (1). La distribución de estos polimorfismos varía en la población

mundial, lo que puede explicar la heterogeneidad en la respuesta al tratamiento de acuerdo a grupos étnicos.

TRATAMIENTO

El objetivo de la terapia es la erradicación de la infección para evitar la progresión a complicaciones relacionadas. El punto final del tratamiento es la obtención de la respuesta viral sostenida (RVS), pues se relaciona en más de 99% de los casos con curación. Puntos intermedios indican la probabilidad de lograr RVS. Cuando se erradica el VHC, la necroinflamación cesa y la fibrosis se cura en pacientes no cirróticos (1). Sin embargo, la RVS se logra sólo en un 42-46% en pacientes con genotipo 1 con el tratamiento estándar actual de interferón alfa pegilado (PegIFN alfa) y ribavirina (RBV). En el año 2009, se publicó el estudio IDEAL (eficacia de dosificación individualizada vs dosis fija para evaluar la terapia óptima con interferón pegilado, por sus siglas en inglés), donde se compararon los dos esquemas aprobados para el manejo de la hepatitis C, PegIFN alfa 2a 180 microgramos/semana + RBV 1-1.2 g/día versus PegIFN alfa 2b 1.5 microgramos/kg/semana + RBV 0.8-1.4 g/día por 48 semanas, sin hallar diferencias estadísticas significativas (41% vs 40%) en cuanto a RVS para pacientes con genotipo 1 (5). En genotipos 2 y 3, la frecuencia de RVS es mayor (74% y 69%). Los factores predictivos más fuertes de RVS son el genotipo del VHC, la carga viral (con punto de corte entre 400,000 y 800,000UI/ml) y el estado de fibrosis/cirrosis. Otros predictores son la duración del tratamiento, índice de masa corporal (IMC), edad, resistencia a la insulina y género (1). En la valoración pretratamiento se recomienda determinar el daño hepático con pruebas hepáticas completas y ultrasonografía hepática; buscar otras causas de hepatopatía (co-infecciones, alcoholismo, autoinmunidad, enfermedades metabólicas); determinar el grado de severidad, puesto que en los pacientes con cirrosis, la probabilidad de responder a tratamiento está alterada. Determinar el estado de

fibrosis por medio de biopsia no es obligatorio, ya que se han desarrollado algunas alternativas; el uso de la elastografía valora adecuadamente estado de cirrosis, no así estados leves de fibrosis. El uso combinado de pruebas sanguíneas y elastografía aumenta su precisión. En las últimas guías de prácticas clínicas, se ha agregado la determinación de factores genéticos, puesto que se ha definido ampliamente la asociación entre polimorfismos del gen IL28B con la RVS en pacientes con genotipo 1(1). Por lo anterior, se recomienda la determinación del polimorfismo genético de la IL28B para valorar la probabilidad de respuesta al tratamiento. Existen contraindicaciones absolutas al tratamiento estándar: depresión descontrolada, psicosis, epilepsia, enfermedad autoinmune descontrolada, embarazo, enfermedad severa concomitante (HAS severa, ICC, neumopatía obstructiva crónica) (1), trasplante de órganos sólidos (renal, corazón, pulmón) (4). La monitorización deberá realizarse en las semanas 4, 12, 24, 48 durante el tratamiento y en la semana 24 posterior al mismo, valorando la eficacia (carga viral) y seguridad (efectos secundarios). La probabilidad de RVS es directamente proporcional al tiempo en que desaparece la carga viral. Se define como respuesta virológica rápida a la ausencia de RNA viral en un estudio sensible a las semana 4 del tratamiento (25% en genotipo 1) y puede detenerse el tratamiento a la semana 24 si cuenta con CV basal menor a 400,000UI/ml. La respuesta virológica temprana (RVT) se define como la ausencia de RNA de VHC a la semana 12, a quienes se les deberá completar el tratamiento hasta 48 semanas. El tratamiento deberá suspenderse en todos aquellos pacientes que no logren disminuir la carga viral en más de 2 logaritmos UI/ml a la semana 12; y a la semana 24 si es que permanece detectable el RNA del VHC.

POLIMORFISMO DEL GEN IL28B.

La necesidad de encontrar factores predictivos de respuesta virológica al tratamiento en pacientes con infección crónica por VHC, es definida por la probabilidad de alcanzar la erradicación del virus, incluso con esquemas de tratamiento acortados. Entre los factores predictivos clásicos se encuentran: genotipo no-1, carga viral menor de 400,000-800,000UI/ml, género femenino, edad menor de 40 años, raza no-afroamericana, peso corporal menor a 75kg, ausencia de resistencia a la insulina y ausencia de fibrosis o cirrosis (6).

En 2009, inició una nueva etapa de estudios encaminados a determinar la relación entre factores genéticos del hospedero con la respuesta al tratamiento. Ge et al. (7), realizaron el primer análisis de asociación genómica (GWAS por sus siglas en inglés) en más de 1600 pacientes tomados del estudio IDEAL, todos genotipos 1 y vírgenes a tratamiento estándar. Encontraron un polimorfismo (PNS) en el cromosoma 19, el rs12979860, fuertemente asociado a la RVS en todos los grupos de pacientes. El polimorfismo reside cerca del gen *IL28B* que codifica para el IFN lambda 3. El genotipo CC está asociado a una tasa 2 veces mayor de RVS (IC 95% 1.8-2.3) en comparación al genotipo TT. Similares tasas, se documentaron entre la población europea y los afroamericanos. Además, se observó una asociación significativa entre el genotipo CC y la carga viral basal. Al contrario de lo que se sospecharía, la carga viral basal en estos pacientes es significativamente mayor (6.3 log 10 vs 6.1 log 10 en genotipo TT).

Desde entonces, se han realizado algunos estudios genéticos que demuestran una liga de mecanismos entre la inmunidad innata y la eliminación del virus. En 2010, Thompson et al. (8), confirmó la relevancia clínica del polimorfismo, en un estudio basado en el principio de intención a tratar, en donde se tipificó a pacientes con VHC G1 en el sitio polimórfico rs12979860 como CC, CT y TT. Se asoció a la IL28B tipo CC con mejor cinética viral

temprana y mayor probabilidad de RVR (28% vs 5% y 5%. $P < .0001$) y de RVS (69% vs 33% vs 27% $P < .0001$) comparados con CT y TT respectivamente.

Honda et al. (9), en 2010, estudió en 168 pacientes, la expresión de genes estimulados por interferón (ISG por sus siglas en inglés: Interferon-stimulated genes) a través de RT-PCR. Se determinaron variaciones genéticas en IL28B (rs8099917) en 91 pacientes. Encontró que el genotipo TT tenía niveles de expresión hepática de ISGs menores que los otros genotipos, y esto puede estar asociado a la presencia de mayores concentraciones de RNA del VHC. La sensibilidad a interferones exógenos presenta una asociación inversa con los niveles de ISGs. En el caso de los pacientes con polimorfismos de IL28B rs8099917 TT, presentan mayores cargas virales y menores niveles de expresión de ISGs, lo que justifica la mejor respuesta a tratamiento basado en interferones exógenos.

La respuesta inmune del hospedero varía entre los individuos, algunos no presentan respuesta de IFN en el hígado, mientras que otros tienen una activación completa de ISG. La preactivación de estos sistemas de IFN endógenos se asocia con no-respondedores. Dill et al., en 2011, investigaron si el genotipo de la IL28B determina la expresión de los ISG en el hígado. El alelo menor de la IL28B presentó una asociación significativa con el aumento en la expresión de los ISG, y este aumento está relacionado con los no-respondedores (10).

La fuente principal de IFN lambda son las células dendríticas y los macrófagos. En el hígado se desconoce el origen, pero se sugiere que las células de Kupffer y las células endoteliales sinusoidales producen esta familia de interferones (11). Su sitio de acción, está limitado a la presencia de su receptor: la cadena alfa del receptor de la IL28 (IL28R α) y la cadena beta del receptor de la IL10 (IL10R β). El IL28R α se encuentra en células epiteliales. Posterior a la unión a su receptor, existe una reacción de fosforilación de las proteínas STAT1 y STAT2, estimulando la formación de los ISG y con esto favorecer la respuesta celular contra

infecciones virales (11). La familia de IFN-lambda incluye a los IFN-lambda 1, 2 y 3, también conocidos como IL29, IL28A o IL28B y son parte de un nuevo grupo de citocinas. Desde 2005, ya existía un reporte sobre la capacidad de inhibir la replicación del VHC por parte del interferón lambda. Robek y cols., al señalar que este IFN induce una respuesta antiviral similar a los IFN alfa/beta, determinó la capacidad del IFN lambda para inhibir la replicación del VHC y VHB en hepatocitos murinos e “in vitro” en hepatocitos humanos, sugiriendo la posibilidad terapéutica de estos IFN sobre la infección crónica por VHC (12).

Puesto que los IFNs inhiben la replicación viral, es lógico pensar que la expresión de IFN endógenos determinará el control sobre las infecciones virales. Dos estudios (11,13) compararon los niveles de ARNm de IFN lambda en sangre de sujetos con el alelo T con aquellos con alelo G, y se demostró que la mayor expresión de IFN lambda es en sujetos con genotipo TT, comparado con los genotipos TG y CG; hecho no observado en los estudios de Ge *et al.* Sin embargo, estudios realizados en animales, indican que la distribución tisular del IL28R α determina la respuesta al IFN lambda (11-15).

La implicación clínica de estos hallazgos, es el poder predictivo que tiene el genotipo de la IL28B sobre la RVS, sin embargo, la IL28B no tiene un valor predictivo positivo del 100%. Hecho documentado en los estudios de Ge *et al.* (7) en donde sólo el 56% de pacientes con RVS fue explicado por la presencia de genotipos favorables hasta 82% entre sujetos de raza blanca con genotipo rs12979860 CC; y del 63% en el estudio realizado por Suppiah *et al* (13); por lo que no se recomienda su uso como predictor único de respuesta.

En 2011, Moghaddam realizó un análisis retrospectivo de 281 pacientes con genotipo 3, reconoció a la edad (menor de 40 años), carga viral basal (menor a 400,000UI/ml) y el genotipo rs12979860 o rs8099917 como factores predictivos independientes de respuesta viral rápida (16).

Varios autores, han sugerido el uso de modelos de predicción pretratamiento. En un trabajo muy reciente Kurosaki *et al.* (2011), recolectaron información de 496 pacientes con genotipo 1 en Japón y concluyeron que el polimorfismo de la IL28B y las mutaciones en la región determinante de sensibilidad a IFN (ISDR por sus siglas en inglés: IFN sensitivity determining región) del VHC son predictores pretratamiento significativos (17).

De igual manera se han estudiado los polimorfismos virales, incluyendo sustituciones en la proteína de la cápside (C) y en la NS5A del VHC (18). Hayes en 2011, estudió 817 pacientes con infección crónica del VHC y analizó sustituciones en los aminoácidos 70 y 91 de la proteína C y sustituciones dentro de la región que determina la sensibilidad al IFN (ISDR) en NS5A. Reporta que el genotipo rs12979860 CC y la sustitución del aminoácido 70 de la proteína C son factores predictivos independientes (19).

Por su parte, Stättermayer en el 2011 investigó el papel del polimorfismo de nucleótido único (PNS) en la respuesta virológica temprana en pacientes que no habían recibido tratamiento previo, identificando los polimorfismos a través de RT-PCR (682 muestras). Pacientes con genotipo C/C tuvieron mayor tasa de RVR y RVS (79.1%). El valor predictivo positivo de PNS rs12979860 CC para RVS fue superior que aquel para el PNS rs8099917 TT (80.5% vs 71.6%). Sin embargo, al igual que otros autores, Stättermayer reconoce a la RVR como el mejor predictor de RVS. (20).

Ya desde el 2010, Montes Cano *et al.*, realizaron la primera cohorte realizada en la población española, constituida por 371 individuos. Se realizó genotipificación del rs12979860 y reportaron que el genotipo CC representó la mayoría entre los pacientes infectados con virus genotipo no-1, pacientes con resolución espontánea de la enfermedad y pacientes con respuesta virológica sostenida (66.7%, 72.5% y 60.2% respectivamente) (21).

En Junio de 2010, McCarthy *et al.*, publicaron un estudio transversal de 231 pacientes que recibieron tratamiento estándar combinado, incluyendo 178 caucásicos y 53 afroamericanos.

Se encontró que 40% de los pacientes caucásicos eran portadores de rs12979860 CC, y que predecía la RVS con un OR de 5.79, independientemente del genotipo del VHC y con sensibilidad de 65% y especificidad de 78%. Concluyeron que el genotipo rs12979860 es un predictor independiente significativo de respuesta a tratamiento estándar (22).

El polimorfismo de *IL28B*, su impacto en la cinética viral y su relación con otros predictores no ha sido bien documentada (23,24). Recientemente, Lindh y cols., analizaron 2 PNS, rs12979860 y rs8099917 en 110 pacientes con genotipo 1. La reducción de la carga viral a los 7 días y a las 4 semanas, fue más pronunciada en pacientes con PNS rs12979860 CC ($P<0.0001$). La eliminación viral fue significativamente influenciada por el polimorfismo genético, independientemente de la CV basal, edad o fibrosis (25).

Tilman y cols., reportaron en 2011 la asociación que existe entre niveles altos de colesterol LDL y el genotipo rs12979860 CC. Realizaron 2 cohortes de 141 y 180 pacientes con genotipo 1, donde documentan que dicha asociación es más baja en pacientes con la variedad CC (22.5%) en comparación con aquellos con genotipo no-CC (47.6%). (24). En el 2011, Brietto et al., estudiaron el papel complementario de la vitamina D en predecir la respuesta en 211 pacientes con VHC, demostrando que los niveles séricos de vitamina D son complementarios al polimorfismo rs12979860 de la *IL28B* en aumentar la predicción de la RVS (14).

En el 2010, Lotrich y cols., publicaron el único estudio hasta el momento, relacionando la presencia de efectos secundarios por PegIFN alfa y el polimorfismo de la *IL28B*. Se evaluaron a 133 pacientes de forma retrospectiva, y documentó que, efectivamente, el PNS rs12979860 se relacionó a variaciones en la respuesta al tratamiento, siendo el genotipo TT el que presentaba la peor respuesta. Sin embargo también documentó que ese mismo genotipo presentó menores alteraciones del apetito (3.1% vs 10.1% y 8.8% para CT y CC respectivamente), y del sueño (10.8% vs 16.1% y 20.7% respectivamente) (26).

En Febrero de 2011, Pearlman BL, publicaron que ya se encuentra comercialmente disponible, pruebas que determinan el polimorfismo de la IL28B, por lo que contamos con un arma poderosa para la predicción del tratamiento en pacientes con VHC (17).

1.2 ANTECEDENTES ESPECIFICOS.

PNS DEL GEN IL28B EN POBLACIÓN MEXICANA.

Hasta el día de hoy, la búsqueda a través de PubMed sólo demuestra la existencia de una publicación sobre población mexicana. En Diciembre del 2012, Martínez-Gómez y cols. (27), determinaron la asociación entre PNS IL2B y la RVS después de tratamiento a base de PEG-IFN y RBV en una cohorte de pacientes con VHC genotipo 1 y 2. Reportaron un periodo de reclutamiento de Mayo 2007 a mayo 2011 en 2 centros de atención médica (Unidad hepática de la Clínica Médica Sur, D.F. y el Centro de Enfermedades infecciosas, INSP, Cuernavaca, Morelos). La cuantificación de carga viral se realizó a través de COBAS TaqMan HCV test v2.0, Roche; utilizando un punto de corte de 400,000UI/ml para determinar cargas bajas/altas. Posteriormente realizaron genotipificación del PNS IL28B a través de PCR-RT usando sondas de TaqMan, las muestras fueron analizadas por 2 investigadores. Utilizaron estadística descriptiva para características individuales, prueba chi cuadrada para análisis de variables categórica y modelos de regresión logística. Se determinó el OR con 95% de IC, para los diferentes genotipos, ajustándolo para edad, género y genotipo viral. Reportan un grupo de 83 pacientes, de los cuales 58 fueron genotipo 1. La edad media de sus pacientes fue de 57 años, con cargas virales basales promedio de 434,955 UI +/- 387,213 UI. Lograron en general 32% de pacientes con RVS. Reportaron la asociación de 3 diferentes PNS de regiones cercanas al gen IL28B (rs8099917, rs8103142 y rs12979860), identificando al rs12979860 CC como único genotipo asociado a RVS ($P=0.033$) OR = 4.83, 95% IC = 1.12-20.8.

El estudio de Martínez-Gómez y cols. es el primero en población mexicana y, compatible con lo reportado a nivel global, demostraron una asociación positiva entre el PNS del gen IL28B en su variedad alélica CC, con la probabilidad de RVS. Además reportan la frecuencia de alelos CC, CT y TT (24%, 41% y 35%, respectivamente), resultados que contrastan con lo publicado por Ge y cols (7), donde en población hispana la frecuencia de CC es del 50% aproximadamente. Sin embargo, la población utilizada por Martínez-Gómez y cols es una combinación de genotipos virales, lo que modifica el análisis de sus resultados, puesto que la vasta mayoría de estudio de asociación genómica amplia se ha realizado sólo en población con genotipo 1, población en la que está realmente indicada la genotipificación del PNS IL28B. Hasta el momento, no existen estudios realizados en población específica con factores predictivos de mal pronóstico.

2. JUSTIFICACIÓN

La tasa de RVS es de aproximadamente el 50% en pacientes con genotipo 1, el cual es el más frecuente en nuestra población. Esto, es debido en parte a factores relacionados con el hospedero. Actualmente se han reconocido los PNS de la IL28B, como uno de los factores predictivos pretratamiento más poderosos. Estos polimorfismos, varían de acuerdo a los grupos étnicos. En México, sólo existe una cohorte de 83 pacientes, donde se documenta que la variedad más frecuente entre los mexicanos es el tipo CT y el más raro es el tipo CC (que otorga mejor pronóstico). Determinar la asociación entre el polimorfismo de la IL28B y la respuesta sostenida al tratamiento en pacientes con infección crónica por VHC y que presenten factores predictivos de mal pronóstico (genotipo, carga viral) en población mexicana, nos proveerá información sobre el valor predictivo independiente de estos polimorfismos genéticos.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El servicio de Gastroenterología del HEP UMAE Puebla, es el centro de referencia de pacientes portadores de infección crónica por VHC para valorar el inicio del tratamiento y vigilancia del mismo. Similar a lo que se reporta en la literatura mundial, solamente el 50% aproximadamente alcanzan la RVS con el tratamiento estándar actual, lo que hace necesario la investigación sobre factores predictivos en nuestra población, y de esta manera individualizar el tratamiento. Así, podremos incidir directamente en la salud del paciente, optimizar duraciones del tratamiento y mejorar la balanza de costo-beneficio. Seguramente, los pacientes con pocas probabilidades de alcanzar la RVS, se puedan beneficiar en un futuro con los potenciales esquemas antivirales en desarrollo.

4. PREGUNTA CIENTÍFICA

¿Qué asociación existe entre el PNS rs12979860 del gen IL28B y la obtención de RVS, en pacientes mexicanos infectados con el VHC y con factores predictivos de mal pronóstico?

5. HIPOTESIS

HO:

Los pacientes mexicanos infectados con VHC genotipo 1, con carga viral mayor a 400,000UI/ml, independientemente de su polimorfismo genético, tienen poca probabilidad de alcanzar respuesta virológica sostenida con tratamiento combinado PegIFN alfa 2a + RBV.

H1:

Los pacientes mexicanos infectados con VHC genotipo 1, con carga viral mayor a 400,000UI/ml y con PNS del gen IL28B rs12979860 CC, tienen alta probabilidad de alcanzar respuesta virológica sostenida con tratamiento combinado PegIFN alfa 2a + RBV.

6. OBJETIVOS.

6.1.GENERAL

Asociar el polimorfismo del gen *IL28B* como factor predictivo de respuesta virológica sostenida en pacientes mexicanos con infección crónica por VHC con factores predictivos de mal pronóstico.

6.2 ESPECIFICOS

6.2.1. Determinar el polimorfismo rs12979860 del gen *IL28B*, en pacientes mexicanos derechohabientes al IMSS, infectados con VHC genotipo 1, con carga viral mayor a 400,000UI/ml.

6.2.2. Cuantificar cargas virales a las semanas 0, 4 y 48 durante el tratamiento y 24 semanas posteriores al mismo, en pacientes mexicanos derechohabientes al IMSS, infectados con VHC genotipo 1, con carga viral mayor a 400,000UI/ml.

6.2.3. Determinar la presencia de respuesta virológica rápida, definida como niveles indetectables (menos de 50UI/ml) de RNA de VHC a la semana 4 del tratamiento en pacientes mexicanos derechohabientes al IMSS, infectados con VHC genotipo 1, con carga viral mayor a 400,000UI/ml.

6.2.4. Determinar la presencia de respuesta virológica sostenida, definida como niveles indetectables (menos de 50UI/ml) de RNA de VHC a la semana 24 posterior al tratamiento, en pacientes mexicanos derechohabientes al IMSS, infectados con VHC genotipo 1, con carga viral mayor a 400,000UI/ml.

7. MATERIAL Y METODOS

7.1 Diseño del estudio

Analítico.

Por la participación del investigador: observacional.

Por la temporalidad del estudio: longitudinal.

Por la direccionalidad: prospectivo.

Por la obtención de la información: ambilectivo.

Por la institución: unicéntrico.

Por el tipo de la población: homodémico.

7.2 Ubicación espaciotemporal

El estudio se llevó a cabo en la Unidad Médica de Alta Especialización IMSS Puebla, Centro Médico Nacional “Gral. de División Manuel Avila Camacho”, a cargo del Servicio de Gastroenterología y en el Laboratorio de Virología , para la determinación del polimorfismo genético. Durante el periodo Marzo de 2012 a Agosto de 2013.

7.3 Estrategia de trabajo

Se realizó búsqueda y análisis de expedientes clínicos de pacientes infectados con el VHC y que hayan recibido tratamiento estándar con interferón pegilado alfa 2a (Pegasys®) 180µg semanales con aplicación subcutánea por 48 semanas y ribavirina a dosis ponderal de 15mg/kg/día por vía oral por 48 semanas. Se seleccionaron pacientes que cumplan con los criterios de inclusión y se asignaron a 2 grupos, de acuerdo a la presencia o ausencia de RVS. Se contactó con dichos pacientes vía telefónica y en caso de aceptar participar en el protocolo, previa firma de consentimiento informado, se incluyeron en el mismo. Se tomó

muestra de sangre venosa en la Clínica de Hepatitis y se enviaron al Laboratorio de Virología para su procesamiento. Se recabaron los datos arrojados en la determinación del polimorfismo genético y en la monitorización virológica durante el tratamiento y se recopilaron en la hoja de recolección. Se analizó la asociación entre el PNS del gen *IL28B* y la tasa de respuesta virológica sostenida. Se evaluaron los resultados y se publicarán las conclusiones.

7.4 Marco muestral

7.4.1 Población fuente

Pacientes de la clínica de Hepatitis del servicio de Gastroenterología de la UMAE IMSS Puebla CMN MAC.

7.4.2 Sujetos de estudio

Pacientes con infección crónica por VHC, genotipo 1 con carga viral basal mayor a 400,000UI/ml, que hayan recibido tratamiento combinado en la UMAE IMSS Puebla CMN MAC.

7.4.3 Criterios de selección:

7.4.3.1 Criterios de inclusión:

- Pacientes mexicanos de cualquier género.
- Edad mayor a 18 años.
- Con infección crónica por VHC genotipo 1.
- Con carga viral basal mayor a 400,000UI/ml.

- Pacientes que hayan recibido o que estén en tratamiento combinado contra el virus de la Hepatitis C de acuerdo a las guías internacionales de práctica clínica, y que concluyan antes de Agosto del 2012.
- Derechohabientes del IMSS.

7.4.3.2 Criterios de exclusión.

- Pacientes no derechohabientes del IMSS.
- Pacientes portadores de VHC genotipo no-1.
- Con Carga viral basal menor a 400,000UI/ml.
- Pacientes co-infectados con VHB o VIH.
- Pacientes que no acepten participar en el estudio.

7.4.3.3 Criterios de eliminación:

- Pacientes que fallezcan durante el estudio.
- Pacientes que no toleren los efectos secundarios a PegIFN alfa 2a o ribavirina.

7.5 Diseño y tipo de muestreo:

Muestreo probabilístico aleatorio.

7.6 Tamaño de la muestra:

Conveniente al investigador.

7.7 Variables y escala de medición

VARIABLE	TIPO	ESCALA	UNIDAD DE MEDICION	EQUIPO
EDAD	CUANTITATIVA	DISCRETA	AÑOS	EVALUADOR
GENERO	CUALITATIVA	NOMINAL	FEMENINO MASCULINO	EVALUADOR
CARGA VIRAL BASAL	CUANTITATIVA	CONTINUA	UI / ML Y LOG	LABORATORIO
POLIMORFISMO RS12979860	CUALITATIVO	NOMINAL NO BINARIA	CC / TT / TC	LABORATORIO CIBIOR
RESPUESTA VIRAL SOSTENIDA	CUALITATIVO	DICOTOMICA	SI / NO	EVALUADOR
RESPUESTA VIRAL RAPIDA	CUALITATIVA	DICOTOMICA	SI/ NO	EVALUADOR

7.8 DEFINICIÓN DE VARIABLES

Variable independiente: pacientes infectados con VHC que hayan recibido o que estén recibiendo tratamiento combinado PegIFN alfa 2a + RBV y que concluyan antes de Agosto de 2012.

Variable dependiente: Respuesta viral sostenida, definida como la ausencia de carga viral (<50UI/ml) a la semana 24 post-tratamiento.

EDAD:

Definición conceptual: tiempo de existencia desde el nacimiento.

Definición operacional: número de años cumplidos en un sujeto.

GENERO:

Definición conceptual: condición humana atribuida de acuerdo al sexo de un individuo.

Definición operacional: en base a lo documentado en el expediente clínico.

CARGA VIRAL BASAL:

Definición conceptual: cantidad de material genético de VHC (ARN) medido en unidades internacionales en un mililitro de sangre venosa, obtenida previo a tratamiento.

Definición operacional: valor obtenido en muestra sanguínea enviada a laboratorio particular para carga viral de virus de la hepatitis C, previo a tratamiento.

POLIMORFISMO rs12979860 DEL GEN IL28B:

Definición conceptual: Presencia de múltiples alelos de un gen presentes en una población.

Definición operacional: Identificación de CC, CT o TT en la posición polimórfica rs12979860 del gen il28B.

RESPUESTA VIRAL SOSTENIDA:

Definición conceptual: carga viral negativa a la semana 24 postratamiento.

Definición operacional: nivel de ARN de VHC indetectable (<50UI/ml) después de 24 semanas de fin de tratamiento.

RESPUESTA VIRAL RAPIDA:

Definición conceptual: carga viral negativa a la semana 4 de tratamiento.

Definición operacional: nivel de ARN de VHC indetectable (<50UI/ml) en la semana 4 de tratamiento.

7.9 Métodos de recolección de datos:

Llenar hoja de recolección de datos y cuestionario.

Mantener actualizado un censo demográfico con las variables ya descritas.

7.10 Técnica y procedimiento:

Muestras

A los pacientes seleccionados se les tomó muestra de sangre por punción venosa, la cual se manejó en tubos con EDTA como anticoagulante en la Consulta Externa de la Clínica de Hepatitis. Las muestras se mantuvieron en refrigeración y fueron llevadas al laboratorio de Virología para obtención del ADN celular y determinación del polimorfismo del gen IL28B.

Extracción de ADN

El ADN se obtuvo a partir de la sangre total mediante un método de afinidad con el sistema comercial GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Fermentas), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Determinación de polimorfismos en el gen *IL28B*

a) Amplificación y purificación de productos de PCR

Con el ADN purificado de cada paciente se realizó la amplificación de un segmento del genoma mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el cual contiene el sitio polimórfico rs12979860. Los iniciadores de PCR utilizados fueron denominados R1260s (5'-CTG AGC ACT GCC TGG GCG TC-3') y R1260a (5'-TGC ACG GTG ATC GCA GCG G-3'), con los cuales se produce un amplicón de 796 pb. El fragmento se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de

etidio y se purificó con el producto comercial Wizard SV Gel Purification System (Promega) para posteriormente enviarse a secuenciación.

b) Secuenciación

Los productos de PCR purificados se enviaron al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) de CINVESTAV-Irapuato para determinar su secuencia nucleotídica mediante el método de Sanger. Los electroferogramas obtenidos se analizaron en el Laboratorio de Virología mediante el programa BioEdit v. 7.2.3, con el que se determinó la presencia de los polimorfismos, los cuales pueden reportarse como CC, TT o TC.

7.11 Análisis de datos:

Se utilizó estadística descriptiva para los datos generales de la población en estudio. Para las variables cuantitativas se utilizó la media como la medida de tendencia central y desviación estándar como medida de dispersión y rangos.

Para las variables cualitativas se aplicó el cálculo de porcentajes y proporciones. Se realizó la prueba de ji cuadrada, posteriormente las variables con un valor de $p \leq 0.100$ serían introducidos a un análisis multivariado. Se utilizó el software Statgraphics (v. XVI, Statpoint Tec).

8. LOGISTICA:

8.1 Recursos Humanos

Grupo de trabajo. Todos los colaboradores de este proyecto son médicos, investigadores y empleados adscritos al IMSS, o estudiantes inscritos en programas de posgrado de la Universidad Popular Autónoma de Puebla y de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y que realizaron en su totalidad el trabajo en el Instituto Mexicano del Seguro Social. La admisión y determinación de estado de los pacientes, así como su enrolamiento en el programa de tratamiento y la toma de muestras se realizó en el Hospital de especialidades del Centro Médico Nacional Manuel Ávila Camacho en Puebla, Puebla, mientras que los procesos de extracción de ácidos nucleicos y determinación de polimorfismos se realizó en el Laboratorio de Virología.

Experiencia del grupo de investigación. Participaron en el proyecto el Dr. Daniel E. Meléndez Mena, Gastroenterólogo adscrito a la clínica de Hepatitis y Asesor Experto del presente protocolo; el Dr. Víctor Hugo García Y García, residente de Sub-Especialidad en Gastroenterología, quien obtendrá el grado de especialidad con los datos obtenidos en este trabajo; El Dr. Gerardo Santos López, Doctor en Ciencias con experiencia en virología y diversas técnicas de biología molecular; la Dra. Francisca Sosa Jurado, Asesora Metodológica del presente trabajo.

De manera especial nuestro grupo tiene experiencia en el procesamiento de muestras clínicas de pacientes infectados por el VHC, extracción de ácidos nucleicos, así como en la detección y caracterización de secuencias genéticas mediante diversas metodologías, entre ellas por PCR en tiempo real. Se cuenta con el espacio físico suficiente para llevar a cabo los estudios propuestos en el laboratorio de Virología, donde se halla el equipo para el procesamiento y

almacenamiento de muestras. Básicamente se cuenta con centrifugas, refrigeradores, ultracongelador, campana de seguridad biológica, incubadora de CO₂, así como equipo para la realización de los ensayos de PCR en tiempo real. Adicionalmente se solicitó apoyo para la compra de reactivos especializados para los ensayos moleculares, así como material desechable como tubos y puntas de plástico, micropipetas de diferentes volúmenes.

8.2 Recursos Materiales

- Expedientes clínicos
- Material bibliográfico recopilado
- Hojas de recolección de datos
- Jeringas y tubos para muestras sanguíneas.
- Los proporcionados por el Laboratorio: centrifugas, refrigeradores, ultracongelador, campana de seguridad biológica, incubadora de CO₂, así como equipo para la realización de los ensayos de PCR en tiempo real.

8.3 Recursos Financieros:

- Recursos del departamento de Gastroenterología del Hospital de Especialidades de Puebla.

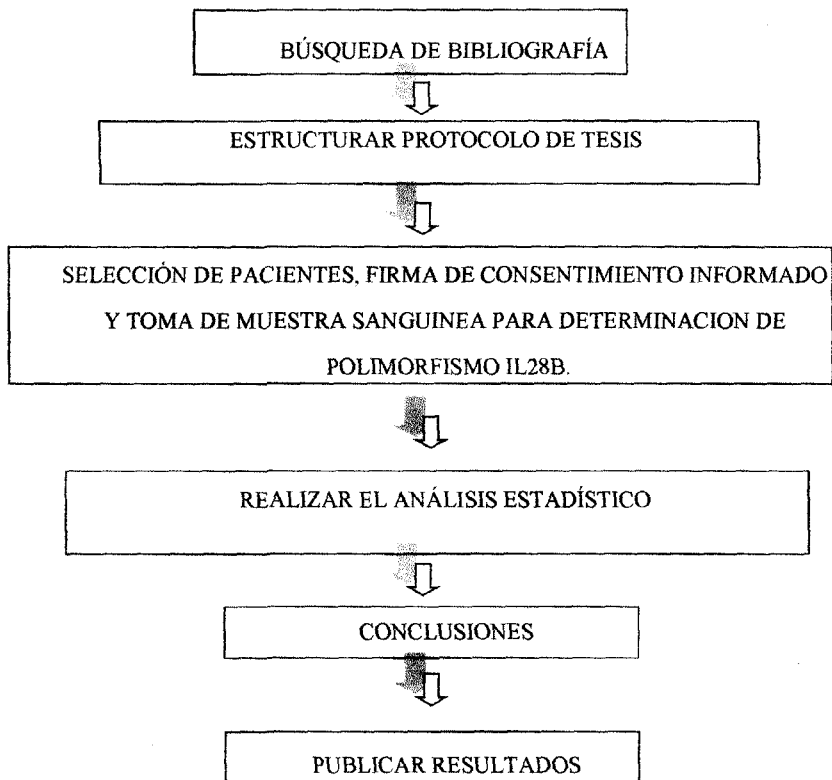
8.4 Consideraciones éticas

El presente protocolo de ajusta a los lineamientos de la Ley General de Salud de México promulgada en 1986 y al código de Helsinki de 1975 y modificado en 1989, respecto a la confidencialidad de los participantes en el estudio, por lo que se solicitó consentimiento informado por escrito y firmado.

9. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Recolección de material bibliográfico	Agosto 2012 – Febrero 2013.						
Realización de protocolo		Agosto 2012 – Febrero 2013.					
Desarrollo de la Investigación			Marzo 2013- Junio 2013.				
Recolección datos y captura de la información				Marzo 2013 – Agosto 2013.			
Análisis de resultados					Julio 2013 – Septiembre 2013.		
Redacción del documento						Septiembre 2013	
Escritura de la Tesis							Septiembre 2013 – Octubre 2013.

10. DIAGRAMA DE FLUJO.



11. RESULTADOS.

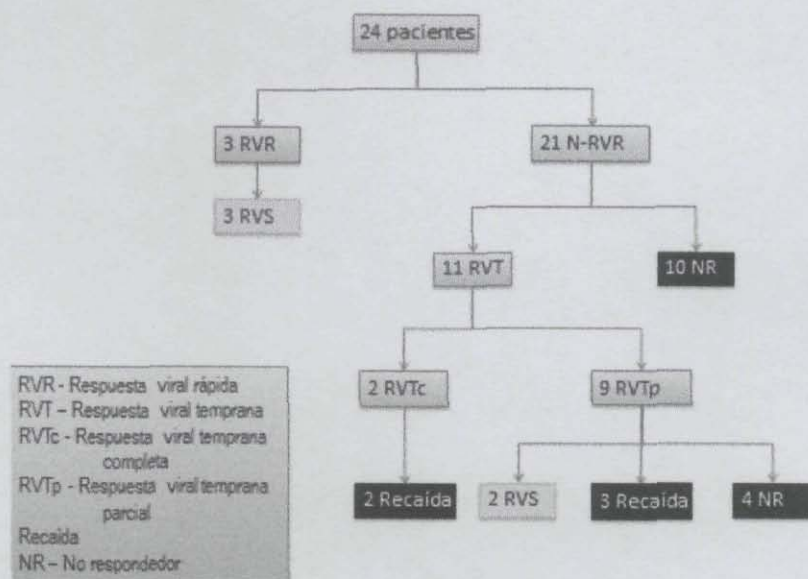
Se realizó un estudio epidemiológico, analítico, no experimental, observacional, longitudinal, prospectivo y por la obtención de la información ambilectivo, unicéntrico y homodémico, en una cohorte que incluyó 24 pacientes, 66% mujeres, con edad promedio de 52.5 años, carga viral basal alta, la media por arriba del millón de UI/ml, 41% de los pacientes se consideraron en fase de cirrosis por criterios clínicos, más del 60% demostraron cierto grado de sobrepeso/obesidad (cuadro 1).

CUADRO 1. CARACTERÍSTICAS BASALES DEL UNIVERSO.

CARACTERÍSTICA	GENERAL #24 (%)	RVS #5 (%)
GENERO FEMENINO	16 (66%)	4 (80%)
EDAD (AÑOS)	52.5 ±4.9	55.6
CV BASAL UI/ml	1,219,000 ± 322,887	1,209,000
CV BASAL LOG	6.08 ±0.12	6.08
SUBTIPO VIRAL 1B	12 (50.0%)	3 (60%)
RVS	5 (20.8%)	5 (100%)
RVT	11 (45.8)	2 (40%)
RVR	3 (12.5%)	3 (60%)
CIRROSIS	10 (41.6%)	1 (20%)
IMC >25	15 (62.4%)	2 (40%)

De acuerdo al tipo de respuesta virológica a tratamiento estándar (gráfica 1), se clasificó a los pacientes en aquellos que alcanzaron RVR (n=3), aquellos sin RVR, se realizó medición de carga viral a las 12 semanas de tratamiento, evidenciando que cerca del 50% no lograron descenso de al menos 2 log de CV, por lo que se consideraron No respondedores (respondedores nulos) y se suspendió el manejo médico. El 45% de la población logró algún tipo de respuesta viral temprana, sin embargo sólo 2 pacientes en general, lograron la RVS.

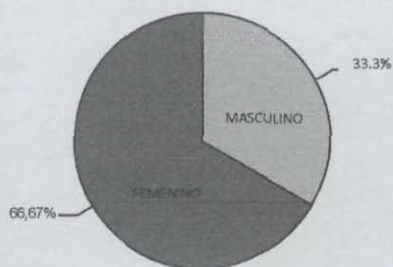
GRÁFICA 1. FLUJOGRAMA DE ACUERDO A CINÉTICA VIRAL INDUCIDA.



Lo anterior demuestra que el 100% de pacientes que alcanzaron RVR a la poste encontraron RVS, por el contrario, sólo el 9.5% de los pacientes que no alcanzaron respuesta viral rápida inducida por interferón, logró la curación virológica.

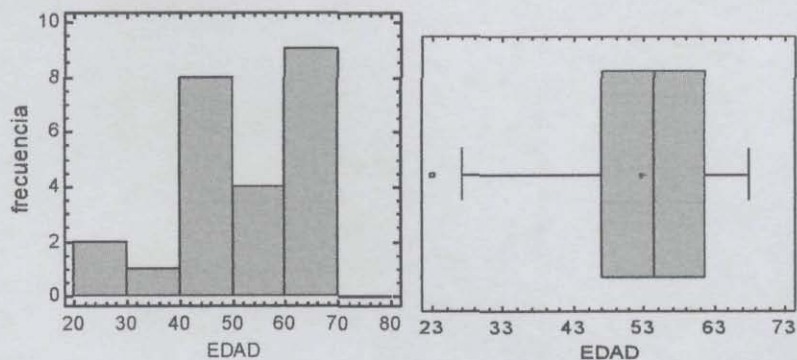
Por variables basales, reportamos que la mayoría de pacientes fueron del género femenino (66.6%, n=16) (gráfica 2).

GRÁFICA 2. FRECUENCIA POR GÉNERO.



La edad media fue de 52.5 años $\pm$ 4.9 años (IC del 95% 47.5 – 57.4) (gráfica 3). Cabe señalar, que sólo un paciente fue menor de 40 años (23 años), el cual presentó RVS, esto en relación a la edad como factor predictivo de respuesta, con punto de corte en los 40 años.

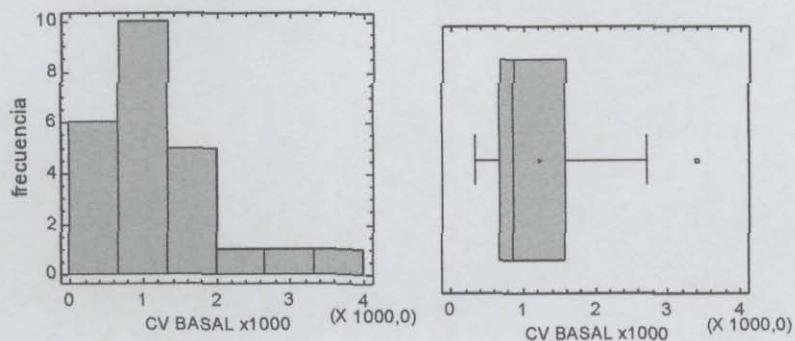
GRÁFICA 3. DISTRIBUCION POR EDAD.



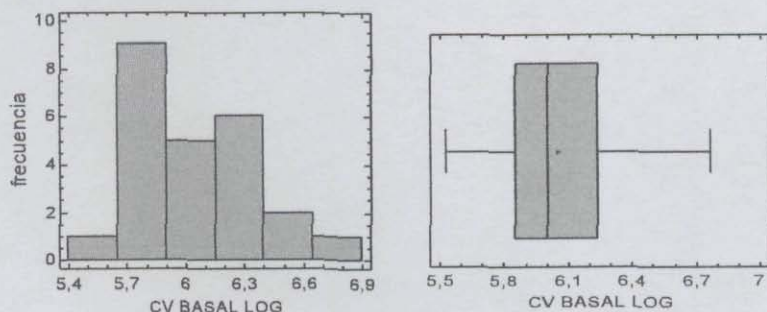
La CV basal en promedio fue 1,219,000 UI/ml $\pm$ 322,887 UI/ml (IC del 95% 896,113 – 1,541,890) (gráfica 4); expresado en Log, la CV basal promedio fue de 6.05Log $\pm$ 0.12Log

(IC del 95% 5.92 – 6.17) (gráfica 5). Por género, la CV basal en mujeres fue discretamente menor en comparación con el género masculino (1,192,310UI/ml - 6.04Log- vs 1,273,880 UI/ml -6.07Log) sin representar una diferencia estadística significativa ($P=0.81$).

GRÁFICA 4. CARGA VIRAL BASAL UI/ml (por 1,000,000).

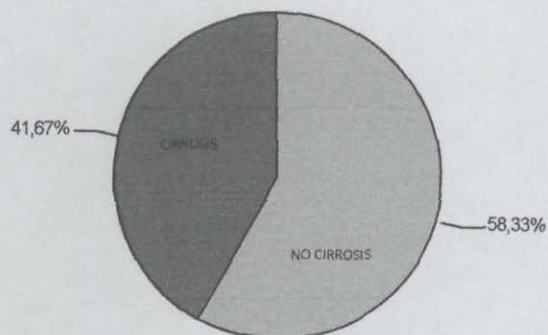


GRÁFICA 5. CARGA VIRAL BASAL Log.

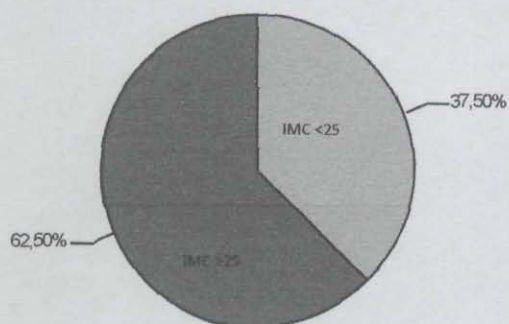


Dentro de las comorbilidades más significativas, se reportó la presencia de cirrosis (gráfica 6) en clase funcional A en 10 pacientes (41.6%). El sobrepeso/obesidad se documentó en 15 pacientes (62.5%) al contar con índice de masa corporal mayor a 25kg/m² (gráfica 7).

GRÁFICA 6. FRECUENCIA DE CIRROSIS.

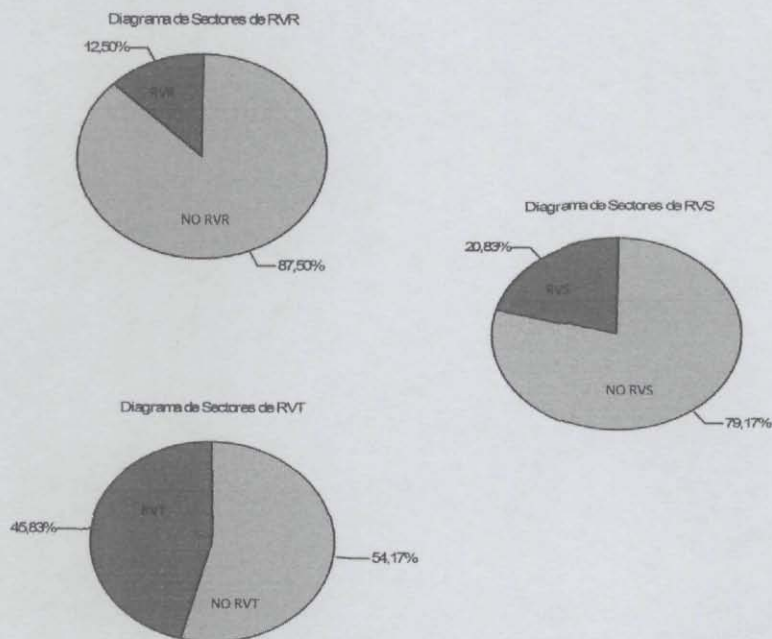


GRÁFICA 7. FRECUENCIA DE SOBREPESO/OBESIDAD.



En la gráfica 8, se observa la frecuencia de pacientes de acuerdo a su cinética viral; con RVR en 12.5% (n=3), la RVT se presentó en 45.8% (n=11) de la población; mientras que la RVS se reportó en 20.8% (n=5),

GRÁFICA 8. FRECUENCIAS DE RESPUESTAS VIRALES A TRATAMIENTO.



De forma inesperada, la determinación del PNS del gen IL28B fue del 100% (n=24) para la variante alélica T/T, ninguno de los 24 pacientes es portador de la variante protectora C/C. Debido a esto, no es posible determinar la probabilidad de RVS en comparación de las otras variantes alélicas.

Se realizó análisis univariado (cuadro 2) a través de chi-cuadrada, tomando en cuenta la RVS como variable dependiente, demostrando ninguna relación estadística significativa entre la RVS y: RVT (P=0.76) ni RVR (P=0.06).

CUADRO 2. REGRESIÓN LOGÍSTICA - RVS

Pruebas de Razón de Verosimilitud

<i>Factor</i>	<i>Chi-Cuadrada</i>	<i>Valor-P</i>
RVT	0,0871509	0,7678
<i>Factor</i>	<i>Chi-Cuadrada</i>	<i>Valor-P</i>
RVR	3,51955	0,0606

Al realizar regresión logística (cuadro 3) por medio de análisis multivariado (RVR, RVT, IMC, Género, Cirrosis) se reportó a la RVR como el único factor predictivo de RVS con relación estadísticamente significativa ($P=0.005$).

CUADRO 3. REGRESIÓN LOGÍSTICA. - RVS

Factores: RVR, RVT, IMC, FEMENINO, CIRROSIS

Pruebas de Razón de Verosimilitud

<i>Factor</i>	<i>Chi-Cuadrada</i>	<i>Valor-P</i>
RVR	7,64838	0,0057
RVT	0,0000456555	0,9946
IMC	0,0428843	0,8359
FEMENINO	2,58423	0,1079
CIRROSIS	0,271499	0,6023

El estudio cumplió con todos los objetivos específicos planteados:

1. Se determinó el PNS rs12979860 del gen IL28B en todos los pacientes, el 100% de ellos se reportó con la variante T/T.
2. Se cuantificaron las cargas virales a las semanas 0, 4, 48 y 72 semanas en todos los pacientes que lo ameritaban.
3. Se determinó la respuesta viral rápida en todos los pacientes, siendo positiva sólo en 3 de ellos (12.5%).
4. Se determinó la respuesta viral sostenida en todos los pacientes, estando presente sólo en 5 pacientes (20.8%).

12. DISCUSION.

La infección crónica por VHC, tiene como tratamiento estándar la aplicación de PegIFN alfa y Ribavirina, sin embargo, este esquema solamente ofrece cerca del 50% de eficacia para lograr la curación (1,2,3,4). Es por ello, que existe una investigación continua sobre factores que puedan predecir la respuesta viral sostenida, incluso antes de iniciar el tratamiento combinado. En el 2009, Ge et al. (7) demostró la asociación de un PNS cerca del gen de la IL28B con la RVS en pacientes con genotipo 1. Thompson et al en 2010 (8), usando la misma cohorte del estudio IDEAL, diseñó un estudio basado en intención a tratar, para demostrar el uso clínico de estos hallazgos genéticos. Demostró que la asociación es proporcional al aumentar la cinética viral temprana, es decir, PNS favorables aumentan la tasa de RVR y por otra parte, alcanzan tasas mayores al 80% de RVS en pacientes en quienes no alcanzaron la RVR. Se demostró también que la frecuencia de alelos varía entre las diferentes razas, siendo los caucásicos, la población que más se beneficia de estas diferencias, al contar con mayor frecuencia el genotipo C/C IL28B. Todo lo anterior, se comprueba a través de análisis multivariados, definiendo al factor genético como el predictor pre-tratamiento más poderoso (1,7,8,16,22). En México, sólo existe una cohorte que asoció esta variación genética del hospedero (27). No existe, a la fecha, estudios sobre tasa de RVS y su asociación al PNS del gen IL28B en poblaciones con factores de mal pronóstico basales ("perfil difícil").

El objetivo de nuestro estudio fue analizar la asociación que existe entre el PNS rs12979860 y la RVS en una cohorte de pacientes mexicanos con características de mal pronóstico, como son el genotipo viral 1 y la carga viral basal alta. El tamaño de la muestra (24 pacientes) es relativamente pequeño, justificado por los criterios de selección que generan un subgrupo reducido de pacientes que recibieron terapia estándar.

Existe en la literatura, la publicación de un solo trabajo mexicano encabezado por Martínez-Gómez LE et al (27), quien estudió un grupo de 83 pacientes, sin embargo constaba tanto de genotipo 1 como del genotipo 2; por otra parte no se trató de pacientes con un perfil basal difícil. Martínez-Gómez concluyó que el PNS rs12979860 es el mejor predictor de RVS en pacientes mexicanos y que la frecuencia de sus alelos es similar a la reportada de forma global.

Nuestra cohorte constó de 24 pacientes, y se documentó que el 100% es portador del PNS IL28B T/T, por lo que no podemos confirmar hasta el momento los resultados mencionados por otros autores en relación al poder predictivo del polimorfismo CC IL28B. Es probable, que el tamaño de la muestra influya en la frecuencia de los alelos, por lo que consideramos que aumentar el tamaño de la misma, probablemente favorezca a la aparición de otros alelos. Este hallazgo, sin embargo, es inesperado considerando que diferentes autores han confirmado la relación “contra-intuitiva” entre el polimorfismo favorable y cargas virales basales altas (7,8), por lo que esperábamos encontrar al genotipo CC de forma predominante. Esta relación entre la RVS y la carga viral basal, ha sido justificada por la probabilidad de un sesgo de selección en los estudios de asociación de genoma amplio pivote (7,12,13), entendiendo que, pacientes con genotipo favorable y cargas virales basales bajas tendrían mayor probabilidad de lograr aclaramiento natural, por ende, los pacientes genotipo CC incluidos en estos estudios, deberían contar con cargas virales altas que condicionen la cronicidad de la enfermedad (28). Este fenómeno tampoco fue reproducido en nuestro estudio, incluso consideramos que la media de la carga viral basal en nuestra población es una de las más altas reportadas a nivel mundial. Si a la característica anterior, agregamos que el 100% de nuestros pacientes son genotipo T/T, se espera que la respuesta a tratamiento estándar se encuentre por debajo de la media publicada en diferentes grupos tanto mexicanos como hispanos (7,8,27). Sin embargo, nuestra tasa de RVS (20.8%) es similar a la reportada

por Ge et al en la cohorte del estudio IDEAL (7), por Thompson et al en la misma cohorte con un diseño de ITT en población hispana (8) y por Martínez-Gómez en pacientes mexicanos (9).

Mención especial amerita la RVR como factor predictivo de RVS, puesto que el 100% de pacientes que lograron la negativización de RNA a la semana 4, alcanzaron la curación virológica tras 48 semanas de tratamiento estándar con PEG-IFN y RBV, independientemente de su genotipo IL28B y de su carga viral basal. Por lo que se confirma la aseveración realizada por Ge et al (7), en relación a que la RVR es uno de los factores predictivos de RVS más potente; su desventaja es el hecho de ser un predictor durante-tratamiento, por lo que el beneficio de no someter al paciente a los efectos deletéreos del tratamiento estándar, no es posible.

Nuestros resultados corroboran las sugerencias realizadas en los estudios considerados pivote sobre la IL28B (7,8,12,13), donde se recomienda el uso del PNS del gen IL28B para mejorar la toma de decisiones médicas, en una realidad de terapia individualizada. Los pacientes con genotipo favorable tienen altas probabilidades de alcanzar RVS, por lo que son los candidatos ideales para recibir tratamiento estándar. En contraste con los pacientes con genotipo no-C/C, especialmente con otros factores de pobre pronóstico, como lo son los pacientes en nuestra cohorte; en quienes la urgencia de iniciar tratamiento estándar debería ser cuestionada ante la posibilidad de nuevas terapias con agentes antivirales de acción directa en un futuro cercano.

El mecanismo funcional a través del cual, el genotipo de IL28B favorece el aclaramiento natural e inducido del VHC se desconoce. El producto final de dicho gen, el IFN lambda 3, es miembro de una reciente familia de interferones, a los cuales se les ha demostrado actividad *in vivo* e *in vitro* contra el virus C de la hepatitis. Por ello, se considera que alteraciones en la citocina final, o de sus ISGs, condicionen efectos deletéreos en su función antiviral.

En base a lo anterior, se desprende nuestra sugerencia. Consideramos que en países como el nuestro, en donde la terapia triple a nivel de Salud Pública es una promesa poco alcanzable, y que nuestro tratamiento estándar seguirá siendo a base de PEG-IFN/RBV, la determinación del polimorfismo del gen IL28B podrá determinar una terapia personalizada. Específicamente, los pacientes con genotipo TT y perfil basal “difícil”, tienen una probabilidad de alcanzar RVS del 20%; probabilidad que disminuye hasta menos del 10% en pacientes que no alcanzaron RVR, por lo que concordamos con la idea de posponer terapia hasta la posibilidad de usar antivirales de acción directa. Por otra parte, este mismo grupo de pacientes, pero que SI alcanzan RVR, tienen una probabilidad casi absoluta de lograr curación virológica.

Es por ello que nuestro grupo propone dar terapia dual a este grupo específico de pacientes, con punto crítico en la semana 4 de tratamiento, pues al presentar carga viral positiva en dicha determinación, se deberá suspender la terapia hasta nuevas opciones; si por el contrario, se presentara RVR, se deberá continuar terapia por 48 semanas pues la posibilidad de alcanzar RVS es casi un hecho. Es probable que el poder predictivo de la RVR aumente conforme mayor sea la carga viral basal.

13. CONCLUSIONES.

- 13.1 Los pacientes mexicanos con infección crónica por VHC, genotipo 1 y con cargas virales basales altas, presentan la variante T/T del PNS rs12979860 del gen IL28B al 100%; seguramente, este porcentaje se modificará al aumentar el tamaño de la muestra.
- 13.2 Los pacientes infectados por VHC genotipo 1 y con cargas virales basales altas tienen poca probabilidad de alcanzar la RVR; sin embargo, aquellos que la obtengan, tendrán la certeza de alcanzar la curación virológica al 100%.

14. BIBLIOGRAFIA.

1. Craxi A., et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2011;55:245-264.
2. Cisneros G., et al. Guías clínicas de diagnóstico y tratamiento de Hepatitis C. *Rev Gastroenterol Mex* 2007;72:179-180.
3. Barrera C., Cabrera A., Dehesa V., et al. Diagnóstico y tratamiento de Hepatitis C, México; Instituto Mexicano del Seguro Social, 2009.
4. Ghany et al. Diagnosis, Management, and Treatment of Hepatitis C: an Update. *AASLD Guidelines. Hepatology* 2009;49:1335-1374.
5. McHutchinson JG, Lawitz, Shiffman ML, et al. Peginterferon alfa-2b or alfa 2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. *New Engl J Med* 2009; 361:580-593.
6. Manns MP, McHutchinson JG, Gordon SC, et al. Peginterferon alpha 2a plus ribavirin compared with peginterferon 2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. *Lancet* 2001;258:958-965.
7. Ge D, Fellay J, Thompson AJ. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009;46:399-401.
8. Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, et al. Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2010;139:120-9.
9. Honda M, Sakai A, Yamashita T, et al. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2010; 139:499-509.
10. Dill MT, Duong FH, Vogt JE, Bibert S. Interferon-induced gene expression is a stronger predictor of treatment response than IL28B genotype in patients with hepatitis C. *Gastroenterology* 2011; 140:1021-31.

11. Ank N, West H, Paludan SR. IFN-lambda: novel antiviral cytokines. *J Interferon Cytokine Res* 2006;26:373-379.
12. Suppiav V, Moldovan M, Ahlensteil G, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 2009;41:1100-1104.
13. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009;41:105-1109.
14. Bitetto D. Complementary role of vitamin D deficiency and the interleukin-28B rs12979860 C/T polymorphism in predicting antiviral response in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2011;53:1118-26.
15. Moghaddam A, Melum E, Reinton N. IL28B genetic variation and treatment response in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection. *Hepatology* 2011;53:746-54.
16. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. *J Hepatol* 2011;54:439-48.
17. Pearlman BL. The IL-28 genotype: how it will affect the care of patients with hepatitis C virus infection. *Curr Gastroenterol Rep* 2011;13:78-86.
18. Hayes CN, Kobayashi M, Akuta N HCV substitutions and IL28B polymorphisms on outcome of peg-interferon plus ribavirin combination therapy. *Gut* 2011; 60:2617.
19. Stättermayer AF, Stauber R, Hofer H. Impact of IL28B genotype on the early and sustained virologic response in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011; 9:344-350.

20. Montes-Cano MA, García-Lozano JR, Abad-Molina C. Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *Hepatology* 2010;52:33-7.
21. McCarthy JJ, Li JH, Thompson A. Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. *Gastroenterology* 2010;138:2307-14.
22. Li M, Liu X, Zhou Y, Su SB. Interferon-lambdas: the modulators of antiviral, antitumor, and immune responses. *J Leukoc Biol.* 2009;86:23-32.
23. Robek MD, Boyd BS, Chisari FV. Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. *J Virol.* 2005;79:3851-4.
24. Tillmann HL, Patel K, Muir AJ. Beneficial IL28B genotype associated with lower frequency of hepatic steatosis in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2011;14.
25. Lindh M, Lagging M, Arnholm B. IL28B polymorphisms determine early viral kinetics and treatment outcome in patients receiving peginterferon/ribavirin for chronic hepatitis C genotype 1. *J Viral Hepat* 2011;18:e325-31.
26. Lotrich FE, Loftis JM, Ferrell RE. IL28B Polymorphism Is Associated with Both Side Effects and Clearance of Hepatitis C During Interferon-Alpha Therapy. *J Interferon Cytokine Res.* 2010; 6.
27. Martínez-Gómez LE, et al. IL28B polymorphisms predict the response to chronic Hepatitis C virus infection treatment in a Mexican population. *Annals of Hepatology* 2012;11:876-881.
28. Thomas Urban, Charlton, B. Goldstein. Introduction to the Genetics and Biology of Interleukin-28B. *Hepatology* 2012;56:361-366.

15. ANEXOS.

15.1 HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS:

Instituto Mexicano del Seguro Social.

Servicio de Gastroenterología

Clínica de Hepatitis.

NOMBRE:	GENERO Y EDAD:
FECHA:	AFIL:
DX:	GENOTIPO VIRAL:
CARGA VIRAL BASAL	RVR:
RVS	GENOTIPO IL28B:
COMORBILIDADES:	IMC:

CARGAS VIRALES:

BASAL	SEMANA 4	SEMANA 48	SEMANA 72

16. CARTA DE CONSENTIMIENTO.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLITICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN

Nombre del estudio:

Patrocinador externo (si aplica):

Lugar y fecha:

Centro Médico Nacional "Manuel Ávila Camacho"; Puebla, Puebla. Marzo 2012

Número de registro:

Justificación y objetivo del estudio:

Analizar el polimorfismo genético del gen IL28B como factor predictivo de respuesta virológica sostenida en pacientes mexicanos con infección crónica por VHC con factores predictivos de mal pronóstico.

Procedimientos:

PUNCIÓN DE SANGRE VENOSA PARA GENOTIPIFICACIÓN DE IL28B

Posibles riesgos y molestias:

DOLOR RELACIONADO A PUNCIÓN.

Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:

RECONOCIMIENTO DE FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA A TRATAMIENTO MEDICO.

Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:

NA.

Participación o retiro:

Privacidad y confidencialidad:

En caso de colección de material biológico (si aplica):

☐
☐
☐

No autoriza que se tome la muestra.

Sí autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.

Sí autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros.

Disponibilidad de tratamiento médico en derechohabientes (si aplica):

Beneficios al término del estudio:

Individualización de terapia médica.

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Investigador Responsable:

VICTOR HUGO GARCIA Y GARCIA

Colaboradores:

DR DANIEL ERASMO MELENDEZ MENA

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congressos, Colonia Doctores, México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comision.etica@imss.gob.mx

Nombre y firma del sujeto

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 1

Testigo 2

Nombre, dirección, relación y firma

Nombre, dirección, relación y firma

Este formato constituye una guía que deberá completarse de acuerdo con las características propias de cada protocolo de investigación, sin omitir información relevante del estudio

Clave: 2810-009-013

