



---

# **UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE MEDICINA. DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

## **ESTUDIO DEL FACTOR GENÉTICO IL-28B EN LA TRANSMISIÓN VERTICAL DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C Y EN LA EVOLUCIÓN HACIA LA CRONICIDAD DE LOS NIÑOS INFECTADOS**

**VIRUS DE LA HEPATITIS C EN LA GESTACIÓN Y PUERPERIO.**

**María Angustias Salmerón Ruiz**

**Enero 2012**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: María Angustias Salmerón Ruiz  
D.L.: GR 1895-2012  
ISBN: 978-84-9028-083-6



# **ESTUDIO DEL FACTOR GENÉTICO IL-28B EN LA TRANSMISIÓN VERTICAL DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C Y EN LA EVOLUCIÓN HACIA LA CRONICIDAD DE LOS NIÑOS INFECTADOS**

Tesis Doctoral presentada por María Angustias Salmerón Ruiz para optar al grado de Doctora por la Universidad de Granada.

## Directores de Tesis:

Dra. ÁNGELES RUIZ EXTREMERA, Profesora Titular de Pediatría del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

Dr. FRANCISCO JAVIER SALMERÓN ESCOBAR, Catedrático de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

Dr. JOSÉ ANTONIO MUÑOZ GÁMEZ, Contratado Ayudante del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Área de Apoyo a la Investigación, Hospital Universitario San Cecilio.



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada por la doctorando María Angustias Salmerón Ruiz en el Área de Apoyo a la Investigación del Hospital Universitario San Cecilio y concluida el 10 de Enero de 2012.

Fdo. María Angustias Salmerón Ruiz.



## **AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS**

**Dra. ÁNGELES RUIZ EXTREMEIRA**, PROFESORA TITULAR DE PEDIATRÍA DEL DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

**CERTIFICA:** Que la presente Tesis, titulada "**ESTUDIO DEL FACTOR GENÉTICO IL-28B EN LA TRANSMISIÓN VERTICAL DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C Y EN LA EVOLUCIÓN HACIA LA CRONICIDAD DE LOS NIÑOS INFECTADOS**", de la que es autora la Lda. Dña. María Angustias Salmerón Ruiz, ha sido realizada bajo mi dirección en el Área de Apoyo a la Investigación del Hospital Universitario San Cecilio de Granada.

Revisado el presente trabajo, considero que tiene la calidad científica necesaria para ser defendido ante el Tribunal que se designe al efecto, por lo que: **AUTORIZO** la presentación de la presente Tesis para su defensa y obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Y para que conste y surta sus efectos en el expediente correspondiente, expido la presente certificación en Granada a 10 de Enero de 2012.

Fdo. Dra. Ángeles Ruiz Extremera





## **AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS**

**Dr. FRANCISCO JAVIER SALMERÓN ESCOBAR**, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

**CERTIFICA:** Que la presente Tesis, titulada "**ESTUDIO DEL FACTOR GENÉTICO IL-28B EN LA TRANSMISIÓN VERTICAL DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C Y EN LA EVOLUCIÓN HACIA LA CRONICIDAD DE LOS NIÑOS INFECTADOS**", de la que es autora la Lda. Dña. María Angustias Salmerón Ruiz, ha sido realizada bajo mi dirección en el Área de Apoyo a la Investigación del Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada.

Revisado el presente trabajo, considero que tiene la calidad científica necesaria para ser defendido ante el Tribunal que se designe al efecto, por lo que: **AUTORIZO** la presentación de la presente Tesis para su defensa y obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Y para que conste y surta sus efectos en el expediente correspondiente, expido la presente certificación en Granada a 10 de Enero de 2012.

Fdo. Dr. Javier Salmerón Escobar



## **AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS**

**Dr. JOSÉ ANTONIO MUÑOZ GÁMEZ**, CONTRATADO AYUDANTE DEL FONDO DE INVESTIGACIONES SANITARIAS (FIS), ÁREA DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN, HOSPITAL UNIVERSITARIO SAN CECILIO.

**CERTIFICA:** Que la presente Tesis, titulada “ **ESTUDIO DEL FACTOR GENÉTICO IL-28B EN LA TRANSMISIÓN VERTICAL DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C Y EN LA EVOLUCIÓN HACIA LA CRONICIDAD DE LOS NIÑOS INFECTADOS**”, de la que es autora la Lda. Dña. María Angustias Salmerón Ruiz, ha sido realizada bajo mi dirección en el Área de Apoyo a la Investigación del Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada.

Revisado el presente trabajo, considero que tiene la calidad científica necesaria para ser defendido ante el Tribunal que se designe al efecto, por lo que: **AUTORIZO** la presentación de la presente Tesis para su defensa y obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Y para que conste y surta sus efectos en el expediente correspondiente, expido la presente certificación en Granada a 10 de Enero de 2012.

Fdo. Dr. José Antonio Muñoz Gámez



## **AGRADECIMENTOS**



Gracias a mis directores de tesis: a Ángela, Javier y José Antonio por estar siempre disponibles, por ayudarme en todo y darme en todo momento su apoyo y cariño, muy especialmente a Ángela, por permitir que mi tesis fuera parte del trabajo más importante de su vida.

A todo el grupo de investigación CTS-277 por vuestras búsquedas bibliográficas, por vuestras horas de laboratorio, por vuestros análisis estadísticos, por vuestras publicaciones, por vuestras horas de trabajo, por vuestro aliento y por vuestro cariño.

A mis padres por su paciencia, a mi hermana por estar siempre ahí.

A Óscar por estar siempre ayudándome en todo, por aguantar estos meses de encierro, mis agobios y mis preocupaciones, siempre con una sonrisa y por corregir el formato, la gramática y la ortografía, a pesar de que él no tenga nada que ver con la medicina.

A los pacientes; madres e hijos. Sin su colaboración no se podría realizar ningún proyecto de investigación.

A mis compañeros y amigos. Sin su ánimo, comprensión y cariño, todo hubiera sido mucho más difícil.





# Índice

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>1.1</b>	<b>Generalidades del VHC.....</b>	<b>23</b>
1.1.1	Características virológicas.....	23
1.1.2	Genotipos y cuasiespecies.....	25
<b>1.2</b>	<b>Epidemiología.....</b>	<b>26</b>
<b>1.3</b>	<b>Historia natural en el adulto y el niño.....</b>	<b>30</b>
<b>1.4</b>	<b>Tratamiento.....</b>	<b>33</b>
1.4.1	Indicaciones de tratamiento en el niño y en el adulto.....	33
1.4.2	Fármacos.....	34
1.4.3	Tipos de respuesta al tratamiento antiviral.....	37
1.4.4	Eficacia en niños.....	39
1.4.5	Efectos adversos en niños.....	40
1.4.6	Factores de respuesta al tratamiento.....	41
<b>1.5</b>	<b>Transmisión vertical del VHC y cronificación del VHC en el niño.....</b>	<b>44</b>
1.5.1	Epidemiología del VHC en la gestante y en el niño.....	44
1.5.2	La respuesta inmune del VHC durante la gestación.....	45
1.5.3	Transmisión vertical del VHC.....	47
1.5.4	Factores de riesgo en la transmisión del VHC.....	48
1.5.5	Perspectivas de tratamiento en el embarazo, puerperio y periodo neonatal.....	52
1.5.6	Factores genéticos e inmunológicos.....	53
<b>2</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>55</b>
<b>2.1</b>	<b>Hipótesis.....</b>	<b>57</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>57</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
<b>3.1</b>	<b>Diseño del estudio:.....</b>	<b>61</b>
<b>3.2</b>	<b>Ámbito de estudio:.....</b>	<b>61</b>
<b>3.3</b>	<b>Sujetos de estudio:.....</b>	<b>61</b>

3.3.1	Criterios de inclusión: .....	61
3.3.2	Criterios de exclusión: .....	61
<b>3.4</b>	<b>Variables de estudio:.....</b>	<b>64</b>
<b>3.5</b>	<b>Recogida y análisis de datos: .....</b>	<b>65</b>
<b>3.6</b>	<b>Métodos .....</b>	<b>65</b>
<b>3.7</b>	<b>Estudio estadístico.....</b>	<b>68</b>
<b>3.8</b>	<b>Consentimiento informado de los pacientes.....</b>	<b>68</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>71</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>119</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....</b>	<b>127</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>131</b>

## **Abreviaturas**

ADPV: Adictos a Drogas por Vía Parenteral  
ARN: Ácido Ribonucleico  
Ac-VHC: Anticuerpos del Virus de la Hepatitis C  
CHC: Carcinoma Hepatocelular  
CH: Cirrosis Hepática  
CMN: Células Mononucleares  
CPA: Célula Presentadora de Antígenos  
HCC: Hepatitis Crónica C  
IFN: Interferón  
IFN-peg: Interferón pegilado  
NR: No Respondedor  
NS: No Estructurales  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa  
RVP: Respuesta Viroológica Precoz  
RVR: Respuesta Viroológica Rápida  
RVS: Respuesta Viroológica Sostenida  
TV: Trasmisión Vertical  
VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana  
VHC: Virus de la Hepatitis C

## **Pies de figuras**

*Figura 1. Estructura de la partícula viral*

*Figura 2. Organización genómica del VHC (superior) y procesamiento de las poliproteínas (inferior).*

*Figura 3. Prevalencia global de la hepatitis C en 2010 (%)*

*Figura 4. Historia natural del VHC*

*Figura 5. Mecanismo de acción de IFN y RBV*

*Figura 6. Resumen del seguimiento durante el tratamiento*

*Figura 7. Activación del sistema inmune tras una infección viral*

*Figura 8. Transaminasas en gestantes anti-VHC positivas*

*Figura 9. ALT durante la gestación y puerperio en mujeres con hepatitis crónica C*

*Figura 10. Evolución temporal de ALT y carga viral en madres ARN-VHC+vas tipo A*

*Figura 11. Correlación entre las diferencias parto vs. post-parto en ALT y carga viral en madres ARN-VHC+vas tipo A*

*Figura 12. Carga viral en madres ARN-VHC+vas tipo A categorizadas como carga viral alta o baja en el parto*

*Figura 13. Evolución temporal de ALT y carga viral en madres ARN-VHC+vas tipo B*

*Figura 14. Correlación entre las diferencias parto vs. post-parto en ALT y carga viral en madres ARN-VHC+vas tipo B*

*Figura 15. Carga viral en madres ARN-VHC+vas tipo B categorizadas como carga viral alta o baja en el parto*

*Figura 16. Transmisión vertical en función de la carga viral en el parto y del tipo de madre según niveles de ALT*

## **Tablas**

Tabla 1. Cohorte general y transmisión vertical

Tabla 2. Características clinicopatológicas de las mujeres con hepatitis crónica C

Tabla 3. Características de las mujeres que aclaran el VHC postparto

# **1 Introducción**



## 1.1 Generalidades del VHC

El virus de la hepatitis C (VHC) fue identificado y caracterizado en 1989 después de múltiples investigaciones para la detección del genoma del virus de la hepatitis “no-A, no-B” (NANB), reconociéndose como la causa principal de este tipo de hepatitis. La prevalencia de la infección por VHC alcanza un 2-3% en nuestra área geográfica. El desarrollo de una infección persistente es una de las características más importantes del VHC. Así, más del 80% de los individuos que presentan primoinfección desarrollarán una infección crónica y se ha convertido en la causa principal de la hepatitis crónica, de la cirrosis hepática (CH) y del carcinoma hepatocelular (CHC) y así como en la primera indicación de trasplante hepático en nuestro medio [1].

### 1.1.1 Características virológicas

El VHC pertenece a la familia *Flaviviridae*, que incluye patógenos que afectan a humanos y animales. La familia *Flaviviridae* está compuesta al menos, por tres géneros diferentes, como el *Pestivirus*, el *Flavivirus* y el *Hepacivirus* cuyo único miembro es el VHC.

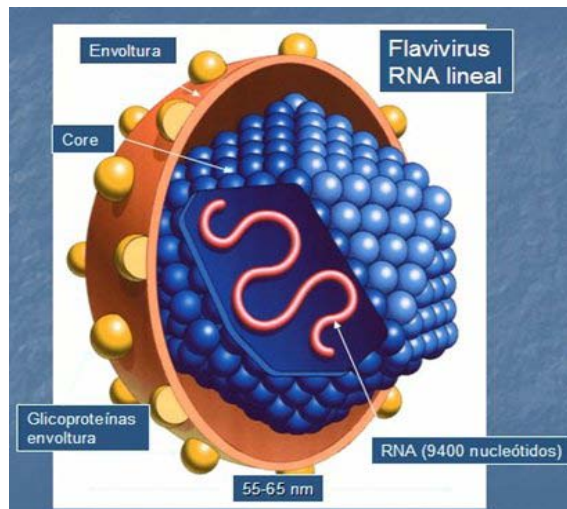


Figura 1. Estructura de la partícula viral



La partícula viral (virión) del VHC es de pequeño tamaño (alrededor de 50 nm de diámetro) que se encuentra recubierta por una envoltura lipídica (Fig. 1). El genoma del VHC está compuesto por una única cadena de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad positiva, con una longitud aproximada de 9600 nucleótidos que codifican una poliproteína de unos 3000 aminoácidos. Este genoma se encuentra rodeado por el core (nucleocápside icosaédrica), que a su vez está recubierta por una envoltura lipídica en la que se encuentran dos glucoproteínas virales (E1 y E2) necesarias para formar las partículas infectivas. E1 y E2 están implicadas en la unión a los receptores celulares de las células huésped para su posterior fusión y entrada al citoplasma celular. Estas glucoproteínas presentan un alto grado de heterogeneidad genética [2]. Al core y las glucoproteínas E1 y E2 se las conoce como grupo de proteínas estructurales y los genes que las codifican se encuentran localizados en el extremo 5' del RNA viral (Fig. 2). Estudios *in vitro* han demostrado que la proteína del core podría interactuar con protooncogenes de las células del huésped, estando implicada en el desarrollo de CHC en pacientes con infección crónica por el VHC, al igual que ha ocurrido con otras regiones genómicas [3]

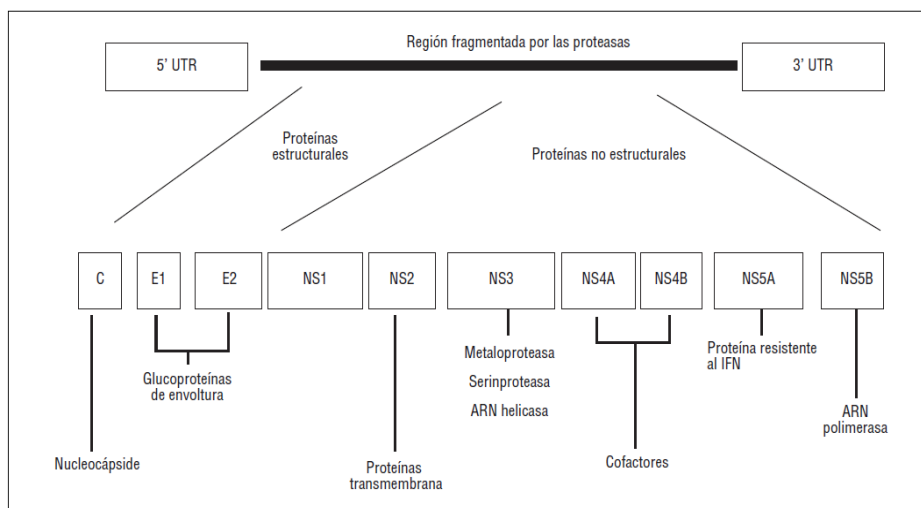


Figura 2. Organización genómica del VHC (superior) y procesamiento de las poliproteínas (inferior).

El grupo de las proteínas no estructurales (NS) está formada básicamente por proteínas con actividad proteasa, helicasa y polimerasa, necesarias para la replicación viral. Por otro lado, la región NS5A se ha relacionado con la modulación de la respuesta antiviral del huésped mediada por el interferón (IFN). En concreto, se ha observado que la acumulación de mutaciones en una determinada región de NS5A, la conocida como ISDR (*Interferon Sensitivity Determining Region*), se relaciona con una mejor respuesta al IFN en pacientes infectados por el genotipo 1b del VHC [4-6]. Además, la presencia de mutaciones en la región PKRBD se ha relacionado con una buena respuesta al tratamiento [7].

### **1.1.2 Genotipos y cuasiespecies**

La variabilidad genética del VHC se describe bajo dos conceptos: los genotipos y cuasiespecies. Así, se habla de genotipo en referencia a la heterogeneidad de secuencias entre diferentes individuos y de cuasiespecies cuando nos referimos a la heterogeneidad genética en un mismo individuo. En este contexto, se han descrito seis genotipos principales (del 1 al 6) y más de 50 subtipos o subgenotipos (Ej.: *1a, 1b, 2a...*) del VHC.

El genotipo 1 es el más común en el mundo occidental, representando un 70-80% de los casos. Los genotipos más frecuentes en Estados Unidos y Europa occidental son el 1a y el 1b, seguidos de los genotipos 2 y 3. Los genotipos virales difieren poco en el pronóstico o severidad en la enfermedad sin embargo difieren en la respuesta al tratamiento.

En la práctica clínica, el genotipo tiene importancia clínica ya que determina la respuesta potencial de la terapia basada en el interferón y la duración que va a requerir la misma. Los genotipos 1, 4 y 5 responden menos a dicho tratamiento que el resto de genotipos (genotipos 2, 3 y 6). La duración de la terapia estándar basada en el interferón para los genotipos 1 y 4 es de 48 semanas, mientras que para los genotipos 2 y 3 es solo de 24 semanas [8].

Una de las características más importantes y con mayor implicación en la patogenia de la infección por el VHC es la gran heterogeneidad genética del VHC a nivel de individuo. Este fenómeno es debido a defectos en la actividad reparadora

de la ARN polimerasa dependiente de ARN y a la ausencia de actividad exonucleasa 5'-3'. El resultado es la aparición de una población de variantes genómicas que difieren de la original y que se denominan en su conjunto cuasiespecies. La cuasiespecie predominante sería aquella que presenta una mayor capacidad replicativa en el huésped. En los virus de ARN, las regiones que presentan mayor variabilidad genética son aquellas expuestas a la acción del sistema inmune, de tal manera que se ha propuesto que la variación antigénica es el resultado directo de la selección de variantes como respuesta a la inmunidad humoral y celular. En la región codificadora, los genes de envoltura E1 y E2, conocidos como región hipervariable 1 (HVR-1), muestran la mayor variación genética; sin embargo, en el gen que codifica la proteína core, la región 5'-NRT y fragmentos de 3'-NTR están altamente conservados.

La diversidad de las cuasiespecies de VHC puede, por tanto, contribuir al desarrollo de la cronicidad durante la infección debido a los rápidos cambios que se suceden en las proteínas de la envoltura viral como mecanismo de escape a la presión inmune ejercida por el huésped. Esta diversidad también tendrá importancia en el diseño y desarrollo de vacunas, selección de mutantes resistentes durante el tratamiento y diseño e interpretación de los métodos diagnósticos.

## **1.2 Epidemiología**

El VHC es un problema de salud a nivel mundial por su elevada prevalencia. La Organización Mundial de la Salud (OMS), en 1999, calculó que 170 millones de personas, un 3% de la población mundial, estaban infectadas [9]. Además se determinó que aproximadamente se presentan entre 3 y 4 millones de nuevos casos de infección de VHC al año en todo el mundo. En España, se ha descrito que la prevalencia en la población general es aproximadamente del 2%, con algo más de 900.000 personas afectadas y para la subpoblación de gestantes infectadas en torno al 0,5-1,4% [10,11]. Además se conoce que el 70% de la población española infectada tiene el genotipo 1. Los últimos datos epidemiológicos recogidos por el Dr. Lavanchy [12] publicados en febrero de 2011, indican que las cifras globales no están sufriendo cambios significativos en los últimos años, con una estimación global de 160 millones de personas infectadas y una prevalencia global del 2,4%,

pero sí que se presentan datos muy variables de unas regiones a otras. El país que registra una mayor prevalencia de personas con anticuerpos del VHC (Ac-VHC) es Egipto, con un 14% de la población. Por otro lado, en algunos países incluso se ha registrado un aumento significativo de la prevalencia, a los que hay que sumar, regiones donde no existen datos suficientes pero se sospecha una alta prevalencia. La prevalencia real es aún desconocida y es necesario la realización de estudios epidemiológicos para conocer el alcance del problema (Fig.3) [12].

Se pueden identificar tres patrones epidemiológicos diferentes: 1) en países como EEUU y Australia donde la mayor parte de las infecciones por VHC aparecen en personas entre 39 y 40 años, lo que indica que la principal transmisión de VHC ocurrió en el pasado, de forma predominante entre adultos jóvenes infectados a través de drogadicción intravenosa, 2) en áreas como Japón o el sur de Europa donde la prevalencia de infección por VHC es mayor en personas de edad avanzada, lo que sugiere que el riesgo de transmisión del VHC era más elevado en décadas pasadas (hace más de 30 años) que en la actualidad. En estos países los procedimientos médicos, en particular la inyección con reutilización de jeringas de vidrio contaminadas y las prácticas médicas alternativas, pueden haber desempeñado un papel principal en la diseminación del virus y 3) en países como Egipto, donde se observan tasas elevadas de infección en todos los grupos de edad, lo que sugiere que el alto riesgo de adquirir el VHC continúa.

Hay que hacer constar que un alto porcentaje de personas con infección crónica permanece asintomático y aún no han sido diagnosticadas, pero, probablemente, recibirán atención médica en la próxima década por lo que se espera un incremento considerable de la prevalencia del VHC en los próximos años.

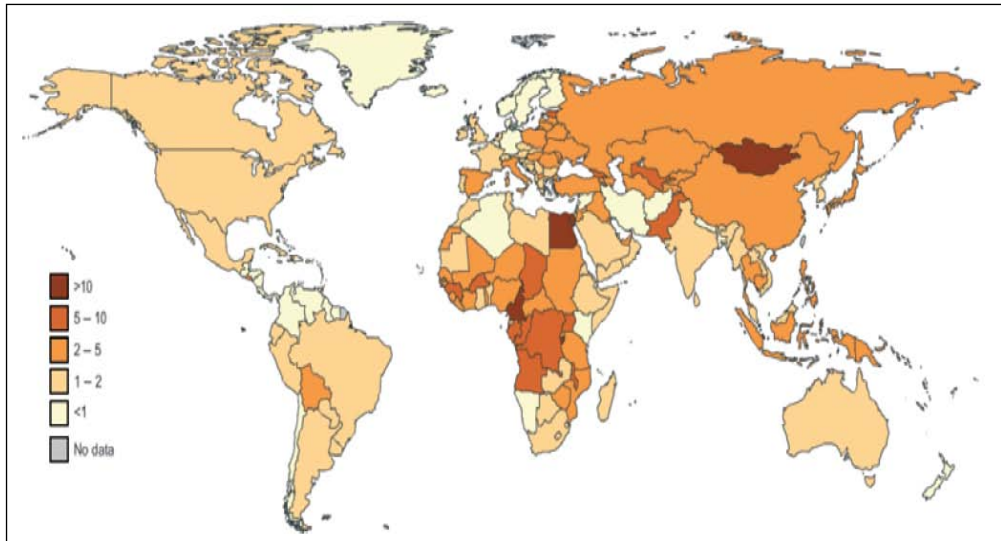


Figura 3. Prevalencia global de la hepatitis C en 2010 (%) [12].

Conjuntamente con los datos epidemiológicos, hay que indicar que el VHC genera un alto costo sanitario en los países industrializados. Los estudios realizados muestran que el VHC es el agente causante del 20% de las hepatitis agudas, del 70% de las hepatitis crónicas, del 40% de las cirrosis hepáticas, del 60% del CHC y del 30% de los trasplantes hepáticos, siendo una de las principales causas de cirrosis hepática de etiología viral y una de las principales indicaciones del trasplante hepático.

**Los mecanismos de transmisión** del VHC no son de todo conocidos, las principales vías de transmisión son la vía parenteral en el adulto y la vertical en el niño [12,13]. Hay que distinguir entre los contagios actuales y los realizados con anterioridad a la década de los noventa, en la que no se podía detectar el VHC en sangre, lo que provocó que muchas personas se infectaran a través de transfusiones o de derivados sanguíneos. Los controles actuales para la detección del VHC han eliminado esta vía de contagio. Sin embargo, los controles sanitarios escasos en algunos países subdesarrollados así como la falta de esterilización en el instrumental médico hace que la vía parenteral siga siendo importante en los mismos.

- **Vía parenteral:** en la actualidad, es la vía más efectiva y la principal vía de transmisión en el adulto a nivel mundial, en países subdesarrollados. Las transfusiones de sangre y de hemoderivados antes de la década de los noventa y el uso compartido de jeringuillas fueron las vías más importantes de transmisión en los países desarrollados.
- **Vía sexual:** en los Estados Unidos el 15-20% de los casos de infección aguda del VHC tienen como posible factor de riesgo la transmisión sexual, sin poder demostrar otra vía de transmisión. En Egipto la transmisión sexual ha sido confirmada mediante análisis filogenético del virus en el 15% de las parejas sexuales de individuos con infección aguda del VHC. Diferentes estudios han demostrado que la transmisión sexual del VHC aumenta con el número de parejas sexuales, con las conductas de alto riesgo y al no usar medios anticonceptivos tipo barrera. No se sabe con certeza si la coinfección por VIH aumenta el riesgo y son necesarios más estudios epidemiológicos para conocer con más profundidad esta vía de transmisión.
- **Transmisión vertical (TV):** en la actualidad, en los países desarrollados, es el principal mecanismo de infección en niños. Los factores de riesgo conocidos son la alta carga viral en el parto y la coinfección por VIH en la madre. Estos dos factores son insuficientes al no poder explicar muchos casos de TV, lo que justifica la realización de más estudios para incrementar el conocimiento de dichos factores y minimizar el riesgo de contagios materno-filiales.
- **Otros:** prácticas de riesgo muy divulgadas en países desarrollados en el pasado y que siguen vigentes en el presente en países en vías de desarrollo como: el uso de jeringuillas reutilizables, el uso común de material odontológico, algunas técnicas de medicina tradicional, tatuajes, *piercing* e incluso las barberías, peluquerías y salones de belleza, si no se utiliza material desechable o no se hace un aseo adecuado, pueden contribuir a la transmisión del VHC. En Egipto el 50% de los partos son atendidos por matronas tradicionales y en su mayoría, no poseen una desinfección adecuada del material utilizado.

### 1.3 Historia natural en el adulto y el niño

#### Historia natural de la infección crónica del VHC en el adulto

La **infección aguda** por VHC se define como la aparición de una nueva viremia con conversión de VHC-ARN negativo a VHC-ARN positivo. La infección aguda es asintomática en la mayoría de los casos, tan sólo un 25% de las hepatitis agudas son clínicamente sintomáticas y suelen manifestarse en forma de síntomas inespecíficos como: astenia, anorexia, náuseas e ictericia. La forma fulminante es muy rara. El ARN se puede detectar en el suero en casi todos los pacientes entre la primera y la segunda semana post-exposición. La seroconversión aparece entre los 2 y los 6 meses post-exposición (período ventana) o más tarde en ciertos grupos de riesgo, por lo que la detección de anticuerpos es menos fiable que la detección de ARN en el periodo agudo para el diagnóstico precoz.

Se considera que la fase aguda de la infección son los primeros 6 meses y en esta fase el aclaramiento del virus es posible. En torno a un 20% de los pacientes con hepatitis aguda consiguen la resolución espontánea [14], definiéndose ésta como la ausencia de ARN-VHC en suero acompañado de la normalización de los niveles de transaminasas. Varios trabajos recientes están estudiando los factores que determinan esta eliminación del virus. Los factores predictivos de curación tras una hepatitis aguda son la aparición de ictericia en la fase aguda y el sexo femenino [15,16]. El 85% restante desarrolla una **hepatitis crónica**, definida por la persistencia del ARN-VHC durante un periodo superior a 6 meses tras el comienzo de la infección.

De los más de 500.000 casos nuevos de cáncer de hígado que ocurren cada año a nivel mundial, el 22% (> 100.000) son atribuibles a Infección por el VHC. Los estudios prospectivos han demostrado que el 80% de los casos de hepatitis aguda C progresan hacia la cronicidad; el 10-20% de estos desarrollan cirrosis hepática y en dos o tres décadas el 1-5% desarrollará cáncer de hígado. El excesivo consumo de alcohol, el sexo, la edad en el momento de la infección, los niveles de transaminasas y la coinfección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) u otros virus hepatotropos como el VHB, parecen estar asociadas con una progresión más rápida hacia la fibrosis. Otros estudios longitudinales

prospectivos son necesarios para determinar si otros factores, como la esquistosomiasis, clonorchiasis o la exposición a disolventes tóxicos, común en los países en desarrollo, están asociados con la progresión de la enfermedad. Hay una necesidad urgente de más información sobre la evolución a largo plazo, las consecuencias, el coste y la carga sanitaria [12] (Fig. 4).

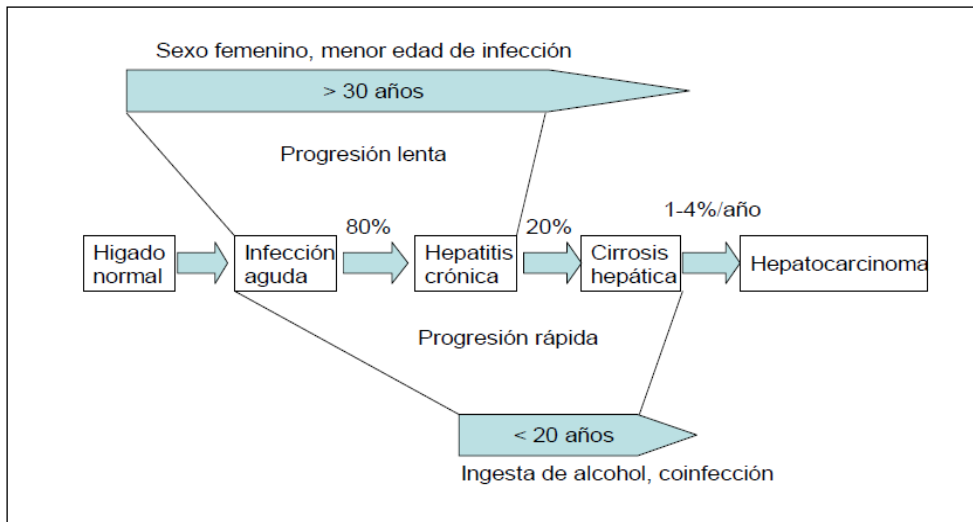


Figura 4. Historia natural del VHC

### Historia natural de la infección crónica del VHC en el niño

La causa más común de hepatitis crónica en los niños en los países desarrollados es la infección por VHC. Con las mejoras en la detección de VHC en los hemoderivados y la prevención de otros modos de transmisión parenteral, el mecanismo más común de transmisión en los niños es la transmisión materno-infantil perinatal. Las estimaciones más conservadoras indican que de 10.000 a 60.000 lactantes al año pueden ser infectados por el VHC en todo el mundo debido a la TV.

En la infección aguda en el niño, a diferencia que en el adulto, no se ha descrito ningún caso de hepatitis icterica aguda o asociado a sintomatología importante. El único signo, tal vez no relacionado, fue la hepatomegalia en el 10% de los casos.



La eliminación espontánea del VHC puede ocurrir hasta en un 25-30% de los niños y es posible hasta los 3 años de edad. Las tasas de eliminación son iguales entre los que se infectan por transmisión vertical o transmisión parenteral. Sin embargo, una edad más temprana en la normalización de los niveles de ALT, el genotipo 3 y unas transaminasas superiores a 5 veces el valor normal se relacionan con una mayor tasa de eliminación del VHC [17,18]. En un estudio de 80 niños españoles e italianos, las biopsias hepáticas mostraron diversos grados de hepatitis crónica persistente: hígado normal o lesiones mínimas no específicas (17,5%), hepatitis crónica con bajo grado de actividad (60%) y con alto grado de actividad (21%). En cuanto a la fibrosis: no se apreció fibrosis en el 27,5% de los casos, fue leve en el 55%, moderada en el 16,5% y sólo hubo un caso de CH entre los 80 niños [19]. Los datos de la población adulta sugieren que aproximadamente el 10-20% de los pacientes con VHC pueden llegar a desarrollar cirrosis y carcinoma hepatocelular. En la actualidad, no existen estudios a largo plazo que muestren las tasas de carcinoma hepatocelular o cirrosis en adultos que han contraído el VHC por TV.

Las directrices actuales de la CDC para el diagnóstico de TV en el niño recomiendan el estudio de anticuerpos en niños nacidos de madres infectadas después de los 18 meses, porque los anticuerpos de la madre son adquiridos pasivamente a través de la placenta y dejan de ser detectables a los 18 meses. Si antes se requieren pruebas, la CDC recomienda PCR para el ARN del VHC a partir de los 2 meses después del nacimiento, puesto que a edades más tempranas existe una alta tasa de falsos positivos.

La red europea Pediátrica del VHC [20] estudió de forma prospectiva a 357 niños expuestos al VHC y encontró que la sensibilidad de la PCR para el ARN del VHC fue del 22% al nacer, aumentando espectacularmente al 70-85% después de 1 mes de edad. Este estudio también mostró que el valor predictivo positivo de la prueba de PCR fue del 33% al nacer, aumentando al 78% a los 9 meses de edad, mientras que el valor predictivo negativo varió del 96% al 99%. Éstos resultados podrían atribuirse a una carga viral muy baja y no detectable en el primer mes de vida y por el período de incubación muy variable del VHC que puede ir desde 2 semanas a los 6 meses. Estos resultados sugieren que la negatividad en la detección del ARN por PCR al nacer no es un indicador adecuado del estado de la

infección por VHC en un año posterior. Por el contrario, una PCR negativa después de los 12 meses de edad debe ser confirmada con el nivel de anti-VHC para detectar a los niños que se infectaron con anterioridad y que aclaran el virus posteriormente [21].

#### **1.4 Tratamiento**

Existen muchos estudios en Europa y en Estados Unidos donde se ha analizado la respuesta de l tratamiento es tándar, combinación de alfa interferón pegilado y ribavirina, mostrando que sólo el 42-52% de los pacientes con genotipo 1 consiguen una Respuesta Viroológica Sostenida (RVS). El 20% de los pacientes con genotipo 1 y el 5% de los pacientes con genotipo 2 ó 3 tienen una nula respuesta al tratamiento, sin conocerse sus causas.

El tratamiento actual pretende, además de la eliminación del virus, detener la progresión de la enfermedad crónica hepática y disminuir el número de personas infectadas.

##### **1.4.1 Indicaciones de tratamiento en el niño y en el adulto**

En general, debe ser tratado todo paciente con HCC no tratado previamente que lo desee, sobre todo los infectados por los genotipos 2 y 3, que tienen mayores posibilidades de curación [22].

**En el adulto** se suelen incluir los pacientes menores de 65 años, o mayores que presenten buena calidad de vida; con una cirrosis compensada; coinfectados por VHB o VIH si están estabilizados; o con trastornos extrahepáticos asociados. Como criterios de exclusión, los que no cumplan estos parámetros y las embarazadas o mujeres en edad fértil que presenten una negativa a usar métodos anticonceptivos.

**En el niño** las indicaciones de tratamiento están todavía en controversia debido a que: 1) no se conoce a fondo la historia natural de la enfermedad en la edad pediátrica, 2) la enfermedad tiene buena evolución desde el punto de vista clínico e histológico en la edad pediátrica y 3) el tratamiento no está exento de

efectos secundarios y se han detectado alteraciones tiroideas y diabetes. Por otro lado, una buena razón para tratar durante la edad pediátrica es que potencialmente se puede curar la enfermedad con el tratamiento, sobre todo en aquellos pacientes con genotipo no 1 que tienen una mejor respuesta al mismo.

Actualmente se considera que no debe tratarse a los menores de tres años, puesto que pueden aprender el virus, y se desaconseja el tratamiento durante la adolescencia por ser una edad conflictiva.

Se recomienda tratar a los niños con edades comprendidas entre los 3 años y la pubertad, con enfermedad crónica por VHC y que presenten signos de mal pronóstico, como la biopsia hepática alterada. Es necesario realizar un estrecho seguimiento de la hepatitis crónica C en el niño.

#### 1.4.2 Fármacos

**Interferón pegilado (IFN-peg):** de forma general, los IFNs son proteínas o glicoproteínas producidas por distintos tipos celulares como respuesta a un estímulo, sobre todo a las infecciones víricas. El IFN alfa es un polipéptido no glicosilado producido por monocitos, leucocitos y linfocitos B como respuesta a infecciones víricas, con la función de mediar la respuesta inmune inespecífica.

Posee dos acciones:

- Antiviral directa: se manifiesta inhibiendo la replicación viral, transmitiendo señales al interior de la célula a través de receptores situados en la superficie celular.
- Inmunomoduladora: incrementando la expresión de moléculas del antígeno leucocitario humano (HLA) en la membrana de los hepatocitos y facilitando que los linfocitos T citotóxicos (Linfocitos T c) reconozcan y eliminen las células infectadas, además de estimular la inmunidad innata (células NK) [23].

La pegilación de una proteína consiste en su unión a una molécula de polietilenglicol para disminuir su aclaramiento y así prolongar su permanencia en el organismo tras su administración, obteniendo una mejoría considerable tanto en la farmacocinética como en la farmacodinamia. El que se utiliza específicamente en el

tratamiento actual es el IFN-pegilado-alfa, que tiene la ventaja de que se administra sólo una vez por semana, disminuyendo los efectos secundarios, además de conseguir una mayor y más eficaz supresión de la actividad viral en comparación con la administración del IFN estándar tres veces por semana. Hay dos tipos de IFN, el alfa-2a y el alfa-2b. Aunque han sido varios los estudios que comparan la eficacia de ambos combinados con RBV, un estudio sistemático realizado por Cochrane [24] sobre ensayos clínicos aleatorizados, en los que se comparaban los dos tipos de IFN-peg con respecto a las tasas de RVS, confirmó las ventajas del alfa-2a, mientras que el tipo de acontecimientos adversos y la incidencia de los mismos fueron muy parecidos en ambas pautas de tratamiento [24,25].

**Rivabirina (RBV):** es un análogo de nucleósido (guanosina), utilizado también en el tratamiento del VIH. Su incorporación a la terapia frente a VHC mejoró sustancialmente los porcentajes de respuesta viral sostenida (RVS) en pacientes infectados por VHC, incrementando por un lado la proporción de casos que aclaraban el virus y disminuyendo, por otro, el número de recaídas.

La RBV tiene un efecto sinérgico, y actúa cooperando y potenciando al IFN alfa, aunque su mecanismo de acción no se conoce con exactitud. Los hepatocitos infectados producen una liberación de viriones infecciosos y no infecciosos. El IFN inhibe la producción del VHC, y la RBV introduce mutaciones dentro del genoma VHC e incrementa la producción de viriones no infecciosos. Se piensa que el IFN y la RBV favorecen la respuesta inmunológica a través de los linfocitos NK y linfocitos T, consiguiendo la muerte de las células infectadas por el VHC. La RBV también puede actuar a través de un mecanismo no citolítico, curando las células infectadas sin destruirlas. Esto explicaría por qué la RBV tiene ese efecto llamado “cosmético” y normaliza las transaminasas. Las células dianas del virus, que son los hepatocitos sanos, pueden ser atacadas por los viriones infecciosos pero no por los no infecciosos [26] (Fig. 5).

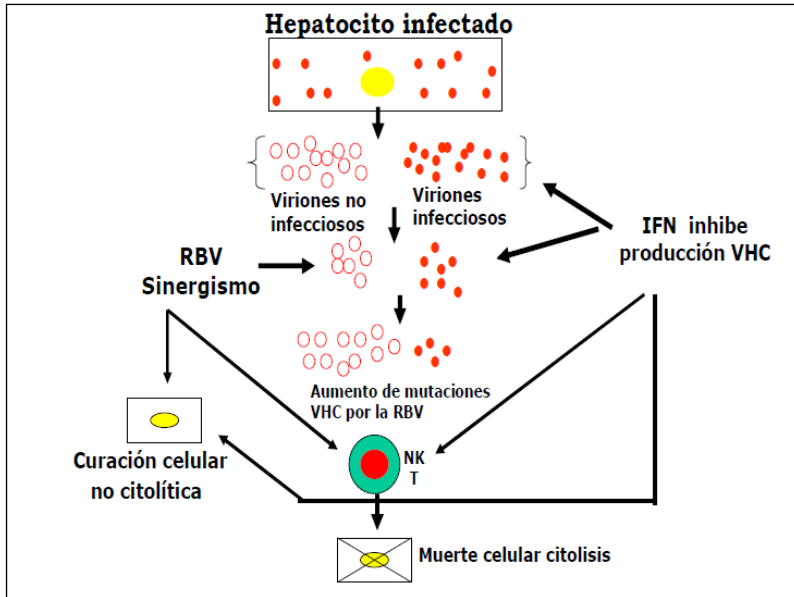


Figura 5. Mecanismo de acción de IFN y RBV

**Inhibidores de la proteasa NS3/4A:** Son muchos los inhibidores de la proteasa NS3/4A que están en desarrollo para el tratamiento de la infección crónica del VHC. Se ha demostrado que tienen una potente acción antiviral, pero también presentan una baja barrera genética de resistencia, lo que condiciona la selección de mutaciones de resistencia y la recidiva durante la monoterapia. No obstante, las resistencias se pueden eliminar prácticamente si se combinan con IFN-peg y RBV. Los dos fármacos que es tan más avanzados son el telaprevir y el bocoprevir. El telaprevir tiene una potente acción antiviral pero en los estudios en fase 1 se demostró que durante la segunda semana aparecía una recidiva virológica (*breakthrough*) debido a la aparición de mutaciones, lo que indica que la monoterapia no es efectiva. Afortunadamente estas mutaciones son sensibles al tratamiento combinado con IFN-peg y RBV. Otro aspecto importante es que la reducción de la carga viral es mucho menor en los pacientes con genotipo 2, 3 y 4 (-3,9, -0,5 y -0,9 log<sub>10</sub> UI/ml, respectivamente); la consecuencia es que estos fármacos no están indicados en estos genotipos porque son poco activos. La reducción de la carga viral con 400 mg cada 8 horas de bocoprevir es menor (-2,1 log<sub>10</sub> UI/ml); no obstante, la dosis recomendada de este fármaco en la práctica clínica es de 800 mg cada 8 horas. Actualmente existen varios ensayos clínicos en

fase 2 y 3, tanto en pacientes *naive*, no tratados previamente, como en pacientes no respondedores con resultados esperanzadores [27].

### 1.4.3 Tipos de respuesta al tratamiento antiviral

La respuesta al tratamiento se define por: 1) criterios bioquímicos como la normalización de las transaminasas, 2) criterios virológicos considerando la ausencia de ARN-VHC y 3) según criterios histológicos valorados por la mejoría en el índice de actividad inflamatoria hepática. Es importante conocer las distintas modalidades de respuesta al tratamiento para decidir qué dosis y qué duración se ha de mantener, permitiendo individualizar el tratamiento, reducir los costes y mejorar la respuesta.

**Evaluación de la respuesta tras 4 semanas de tratamiento:** la respuesta virológica rápida a la semana 4 de tratamiento (RVR-4s) se define como ARN-VHC indetectable en ese tiempo, y se ha reconocido como uno de los factores predictivos de RVS independientes más importantes [28] (tabla 2).

**Evaluación de la respuesta tras 12 semanas de tratamiento:** la respuesta virológica precoz (RVP), definida como la disminución de la carga viral  $>2\log_{10}$  o ARN indetectable en la semana 12, se utiliza como el principal factor para tomar decisiones acerca del tratamiento. En pacientes infectados con el genotipo 1 del VHC que han presentado una RVP parcial (descenso  $>2\log_{10}$  pero con ARN detectable en la semana 12) logran una RVS en un 17-29% con IFN-peg/RBV durante 48 semanas, beneficiándose este subgrupo de pacientes “respondedores lentos” de una ampliación de la duración del tratamiento combinado a 72 semanas [29,30] (Fig. 6).

**Evaluación de la respuesta tras 24 semanas de tratamiento:** los pacientes que cumplen criterios de RVP pero que mantienen niveles de ARN viral detectables en la semana 24 no alcanzarán RVS en el 98-100% de los casos, por lo que se recomienda la interrupción del tratamiento en esta situación (Fig. 6).

La RVS es la ausencia de ARN del VHC y normalización de las transaminasas tanto al final del tratamiento como a los 6 meses de seguimiento.

Lograr una RVS es sinónimo de curación, ya que se produce una mejoría paulatina de la lesión hepática y desaparece el riesgo de desarrollar complicaciones relacionadas con la hepatitis C.

La respuesta con recaída se define como la normalización de los valores antes citados al término del tratamiento, pero con reaparición del ARN en el control semestral. Los no respondedores (NR) se definen como aquellos que presentan una caída de menos de 2 logaritmos en los valores de ARN-VHC durante las 12 primeras semanas de tratamiento y/o la persistencia del mismo a partir de la semana 24 de tratamiento (Fig. 6).

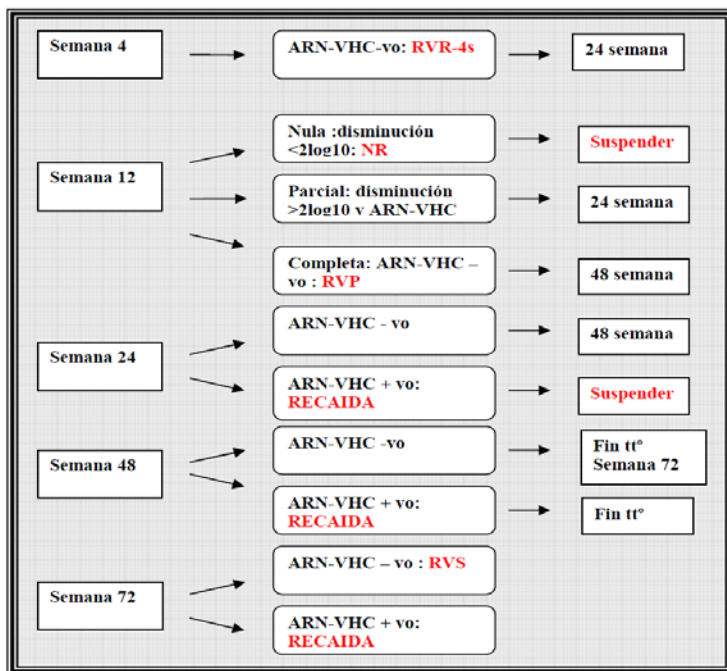


Figura 6. Resumen del seguimiento durante el tratamiento

En pacientes con genotipo 1, previamente no tratados (*naive*), el tratamiento combinado con IFN-peg y RBV consigue una RVS del 50-55%. Los pacientes con genotipos 2 y 3 consiguen una tasa de RVS alrededor del 80%, y con menor tiempo de tratamiento [31-33]. Los pacientes no respondedores a los tratamientos previos con interferón convencional en monoterapia o combinado con

RBV presentan unas tasas de RVS al tratamiento estándar actual de un 28% y un 12% respectivamente [33-34].

El cumplimiento terapéutico es fundamental en estos pacientes, ya que si no reciben al menos el 80% de la dosis inicial, la tasa de RVS desciende de forma significativa.

#### **1.4.4 Eficacia en niños**

El tratamiento combinado de peginterferón y ribavirina proporciona tasas de respuesta sostenida mejores que otros tratamientos. En niños está en investigación, mediante un estudio multicéntrico de la farmacocinética, eficacia y seguridad del peginterferón alfa 2b 60  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{semana}$  combinado con ribavirina 15 mg/kg/día.

Los datos disponibles sobre la eficacia y efectos adversos en niños provienen de dos ensayos. Uno fue realizado en España, en 30 niños que recibieron IFN-peg alfa 2b 1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{semana}$  y RVB 15 mg/kg/día. Otro fue realizado en Alemania, en 61 niños tratados con IFN-peg alfa 2b 1,5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{semana}$  y RVB 15 mg/kg/día. En ambos ensayos la duración del tratamiento fue de 24 semanas en infecciones por genotipos 2/3 y de 48 semanas en infecciones por genotipo 1. Los resultados fueron similares en ambos estudios, indicando que la respuesta se obtiene en un porcentaje igual o ligeramente superior al tratamiento combinado con alfainterferón convencional y RVB.

En el estudio español, realizado en el Hospital Infantil Universitario La Paz (Madrid) con criterios de inclusión estrictos de infección crónica (más de 3 años desde ínculo) y edad entre 3,5 y 16 años, el 69% de los casos eran debidos a infección madre-hijo, el 86,6% eran genotipo 1 y en el 66,6% la viremia fue  $>10^5$  UI/ml. La RVS se obtuvo en el 50% (46,6% con genotipo 1 y en el 100% de 3 pacientes con genotipo 3). En la 4ª semana solamente un paciente negativizó el RNA-VHC. En la 12ª semana de tratamiento, el 51,7% habían negativizado RNA-VHC y el 72% tuvo un descenso  $>2$  log con respecto a la carga viral basal, existiendo una RVS en el 87% y 71% de los casos, respectivamente. Ningún caso con descenso  $<2$  log en la semana 12ª obtuvo respuesta. El tratamiento continuado hasta la 48ª semana en 6 niños con viremia positiva a la semana 24ª no obtuvo respuesta sostenida en ninguno de los casos.



En el estudio alemán, los niños tenían una edad comprendida entre los 2 y los 17 años, el 40,3% eran debidos a TV y el 75,8% a genotipo 1. Hubo respuesta sostenida en el 47,8% (22/46) de los niños con genotipo 1 y 100% (13/13) en niños con genotipo 2/3 ( $p=0,0003$ ). En la semana 12<sup>a</sup> el 62,3% de los tratados obtuvieron RNA-VHC negativo. El 91% de los pacientes con genotipo 1 y el 92,3% de los casos con genotipos 2/3, que consiguieron respuesta sostenida, tuvieron viremia indetectable en la semana 12<sup>a</sup> de tratamiento.

En estos ensayos no hubo diferencias de respuesta según la edad (menores de 12 años comparado con mayores: 54,8% vs 63,3% en el estudio alemán, 45% vs 60% en el estudio español), ni con la cifra de ALT basal o comparando niños con transaminasas normales con los que presentaban alteración funcional previa al tratamiento. La carga viral basal y el índice de Knodell no influyeron en la respuesta en niños españoles. En ambos estudios, la respuesta de los pacientes con adquisición de la infección por vía transfusional tuvo tendencia a ser superior a la de niños infectados por vía madre-hijo (niños alemanes: 70,4% vs 48%  $p = 0,087$ ; niños españoles: 78% vs 38%  $P = 0,1$ ).

En el grupo de niños que actualmente constituyen la población más numerosa: infectados por genotipo 1 por vía madre-hijo, el tratamiento combinado es eficaz en el 37,5% y 35% de los casos (España y Alemania, respectivamente) [35].

#### **1.4.5 Efectos adversos en niños**

Los efectos adversos del interferón pegilado combinado con ribavirina disminuyen en comparación con el empleo de interferón alfa, por reducirse el número de inyecciones y de reacciones inmediatas a la inyección. Otros efectos adversos han sido de igual naturaleza e intensidad. Todos pudieron mantener la asistencia al colegio. El cambio transitorio de carácter o estado de ánimo se ha observado en el 15-30% de los niños, sin casos graves. La cifra de hemoglobina descendió 1,6-1,4 g/dl respecto al valor basal; en el 5-23% de los casos hubo que reducir la dosis de peginterferón por neutropenia. Alteraciones significativas de la función tiroidea fueron observadas en 5/61 niños alemanes, precisando tratamiento con L-tiroxina. Dos de ellos siguieron precisando hormona tiroidea a los 12 meses de seguimiento. Hubo un caso de diabetes mellitus. En el estudio español, el

tratamiento combinado fue suspendido por hipertiroidismo en 2 niños y las alteraciones se resolvieron en ambos.

En conclusión, la eficacia del tratamiento combinado en niños a vala su aplicación. Sin embargo, deben ser investigadas más profundamente las causas involucradas en el desarrollo de alteraciones tiroideas y diabetes en algunos niños [35].

#### 1.4.6 Factores de respuesta al tratamiento

##### Características virales

- **Genotipo viral:** el genotipo determina la dosis y duración del tratamiento, siendo uno de los principales factores que predicen la respuesta al tratamiento, con menor respuesta del genotipo 1 frente a los no 1. En cuanto a la duración del tratamiento, los genotipos 2 y 3 se tratarán durante 24 semanas y el genotipo 1 durante 48 semanas. En cuanto a la dosis, el genotipo no 1 se trata con 800 mg de RBV; mientras que en el caso del genotipo 1 se administran dosis máximas de RBV según peso (1.000 mg/día < 75 kg peso y 1.200 mg/día > 75 kg peso).
- **Carga viral elevada:** los pacientes con alta carga viral (> 600.000 - 800.000 UI/mL) responden peor al tratamiento, de tal manera que en pacientes con genotipo 1 que alcanzan una RVR podría acortarse el tratamiento si presentan una carga viral basal baja, ya que en este grupo se mantendrían intactas las posibilidades de curación. Por otro lado, se ha observado recientemente que los pacientes con genotipo 3, que tradicionalmente se han considerado más fáciles de curar, si presentan una carga viral basal elevada (> 800.000 UI/mL) obtienen una respuesta mediocre, inferior al 50% en muchos casos [36].
- **Cinética viral durante el tratamiento:** tanto el virus, como el sistema inmune del huésped y el tratamiento favorecen la aparición de cuasiespecies. La aparición de estas nuevas mutaciones se producen mayoritariamente en la región hipervariable E1 y E2 del genoma viral, a más cantidad de cuasiespecies menor RVS [37, 38].

- **Patrón de aminoácidos en la región sensible del interferón:** en la clínica tiene una gran importancia el número de mutaciones en NS5A, sobre todo en las regiones ISDR (o región determinante de la sensibilidad al IFN) y en la PKRBD; a mayor número de mutaciones en NS5A mayor tasa de RVS [39]. Si la secuencia mayoritaria del virus está conservada en estas regiones de la proteína, los pacientes serían resistentes al tratamiento con IFN, lo que en la clínica se correspondería con los NR.

### **Factores del huésped:**

Edad avanzada, sexo masculino, raza, rápida evolución a fibrosis hepática, obesidad, resistencia a la insulina y síndrome metabólico están relacionados con una tasa menor en la respuesta al tratamiento.

### **Factores genéticos IL28B y HLA:**

La IL28B o IFN- $\lambda$ 3 es una citoquina involucrada en la respuesta antiviral. Su función bioquímica exacta es aún desconocida. Fue descubierto en 2003 por ZymoGenetics utilizando un proceso de investigación genómica en el que se escanea el genoma humano completo. En humanos, los genes de la IL-28B se encuentran en el cromosoma 19.

Las células productoras de IFN- $\lambda$  son las células dendríticas y macrófagos (células presentadoras de antígenos). Existen tres tipos de IFN- $\lambda$ : 1) IFN- $\lambda$ 1 o IL29, 2) IFN- $\lambda$ 2 o IL 28A y 3) IFN- $\lambda$ 3 o IL28B. Todos actúan a través de los receptores de membrana IL-28R $\alpha$ /IL-10R2, activando las rutas de las JAK-STATs y MAPKs desencadenando diferentes tipos de respuesta: antiviral, antiproliferativa, antitumoral e inmune.

### **Respuesta antiviral del IFN- $\lambda$ :**

- Presentan actividad antiviral frente al VHB y VHC a través de la inhibición de la replicación viral.
- El IFN- $\lambda$ 1 pegilado provoca menores efectos secundarios hematopoyéticos que el IFN- $\alpha$  debido a la limitada expresión de receptores en las células

hematopoyéticas: Ensayo clínico en fase I (ClinicalTrials.gov, identifier: NCT00565539).

- Inducen incrementos en las expresiones de los genes de interferón potenciando el efecto antiviral.
- Inducen la sobreexpresión de antígenos HLA de clase I.
- IL28A (IFN- $\lambda$ 2) impide específicamente la entrada del RNA del VHC al ribosoma.
- La función específica del IFN- $\lambda$ 3 es desconocida, pero in vitro tienen acción antiviral frente al VHC, aunque es menos potente que la del IFN- $\alpha$ .

Recientemente cuatro estudios independientes de asociación de genoma completo o GWAS han identificado varios SNPs, localizados en el cromosoma 19, fuertemente asociados con un incremento en la respuesta virológica sostenida al tratamiento antiviral en pacientes de diferente origen étnico crónicamente infectados por VHC y G1 [40-43]. La tasa de respuesta virológica sostenida en los pacientes que presentan el genotipo CC del SNP rs12979860, localizado a 3 kilobases del gen de la IL28B, es del 75-80% comparados con los no-CC (CT/TT). Además, se ha comprobado que los niveles de expresión del ARN mensajero del gen IL28B (que codifica el interferón  $\lambda$ 3) son mayores en los pacientes respondedores comparados con los no respondedores. Por otro lado, se sabe que de los pacientes infectados con el VHC el 30% aclaran el virus espontáneamente. Thomas y cols. [44] estudiaron la asociación entre este polimorfismo y la cronificación o aclaramiento espontáneo del VHC en dos grupos de pacientes de diferente origen étnico con hepatitis aguda. De estos resultados se concluye que los pacientes con genotipo CC presentan tres veces más probabilidad de aclarar el virus que los genotipos no-CC, en el grupo global de pacientes.

En el último año se han publicado múltiples artículos donde se ha estudiado la influencia del genotipo de la IL28B en la infección aguda, en la RVS tanto en genotipo 1 como no 1 y en pacientes coinfectados por VIH, comprobándose que el genotipo CC es un factor protector independiente frente al genotipo no CC [45, 46, 47, 48].

En el Genotipo no 1 se ha demostrado que la IL28B se asocia a una mejor respuesta en aquellos pacientes que no alcanzan RVR [46].

Nuestro grupo ha publicado recientemente el papel de la IL28B y el HLA en la RVS con IFN-peg y RBV. El alelo HLA-DQB1 \* 0301 y el genotipo IL28B son factores que se asociaron independientemente con la RVS. Hay una sinergia entre los alelos HLA-DQB1 \* 0301 y HLA-A \* 0201 con el polimorfismo rs12979860 CC, lo que aumenta la tasa de RVS, siendo el genotipo IL28B el mejor predictor de RVS [49].

El estudio de los factores que condicionan la respuesta al tratamiento es necesario, ya que el elevado coste del mismo y los múltiples efectos secundarios serían minimizados si se pudiera predecir la probabilidad que tiene un sujeto de responder al tratamiento.

## **1.5 Transmisión vertical del VHC y cronificación del VHC en el niño**

### **1.5.1 Epidemiología del VHC en la gestante y en el niño**

La prevalencia del VHC en mujeres embarazadas es del 0,15% al 2,4% en los países desarrollados y mucho mayor en países como Egipto, donde se estima que es un 8,6%. La prevalencia de la infección por VHC en niños varía del 0,05% al 0,36% en los estudios realizados en los Estados Unidos y Europa y es mayor en los países en vías de desarrollo con una estimación entre el 1,8% y el 5%.

En los países desarrollados, la TV es la principal vía de transmisión del VHC en niños. En los Estados Unidos se estima que 240.000 niños tienen anticuerpos contra el VHC, con seroprevalencias del 0,1-0,2% que aumentan hasta el 2% en menores de edad encarcelados y hasta el 10-20% en niños con otras patologías asociadas como tumores malignos, insuficiencia renal crónica (IRC) sometidos a hemodiálisis o cardiopatas intervenidos. La mayoría de las infecciones por VHC adquiridas en el periodo perinatal son silenciosas e inician complicaciones en la edad adulta, siendo subestimadas, con una predicción de importante carga económica y de salud en la sociedad. Con la actual tasa de infección por VHC en los niños, se estima el coste en la próxima década en 26 millones de dólares en la

detección, 117-206 millones de dólares en el seguimiento y 56-104 millones de dólares en el tratamiento. El coste total se calculó entre 199 y 335 millones de dólares [21].

### **1.5.2 La respuesta inmune del VHC durante la gestación.**

Las mujeres infectadas crónicamente por el VHC tienen algunas características especiales en la historia natural de la infección, así se ha demostrado que el índice de progresión de fibrosis es menor en las que han tenido hijos frente a las nulíparas. También resulta inferior la progresión de la fibrosis en las mujeres menopáusicas que reciben terapia hormonal sustitutiva frente a las que no la reciben [45]. Una explicación posible es la protección que sobre el hígado ejercen los estrógenos.

Ante una infección viral se activa una defensa inicial inespecífica mediada por células NK, PMN y macrófagos, tras ello las células presentadoras de antígenos internalizan los viriones por endocitosis, procesan las proteínas del virus y presentan péptidos antigénicos junto al complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (CMH clase II). Las células T CD4+ cooperadoras reconocen los antígenos asociados al CMH clase II y secretan citocinas que regulan la actividad de la respuesta celular (Th1) mediada de las células T CD8+ y la producción de anticuerpos por los linfocitos B o respuesta humoral (Th2). Las células T CD8+ pueden reconocer antígenos del virus que se presentan en la superficie celular de los hepatocitos infectados junto con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I (CMH de tipo I). Las células T CD8+ pueden controlar la replicación viral mediante histólisis de células infectadas, o mediante mecanismos no citotóxicos que secretan citocinas que inactivan al virus intracelularmente (Fig. 7).

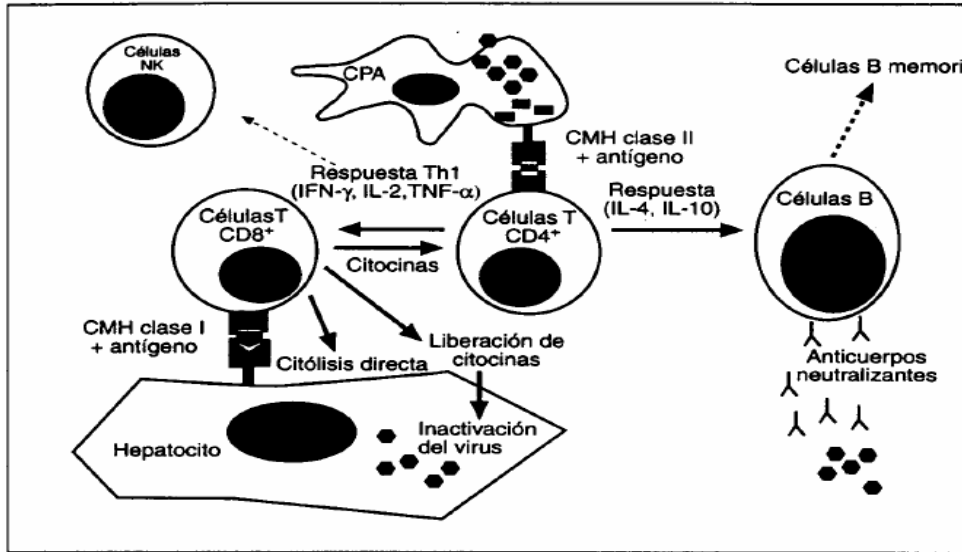


Figura 7. Activación del sistema inmune tras una infección viral

Es conocido que si la respuesta de los linfocitos T citotóxicos (Th1) durante la infección aguda por el VHC es vigorosa, aumenta la lisis de los hepatocitos infectados, disminuye la producción de viriones y se reduce la probabilidad de que la infección se cronifique. Esta respuesta inmune, de tipo Th1, está mediada en parte por las moléculas HLA y por citoquinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, siendo la base del uso de interferón pegilado. También se sabe que si la respuesta Th1 es reducida al inicio de la infección, se facilita la evolución a la cronicidad.

Durante la gestación normal existe una represión de la respuesta inmune, en especial de la inmunidad Th1 citotóxica, lo que provoca un predominio de la respuesta humoral Th2 mediada por la IL4 e IL10. Este mecanismo tiene como objetivo proteger al feto del sistema inmune de la madre y es tácticamente inducido posiblemente por el incremento de progesterona y el estímulo adrenal-corticoideo. Este nuevo escenario afecta a la evolución de las poblaciones del VHC, de forma que las mujeres infectadas crónicamente presentan durante el embarazo una tendencia a la normalización de las transaminasas, disminución del número de cuasiespecies y un incremento de la carga viral, alcanzando en el último trimestre y en el parto sus niveles máximos. En los meses siguientes al parto se restituye la inmunidad citotóxica, lo que provoca un incremento en las transaminasas y una

disminución de la carga viral, con tanta expresividad que en algunas mujeres los valores de transaminasas recuerdan a una hepatitis aguda por VHC. Por último, hacia el final del primer año post-parto, estos parámetros son similares a los que tenía la mujer antes del embarazo. En este periodo post-parto se han comunicado casos aislados de aclaramiento espontáneo del virus hasta en un 14% de los casos. Por este último motivo algunos autores preconizan el tratamiento en este periodo en las mujeres tratadas previamente y que fueron no respondedoras.

Un estudio realizado en Japón con 22 embarazadas RNA VHC positivo, concluyó que algunas mujeres pueden tener una resolución espontánea de la viremia tras el parto. También señaló, de manera significativa, en comparación con el grupo control de no embarazadas, mayores tasas de aclaramiento viral. Además, los niveles de la proteína del core del VHC a los 3 meses posteriores al parto eran mucho más bajos entre los pacientes que tuvieron aclaramiento viral frente a los que tuvieron una elevación de la proteína del core VHC de forma persistente. Estudios recientes han confirmado que un aumento en las células T específicas del VHC en el tercer trimestre y en el post-parto se acompaña de una disminución en el ARN del VHC. Honegger *et al.* demostraron en nueve mujeres con infección crónica que la respuesta específica del interferón- $\gamma$  aumenta cuando se produce una caída de 1,4 log en la carga viral del ARN-VHC medido por ELISPOT [21].

### **1.5.3 Transmisión vertical del VHC**

Aunque la tasa de TV del VHC es baja, un 1-8% en madres no coinfectadas por VIH y un 20-30% en las coinfectadas, hay que tener en cuenta que el 90% de los niños infectados han adquirido el virus por transmisión vertical. También se conoce que en los primeros meses de vida los niños pueden aclarar el virus y de los que persisten con viremias positivas, un 12% que darán crónicamente infectados [50, 51]. En un estudio publicado por nuestro grupo [50] con una muestra de 73 hijos y 63 madres anti-VHC positivas y anti-VIH negativas, se comprobó que 8 niños tuvieron viremias positivas (11%), pero solamente uno quedó crónicamente infectado (1,3%). Así, de los niños infectados, el 12,5% (1/8) cronifica el virus mientras que el 87,5% (7/8) lo aclaran sin seroconversión. Esta baja tasa de



cronificación ha sido cuestionada, ya que algunos niños presentan en los primeros meses de vida viremias transitorias sin seroconversión.

Los estudios sobre la patogénesis del VHC en la TV han sido numerosos y han obtenido resultados opuestos. Hay trabajos que han analizado el momento en el que se produce la TV; algunos estudios demuestran que los niños infectados con el VHC tienen las pruebas de PCR positivas durante o poco después del parto, lo que sugiere transmisión en el útero, por otro lado, no se ha demostrado la presencia del VHC en el líquido amniótico, lo que sugiere que la transmisión puede ocurrir directamente a través de la placenta; esto es apoyado por numerosos estudios que no han encontrado diferencias significativas con el tipo de parto. Los informes de casos que han obtenido resultados divergentes en gemelos monocoriales biamnióticos sugieren que es probable que la infección de la placenta sea un evento esporádico. En los estudios de las regiones hipervariables del VHC en recién nacidos se observó una limitada diversidad, lo que indica que es probable que la transmisión puede restringirse a unos pocos viriones. Los factores maternos que tienen un papel significativo en la TV del VHC son ciertos tipos de HLA, así como la presencia del ARN del VHC en las células mononucleares de sangre periférica de la madre. La presencia de anticuerpos neutralizantes de la madre no tiene ningún papel en la TV. Se pueden obtener algunas conclusiones generales a partir de los resultados de estos estudios dispares: la TV es poco frecuente y no se sabe con certeza en qué momento ocurre y es probable que el VHC se transmita por el paso a través de la placenta de algunos viriones con poca o ninguna diversidad. La opinión más difundida es que el momento de la transmisión debe ser el parto, aunque el tipo de parto o las horas de bolsa rota no parecen influir. En los últimos años se intentan clarificar algunos aspectos sobre factores genéticos o inmunológicos como el HLA de la madre [21].

#### **1.5.4 Factores de riesgo en la transmisión del VHC**

La transmisión perinatal se cree que es la principal causa de transmisión de madre a hijo, aunque la prenatal y postnatal son posibles.

Se ha n estudiado múltiples factores como posibles modificadores de la frecuencia de la transmisión vertical del VHC: la carga viral de la madre en el momento del parto ( $>10^5$  copias/mL), coinfección por el VIH, el genotipo del VHC, anticuerpos neutralizantes, la modulación de citoquinas, la amniocentesis, procedimientos invasivos en el parto como la monitorización de la sangre fetal, ruptura de membranas prolongada y tipo de parto. Pero los únicos factores que tienen evidencia científica, relacionados con mayor riesgo de TV, son la carga viral y la coinfección con el VIH. En un estudio realizado por nuestro grupo, los únicos factores relacionados con la TV fueron la mayor carga viral y el ARN-VHC positivo en leche materna [50]. Los resultados del grupo europeo para el estudio de la TV [52] son parecidos y no han conseguido implicar a otros factores.

### **Coinfección por el VIH**

Se ha demostrado que la coinfección materna por VIH se asocia con tasas de TV de 3 a 4 veces mayor en comparación con la madre infectadas sólo por el VHC. Polis *et al.* en un meta-análisis de 10 artículos demostraron que el VIH y la coinfección por el VHC aumentan las probabilidades de TV en un 90%. La incidencia de la transmisión vertical es aproximadamente del 5,3% en madres ARN-VHC positivo y VIH negativas, pero puede ser del 19% en madres coinfectados por el VIH. Incluso cuando se controla el VIH, se aumenta la probabilidad de TV del VHC en 2,82 veces. Los estudios han demostrado una transmisión del 0%, cuando la madre es ARN-VHC negativa [21].

### **Ruptura prolongada de membranas**

La ruptura prolongada de membranas mayor de 6 horas, el tipo de parto y el impacto de los procedimientos obstétricos en el parto se han asociado significativamente con la TV, sin embargo hay falta de datos. Gibb *et al.* en un estudio en 441 parejas madre-hijo en el Reino Unido e Irlanda informaron de una tasa de transmisión del 7,7% en los bebés que nacieron por parto vaginal, un 5,9% entre los que nacieron por una cesárea urgente y el 0% en los nacidos por cesárea electiva. Paccagnini *et al.* en un estudio en 70 parejas madre-hijo de alto riesgo (VIH positivo y/o con antecedentes de consumo de drogas) mostraron una tasa del 32% de la transmisión vertical en los bebés nacidos por vía vaginal en comparación con el 6% en los que nacieron por cesárea. Sólo había dos bebés que eran VIH

positivos y ambos nacieron por cesárea. Sin embargo, la mayoría de los estudios no han encontrado ninguna asociación entre la vía del parto y una disminución en las tasas de transmisión. El estudio de La Red Europea contra la hepatitis C pediátrica demostró en un estudio realizado en 1.758 parejas madre-hijo que no había diferencias significativas ( $P = 0,16$ ) en la transmisión vertical entre cesárea, parto vaginal o cesárea urgente [21].

### **Gravedad de la enfermedad del VHC materna**

El papel que desempeña en la TV la actividad del VHC en la madre no se conoce completamente. Dos estudios recientes mostraron que las madres con infección de los monocitos de sangre periférica por el VHC tienen una mayor tasa de transmisión a sus hijos. Esto es similar a lo que ocurre en la transmisión vertical de otros virus, por ejemplo, el VIH. También se ha observado que los niveles de ALT persistentemente elevados en el año anterior al embarazo o durante el embarazo se asocian con mayores tasas de transmisión vertical. Esto está probablemente relacionado con la carga viral más alta, que puede causar un daño hepático más extenso, y la posterior elevación de la ALT. La elevación de la ALT también se asocia con ciertos genotipos del VHC que tienen más probabilidades de ser transmitido, como el 1a o el 1b.

Un pequeño estudio realizado que compara a 12 madres VHC positivas y sus hijos con un grupo control de 16 madres y sus recién nacidos sanos, mostró un aumento en las células natural killer (NK) de la placenta de madres VHC positivas en comparación con el grupo control. También se demostró que estas células tenían una mayor citotoxicidad en las madres VHC positivas. Esto puede ser una explicación de las bajas tasas de transmisión vertical, sin embargo, el aumento de la citotoxicidad de las células NK también puede conducir a un mayor riesgo de parto prematuro en las madres VHC positivas [21].

### **La lactancia materna**

El ARN del VHC se ha detectado en la leche materna y el calostro. Sin embargo, sólo existen estudios aislados que muestran algún indicio de infección por el VHC en los bebés de madres con carga viral elevada en la leche y que hayan sido alimentados con lactancia materna. La mayoría de los estudios indican que a

pesar de que la transmisión teórica puede ser posible, la cantidad de virus en la leche materna es muy baja y es probable que se inactive en el tracto digestivo del recién nacido. El estudio de La Red Europea contra la hepatitis C pediátrica no observó diferencia en las tasas de infección en bebés alimentados con fórmula en un estudio realizado en 1.758 niños. El riesgo de transmisión es mayor si la madre tiene pezones agrietados o sangrantes. Para las madres que están coinfectadas por el VIH se recomienda que sigan las directrices actuales para la prevención de la transmisión del VIH [21]. En el artículo publicado por nuestro grupo [50] no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la transmisión vertical y lactancia materna o artificial, aunque sí resultó significativo cuando las madres tenían el ARN-VHC positivo. Al analizar el ARN del VHC en la leche materna cuatro (20%) de las 20 madres que fueron ARN del VHC positivo en suero fueron también ARN positivo en la leche materna. Las madres con el ARN del VHC detectado en la leche materna tenían mayores títulos de ARN del VHC aunque sin diferencias estadísticamente significativas. De los 8 niños infectados en 4 se estudió el ARN de la leche y 3 resultaron positivo. El genotipo fue el mismo en la madre, hijo y leche materna.

De todo ello se deduce que la TV no es bien conocida porque no todas las madres con carga viral alta transmiten el virus a sus hijos y se han descritos casos de TV en madres con carga viral baja en ausencia de coinfección por VIH, lo que sugiere que hay otros factores implicados que aún no se conocen. Asimismo, se desconoce el mecanismo por el cual, la mayoría de los niños aclaran el virus y por qué las posibilidades de cronificación son relativamente bajas, lo que contrasta con la alta tasa de cronificación en adultos (80%). Una de las posibles explicaciones de la baja tasa de TV es la pequeña cantidad de inóculo que el hijo recibiría de la madre, lo que explicaría que la carga viral en el momento del parto sea un factor predictivo importante. No obstante, es muy posible que haya otros factores relacionados con la fisiología del neonato e incluso con la composición de las poblaciones virales presentes en la madre al final del embarazo. Como ya se ha resaltado, la supresión de la inmunidad celular durante la gestación afecta considerablemente en el desarrollo de la infección y el inóculo que infecta al neonato proviene precisamente de un virus que ha evolucionado en un escenario inmunológico muy particular.

### **1.5.5 Perspectivas de tratamiento en el embarazo, puerperio y periodo neonatal**

El tratamiento actual del VHC es la combinación de interferón pegilado y ribavirina. Estos medicamentos tienen varios inconvenientes, que se incrementan durante el embarazo y en el periodo neonatal. El interferón pegilado puede ser problemático por sus efectos secundarios psiquiátricos en estas mujeres, dada la alta tasa de de presión p osparto, y puede afectar al feto. Del mismo modo, la ribavirina es un teratógeno conocido y no se puede utilizar durante el embarazo.

El niño en el primer año de vida padece una hepatitis aguda que podría ser tratada como en el adulto con interferon durante seis meses, pero debería hacerse mediante ensayos clínicos. Las razones en contra del tratamiento se basan en las bajas tasas de transmisión vertical, la alta tasa de resolución espontánea y la falta de síntomas.

Una primera estrategia sería la de seleccionar qué pacientes se beneficiarían más de la terapia. La IL28B podría ser utilizada para tratar a las mujeres jóvenes infectadas por el VHC que tengan intención de darse embarazada, para resolver la infección antes de la concepción. Esto podría llevarse a cabo de inmediato ya que las pruebas IL28B están disponibles.

Hay numerosas moléculas en distintas fases de desarrollo que entrarán a formar parte del tratamiento del virus C y es posible que en un tiempo no lejano se pueda usar la misma estrategia seguida para la interrupción de la transmisión vertical del VIH. Las estrategias iniciales se centraron en el uso de un agente antiviral, en este caso, la zidovudina, para las últimas 6 semanas del embarazo, como infusión durante el parto y en las primeras 6 semanas de vida de los recién nacidos. Esta estrategia, cuando se aplicó por primera vez redujo la tasa de transmisión del VIH del 25% al 8%. Con los años, se han añadido otros agentes reduciendo la TV a tasas inferiores al 2% en los países desarrollados. Obviamente, la transmisión vertical del VHC no tiene las consecuencias inmediatas que el VIH causa, por lo que la necesidad de ser tan agresivo en la prevención no es necesaria. Sin embargo, si se aprueba el uso de los inhibidores de la proteasa y el inhibidor de la polimerasa en el VHC en el posparto en la mujer embarazada y se

podría combinar con el tratamiento en los recién nacidos en los que se demuestre el virus poco después del nacimiento, esto podría utilizarse como estrategia preventiva para la transmisión vertical del VHC, aunque los costes asociados tendrían que ser considerados.

Para diseñar estrategias de tratamiento más eficaces es necesario investigar sobre: 1) la infección por el VHC durante el embarazo y la lactancia, 2) la influencia del embarazo sobre la respuesta inmune contra el VHC, 3) el impacto de la IL28B en la TV y 4) cómo el VHC infecta el hígado del feto y así poder realizar una mejor selección de los candidatos a tratamiento así como investigar agentes no teratogénicos para la terapia [21].

### **1.5.6 Factores genéticos e inmunológicos**

En la actualidad, los estudios genéticos e inmunológicos en pacientes adultos crónicamente infectados por el VHC, han puesto de manifiesto la implicación de factores genéticos del paciente relacionado con el aclaramiento viral espontáneo y con mayor probabilidad de respuesta al tratamiento. El papel de dichos factores en la TV del VHC es desconocido en la actualidad, puesto que la carga viral y la coinfección por VIH no aclara todos los casos de TV. Es importante conocer si el estudio de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) y el gen de la IL28B desempeñan algún papel en la TV del VHC y en el curso clínico de la infección en los niños.

#### **HLA y transmisión vertical**

Los factores inmunogenéticos, como el HLA, debido a su papel en la respuesta inmune adaptativa, han sido estudiados ampliamente en la transmisión perinatal de diferentes virus, como el VIH, sin embargo, solamente existen cuatro trabajos que aborden este grupo de genes con la TV del VHC. Azzari y cols. [53] exclusivamente estudian genes HLA clase I (A\*, B\* y C\*), no encontrando diferencias significativas en la concordancia madre-hijo de dichos alelos. Sin embargo, otros tres estudios [54-56] sí encuentran asociación entre los genes HLA clase II (HLA-DRB1\*) y la TV del VHC. Bosi y cols. [54] estudian la coinfección por VIH y el tipo de lactancia, y Bevilacqua y cols. [56] también estudian el papel que

desempeña el genotipo viral y los polimorfismos de MBL2 y diversas citoquinas. De los resultados que se obtienen de estos trabajos, cabe destacar que si existe concordancia en determinados alelos del HLA (concretamente en DRB1\*) entre la madre y el hijo es mayor la probabilidad de transmisión del VHC. Para este hecho, caben dos hipótesis:

1) Cuando las células mononucleares (CMN) de la madre están infectadas por el VHC y pasan al hijo, pueden expresar en su superficie moléculas HLA diferentes a las del niño; la consecuencia es que el sistema inmune de éste tienda a eliminarlas, con la consecuente destrucción viral. En cambio, cuando hay concordancia del HLA, estas células viven más tiempo en el hijo, favoreciendo la infección; esto queda sustentado con los resultados de Azzari y cols. [53] y Billington y cols. [57], los cuales afirman que, por un lado, la infección de CMN maternas se asocia con la TV del VHC, y que las células maternas sobreviven más tiempo en su descendencia cuando ambos presentan idénticos HLA en determinados alelos.

2) La presión selectiva ejercida por la respuesta inmune materna frente al virus (respuesta de células T mediadas por HLA) genera una serie de variantes virales, cuasiespecies, capaces de escapar de esta respuesta inmune y de ser transmitidas a los hijos, por lo, los hijos con HLA concordante con su madre al tener cuasiespecies seleccionadas capaces de escapar al sistema inmune tendrían mayor riesgo de infectarse.

## **IL28B**

Hasta el momento no se ha publicado ningún trabajo donde se analice la influencia del genotipo de la IL28B en la TV del VHC ni su asociación con el aclaramiento espontáneo o cronificación del VHC en niños, como ocurre en pacientes adultos.

## **2 Hipótesis y objetivos**





## 2.1 Hipótesis

Debido a que no están claramente definidas las siguientes cuestiones:

- La interesante relación entre gestación y evolución de la infección crónica por VHC durante la gestación y puerperio, junto con el hecho de que durante este periodo, la respuesta inmune Th1 se encuentra reprimida y puede afectar al curso de la enfermedad.
- Los factores de riesgo asociados a transmisión vertical del VHC y el mayor aclaramiento viral espontáneo en niños con respecto a los adultos, no está bien definido. No se conoce con claridad la influencia de los factores clásicos (factores virales, obstétricos, lactancia, entre otros) y prácticamente nada de los factores inmunogenéticos de la madre y del hijo (genotipo CC del polimorfismo rs12979860 de la IL28B).

Nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

“La evolución de la infección crónica por VHC se ve influenciada por la gestación y puerperio y esto puede afectar a la transmisión vertical del VHC. La tasa de transmisión materno-filial del VHC así como su cronificación está afectada por factores virales y por el perfil inmuno-genético de la madre y del hijo”

## 2.2 Objetivos.

Para verificar la hipótesis anterior hemos realizado el trabajo que en esta Tesis se presenta y que resumimos enunciando sus objetivos:

1. Analizar la evolución de la enfermedad viral durante la gestación y puerperio en un modelo natural de represión y restitución de la respuesta inmune, así como su potencial relación con la transmisión vertical del VHC.
2. Analizar los factores de riesgo clásicos implicados en la transmisión vertical y en la cronificación del VHC en el hijo.
3. Estudiar la influencia del perfil inmuno-genético (IL28B) de la madre y/o hijo en la transmisión vertical del VHC.
4. Estudiar la influencia del perfil inmuno-genético (IL28B) en la evolución de la infección del VHC en niños ARN-VHC(+).
5. Estudiar la asociación existente entre los factores genéticos y el aclaramiento viral espontáneo en madres Ac-VHC(+)/ARN-VHC(+), utilizando como grupo control las madres Ac-VHCARN-VHC(-).

### **3 Material y métodos**



### **3.2 Diseño del estudio:**

Estudio retrospectivo de un seguimiento prospectivo en embarazadas infectadas por el VHC y sus hijos.

### **3.3 Ámbito de estudio:**

Hospital Universitario "San Cecilio" de Granada.

### **3.4 Sujetos de estudio:**

Mujeres ELISA Ac-VHC(+) que fueron atendidas en la gestación y/o el parto y posteriormente seguidas junto a sus hijos en la consulta de hepatología infantil del Hospital Universitario San Cecilio desde Septiembre de 1992 hasta Diciembre de 2009.

#### **3.4.1 Criterios de inclusión:**

- Mujeres ELISA Ac-VHC(+) y sus hijos

#### **3.4.2 Criterios de exclusión:**

- Pérdida del seguimiento del hijo
- Se excluyen los niños con factores de riesgo de infección diferentes al de la transmisión vertical (transfundidos con hemoderivados o cirugía, entre otros).
- **Para el estudio de la IL28B se excluyeron también:**
- Madres e hijos de los que no se disponía de muestras de CMN y suero a menos 80°C.
- Coinfección con VIH.

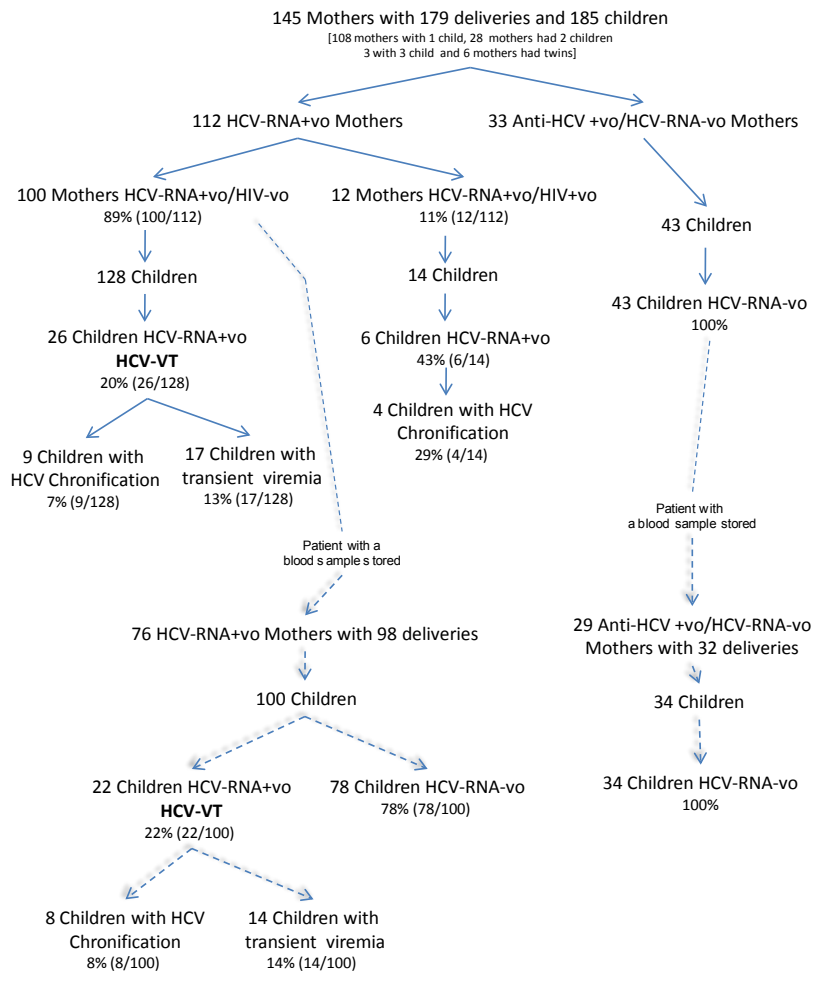
### **Pacientes**

De una cohorte histórica compuesta por 145 mujeres (Tabla 1); 100 (Ac-VHC(+)) y ARN-VHC(+), 12 (Ac-VHC(+), ARN-VHC(+)) y VIH(+) que fueron excluidas del estudio, aunque se analiza como influye en la TV y 45 mujeres (Ac-VHC(+)) y ARN-VHC(-). Nacieron 185 hijos (31 mujeres tuvieron más de 1 hijo: 2 casos de gemelos, 4 casos de mellizos, 2 mujeres con 3 hijos en partos sucesivos y 23 mujeres con 2 hijos en partos sucesivos).

A) Capítulo 1. De la cohorte general se incluyeron 122 mujeres gestantes que tenían un seguimiento clínico y anatómico completo. 89 madres fueron VHC-RNA+vo y 33 VHC-RNA-vo/VHC antiVHC+vo. Se analizaron los niveles séricos de ALT y carga viral durante intervalos regulares en el embarazo, en el parto y se finalizó un año después de la gestación.

B) Para el estudio de la IL28B (Tabla 1) después de la revisión realizada en los protocolos de seguimiento, y tras aplicar los criterios de inclusión y exclusión, se incluyeron dos grupos de madres: 76 ARN-VHC (+) con sus 100 hijos y 29 ARN-VHC negativas y sus 34 hijos, todas fueron ELISA (+), RIBA (+) y VIH (-)

Table 2: Infant Outcomes According to Maternal HCV Status



El seguimiento de los niños se realizó cada 2 meses el primer año, cada seis meses el segundo año y anual hasta los seis años. En las revisiones se analizaron las transaminasas ALT, AST y CGT y la Carga viral del VHC.



A la hora de realizar el análisis estadístico, se consideró que había transmisión vertical cuando el niño presentó en algún momento del seguimiento un ARN-VHC(+), confirmado en una nueva muestra realizando una segunda determinación para minimizar los falsos positivos, en esta segunda muestra se realizó el genotipo viral.

Los grupos de estudio en los niños fueron:

1. Infección con viremia transitoria, definida por niños que presentaron ARN-VHC positivo confirmado en una segunda determinación pero que durante el seguimiento fueron ARN-VHC negativos y no presentaron seroconversión

2. Infección crónica o persistente, definida por los niños que presentaron ARN-VHC (+) de forma permanente y seroconversión con anticuerpos VHC detectables, después de los 18 meses de vida

3. No infectados, cuando el ARN-VHC fue persistentemente negativo y los niños perdieron los anti-VHC pasivos recibidos de la madre.

### **3.5 Variables de estudio:**

#### **Capítulo 1**

Variable resultado:

ALT en la madre en los distintos periodos, gestación parto y puerperio

#### **Capítulo 1y 2**

- Variable resultado:

1. Transmisión del VHC (Madre positiva-Hijo positivo) vs. no-transmisión del VHC (Madre positiva-Hijo negativo),

2. En el caso de niños con ARN positivo: niños con infección crónica vs. Niños con aclaramiento viral.

- Variables independientes:

1. Polimorfismos IL28B (rs12979860 genotipo CC vs. genotipo no-CC)

2. Carga viral en suero de la madre en el parto (>600000UI/ml vs. <600000UI/ml)

- Variables independientes:

3. Polimorfismos IL28B (rs12979860 genotipo CC vs. genotipo no-CC)
4. Carga viral en suero de la madre en el parto (>600000UI/ml vs. <600000UI/ml)
5. Presencia de ARN-VHC en CMN en la madre ( Presencia ARN-VHC vs. Ausencia de ARN-VHC) y, en caso de positividad, carga viral (>600000UI/ml vs. <600000UI/ml)
6. Genotipo viral de la madre (genotipo 1 vs. genotipo no-1)
7. Tipo de parto (espontáneo, inducido, instrumental y cesárea)
8. Coinfección VIH (VIH(+)) vs. VIH(-)
9. Tipo de lactancia (materna vs. artificial) y duración de la misma (variable continua)
10. Presencia de ARN-VHC (+) en la leche materna (ARN-VHC(+)) vs. ARN-VHC(-) y, en caso de positividad, carga viral (>600000UI/ml vs. <600000UI/ml)
11. Horas de bolsa rota (variable continua)

### **3.6 Recogida y análisis de datos:**

Los datos de interés para este estudio se recogieron de los protocolos de seguimiento de las mujeres VHC positivas y sus hijos, siendo incluidas en una base de datos anónima, utilizada exclusivamente para el análisis estadístico de este estudio. En esta base de datos se incluyeron posteriormente los datos de: 1) los polimorfismos genéticos de la IL28B; 2) las cargas virales 3) y genotipo viral. Se dispone de una amplia seroteca en la que se congelaron a -80°C los sueros y CMN procedentes de madres e hijos. En cuanto a los hijos de las madres ARN-VHC(+), se les recogió suero y CMN cada 2 meses durante el primer año de vida, a los 18 meses, 2 años y anualmente hasta los seis años.

### **3.7 Métodos**

Tanto la carga viral como la determinación del VHC-RNA y el genotipo viral se han realizado en el laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario San Cecilio de Granada. Así mismo, la bioquímica y el hemograma se realizaron en el laboratorio de Hematología de este Hospital.

### **1. Obtención de los sueros:**

La muestra de sangre completa se adicionó a un tubo de vidrio de Bioquímica (BD Vacutainer Ref 364915). Se incubó a 37 °C durante 1 h, hasta que la sangre estuvo bien coagulada. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 4000 rpm durante 15 min a 4 °C y con una pipeta Pasteur se recogió el sobrenadante (suero) y se almacenó a -80 °C hasta su utilización.

### **2. Obtención de células mononucleares de sangre periférica:**

La extracción de CMSP se realizó en gradiente de Ficoll Hypaque (Sigma-Aldrich, Histopaque-1077, Germany). Sobre 3 ml de Histopaque se añadieron 3 ml de sangre heparinizada y se sometieron a centrifugación (400 x g durante 30 min a 20 °C) y se separó el anillo de células mononucleares con una pipeta Pasteur. Las células se lavaron con PBS (NaCl 0,14 M; KCl 0,003 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,008 M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0015 M; pH 7,4) y se centrifugaron (400 x g durante 10 min a 20 °C) para obtener el sedimento celular que fue diluido en medio de congelación isotónico (8 ml de medio de cultivo RPMI, 1 ml de suero fetal bovino 1 ml de DMSO) almacenado a -80°C hasta su utilización.

### **3. La determinación del genotipo viral:**

El Genotipo viral se determinó tanto en las madres como en los niños y se realizó mediante hibridación inversa (Inno-LIPA II HCV; Innogenetics, SA, Ghent, Belgium).

### **4. La determinación cuantitativa de la carga viral del VHC en suero:**

Esta se analizó mediante COBAS TaqMan HCV Test (Roche Diagnostics).

### **5. Obtención ADN:**

La obtención del ADN genómico se realizó de las células mononucleares almacenadas a -80°C de las madres y de los niños. Para su obtención se utilizó un Kit de extracción y se siguieron las recomendaciones del fabricante (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche, Germany). 200 µl de la disolución de células mononucleares fue mezclado con 200 µl de Binding Buffer con proteinasa K y se incubó 10 min a 70°C. A continuación se añadieron 100 µl de

isopropanol y se depositó la muestra sobre las columnas de extracción. Tras centrifugar durante 1 min a 8.000 x g, se procedió a lavar el ADN inmovilizado en la cubeta con 500 µl de Wash Buffer. Finalmente se eluyó el ADN utilizando 200 µl de Elution Buffer a 70°C y centrifugando a 8.000 x g durante 1 min. Estas muestras fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de su utilización.

## 6. Genotipado de la IL28B (SNP-Rs12979860):

Utilizando como molde el DNA genómico extraído, se identificó la incidencia de los utilizando el ensayo TaqMan SNP genotyping (Applied Biosystem) Se determinó el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) Rs12979860 por medio de un ensayo de discriminación alélica utilizando sondas Taqman (Custom Assay Service, Ref. AHI050J) y utilizando como molde el DNA genómico extraído de las células mononucleares de las madres y de los niños. Los tres polimorfismos descritos para este SNP son los siguientes CC, CT y TT. Los oligonucleótidos cebadores utilizados fueron: Oligo sentido 5'-GCCTGTCGTGACTGAACCA-3' y el antisentido 5'-GCGCGGAGTGCAATTCAAC-3'. Las secuencias de las sondas Taqman fueron: a) para la detección del polimorfismo C la sonda marcada con el fluorocromo VIC 5'-TGGTTCGCGCCTTC-3' y b) para el polimorfismo T, la sonda 5'-CTGGTTCACGCCTTC-3' etiquetada con el fluorocromo FAM. Las reacciones de amplificación por PCR fueron realizadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un equipo Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, con un volumen final de 4µl, siguiendo el siguiente protocolo térmico: preincubación a 50°C durante 2 min, incubación a 95°C durante 10 min seguidos de 40 ciclos formados por dos etapas, la primera de desnaturalización a 95°C durante 15s y la segunda de hibridación-elongación a 60°C, 1 min. La intensidad de fluorescencia se analizó a tiempo final (transcurridos los 40 ciclos), y la determinación de los polimorfismos se realizó automáticamente mediante la utilización del software de discriminación alélica SDS 2.2.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### 3.8 Estudio estadístico

Para cubrir los objetivos del estudio se llevó a cabo un análisis estadístico consistente en:

1. Estadística descriptiva: Los resultados de las variables cualitativas serán expresados en porcentajes y las variables cuantitativas se expresarán como medias  $\pm$  desviación típica.
2. Análisis bivariante: Debido a que las variables dependientes son cualitativas, se aplicará el test estadístico  $\chi^2$  o el test exacto de Fisher unilateral (variable independiente cualitativa) y el análisis de Regresión Logística calculando la odds ratio (OR) y su correspondiente intervalo de confianza (IC 95%) (variable independiente cuantitativa o cualitativa).
3. Análisis multivariante: Todas las variables pronósticas o de riesgo de transmisión del VHC y/o cronificación del VHC en niños, incluidos los factores genéticos, se incluirán en un análisis multivariante mediante regresión logística, tomándose como medida de asociación la OR (IC 95%).

Se considerará significación estadística valores de  $p < 0.05$ . En todos los casos se empleará el paquete SPSS 15.0.

### 3.9 Consentimiento informado de los pacientes

En los sueros que datan de fechas más recientes, tenemos recogido el consentimiento informado de los pacientes, sin embargo, en una pequeña proporción de muestras de suero que datan de fechas antiguas, no se cuenta con consentimiento informado de los pacientes. De hecho, según la nueva ley de Investigaciones Biosanitarias, aquellos estudios con muestras biológicas obtenidas con cualquier finalidad con anterioridad a la entrada en vigor de esta Ley, con el propósito de no entorpecer su uso para la investigación, velando al mismo tiempo por los intereses de los sujetos fuente de aquéllas, quedan exentos del consentimiento informado exigiéndose el dictamen favorable del Comité de Ética de la Investigación correspondiente. Así, según el Título V, Capítulo III, Artículo 58 de la Ley 14 /2007 de Investigaciones biomédicas: 1. La obtención de muestras biológicas con fines de investigación biomédica podrá realizarse únicamente

cuando se haya obtenido previamente el consentimiento escrito del sujeto fuente y previa información de las consecuencias y los riesgos que pueda suponer tal obtención para su salud. Dicho consentimiento será revocable; 2. El consentimiento del sujeto fuente será siempre necesario cuando se pretendan utilizar con fines de investigación biomédica muestras biológicas que hayan sido obtenidas con una finalidad distinta, se proceda o no a su anonimización. No obstante lo anterior, de forma excepcional podrán tratarse muestras codificadas o identificadas con fines de investigación biomédica sin el consentimiento del sujeto fuente, cuando la obtención de dicho consentimiento no sea posible o represente un esfuerzo no razonable en el sentido del artículo 3 de esta Ley. En estos casos se exigirá el dictamen favorable del Comité de Ética de la Investigación correspondiente.

La aprobación previa para el estudio fue obtenida del Comité de Ética del Hospital Universitario San Cecilio de Granada.



## **4 Resultados**





## **Capítulo 1**

### **Comportamiento de las transaminasas en gestante con HCC**



**Comportamiento de las transaminasas en mujeres con anticuerpos positivos del virus de la hepatitis C, durante la gestación, parto y puerperio.** De las 122 mujeres anti-VHC+vas, 89 fueron ARN-VHC positivas y 33 negativas. En la figura 8 se observa el comportamiento de la transaminasa (ALT) en los distintos periodos de estudio. Las gestantes con ARN-VHC+vas tienen un comportamiento parecido a las ARN-VHC-vas durante la gestación y el parto pero entre los 3 y 6 meses postparto el 66% de las mujeres ARN-VHC+vas, presentan un aumento de ALT que solamente está presente en un 6% de las mujeres ARN-VHC-vas ( $P<0.001$ ).

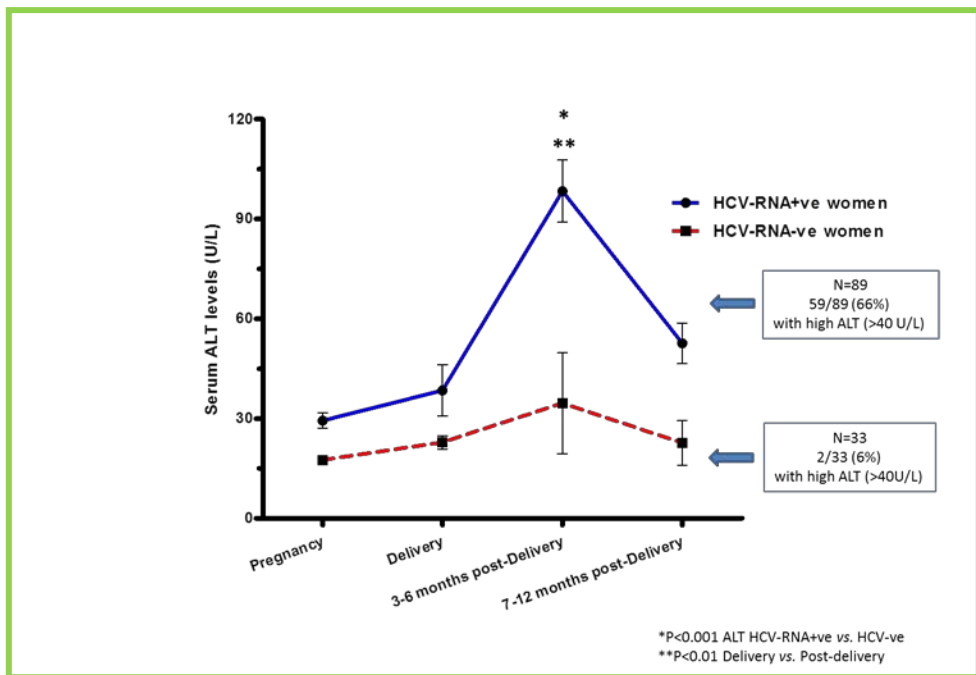


Figura 8. Transaminasas en gestantes anti-VHC positivas

**Comportamiento de las transaminasas en mujeres con infección crónica por el virus de la hepatitis C (HCC), durante la gestación, parto y puerperio.** Como hemos comentado en el párrafo anterior, no todas las mujeres ARN-VHC+vas tienen el mismo comportamiento en cuanto a los niveles séricos de ALT. En la figura 9 se representan las madres ARN-VHC+vas en función de si presentan o no cambios en sus niveles de ALT en el puerperio. Así, en el 66% (59/89) de estas madres se observó un aumento de ALT (niveles superiores a 40 U/L) entre los 3 y 6 meses tras el parto. A estas madres las hemos clasificado como “**madres tipo A**”.

Por otro lado, un 34% (30/89) de las madres ARN-VHC+vas, no presentaron variaciones en sus niveles séricos de ALT (<40 U/L), a estas madres las denominamos “**madres tipo B**”.

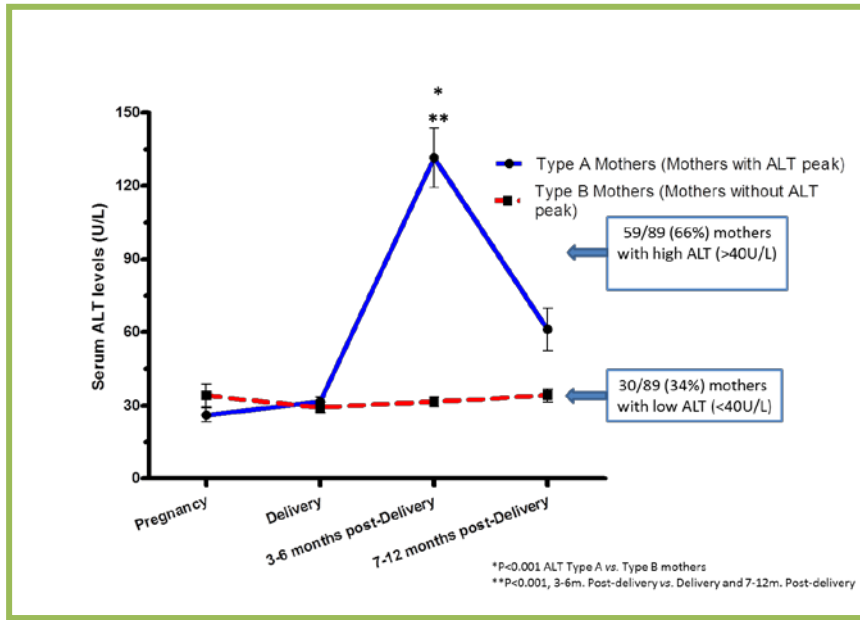


Figura 9. ALT durante la gestación y puerperio en mujeres con hepatitis crónica C

A continuación se analizaron las diferentes características clínicas de estas mujeres para tratar de identificar los posibles factores implicados en este distinto comportamiento de la ALT (tabla 2). Las madres tipo A tuvieron un aumento medio en sus valores de ALT de 100 U/L frente a 2 U/L de las tipo B. Además, el 79% de las madres con carga viral en el parto (>600.000 UI/mL) son tipo A frente al 21% de las tipo B (P=0.01). Asimismo, las madres tipo A mostraron un descenso en su carga viral (CV en el parto-CV en el puerperio) de  $2.4 \times 10^6$  UI/mL frente a  $11 \times 10^3$  UI/mL de las madres tipo B (P=0.031). No se observó ninguna diferencia significativa entre ambos tipos de madres con respecto a la edad, la epidemiología, el polimorfismo de IL28B y el genotipo viral.

**Evolución de la ALT y la carga viral en las madres tipo A.** En la figura 10 se observa que las madres tipo A presentan un incremento en sus niveles de ALT entre los 3 y 6 meses tras el parto y esto coincidió temporalmente con un descenso estadísticamente significativo en su carga viral. Además, existe una correlación

estadísticamente significativa entre ambos sucesos ( figura 11,  $P < 0.001$ ). Finalmente, si separamos las madres tipo A en función de su niveles de ARN-VHC en madres con alta carga viral en el parto ( $>600.000$  UI/mL) y madres con baja carga viral en el parto ( $<600.000$  UI/mL), se observa que independientemente de la carga viral que se presente en el parto, las madres tipo A muestran un descenso estadísticamente significativo en sus valores de ARN-VHC entre los 3 y 6 meses post-parto (figura 12).

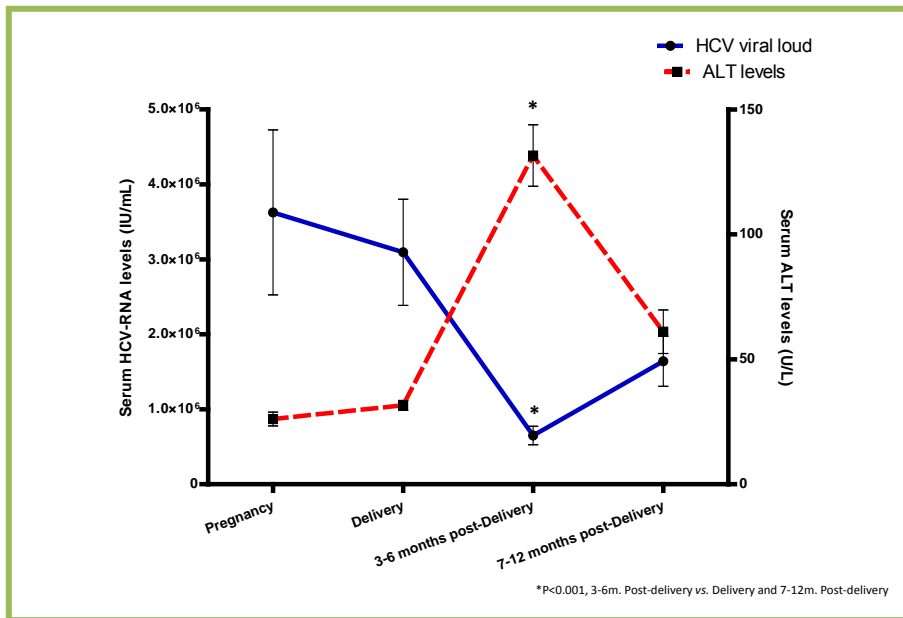


Figura 10. Evolución temporal de ALT y carga viral en madres ARN-VHC+vas tipo A

**Tabla 2. Características clinicopatológicas de las mujeres con hepatitis crónica C**

Mothers categorized in accordance with ALT (n=89)	Type A Mothers n=59 (66%)	Type B Mothers n=30 (34%)	P-Value
<b>Age<sup>1</sup></b>	29 ± 0.7	30 ± 0.9	<i>ns</i>
<b>Viral Genotype</b> Geno. 1	41 (67)	20 (33)	<i>ns</i>
Geno. non-1	13 (65)	7 (35)	
<b>Mother's Delivery Viral Load (IU/mL)</b>			
≤600,000	20 (50)	20 (50)	<b>0.01</b>
>600,000	37 (79)	10 (21)	
<b>Difference Between Delivery and post-child-birth Viral Load<sup>1</sup></b>	2.4x10 <sup>6</sup> ± 6x10 <sup>5</sup>	1.1x10 <sup>5</sup> ± 6x10 <sup>5</sup>	<b>0.031</b>
<b>Difference Between post-child-birth and Delivery ALT Levels<sup>1</sup> (U/L)</b>	100 ± 11	2 ± 2	<b>0.001</b>
<b>IL28B genotype</b> CC	14 (74)	5 (26)	<i>ns</i>
No-CC	39 (66)	20 (34)	
<b>Vertical Transmission</b> Yes	12 (80)	3 (20)	<i>ns</i>
Non	47 (63)	27 (37)	
<b>Gestational Age<sup>1</sup> (Weeks)</b>	38.84 ± 0.3	38.80 ± 0.4	<i>ns</i>
<b>Type of birth</b> Caesarean	15 (48)	16 (52)	<i>ns</i>
Non-Caesarean	32 (56)	25 (44)	
<b>Breast-feed Infants</b> Yes	37 (63)	22 (37)	<i>ns</i>
No	16 (76)	5 (24)	
<b>Breast-feeding days<sup>1</sup></b>	50 ± 8	60 ± 15	<i>ns</i>
<b>Child Weight (g)<sup>1</sup></b>	3216 ± 68	3025 ± 105	<i>ns</i>
<b>Epidemiology</b> Parenteral	39 (63)	23 (37)	<i>ns</i>
No-Parenteral	17 (81)	4 (19)	

<sup>1</sup>Mean ± the standard error of the mean (SEM)

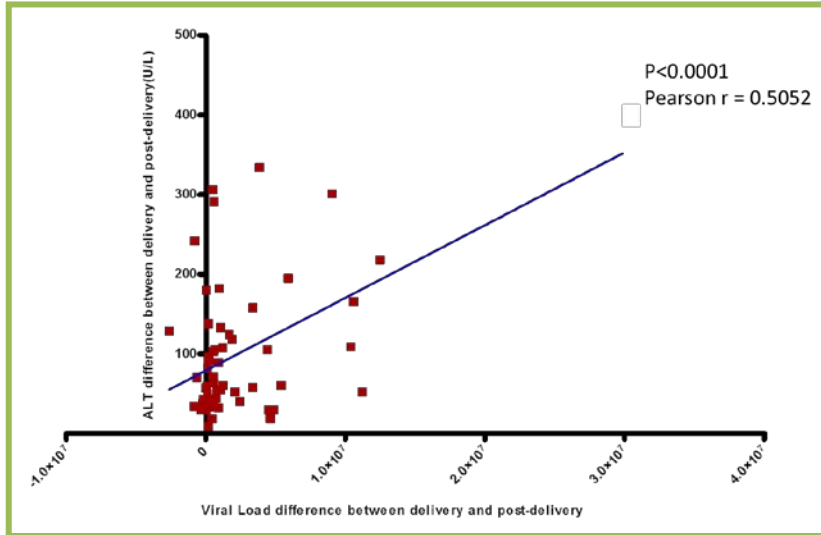


Figura 11. Correlación entre las diferencias parto vs. post-parto en ALT y carga viral en madres ARN-VHC+vas tipo A

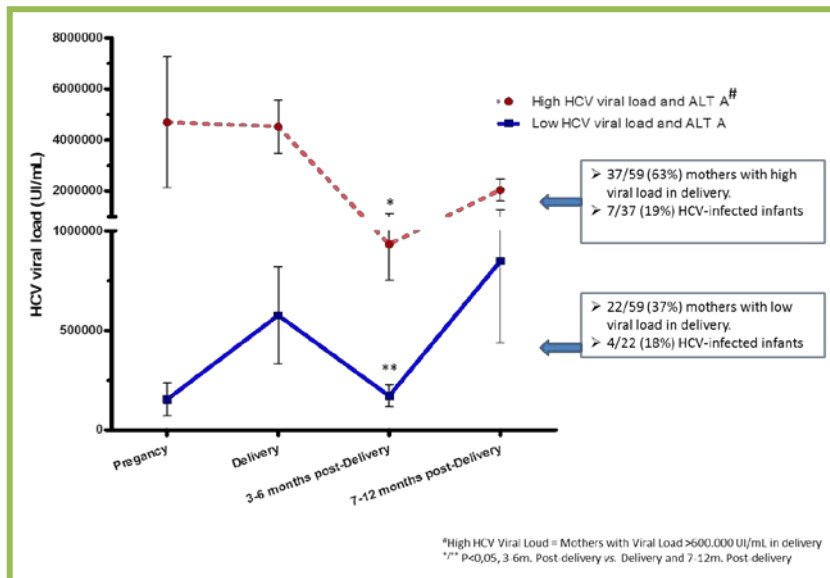


Figura 12. Carga viral en madres ARN-VHC+vas tipo A categorizadas como carga viral alta o baja en el parto



**Evolución de la ALT y la carga viral en las madres tipo B.** Por el contrario, las madres tipo B no presentaron variación estadísticamente significativa en su carga viral (figura 13) y por lo tanto no existe en ellas ninguna correlación entre variación en ALT y carga viral (Figura 14). Finalmente, si separamos las madres tipo B en función de sus niveles de ARN-VHC, en madres con alta carga viral en el parto (>600.000 UI/mL) y madres con baja carga viral en el parto (<600.000 UI/mL), se observa que independientemente de la carga viral que se presente en el parto, las madres tipo B no muestran variación estadísticamente significativa en sus valores de ARN-VHC durante la gestación, parto y puerperio (figura 15).

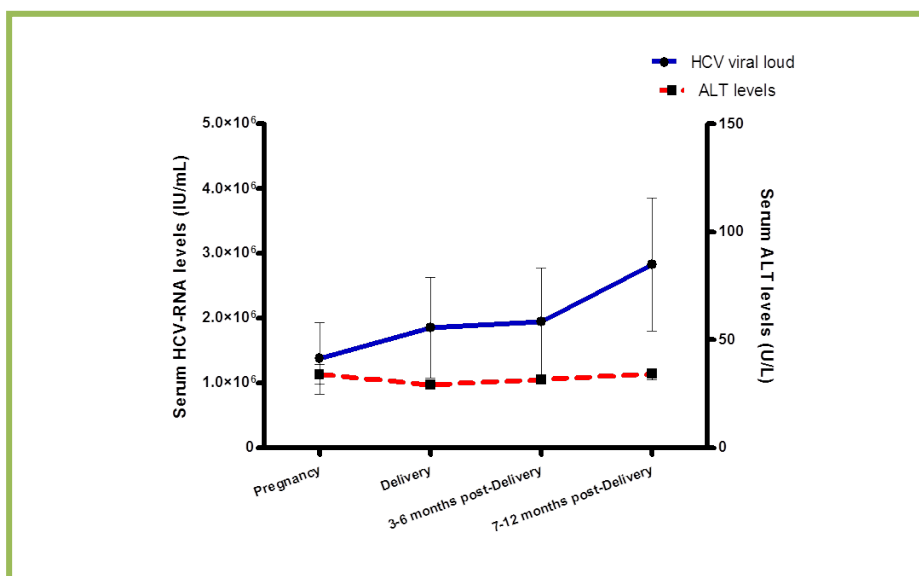


Figura 13. Evolución temporal de ALT y carga viral en madres ARN-VHC+vas tipo B

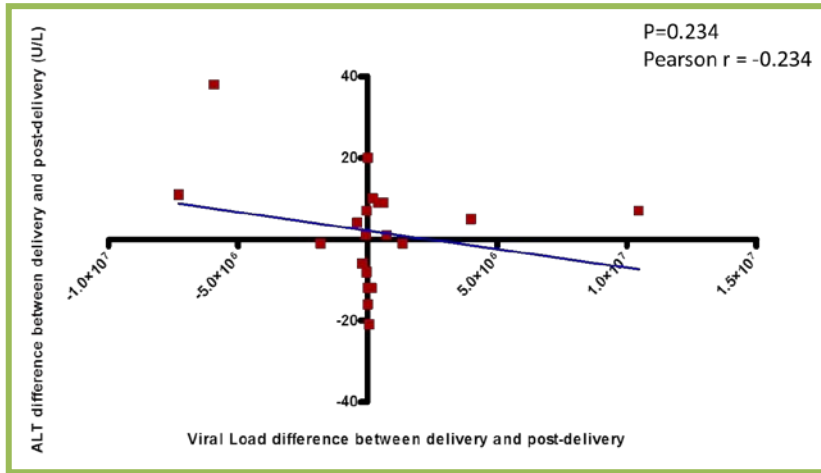


Figura 14. Correlación entre las diferencias parto vs. post-parto en ALT y carga viral en madres ARN-VHC+vas tipo B

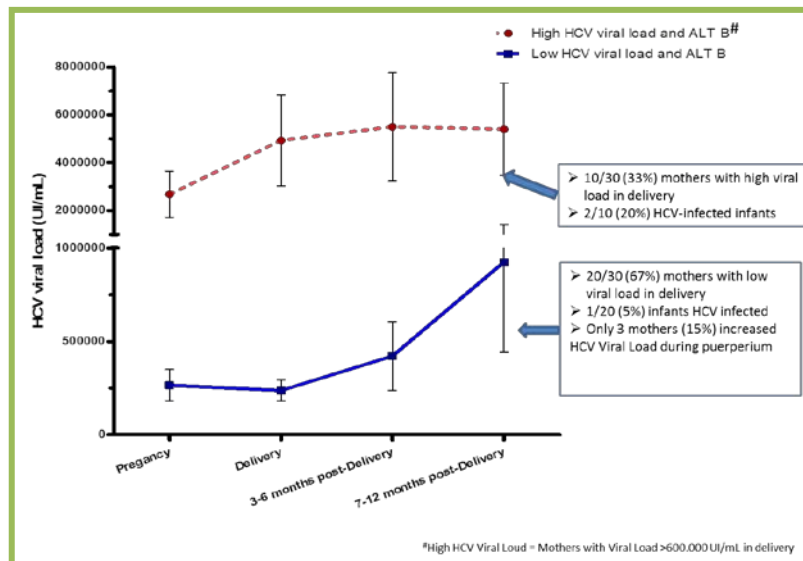


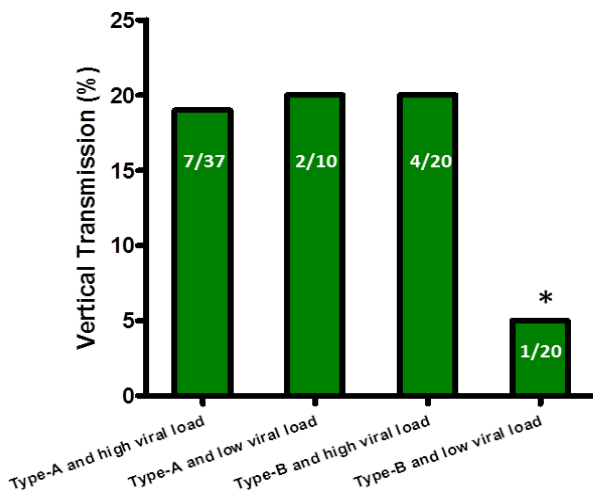
Figura 15. Carga viral en madres ARN-VHC+vas tipo B categorizadas como carga viral alta o baja en el parto

## **Relación entre transmisión vertical, evolución de la ALT y carga viral en el parto.**

**A) Carga viral y transmisión vertical:** Si clasificamos a las madres en función de los valores de su carga viral en el parto en carga viral alta (>600.000 UI/mL) y carga viral baja (<600.000 UI/mL), se observa que el 86% de los niños infectados (19/22) son hijos de madres con alta carga viral ( $P=0.02$ ). El análisis multivariante muestra que la alta carga viral en el parto es una variable independientemente asociada con transmisión vertical (OR: 7.3; IC95%: 1.8-29.4;  $P=0.005$ ).

**B) Aumento de los niveles de ALT en el puerperio y transmisión vertical:** En cuanto a la relación entre el tipo de madre A o B y transmisión vertical, se observa una tendencia estadísticamente no significativa en la que el 80% de los niños infectados verticalmente proceden de madres tipo A (Tabla 2,  $p>0.05$ ).

**C) Si se tienen en cuenta ambos criterios** se observó que las madres tipo B con carga viral baja presentaban la tasa de transmisión vertical más baja (5%) en relación al resto de madres (Figura 16). Así, las madres con alta carga viral presentaron tasas de transmisión vertical similares (en torno al 20%) independientemente de si son tipo A o B y las madres tipo A y carga viral baja, mostraron una tasa de transmisión semejante (20%), sugiriendo que las fluctuaciones en los niveles de la ALT o los motivos que la producen (sistema inmune) pueden tener alguna relación con la transmisión vertical.



\*P<0,05

Figura 16. Transmisión vertical en función de la carga viral en el parto y del tipo de madre según niveles de ALT

**Aclaramiento espontáneo del virus de la hepatitis C tras el embarazo.** Por lo general, las madres tipo A, presentaron una reducción en su carga viral entre los tres a seis meses tras el parto, hecho que no se observó en las madres tipo B (figuras 12 y 13). En nuestra población de estudio (89 madres ARN-VHC+vo), 4 madres presentaron aclaramiento viral espontáneo tras el embarazo (4,4%, tabla 3). Tres de las cuatro presentaban una carga viral baja (<600.000 UI/mL) y genotipo de la IL-28B no TT (dos CC y una CT).

Tabla 3. Características de las mujeres que aclaran el VHC postparto

Case	Aged	Genotype Mother	Viral Load (UI/mL)	Type Mothers (ALT)	IL28B Mother	Gestational Age	Type of birth	Vertical transmission	Epidemiology	Infant Chronic	Relapser
1	33	1	<600,000	B	CC	39	Non-Caesarean	No	Drugs	No	No
2	28	1	<600,000	B	CC	40	Non-Caesarean	Yes	Sporadic	No	No
3	35	1	<600,000	A	CT	41	Caesarean	No	Transfusion	No	Yes
4	32	3	>600,000	A	TT	41	Non-Caesarean	No	Drugs	No	No



**CAPITULO I**

**COMUNICACIONES A CONGRESOS**



1. Congreso Americano de la AASLD ( American Association for the Study of the Liver Diseases) titulado “LIVER MEETING 2011”, celebrado en San Francisco, US.

Saturday, Nov. 5 PM - Poster Presentations				
Presentation Time/ Session Start Time	Location	Prog. #/Type	Authors Institutions	Abstract Title Session #/Title
Saturday, Nov. 5, 2:00 PM - 7:30 PM/ 2:00 PM	Poster Hall	402 Poster	<p>A.Ruiz-Extremera<sup>1,2</sup>,            J.Muñoz-Gómez<sup>3</sup>,            M.Salmerón-Ruiz<sup>4</sup>,            P.Muñoz de Rueda<sup>3,2</sup>,            R.Quiles<sup>3,2</sup>, A.Gila<sup>3,2</sup>,            J.Casado<sup>3</sup>, A.Martin<sup>3</sup>,            L.Sanjuan<sup>5</sup>, A.Carazo<sup>3</sup>,            E.Pavón<sup>3</sup>, E.Ocete-Hita<sup>1</sup>,            J.León<sup>3,2</sup>, J.Salmeron<sup>3,2</sup></p> <p>1. Pediatric Unit, San Cecilio University Hospital, Granada, Granada, Spain;            2. Centro de Investigacion Biomedica en Red de Enfermedades Hepaticas y Digestivas, Ciberehd, Granada, Granada, Spain;            3. Clinical Management Unit of Digestive Disease, San Cecilio University Hospital, Granada, Granada, Spain;            4. Pediatric Unit, La Paz University Hospital, Madrid, Madrid, Spain;            5. Department of Medicine, Granada University, Granada, Granada, Spain</p>	<p><b>Transaminases and HCV - RNA evolution during pregnancy, delivery and puerperium among women with chronic hepatitis C</b>  <b>51 HCV: Diagnosis and Natural History</b></p>



**Transaminases and HCV - RNA evolution during pregnancy, delivery and puerperium among women with chronic hepatitis C.** A.Ruiz-Extremera<sup>1,2</sup>; J.Muñoz-Gómez<sup>3</sup>; M. Salmerón-Ruiz<sup>4</sup>; P .Muñoz de Rueda<sup>3,2</sup>; R .Quiles<sup>3,2</sup>; A .Gila<sup>3,2</sup>; J.Casado<sup>3</sup>; A .Martín<sup>3</sup>; L .Sanjuan<sup>5</sup>; A .Carazo<sup>3</sup>; E. Pavón<sup>3</sup>; E .Ocete-Hita<sup>1</sup>; J .León<sup>3,2</sup>; J.Salmeron<sup>3,2</sup>

1. Pediatric Unit, San Cecilio University Hospital, Granada, Granada, Spain; 2. Centro de Investigación Biomedica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Ciberehd, Granada, Granada, Spain; 3. Clinical Management Unit of Digestive Disease, San Cecilio University Hospital, Granada, Granada, Spain; 4. Pediatric Unit, La Paz University Hospital, Madrid, Madrid, Spain; 5. Department of Medicine, Granada University, Granada, Granada, Spain

**Program Number:** 402

**Presentation Time:** Saturday, Nov. 5, 2:00 PM - 7:30 PM

**Location:** Poster Hall

During pregnancy, the Th1 immune response is repressed and it affects to the HCV evolution. Several works have described transaminase level normalization and increase of viral load during gestation, with restitution of original transaminase and viral load levels one year after pregnancy although it does not have been clearly established. The aim of this study was to determine the disease evolution during the pregnancy, delivery and puerperium as a natural model of immune repression and restitution as well as its potential relation with vertical transmission (VT). Between 1991 and 2009, 145 mothers were recruited to this study, out of which, 100 were HCV-RNA+ve/HIV-ve, with 128 children, and 33 were HCV-RNA-ve/HCV antibody+ve, with 43 children. The mothers were tested during pregnancy, delivery and post-delivery at regular intervals until 1 year after the childbirth. The infants were tested for HCV-RNA at birth and at regular intervals until the age of 6 years. In the infants the IL28B (rs12979860) and in the mothers, the IL28B, the serum transaminases (ALT, AST and GGT) and HCV-RNA were determined. No differences in ALT levels were observed during pregnancy (29.4 vs 17.5 UI/mL), and delivery (38.5 vs 23 UI/mL). Between HCV-RNA+ve and HCV-RNA-ve mothers, however, significant differences in ALT levels were observed during the four months after childbirth (98.3 vs 34.5 UI/mL respectively,  $p < 0.001$ ). 67% of the HCV-RNA+ve

mothers showed an increase in ALT levels with respect to the delivery and this event was coextensive with a decrease in serum HCV-RNA with respect to the delivery levels (HCV-RNA was decreased in  $2.4 \times 10^6$  UI/mL vs  $1.1 \times 10^4$  UI/mL in the mothers without alteration in ALT,  $p < 0.01$ ). The HCV-RNA+ve mothers were categorized as: (A) Mothers with a decrease in serum HCV-RNA levels between delivery and puerperium (0.5 logarithms), and (B) mothers without decrease. The type A mothers (53%), had higher HCV-RNA levels in the delivery than type B ( $4.1 \times 10^6$  vs  $9.4 \times 10^5$ ;  $p = 0.003$ ) and in the post-childbirth had higher ALT values (133 vs 63 UI/mL,  $p = 0.001$ ) and AST (76 vs 36 UI/mL,  $p = 0.017$ ). 20% of the infants born of the HCV-RNA+ve mothers acquired HCV infection, but only 7% were chronically infected. 75% of positive infants were born of type A mothers whereas only the 25% of positive children were born of B category mothers ( $p < 0.05$ ). None differences were observed between these groups in regard to GGT levels, viral genotype, age and IL28B (mother and children). Conclusions: The mothers with a decrease in serum HCV-RNA levels between delivery and puerperium exhibited more probability of VT. This decrease was coextensive with an increase in ALT/AST levels.

**2.- Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH), Madrid, febrero de 2012. (Aceptado)**

**EVOLUCIÓN DE LA ALT Y DE LA CARGA VIRAL DURANTE LA GESTACIÓN, PARTO Y PUERPERIO EN GESTANTES INFECTADAS CRÓNICAMENTE POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC) Y SU RELACIÓN CON TRANSMISIÓN VERTICAL**

**Introducción:** La evolución de la infección crónica por VHC durante la gestación y puerperio no está claramente definida. En este periodo, la respuesta inmune Th1 se encuentra reprimida y puede afectar al curso de la enfermedad.

**Objetivos:** Determinar la evolución de la enfermedad viral durante la gestación y puerperio en un modelo natural de represión y restitución de la respuesta inmune, así como su potencial relación con la transmisión vertical del VHC.

**Pacientes y Métodos:** Se reclutaron 122 madres gestantes seguidas en el Hospital Universitario San Cecilio entre los años 1991 y 2009. 89 madres fueron VHC-RNA+vo y 33 VHC-RNA-vo/VHC antiVHC+vo. Se analizaron los niveles séricos de ALT y carga viral durante intervalos regulares en el embarazo, en el parto y se finalizó un año después de la gestación. En los recién nacidos se midieron los niveles séricos de VHC-RNA a intervalos regulares desde el nacimiento hasta los 6 años de edad. A los niños positivos se les determinó el genotipo viral. Se asumió transmisión vertical cuando los niños presentaron VHC-RNA+vo en dos muestras de sangre consecutivas. Finalmente, se determinó el polimorfismo de la IL28B en las madres y en sus hijos.

**Resultados:** Los niveles séricos de ALT permanecieron normales durante la gestación y el parto, tanto en las madres VHC-RNA+vas como en las VHC-RNA-vas (<40 UI/mL). Las madres HCV-RNA+vas presentaron un incremento estadísticamente significativo en los niveles séricos de ALT a los 6 meses tras el parto con respecto a las HCV-RNA-vas (98.3 vs 34.5 UI/mL,  $p < 0.001$ ). El 67% de las gestantes HCV-RNA+vas, presentaron niveles elevados de la ALT en el postparto (>40 UI/mL, clasificadas como madres tipo A) y este evento se correlacionó con un descenso en el puerperio de su carga viral con respecto al parto (descenso en madres tipo A =  $2.4 \times 10^6$  UI/mL vs madres tipo B =  $1.1 \times 10^4$  UI/mL,  $p < 0.05$ ). El 79% de las madres tipo A presentaron niveles altos de la carga viral en el parto (>600.000 UI/mL) frente al 10% de las tipo B ( $p = 0.01$ ). La tasa de transmisión vertical fue del 20% pero solo el 7% de los niños permanecieron crónicamente

infectados. Las madres tipo B con baja carga viral ( $<600.000$  UI/mL) presentaron una tasa de transmisión vertical del 5% frente al 20% del resto de madres ( $p<0.05$ ). No se observó ninguna diferencia significativa con respecto a la edad, la etiología, el polimorfismo de IL28B y el genotipo viral entre ambos tipos de madres.

**Conclusiones:** La mayoría de las mujeres VHC-RNA+vas en el puerperio, sufren un aumento de ALT con descenso de la carga viral, posiblemente por la restitución de la inmunidad Th1. Existe una relación directa entre alta carga viral en el parto e incremento en los niveles de ALT. Las madres tipo B con carga viral baja presentan la tasa de transmisión vertical más baja.



**Capítulo 2. Genetic Variation in Interleukin 28B with Respect to Vertical  
Transmission of Hepatitis C Virus and Spontaneous Clearance  
in HCV-Infected Children**

Trabajo publicado en la Revista  
Hepatology, Vol 53, No. 6, 2011



**Genetic Variation in IL28B with respect to Vertical Transmission of Hepatitis C Virus and Spontaneous Clearance in HCV Infected Children** Ángeles Ruiz-Extremera, Jose Antonio Muñoz-Gámez, M<sup>a</sup> Angustias Salmerón-Ruiz, Paloma Muñoz de Rueda, Rosa Quiles-Pérez, Ana Gila-Medina, Jorge Casado, Ana Belén Martín, Laura Sanjuan-Nuñez, Ángel Carazo, Esther José Pavón, Esther Ocete-Hita, Josefa León, Javier Salmerón.. *Hepatology* 2011;53:1830-38.

**Introducción.** La transmisión vertical del virus de la hepatitis C (VHC) es la principal vía de infección en niños nacidos en los países desarrollados, pero los factores de riesgo involucrados en este tipo de transmisión permanecen sin determinar.

**Objetivos:**

- 1.- Describir las tasas de transmisión vertical y cronificación de la infección en niños de nuestro entorno.
- 2.- Conocer los factores que influyen en la transmisión vertical y en la cronificación del VHC en los hijos de madres con hepatitis C.
- 3.- Analizar si el factor genético de la IL-28B juega algún papel en la TV y en el aclaramiento viral espontáneo de los niños infectados con genotipo viral 1.

**Pacientes y Métodos.** Entre 1991 y 2009, fueron incluidas en el estudio a 133 madres. De estas, 100 fueron VHC-RNA+vo y tuvieron 128 niños, y 33 madres fueron VHC-RNA-vo/VHC antiVHC+vo, con 43 niños. Los recién nacidos fueron seguidos al nacimiento y a los 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 y 24 meses y anualmente a los 3, 4, 5 y 6 años analizando el ARN-VHC y en los positivos se determinó el genotipo viral. IL28B (single nucleotide polymorphisms 12979860) fue determinado en las madres y en sus hijos.

**Definición de Transmisión vertical, viremia transitoria y cronificación:** Se asumió transmisión vertical cuando los niños presentaron VHC-RNA+vo en dos muestras de sangre consecutivas. Los niños infectados fueron clasificados como: (A) niños con **viremia transitoria** con posterior VHC-RNA-vo y sin seroconversión; (B) niños con **infección permanente o crónica** que mantuvieron el VHC-RNA+vo de forma permanente y con seroconversión.



**Resultados.** De las 31 madres con polimorfismo CC de la IL28B, 19 madres (61%) fueron VHC-RNA+vo mientras que entre las 68 madres con polimorfismo no-CC, 56(82%) fueron VHC-RNA+vo (OR=2,95; 95%CI: 1.1-7,7; P<0.026).

Los niños nacidos de madres VHC-RNA-vo y anti-VHC+vo no presentaron transmisión vertical. 26 de los 128 (20%) niños nacidos de madres VHC-RNA+vo adquirieron la infección pero solo 9 (7% con respecto al total de niños y 35% con respecto al total de infectados) presentaron infección crónica (figura 1 del artículo). Por tanto, el porcentaje de aclaramiento viral espontáneo en nuestra cohorte fue del 65%. La tasa de transmisión vertical fue más elevada en los hijos de madres con alta carga viral, así un 86% de los niños infectados nacieron de madres con alta carga viral (tabla 2 del artículo; >600.000 UI/mL; OR=9; 95%CI: 1.1-88; P<0.05).

En cuanto al aclaramiento viral espontáneo y cronificación, los factores de riesgo analizados mostraron que el genotipo viral no-1 y niveles de ALT <40U/L en el seguimiento del niño se asociaron con el aclaramiento viral (P=0.02).

A continuación se realizó el estudio de los polimorfismos de la IL28B en las madres-hijos genotipo 1 (se seleccionó este genotipo ya que en adultos se ha descrito su relación con los SNPs de la IL28B y el aclaramiento viral espontáneo y respuesta viral al tratamiento). Los resultados presentados en la tabla 4 muestran que el polimorfismo de la IL28B de las madres y de los niños genotipo viral 1 no se asoció con un incrementado riesgo de transmisión vertical. Sin embargo, en los niños infectados que presentaron aclaramiento viral espontáneo de VHC, se observó una relación estadísticamente significativa con el genotipo CC de la IL28B del niño, el 87,5 de los niños infectados crónicamente presentaron genotipo no-CC (7/8; P=0.04). La regresión logística multivariante mostró que para la transmisión vertical (figura 2 superior), la carga viral alta (>600.000 UI/mL) en el momento del parto y la ALT del niño (>40 U/L) son factores independientes asociados con TV (OR=7.3; IC 95% = 1.8-29.4; P=0.005). Estos factores se encontraron igualmente cuando se analizó el genotipo viral 1 de forma aislada. Finalmente, en el estudio de cronificación (figura 2 inferior), la regresión logística multivariante mostró que la única variable asociada de forma independiente con el aclaramiento espontáneo fue el polimorfismo CC de la IL28B en los niños infectados verticalmente con VHC genotipo 1 (OR=17; 95%CI: 1.2-250; P<0.05).

## **Conclusiones:**

- 1.- La carga viral alta de la madre es el único factor de riesgo asociado a transmisión vertical del VHC.
- 2.- El polimorfismo de la IL28B no juega ningún papel en transmisión vertical, sin embargo, el genotipo CC de la IL28B del niño está asociado independientemente con aclaramiento espontáneo del VHC en niños infectados con genotipo 1.
- 3.- Existe una alta tasa de aclaramiento viral en los niños, superior a la descrita para los adultos infectados con VHC.
- 4.- Las mujeres con polimorfismo CC de la IL28B tienen mayor probabilidad de ser ARN-VHC -vo.

## **Anexo. Estudio de las tasas de transmisión vertical y cronificación en madres VHC positivas en relación con las coinfectadas con VIH.**

### **Resultados.**

- En las madres ARN-VHC (+) y VIH(-), la tasa de TV-VHC fue de 20% (26/128). Las madres ARN-VHC (+) y VIH(+) fueron 12 con sus 14 hijos. La tasa de TV-VHC fue del 43% (6/14). Las mujeres coinfectadas con VIH muestran 3,6 veces mayor riesgo de TV-VHC a sus hijos.
- Al analizar la cronificación de la infección VHC en los niños fue también distinta según la madre estuviese o no coinfectada por el VIH. La tasa de niños con infección crónica fue del 7% (9/128) en recién nacidos de madres no coinfectadas y del 29% (4/14) en los bebés nacidos de madres coinfectadas presentando en este caso un riesgo de cronificación 5,3 superior a las madres no coinfectadas.

### **Conclusiones**

- 1.- Las mujeres coinfectadas con VIH muestran mayor riesgo de TV-VHC a sus hijos.
- 2.- Los niños nacidos de madres coinfectadas con VIH presentan menor aclaramiento viral espontáneo.



# Genetic Variation in Interleukin 28B with Respect to Vertical Transmission of Hepatitis C Virus and Spontaneous Clearance in HCV-Infected Children

Ángeles Ruiz-Extremera,<sup>1,2\*</sup> José Antonio Muñoz-Gómez,<sup>1\*</sup> María Angustias Salmerón-Ruiz,<sup>3</sup>  
Paloma Muñoz de Rueda,<sup>1,2</sup> Rosa Quiles-Pérez,<sup>1,2</sup> Ana Gila-Medina,<sup>1,2</sup> Jorge Casado,<sup>1</sup>  
Ana Belén Martín,<sup>1</sup> Laura Sanjuan-Nuñez,<sup>1,4</sup> Ángel Carazo,<sup>1</sup> Esther José Pavón,<sup>1</sup>  
Esther Ocete-Hita,<sup>1</sup> Josefa León,<sup>1,2</sup> and Javier Salmerón<sup>1,2,4</sup>

The vertical transmission of hepatitis C virus (HCV-VT) is a major route of HCV infection in children, but the risk factors remain incompletely understood. This study analyzed the role of interleukin 28B (IL28B) in HCV-VT and in the spontaneous clearance of HCV among infected infants. Between 1991 and 2009, 145 mothers were recruited for this study: 100 were HCV-RNA+ve / human immunodeficiency virus negative (HIV-ve), with 128 children, and 33 were HCV-RNA-ve/HCV antibody+ve, with 43 children. The infants were tested for HCV-RNA at birth and at regular intervals until the age of 6 years. IL28B (single nucleotide polymorphism rs12979860) was determined in the mothers and children. HCV-VT was assumed when children presented HCV-RNA+ve in two subsequent blood samples. HCV-VT-infected infants were categorized as: (1) transient viremia with posterior HCV-RNA-ve and without serum-conversion; (2) persistent infection with serum-conversion. Of the 31 mothers with CC polymorphism, 19 (61%) were HCV-RNA+ve, whereas among the 68 mothers with non-CC polymorphism, 56 (82%) were HCV-RNA+ve. In all, 26 of 128 (20%) infants born to the HCV-RNA+ve mothers acquired HCV infection, but only 9 (7%) were chronically infected. The rate of HCV-VT was higher among the mothers with higher HCV viremia. No HCV-VT was detected in the HCV-RNA-ve women. Neither the mothers' nor the children's IL-28 status was associated with an increased risk of HCV-VT. The factors influencing viral clearance among the infected children were genotype non-1 and genotype CC of IL28B. In logistic regression, child CC polymorphism was the only predictor of HCV-clearance in HCV genotype-1. Conclusion: High maternal viral load is the only predictive factor of HCV-VT. IL28B plays no role in HCV-VT, but IL28B CC child polymorphism is associated independently with the spontaneous clearance of HCV genotype-1 among infected children. (HEPATOLOGY 2011;53:1830-1838)

Infection with hepatitis C virus (HCV) is a worldwide health problem, with more than 170 million individuals infected. In industrialized countries, HCV is the most common cause of chronic liver disease in children. Since 1992, HCV vertical transmission (HCV-VT) from an infected mother to her newborn infant has constituted the predominant ac-

quisition mode of HCV infection and, despite better understanding of the risk factors involved in the perinatal transmission of HCV, to date little is known about the underlying transmission mechanisms and timing.<sup>1,2</sup> The natural history of HCV infection in children is not yet well defined; most children are asymptomatic despite common ongoing viremia and

Abbreviations: ALT, alanine transaminase; HCV, hepatitis C virus; HCV-RNA, hepatitis C virus ribonucleic acid; HCV-RNA+ve, HCV-RNA positive; HCV-RNA-ve, HCV-RNA negative; HCV-VT, hepatitis C virus vertical transmission; HIV, human immunodeficiency virus; HLA, human leukocyte antigen; IL28B, interleukin 28B (interferon, lambda 3); PCR, polymerase chain reaction; SNP, single nucleotide polymorphism.

From the <sup>1</sup>San Cecilio University Hospital, Granada, Spain; <sup>2</sup>Centro de Investigación Biomedica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (Ciberehd), Granada, Spain; <sup>3</sup>La Paz Hospital, Madrid, Spain; and <sup>4</sup>Department of Medicine, Granada University, Spain.

Received January 12, 2011; accepted March 5, 2011.

Supported in part by a grant from Ciberehd (Ciberehd is funded by the Instituto de Salud Carlos III), and by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS, Instituto de Salud Carlos III), No. PI080704 and from Consejería de Salud (SAS), Junta de Andalucía No. PI0635-2010.

\*These authors contributed equally to this study.

alanine transaminase (ALT) levels that are variable but could reach levels compatible with acute hepatitis<sup>1</sup> and remain so for decades.<sup>3</sup> Risk factors for mother-to-child transmission of HCV have been shown to include the presence of a high concentration of HCV RNA in maternal blood and human immunodeficiency virus (HIV) coinfection.<sup>4</sup> Vertical transmission is almost always restricted to women with HCV-RNA detectable in peripheral blood by polymerase chain reaction (PCR). Nevertheless, all children born to women with anti-HCV antibodies should be tested for HCV. The relationship between HCV-VT and maternal HCV genotype remains unclear because few studies have investigated the role of HCV genotype as a risk factor for HCV-VT. It has been reported that high ALT levels during the first year of life and genotype 3 infections are associated with a higher chance of sustained clearance of HCV-RNA and biochemical remission.<sup>5,6</sup> However, other authors have indicated that there is no relationship between HCV-VT and maternal HCV genotype.<sup>7</sup> Moreover, the importance of birth mode (vaginal or cesarean) and type of feeding (breast feeding or replacement) has been investigated, in view of their possible influence on transmission, but the results achieved are conflicting and more data are required to clarify the role of these factors in HCV-VT.<sup>8,9</sup>

The HCV risk factors traditionally considered (HIV coinfection, HCV viral load) do not properly describe the possibility of HCV-VT or that of HCV chronic infection. It has been suggested that the role of the immune defense system could better account for the pathogenesis of HCV infection.<sup>10,11</sup> Thus, the relevance of the genetic background has been taken into consideration, with special attention being focused on the human leukocyte antigen (HLA) system, because of its central role in immune response. Bosi et al.<sup>10</sup> showed that HLA DR13 might modulate the immune response to HCV, exerting a protective role against the development of vertical infection. Other studies have reported that HLA-DRB1\*0701, HLA-DRB1\*10, and DRB1\*1401 alleles in the child play a predisposing role for transmission, whereas HLA-DRB1\*1104, DRB1\*1302 alleles in the child and the HLA-DRB1\*04 in the mother are apparently protective.<sup>11,12</sup> These findings highlight the importance of the genetic background in the vertical transmission of HCV and the need for more knowledge of

genetic factors and HCV-VT. Recent studies indicate that there is a relationship between Rs12979860 CC interleukin 28B (IL28B) genotype and HCV treatment response in adults.<sup>13-15</sup> However, the CC IL28B genotype influences in HCV-VT and the spontaneous clearance of HCV among infected children have been little investigated. We hypothesize that maternal and/or neonatal IL28B immunogenetic factors may affect both HCV-VT and its chronic infection.

The aim of the present study was to identify the role of the IL28B genotype and of other risk factors for HCV-VT, and to determine the predictors of spontaneous clearance among children infected with HCV. There was found to be a significant association between IL28B Rs12979860 CC child genotype and the likelihood of the spontaneous clearance of HCV among infants born to HCV-infected mothers. On the other hand, high maternal viral load was the only variable predictive of HCV-VT. The findings of this study could enhance our understanding of both the pathogenesis of vertical HCV infection and of the spontaneous clearance of HCV infection among children, as well as enabling a better identification of cases at higher risk, which would be useful for the development of prevention strategies.

## Materials and Methods

**Subjects.** A prospective cohort study was conducted at Hospital Universitario San Cecilio in Granada (Spain) from 1991 until 2009. In all, 112 consecutive HCV-RNA-positive mothers with their 142 children and 33 HCV-RNA-negative/HCV antibody-positive mothers with their 43 children were enrolled and followed up for at least 6 years. All patients included in this study were Caucasian. These mothers were routinely tested for HCV during prenatal care. The background data for the 179 pregnancies of 145 mothers are given in Fig. 1. The diagnosis of HCV-VT was based on detectable HCV-RNA in the peripheral blood by PCR. HCV-VT was defined as children who presented HCV-RNA-positive in at least two subsequent blood samples. The study groups for HCV-VT were: (1) transient viremia, infants who exhibited HCV-RNA+ve in at least two subsequent blood samples with posterior HCV-RNA-ve and without serum-conversion; (2) chronic or persistent infection group, defined

Address reprint requests to: José Antonio Muñoz-Gómez, Laboratory of Medical Research, San Cecilio University Hospital, Avda de Madrid s/n, 18012, Granada, Spain. E-mail: jamunozgomez@gmail.com; fax: +34-958-023434.

Copyright © 2011 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).

DOI 10.1002/hep.24298

Potential conflict of interest: Nothing to report.

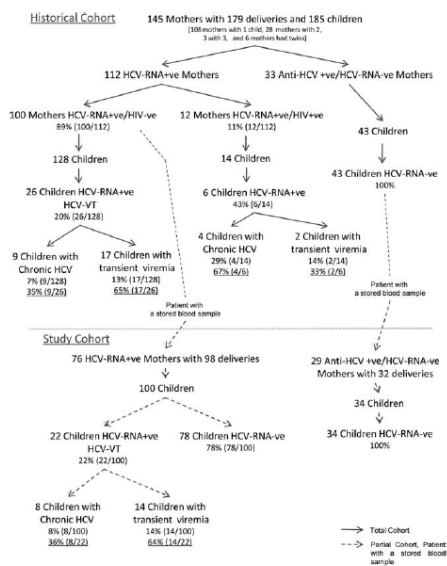


Fig. 1. Infant outcomes according to maternal HCV status. The data for the 179 pregnancies of 145 mothers are shown. In the HCV-VT and chronic infection study, the risk factors were identified among the HIV-negative mothers using a stored blood sample (Partial Cohort).

as children with persistent HCV-RNA+ve with HCV serum-conversion (detectable anti-HCV). The HCV-RNA+ve in at least two samples criterion was established to minimize the risk of false positives. When the infants presented an initial HCV-RNA+ve test, a further analysis was performed in a new blood sample, a few days later, in order to confirm the first positive and to determine the viral genotype. No false positives were recorded in this study and all infants were HCV-RNA+ve in the second test. Risk factors for HCV-VT, transient viremia, and chronic infection were determined among the HIV-negative mothers using a stored blood sample (Fig. 1; 76 HCV-RNA-positive mothers and 29 HCV-RNA-negative/HCV antibody-positive mothers with their children). The risk factors for HCV-VT, transient viremia, and chronic infection were considered, and the values for HCV viral load, genotype, delivery mode, duration of ruptured membranes, ALT levels, breast-feeding, and the duration of breastfeeding were obtained. The infants were examined by pediatricians and tested for HCV-RNA at birth and at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, and 24 months; and thereafter at 3, 4, 5, and 6 years. Informed written consent was obtained from each patient and the study protocol conformed to

the ethical guidelines of the 1975 Helsinki Declaration, as reflected in the *a priori* approval granted by the Ethics Committee.

**Virologic Assays.** HCV genotyping was determined by reverse hybridization (Inno-LIPA II HCV Innogenetics SA Ghent, Belgium). The viral load (cutoff <15 IU/mL, HCV Ampliprep TaqMan, Roche Molecular System) was determined quantitatively during delivery.

**IL28B Genotyping.** Rs12979860 genotyping was performed by means of a Taqman 5' allelic discrimination assay (Custom Assay Service). The primers used were forward GCCTGTCTGTACTGAACCA and reverse GCGCGGAGTGC AATTCAAC. The Taqman probes from the reverse strand were TGGTTCGCGC CTC labeled with VIC and CTGGTTCACGCC TTC labeled with FAM. Single nucleotide polymorphism (SNP) amplification assays were used according to the manufacturer's instructions. The PCR reaction was carried out in a total volume of 10  $\mu$ L with the following amplification protocol: preincubation at 50°C for 2 minutes and at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 95°C, 15 seconds; 60°C, 1 minute. The genotype of each sample was automatically attributed by the SDS 2.2.1 software for allelic discrimination (Applied Biosystems, Foster City, CA).

**Statistical Analysis.** The dependent variables were vertical transmission and the degree of HCV chronic infection among the infants. Bivariate analysis was conducted using the  $\chi^2$  test and Fisher's exact test, and the degree of association between HCV-VT/chronic infection and the independent variables was determined by calculating the corresponding odds ratio (OR) and its 95% confidence interval (95% CI) by means of simple logistic regression. Quantitative variables are expressed as the means  $\pm$  SEM (standard error of the mean). For differences in the quantitative variables, the paired/unpaired Student's *t* test or the Mann-Whitney *U* test was used. Multivariate logistic regression was conducted for the simultaneous analysis of more than one statistical variable and to determine the interaction among the different variables. The following covariates were included in the multivariable model: ALT level, viral genotype, viral load, delivery mode, breast-feeding, and IL28B. A *P*-value < 0.05 was considered statistically significant. All statistical calculations were performed using SPSS software v. 15.0 for Windows.

## Results

### General Cohort

Of the 145 mothers recruited (Historical Cohort), 112 were HCV-RNA-positive (77%) and 33 were

**Table 1. Characteristics of HCV-RNA-Positive Infants and Their Parents**

Case	Genotype Mother/ Child	Epidemiology	Viral Load (IU/mL)	BF (days)	Type of Birth	HCV-RNA+ve* (month)	Highest ALT <sup>†</sup> (U/L)	Seronegative <sup>‡</sup> (month)	IL28B Child/ Mother	Gender	Gestational Age	HCV-RNA Father
1	1	Drugs	>600,000	0	Cesarean	2 (Chronic)	145	No	CT/CT	Male	30	+
2	1	Sporadic	>600,000	75	Noncesarean	2 (Chronic)	108	No	TT/TT	Female	36	-
3	1	Sporadic	>600,000	90	Noncesarean	2 (Chronic)	140	No	CT/CC	Female	39	-
4	1	Transfusion	>600,000	75	Cesarean	3 (Chronic)	78	No	CT/CT	Male	38	-
5	1	Sporadic	>600,000	0	Noncesarean	4 (Chronic)	88	No	CT/TT	Male	39	-
6	1	Sporadic	>600,000	360	Noncesarean	3 (Chronic)	220	No	CC/CC	Male	39	-
7	1	Drugs	>600,000	0	Noncesarean	2 (Chronic)	86	No	TT/CT	Male	33	+
8	1	Transfusion	>600,000	0	Noncesarean	2 (Chronic)	145	No	CT/CC	Female	39	-
9	1	Sporadic	>600,000	15	Noncesarean	4 (3)	199	12	CC/CC	Female	40	-
10	1	Sporadic	>600,000	60	Noncesarean	1 (2)	19	14	CC/CC	Male	40	-
11	1	Sporadic	>600,000	50	Noncesarean	12 (2)	26	8	CT/TT	Male	39	-
12	1	Sporadic	<600,000	240	Noncesarean	2 (2)	34	8	CC/CC	Female	40	-
13	1	Transfusion	>600,000	6	Cesarean	1 (2)	25	12	CC/CC	Female	41	-
14	1	Transfusion	>600,000	120	Noncesarean	2 (3)	50	18	CC/CT	Male	39	-
15	1	Transfusion	<600,000	40	Noncesarean	2 (3)	69	12	CT/CT	Male	41	-
16	3	Drugs	<600,000	30	Cesarean	2 (2)	33	12	TT/CT	Male	38	-
17	3	Drugs	>600,000	90	Noncesarean	1(3)	68	12	CC/CC	Female	41	-
18	3	Drugs	>600,000	30	Noncesarean	3 (3)	53	12	CC/CC	Male	40	-
19	3	Transfusion	>600,000	0	Noncesarean	8 (2)	39	12	CC/CT	Female	28	-
20	3	Sporadic	>600,000	0	Noncesarean	2 (3)	40	10	CT/CC	Male	40	-
21	3	Drugs	>600,000	0	Noncesarean	4 (3)	44	18	CT/CT	Male	38	+
22	4	Drugs	>600,000	0	Noncesarean	4 (2)	32	12	TT/CT	Male	40	+

BF= Breast-feeding.

\*Month with first VHC-RNA positive; the number in parentheses shows the number of tests with HCV-RNA positive; Chronic, indicates that these infants presented HCV-RNA positive permanently.

<sup>†</sup>The normal range of values for ALT is from 5 to 40 U/L.<sup>‡</sup>Month in which the HCV antibodies (mother antibodies) were not detected in the infant.

HCV-RNA-negative/HCV antibody-positive (23%, Fig. 1). In total, 185 infants were born to these mothers. The HCV-RNA-positive mothers had 142 children and 43 were recorded in the HCV-RNA-negative/HCV antibody-positive group. The rate of HCV-VT was 20% (26/128) in the infants born to HCV-RNA+ve/HIV-ve noncoinfecting mothers and 43% (6/14) in those born to HIV+ve-coinfecting mothers (OR = 3.6; 95% CI: 1.4-6.6;  $P = 0.009$ ). The rate of infants with persistent infection (chronic infants) was 7% (9/128) in infants born to HCV-RNA+ve/HIV-ve mothers and 35% (9/26) with respect to the HCV-VT infants. Moreover, the virus cleared in 17 children (17/26, 65%). On the other hand, the rate was 29% (4/14) in infants born to HIV+ve-coinfecting mothers and 67% (4/6) with respect to the HCV-VT infants (OR = 5.3; 95% CI: 2.2-14.5;  $P = 0.0001$ ). In this case, the virus cleared in two infants (2/6, 33%). The genotype in each of the infants was consistent with that of their mothers. None had received a blood transfusion or presented other risk factors. The characteristics of the HCV-RNA+ve infants and their parents are described in Table 1. No vertical transmission was noted among the HCV-RNA-ve women.

**Risk Factors in HCV Vertical Transmission.** In the HCV-VT and chronic infection study, risk factors were identified among the HIV-negative mothers using a stored blood sample (Study Cohort; Fig. 1). The characteristics of the HCV-RNA+ve infants and their parents are described in Table 1. The rate of HCV-VT was higher for infants born to mothers with high HCV viremia (>600,000 IU/mL) than for infants born to mothers with low HCV viremia (<600,000; Table 2;  $P = 0.02$ ). Neither gender, nor weight, nor viral genotype (genotype 1 versus genotype non-1), nor type of birth (cesarean versus noncesarean), nor breast-feeding were associated with increased risk of HCV-VT. None of the infected infants were HCV-RNA-positive at birth and the mean age at the first HCV-RNA-positive result was  $3.81 \pm 0.91$  months. The infected children presented a lower birth weight (nonsignificant) than that of the noninfected children. 37% of the noninfected children presented ALT levels > 40 U/L whereas 68% of the infected infants had high levels of ALT (>40 U/L,  $P = 0.016$ ).

**Risk Factors with Respect to HCV Chronic Infection in Infants.** The study of risk factors for chronic infection was performed in HIV-negative mothers using a stored blood sample (Study Cohort, Fig. 1).

**Table 2. Selected Risk Factors of HCV Transmission to Infants Related to Infection status, for HCV-RNA positive women**

Risk Factors/Infection Status n=100	women		P-Value
	Infected n=22 (22%)	Noninfected n=78 (78%)	
Gender			
Male (58)	13 (22)	45 (78)	ns
Female (42)	9 (21)	33 (79)	
Weight (g)* (100)	2871 ± 217	3000 ± 93	ns
Viral Genotype			
Geno. 1 (74)	15 (20)	59 (80)	ns
Geno. non-1 (26)	7 (27)	19 (73)	
Type of birth			
Cesarean (20)	4 (20)	16 (80)	ns
Noncesarean (80)	18 (23)	62 (77)	
Breast-fed Infants			
Yes (67)	14 (21)	53 (79)	ns
No (32)	8 (25)	24 (75)	
Breast-feeding days*(99)	87 ± 24	77 ± 11	ns
Mother's HCV Viral Load (IU/mL)			
>600,000 (56)	19 (34)	37 (66)	0.02
≤600,000 (42)	3 (7)	39 (93)	

\*Mean ± the standard error of the mean (SEM).

Fourteen of the 22 HCV-VT-infected infants (64%) cleared the HCV virus spontaneously (transient viremia group) and eight infants (36%) had persistent infection (chronic group). The rate of HCV chronic infection was higher among the infants with viral genotype 1 than among those with genotype non-1 (Table 3;  $P = 0.02$ ). In fact, no chronic infection was noted in the infants with genotype non-1 ( $n = 7$ , of whom six had genotype 3 and one had genotype 4), whereas only 1/9 infants with genotype non-1 in the general cohort had persistent infection at the end of the study (this infant was a boy whose mother was genotype 3 but HIV-positive). Neither gender, nor weight, nor the mother's HCV viral load, nor the type of birth (cesarean versus noncesarean), nor breastfeeding were associated with increased risk of HCV chronic infection among these infants. Among the HCV chronic group of infants, the first HCV-RNA-positive result was recorded at a mean age of  $2.33 \pm 0.3$  months, whereas the corresponding value for the transient viremia group was  $4.15 \pm 1.1$  months (nonsignificant). Furthermore, the chronic HCV infants had a lower birth weight than did the transient viremia children (nonsignificant). In all, 50% of the infants with transient viremia presented ALT levels  $>40$  U/L, whereas all the chronic infants presented ALT levels above 40 U/L ( $P = 0.02$ ).

**Study of IL28B and Its Association with HCV-RNA+/-ve Mothers.** This study was performed among the HIV-negative mothers using a stored blood

sample ( $n = 105$ , Study Cohort; Fig. 1. In six mothers it was not possible to determine the IL28B polymorphism). Of the 31 mothers with IL28B CC polymorphism, 19 were HCV-RNA-positive (61%), whereas among the 68 mothers with non-CC polymorphism (CT or TT polymorphism), 56 were HCV-RNA-positive (82%). Accordingly, the mothers with non-CC IL28B polymorphism had a greater probability of being HCV-RNA-positive than did those with CC polymorphism (OR = 2.95; 95% CI: 1.1-7.7;  $P = 0.026$ ). On the other hand, the HCV viral load was not associated with IL28B polymorphism. Thus, 52% of the mothers with CC IL28B polymorphism presented a high viral load ( $>600,000$  IU/mL), as did 54% of the mothers with IL28B non-CC polymorphism.

**Study of IL28B and Its Association with the Vertical Transmission of HCV Genotype 1, Transient Viremia, and Chronic Infection.** We evaluated the role of IL28B polymorphism on the vertical transmission of HCV genotype 1, transient viremia, and persistent infection in infants. Neither the mothers' nor the children's IL28B polymorphism was associated with an increased risk of HCV-VT (Table 4). On the other hand, the study of the role of the IL28B genotype in HCV transient viremia and chronic infection revealed that 83% of the children with Rs12979860 CC genotype presented spontaneous clearance (infants with transient viremia), whereas among the children with

**Table 3. Selected Risk Factors of Chronic HCV Infection in Infants**

Risk Factors/Infection Status n=22	Infants		P-Value
	Chronic n=8 (36%)	Transient Viremia n=14 (64%)	
Gender			
Male (9)	3 (33)	6 (67)	ns
Female (13)	5 (39)	8 (61)	
Weight (g)* (22)	2656 ± 375	3122 ± 155	ns
Viral Genotype			
Geno. 1 (n=15)	8 (53)	7 (47)	0.02
Geno. non-1 (n=7)	0 (0)	7 (100)	
Type of birth			
Cesarean (n=4)	2 (50)	2 (50)	ns
Noncesarean (n=18)	6 (33)	12 (67)	
Breast-fed Infants			
Yes (14)	4 (29)	10 (71)	ns
No (n=8)	4 (50)	4 (50)	
Breast-feeding days* (22)	150 ± 70	68 ± 21	ns
HCV-RNA+ begin (month)* (22)	2.33 ± 0.3	4.15 ± 1.1	ns
Mother's HCV Viral Load (IU/mL)			
>600,000 (19)	8 (42)	11 (58)	ns
≤600,000 (3)	0 (0)	3 (100)	
Child's ALT			
>40 U/L (15)	8 (53)	7 (47)	0.02
≤40 U/L (7)	0 (0)	7 (100)	

\*Mean ± the standard error of the mean (SEM).



**Table 4. Role of IL28B in HCV Vertical Transmission and Chronic HCV Infection in Viral Genotype 1 Infants**

HCV Vertical Transmission			
Risk Factors/Infection Status n=74	Infected n=15 (20%)	Noninfected n=59 (80%)	P-Value
Mother's IL-28B status			
CC (19)	7 (37)	12 (63)	ns
Non-CC (55)	8 (15)	47 (85)	
Child's IL-28B status			
CC (25)	6 (24)	19 (76)	ns
Non-CC (46)	9 (20)	37 (80)	
HCV Chronification			
Risk Factors/Infection Status n=15	Chronic n=8 (53%)	Transient Viremia n=7 (47%)	P-Value
Mother's IL-28B status			
CC (7)	3 (43)	4 (57)	ns
Non-CC (n=8)	5 (63)	3 (37)	
Child's IL-28B status			
CC (n=6)	1 (17)	5 (83)	0.04
Non-CC (n=9)	7 (78)	2 (22)	

non-CC genotype (CT or TT polymorphism), only 22% had transient viremia ( $P = 0.04$ ). Moreover, the mother's IL28B genotype was not associated with spontaneous clearance (transient viremia) and therefore was not associated either with HCV persistent infection in infants (Table 4).

### Multivariate Logistic Regression

**HCV Vertical Transmission.** The multivariate analysis showed that a high HCV viral load ( $>600,000$  IU/mL; OR: 7.3; 95% CI: 1.8-29.4;  $P = 0.005$ ) and ALT values among infants exceeding 40 U/L (OR: 5.3; 95% CI: 1.5-18.8;  $P = 0.01$ ) were independently associated with HCV-VT (Fig. 2). These factors remained independently associated with HCV-VT when HCV genotype 1 was selected (HCV viral load  $>600,000$  versus  $\leq 600,000$  IU/mL; OR: 10.2; 95% CI: 1.73-58;  $P = 0.01$  and children's ALT levels  $>40$  versus  $\leq 40$  U/L; OR: 9.1; 95% CI: 1.7-50;  $P = 0.01$ ).

**HCV Chronic Infection.** The multivariate analysis showed IL28B Rs12979860 CC genotype in infants to be the only factor independently associated with HCV clearance and therefore with transient viremia (Fig. 2; OR: 17.5; 95% CI: 1.2-250;  $P = 0.035$ ).

### Discussion

Vertical transmission of HCV represents the major cause of pediatric HCV infection today, and in industrialized countries it is the most common cause of

chronic liver disease in children. About 10%-15% of those who are chronically infected might develop cirrhosis and eventually hepatocellular carcinoma.<sup>16,17</sup> HCV prevalence in pregnant women is similar to that of the general population and, in general, most HCV-infected pregnant women do not have obstetric complications. At present, there are no antiviral treatment recommendations for HCV-infected women during pregnancy, or guidelines for the prevention of vertical transmission.<sup>18</sup> Although persistent transmission of HCV from infected mothers to their infants is reported in 4%-8% of cases (chronic HCV children), transient HCV perinatal infection also occurs, with a prevalence of about 14%-17%.<sup>19,20</sup> Moreover, the maternal-infant transmission of HCV is more frequent than is generally reported, taking into account that spontaneous HCV-RNA clearance among children is more common than among adults and that in many studies the follow-up of infants is incomplete; moreover, in many cases only limited data, corresponding to the first years of life, are presented.<sup>21</sup> Interferon alpha (IFN $\alpha$ ) is currently the approved drug for hepatitis C treatment for the pediatric population. Combination therapy with IFN $\alpha$  or pegylated IFN $\alpha$  plus ribavirin has recently been approved by the United States Food and Drug Administration (US FDA)-EMA for children older than 3 years with chronic HCV infection, and clinical trials are in progress.<sup>3,22</sup> Although most children are asymptomatic and the associated liver damage appears to be less severe in children than in adults, they have a significantly poorer health status than community controls,<sup>23</sup> which suggests there is a need for the services currently available for adult HCV patients to be extended to support the families of children with HCV.

Conflicting data have been reported regarding the possible role of the level of maternal HCV viremia. Some studies have shown that a high concentration of serum HCV-RNA is associated with a higher risk of transmission, although no specific cutoff value predicting or excluding transmission has been defined.<sup>11</sup> However, other studies have found no such association, with a considerable overlap in concentrations of HCV-RNA between transmitting and nontransmitting mothers.<sup>1,24</sup> Moreover, maternal coinfection with HCV and HIV is associated with high maternal HCV-RNA and with a higher risk of transmission.<sup>18,25</sup> In the present study, we found that both the HCV-RNA concentration (over 600,000 IU/mL) and maternal coinfection with HIV were associated with a higher risk of HCV-VT. The infected infants were not HCV-RNA-positive at birth but all became so within 2-4 months. These data indicate that HCV maternal-fetal transmission

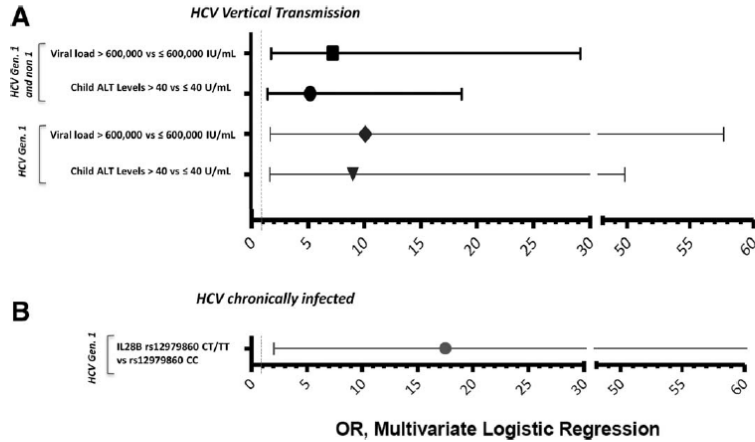


Fig. 2. Multivariate logistic regression: predictors of HCV-VT and HCV clearance. (A) HCV vertical transmission and (B) infants HCV chronically infected. The following covariates were included in the multivariate model: ALT level, viral genotype, viral load, delivery mode, breast-feeding, and IL28B polymorphism. OR is the probability of HCV-VT and HCV clearing for each predictor with respect to the reference group. These factors remained independently associated with HCV-VT when HCV genotype 1 was selected.

did not occur during gestation and, therefore, that the infants were infected during birth. Most of the infected children were asymptomatic despite high levels of ALT, compatible with acute hepatitis. The infants that cleared the HCV virus recovered normal ALT levels. With respect to the type of birth, there was no significant decrease in HCV-VT among the mothers who gave birth by cesarean section versus those who did not. The data on the effect of cesarean section on the risk of HCV perinatal transmission are heterogeneous and high-quality studies of this question have not been reported. A recent meta-analysis including eight studies and 641 mother-infant pairs suggests that cesarean section does not decrease perinatal HCV transmission from HCV-RNA+ve/HIV-ve mothers to infants.<sup>8</sup> No relationship between HCV-VT and the maternal HCV genotype has been found. On the other hand, when we studied spontaneous clearance (children with transient viremia) versus chronic infection in infected infants, the HCV viral genotype was associated with a higher risk of chronic infection. Thus, the rate of HCV chronicity was higher for infants with viral genotype 1 than for those with genotype non-1, a finding that is in accordance with the results of Bortolotti et al.<sup>6</sup> The role of viral genotype and its association with HCV spontaneous clearance and chronic infection should be explored further.

The HCV-VT risk factors that have been most intensively studied to date are viral factors, maternal

characteristics, and birth mode. However, immunogenetic influence has been poorly investigated and mainly confined to HLA-class II serological polymorphisms, because of their central role in the adaptive response. Nevertheless, it has been suggested that the role of the immune defense system, as well as the relevance of the genetic background, could better explain the pathogenesis of HCV infection, and these factors have been examined.<sup>10,11</sup> In adult patients, genetic variations in the IL28B gene, an innate cytokine, have been associated with the response to IFN- $\alpha$ /ribavirin therapy and spontaneous clearance in HCV genotype 1.<sup>26-28</sup> For this reason, we evaluated the role of IL28B polymorphism in HCV genotype 1 vertical transmission, transient viremia, and chronic infection in infants. This is the first study that attempts to describe both HCV-VT and the spontaneous clearance of HCV, taking into account the influence of IL28B polymorphism in mothers and children. The data obtained indicate that the IL28B genotype of mothers and children does not influence HCV-VT. Nevertheless, in the chronic infection study, 83% of the infants with the CC genotype exhibited spontaneous clearance (transient viremia) versus only 22% of the children with a non-CC genotype. On the other hand, the maternal IL28B genotype did not influence HCV chronic infection. Multivariate analysis identified the infant's Rs12979860 CC IL28B genotype as the only factor independently associated with the spontaneous

clearance of HCV. To the best of our knowledge, the present study is the first one to identify IL28B Rs12979860 polymorphism as a predictor of HCV spontaneous clearance in infants infected with HCV genotype 1 by vertical transmission. More information is now needed to understand the mechanisms that underlie this association, as well as the clinical impact of IL28B polymorphisms on HCV infection.

The multivariate analysis performed clearly shows the distinction between the risk factors in HCV-VT and in chronic infection. In HCV-VT, a high HCV viral load was independently associated with HCV-VT, thus confirming the bivariate analysis and the data previously published, by ourselves and by others. These data suggest that the maternal characteristics are more important in HCV-VT than are those of the infants. However, in the chronic HCV infection study, the multivariate analysis showed that the only factor independently associated with HCV clearance was the infants' IL28B genotype, which confirmed our hypothesis that in infected infants the host's immunogenic influence is crucial to the HCV viral response.

Finally, all retrospective analyses have inherent limitations, but we have tried to minimize their effects. The standard method of HCV determination changed during the patient inclusion period but this factor was controlled by using the same PCR technique on all the patients studied, using a stored blood sample. Furthermore, the standard care of HIV and HCV patients also changed during the patient inclusion period; however, in this study the risk factors among the HIV-negative mothers (Study Cohort) were identified. According to standard protocols for HCV pregnant women, no HCV treatment should be applied during the pregnancy, and thus the changes in standard care for HCV patients do not affect our study.

In view of the data presented, we believe it is necessary to make a clear distinction between the risk factors of HCV-VT and of chronic infection. We confirm that viral load and HIV coinfection are the only risk factors involved in HCV-VT. On the other hand, the viral genotype non-1 and the infant's IL28B CC Rs12979860 polymorphism are associated with HCV spontaneous clearance. Our data are the first to account for HCV virus clearance and may provide important information about protective immunity to HCV.

*Acknowledgment:* We thank Estefanía Martino and GENYO, (Granada, Spain), as well as Concepción Fernández and Francisca Aguilar, technicians at the Department of Medicine, Granada University, Spain.

## References

- Indolfi G, Resti M. Perinatal transmission of hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 2009;81:836-843.
- Jhaveri R, Grant W, Kauf TL, McHutchison J. The burden of hepatitis C virus infection in children: estimated direct medical costs over a 10-year period. *J Pediatr* 2006;148:353-358.
- Galoppo M, Galoppo C. Management of hepatitis C virus infection in childhood. *Ann Hepatol* 2010;9(Suppl):98-102.
- Marine-Barjoan E, Berrebi A, Giordanengo V, Favre SE, Haas H, Morigne M, et al. HCV/HIV co-infection, HCV viral load and mode of delivery: risk factors for mother-to-child transmission of hepatitis C virus? *AIDS* 2007;21:1811-1815.
- Resti M, Jara P, Hierro L, Azzari C, Giacchino R, Zuin G, et al. Clinical features and progression of perinatally acquired hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 2003;70:373-377.
- Bortolotti F, Verucchi G, Camma C, Cabibbo G, Zancan L, Indolfi G, et al. Long-term course of chronic hepatitis C in children: from viral clearance to end-stage liver disease. *Gastroenterology* 2008;134:1900-1907.
- Indolfi G, Azzari C, Moriondo M, Lippi F, de Martino M, Resti M. Alanine transaminase levels in the year before pregnancy predict the risk of hepatitis C virus vertical transmission. *J Med Virol* 2006;78:911-914.
- Ghamar Chehreh ME, Tabatabaei SV, Khazanehdari S, Alavian SM. Effect of cesarean section on the risk of perinatal transmission of hepatitis C virus from HCV-RNA+/HIV- mothers: a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet* 2011;283:255-260.
- Ruiz-Extremera A, Salmeron J, Torres C, De Rueda PM, Gimenez F, Robles C, et al. Follow-up of transmission of hepatitis C to babies of human immunodeficiency virus-negative women: the role of breastfeeding in transmission. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:511-516.
- Bosi I, Ancora G, Mantovani W, Miniero R, Verucchi G, Attard L, et al. HLA DR13 and HCV vertical infection. *Pediatr Res* 2002;51:746-749.
- Bevilacqua E, Fabris A, Floreano P, Pembrey L, Newell ML, Tovo PA, et al. Genetic factors in mother-to-child transmission of HCV infection. *Virology* 2009;390:64-70.
- Martinetti M, Pacati I, Cuccia M, Badulli C, Pasi A, Salvaneschi L, et al. Hierarchy of baby-linked immunogenetic risk factors in the vertical transmission of hepatitis C virus. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006;19:369-378.
- Montes-Cano MA, Garcia-Lozano JR, Abad-Molina C, Romero-Gomez M, Barroso N, Aguilar-Reina J, et al. Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *HEPATOLOGY* 2010;52:33-37.
- Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009;461:798-801.
- Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009;461:399-401.
- Heller S, Valencia-Mayoral P. Treatment of viral hepatitis in children. *Arch Med Res* 2007;38:702-710.
- Quiles-Perez R, Munoz-Gamez JA, Ruiz-Extremera A, O'Valle F, Sanjuan-Nunez L, Martin-Alvarez AB, et al. Inhibition of poly adenosine diphosphate-ribose polymerase decreases hepatocellular carcinoma growth by modulation of tumor-related gene expression. *HEPATOLOGY* 2010;51:255-266.
- Valladares G, Chacaltana A, Sjogren MH. The management of HCV-infected pregnant women. *Ann Hepatol* 2010;9(Suppl):92-97.
- Shebl FM, El-Kamary SS, Saleh DA, Abdel-Hamid M, Mikhail N, Allam A, et al. Prospective cohort study of mother-to-infant infection and clearance of hepatitis C in rural Egyptian villages. *J Med Virol* 2009;81:1024-1031.
- Hayashida A, Inaba N, Oshima K, Nishikawa M, Shoda A, Hayashida S, et al. Re-evaluation of the true rate of hepatitis C virus mother-to-child

- transmission and its novel risk factors based on our two prospective studies. *J Obstet Gynaecol Res* 2007;33:417-422.
21. Yeung LT, To T, King SM, Roberts EA. Spontaneous clearance of childhood hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2007;14:797-805.
  22. Hsu EK, Murray KF. Hepatitis B and C in children. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2008;5:311-320.
  23. Nydegger A, Srivastava A, Wake M, Smith AL, Hardikar W. Health-related quality of life in children with hepatitis C acquired in the first year of life. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:226-230.
  24. Mast EE, Hwang LY, Seto DS, Nolte FS, Nainan OV, Wurtzel H, et al. Risk factors for perinatal transmission of hepatitis C virus (HCV) and the natural history of HCV infection acquired in infancy. *J Infect Dis* 2005;192:1880-1889.
  25. Ngo-Giang-Huong N, Jourdain G, Sirirungsri W, Decker L, Khamduang W, Le Coeur S, et al. Human immunodeficiency virus-hepatitis C virus co-infection in pregnant women and perinatal transmission to infants in Thailand. *Int J Infect Dis* 2010;14:e602-607.
  26. Akuta N, Suzuki F, Hiralawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, et al. Amino acid substitution in hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin. *HEPATOLOGY* 2010;52:421-429.
  27. Chevaliez S, Hezode C. IL28B polymorphisms and chronic hepatitis C. *Gastroenterol Clin Biol* 2010;34:587-589.
  28. Ahlensiel G, Booth DR, George J. IL28B in hepatitis C virus infection: translating pharmacogenomics into clinical practice. *J Gastroenterol* 2010;45:903-910.



## **CAPITULO 2. COMUNICACIONES A CONGRESOS**





## XXIII Congreso de Neonatología y Medicina Perinatal de la SEN

5, 6, y 7 Octubre 2011 · OVIEDO

### ESTUDIO DEL FACTOR GENÉTICO IL-28B EN LA TRANSMISIÓN VERTICAL DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C Y EN LA EVOLUCIÓN HACIA LA CRONICIDAD DE LOS NIÑOS INFECTADOS

M.A. Salmerón Ruiz (1), Á. Ruiz Extremera (2), J.A. Muñoz Gámez (2), P. Muñoz De Rueda (2), R. Quiles Pérez (2), J. Salmerón Escobar (2).

(1) Hospital Universitario La Paz, Madrid; (2) Hospital Clínico Universitario San Cecilio, Granada.

**Introducción:** La Transmisión Vertical (TV) del virus de la hepatitis C (VHC) es la principal vía de transmisión del VHC en niños, los factores de riesgo permanecen sin determinar.

**Objetivos:** Analizar el papel de la IL28B en la TV del VHC y el aclaramiento espontáneo del virus en niños infectados por TV.

**Pacientes y Métodos:** Entre 1991 y 2009, 133 madres fueron incluidas en el estudio. De estas, 100 madres fueron VHC-RNA+vo y tuvieron 128 niños, y 33 madres fueron VHC-RNA-vo/VHC anticuerpos+vo, con 43 niños. Los recién nacidos fueron seguidos a los 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 y 24 meses y anualmente a los 3, 4, 5 y 6 años analizando el ARN-VHC y en los positivos se determinó el genotipo viral. IL28B (single nucleotide polymorphism rs12979860) en las madres y en sus hijos. Se asumió TV cuando los niños presentaron VHC-RNA+vo en dos muestras de sangre consecutivas. Los niños infectados fueron clasificados como: (A) niños con viremia transitoria con posterior VHC-RNA-vo y sin seroconversión; (B) niños con infección permanente o crónica que mantuvieron el VHC RNA- positivo de forma permanente y con seroconversión.

**Resultados:** De 31 madres con polimorfismo CC de la IL28B, 19 madres (61%) fueron VHC-RNA+vo mientras que entre las 68 madres con polimorfismo no-CC, 56(82%) fueron VHC-RNA+vo (OR=2,95; 95%CI: 1.1-7,7; P<0.026). Los niños nacidos de madres VHC-RNA-vo y anticuerpos VHC+vo no presentaron TV. 22 de los 128 (17%) niños nacidos de madres VHC-RNA+vo adquirieron la infección pero solo 8 (6%) fueron infectados crónicamente. La tasa de TV fue más elevada en hijos de madres con alta carga viral (>600.000 UI/mL; OR=9; 95%CI: 1.1-88; P<0.05). El polimorfismo de la IL28B de las madres y niños no se asoció con un incrementado riesgo de TV. El genotipo CC de la IL28B del niño así como el genotipo viral no-1 se asociaron con el aclaramiento viral. La regresión logística multivariante mostró que la variable asociada de forma independiente con el aclaramiento espontáneo fue el polimorfismo CC de la IL28B en los niños infectados verticalmente con VHC genotipo 1 (OR=17; 95%CI: 1.2-250; P<0.05).

**Conclusiones:** La carga viral alta de la madre es el único factor de riesgo asociado a TV del VHC. El polimorfismo de la IL28B no juega ningún papel en TV, sin



embargo, el genotipo CC de la IL28B del niño está asociado independientemente con aclaramiento espontáneo del VHC en niños infectados con genotipo 1.

**Este trabajo fue premiado como mejor comunicación oral del congreso.**



2.- Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH), presentado como comunicación oral en Madrid, 2011.



cluye nódulos de 5-20 mm de nueva aparición detectados mediante ecografía de consenso. Pacientes y Métodos: Entre noviembre 2003 y agosto 2006, se incluyeron de forma prospectiva 60 pacientes cirróticos (34 hombres, HCV 47, Child A 52), sin diagnóstico previo de CHC, con detección mediante ecografía de cribado de un nódulo único entre 5-20mm de nueva aparición. Tras obtención de consentimiento informado se realizó una ecografía con contraste, una resonancia magnética dinámica y una punción-biopsia de la lesión; en caso de que la primera biopsia fuera negativa o sin un diagnóstico concluyente, se requirió la biopsia. El diagnóstico final se hizo de acuerdo con los criterios del International Working Party. De las primeras biopsias con material adecuado, se hicieron tres cortes consecutivos con anticuerpos frente a GPC3, HSP70 y G5. El patrón inmunohistoquímico se evaluó como sigue: GPC3 y HSP70 positivos para las muestras con más del 5% de hepatocitos reactivos; G5 positivo cuando se observan áreas de tinción difusa y marcada no relacionadas con la vascularización.

**Resultados:** En 48 pacientes (80,7%) el diagnóstico final fue CHC. Para el diagnóstico de CHC, los marcadores de forma aislada mostraron una sensibilidad y especificidad de: GPC3 62,5% y 85%, HSP70 60% y 85%, G5 50% y 90%, respectivamente. La sensibilidad y especificidad de las diferentes combinaciones de los biomarcadores fue: GPC3+HSP70; 40% y 100%, GPC3+G5; 37,5% y 100%, HSP70+G5; 25% y 100%, GPC3+HSP70+G5; 27,5% y 100%. Si consideramos que al menos dos sean positivos, la sensibilidad y especificidad fueron 57,5 y 100%, respectivamente.

**Conclusiones:** Este trabajo valida la utilidad del patrón inmunohistoquímico y confirma que la tinción para estos marcadores contribuye al diagnóstico anatómico-patológico de CHC en nódulos < 2 cm.

#### ESTUDIO DEL FACTOR GENÉTICO IL-28B EN LA TRANSMISIÓN VERTICAL DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C Y EN LA EVOLUCIÓN HACIA LA CRONICIDAD DE LOS NIÑOS INFECTADOS

A. Ruiz Extremera<sup>1</sup>, J.A. Muñoz-Gómez<sup>2</sup>, R. Quiles-Pérez<sup>3</sup>, M.A. Salmerón Ruiz<sup>4</sup>, P. Muñoz de Rueda<sup>5</sup>, J. Casado<sup>6</sup>, A. Corzo<sup>7</sup>, A. Gil<sup>8</sup>, A. Martín<sup>9</sup>, E.J. Pavón<sup>10</sup>, J. León<sup>11</sup>, L. Sanjuán-Núñez<sup>12</sup> y J. Salmerón<sup>13</sup>

<sup>1</sup>CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd).

<sup>2</sup>Unidad de Pediatría.

<sup>3</sup>Servicio de Digestivo.

<sup>4</sup>Hospital Universitario San Cecilio, Granada, España.

<sup>5</sup>Hospital Materno-Infantil La Paz, Madrid, España.

**Introducción:** Aunque la tasa de TV del VHC es baja (1-8% en madres no coinfectadas por VIH y 20-30% en las coinfectadas), hay que tener en cuenta que el 90% de los niños infectados han adquirido el virus por TV. También se ha comunicado mayor aclaramiento viral en los niños infectados.

**Objetivos:** El objetivo es analizar si el factor genético IL-28B juega algún papel en la TV y en el aclaramiento viral de los niños infectados.

**Pacientes y métodos:** De una cohorte de seguimiento de 182 mujeres gestantes anti-VHC positivas recogidas desde 1991 hasta 2009, se han incluido 105 (58%) madres con un total de 130 gestaciones y 134 niños; en todas se dispuso de sangre total, tanto de la madre como del hijo. 103 (77%) gestaciones presentaron ARN-VHC positivos (76 madres) y 34 ARN-VHC negativos. De las madres ARN-VHC positivas se conoció el genotipo, la carga viral en el parto, condiciones del parto, lactancia y, posteriormente, se determinó el genotipo de la IL-28B (polimorfismo de un solo nucleótido rs12979860). Los recién nacidos (n = 134) fueron seguidos al nacimiento y a los 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 y 24 meses y anualmente a los 3, 4, 5 y 6 años analizando el ARN-VHC y en los positivos el genotipo

viral. A todos los niños se les determinó el polimorfismo de la IL-28B. Se consideró como TV a aquellos niños que presentaron ARN-VHC positivo en algún momento del estudio y cronificación a aquellos niños que mantuvieron el ARN-VHC positivo de forma permanente.

**Resultados:** En el estudio de las madres ARN-VHC positivas y negativas (n = 99), 31 poseían el genotipo CC de la IL-28B, de ellas a 39% eran ARN-VHC negativo; por el contrario, de las 68 madres no-CC, solamente el 17% presentaron ARN-VHC negativo (OR = 2,95; IC95%: 1,1-7,7; p = 0,026). Los niños nacidos de madres ARN-VHC negativas y anti-VHC positivas fueron ARN-VHC negativos. De las hijas de madres ARN-VHC positivas (n = 100), 22 presentaron ARN-VHC positivos y de ellas 8 evolucionaron a la cronicidad. En las madres con genotipo 1, ni la carga viral, ni el polimorfismo de la IL-28B (madre o hijo), ni el tipo de parto se asociaron con la TV. En las madres con genotipo no-1, la carga viral alta (> 600.000 U/ml) se asociaba con un mayor riesgo de TV (OR = 9; IC95%: 1,1-88; p = 0,05). El estudio del aclaramiento viral en los niños infectados con genotipo viral 1, mostró que los niños con genotipo CC de la IL-28B tenían más posibilidad de aclarar el virus (OR = 17; IC95%: 1,2-250; p = 0,05); también los niños con lactancia materna presentaban menos posibilidad de TV (OR = 2,7; IC95%: 1,1-200; p = 0,05). Esta relación no fue significativa en los 7 niños infectados con genotipo no-1, aunque la muestra es muy pequeña.

**Conclusiones:** La IL-28B no influye en la transmisión vertical de VHC. En las madres con genotipo no-1, la carga viral en el momento del parto se asocia con la TV. Por último, la lactancia materna y el genotipo CC de la IL-28B en los niños con genotipo 1 se relaciona con el aclaramiento viral espontáneo del VHC.

#### LA INHIBICIÓN ESPECÍFICA DE LA ANGIOPOIETINA-2 (ANG-2) REDUCE LA INFLAMACIÓN Y LA FIBROSIS HEPÁTICA EN RATAS CIRRÓTICAS

A. Pastor<sup>1</sup>, F. Húgar-Leamos<sup>2</sup>, J. Ribera<sup>3</sup>, V. Reichardt<sup>4</sup>, G. Fernández-Varo<sup>5</sup>, W. Jiménez<sup>6,7</sup> y M. Morales-Ruiz<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Centro Esther Koplowitz, IDIBAPS, CIBERehd, Universidad de Barcelona, España.

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias Fisiológicas I, Facultad de Medicina,

Universidad de Barcelona, Barcelona, España.

<sup>3</sup>Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic,

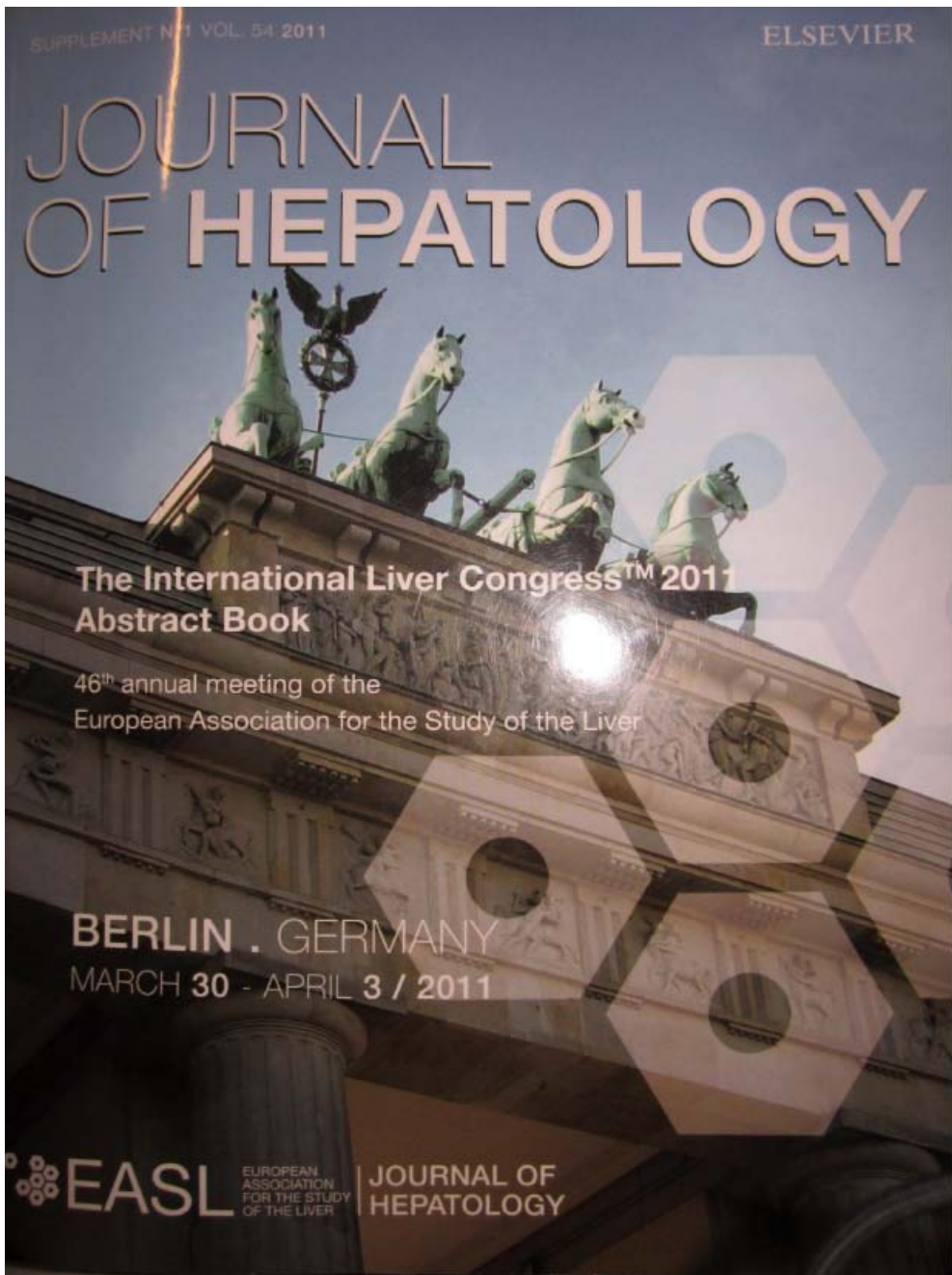
Barcelona, España.

<sup>4</sup>Introducción: Estudios previos han demostrado que antagonistas

del factor de crecimiento vascular del endotelio (VEGF) producen una remarkable reducción de fibrosis hepática y del infiltrado inflamatorio en modelos experimentales de cirrosis (CH). Sin embargo, diversos ensayos clínicos han demostrado que el bloqueo de VEGF está asociado a efectos adversos. Por esta razón, es necesario la búsqueda de nuevos agentes antiangiogénicos con mejor perfil de bioseguridad. En este contexto, se ha demostrado que el bloqueo de ang-2 inhibe la angiogénesis patológica sin afectar a la vascularización en tejidos sanos. Por este motivo, hipotetizamos que el tratamiento con inhibidores de ang-2 podría ser eficaz en el tratamiento de la cirrosis.

**Métodos:** Ratas Wistar fueron expuestas a la inhalación crónica de CCl4 para inducir cirrosis hepática. Un grupo de ratas CH (n = 15) fueron tratadas con un anticuerpo (Ab) específica anti-ang-2 (CVX-060, Pfizer) para inhibir la actividad de ang-2. La dosis de tratamiento fue de 10mg/kg por semana durante cuatro semanas. Se cuantificó la densidad vascular hepática (Ab anti-CD-31, BD Biosciences), el recubrimiento vascular (Ab anti-asna, Sigma), el infiltrado inflamatorio (Ab Cd11b, BD Biosciences y anti-CD3, BD Biosciences) y la expresión de moléculas de adhesión pro-inflamatorias (anti-ICAM, BD Biosciences) por inmunofluorescencia. La fibrosis fue cuantificada por tinción Sirius-Red. Además, se determinaron

3.- Congreso 46th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), presentado como poster en Berlin, 2011.



POSTERS

**1342**  
**STUDY OF GENETIC VARIATION IN IL28B AND VERTICAL TRANSMISSION OF HEPATITIS C VIRUS AND SPONTANEOUS CLEARANCE OF CHILDHOOD HCV INFECTION**

A. Ruiz Estremera<sup>1,2</sup>, J.A. Muñoz-Gómez<sup>3</sup>, R. Quiles-Perez<sup>2,3</sup>, M.A. Salmeron Ruiz<sup>4</sup>, P. Muñoz de Rueda<sup>3,5</sup>, J. Casado<sup>1</sup>, A. Carazo<sup>1</sup>, A. Gila<sup>1,5</sup>, A. Martín<sup>1</sup>, E.J. Pavón<sup>1</sup>, J. León<sup>2,3</sup>, L. Sanjuan-Núñez<sup>2,6</sup>, A. Palacios<sup>2,3</sup>, J. Salmeron<sup>2,3,6</sup>. <sup>1</sup>Unidad de Pediatría, Hospital Universitario San Cecilio, <sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), <sup>3</sup>Hospital Universitario San Cecilio, Granada, <sup>4</sup>Hospital Materno Infantil La Paz, Madrid, <sup>5</sup>Servicio de Digestivo, Hospital Universitario San Cecilio, <sup>6</sup>Departamento de Medicina, Universidad de Granada, Granada, Spain  
 E-mail: arextrem@ugr.es

**Background:** Hepatitis C virus (HCV) vertical transmission (VT) is considered the main route of HCV infection in children. Risk factors affecting VT of HCV are not completely known, if we exclude maternal HIV co-infection. The aim of this study was to analyse the role of the genetic factor IL28B both in HCV VT and in spontaneous clearance of childhood HCV infected.

**Methods:** Between September 1991 and December 2009, 145 mothers were recruited, including 112 HCV-RNA positive mothers with their 142 children; 33 HCV-RNA negative/HCV antibody positive mothers with their 43 children. The risk factors for HCV were carefully sought, and HCV viral load, genotype, delivery mode, ALT levels and breast-feeding were obtained. The infants were tested for HCV-RNA at birth and at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 and 24 months; and annually at 3, 4, 5 and 6 years. IL28B polymorphism (single nucleotide polymorphism rs12979860) was determined in 99 mothers and in their children. VT was defined as children who presented HCV-RNA positive for at least two subsequent blood samples. Chronic or persistent infection was defined as children with HCV-RNA positive at the end of the study.

**Results:** Of the 31 mothers with CC IL28B polymorphism, 19 were HCV-RNA positive (61%) whereas that of the 68 mothers with no-CC polymorphism, 56 were HCV-RNA positive (82%; OR = 2.95; 95%CI: 1.1-7.7; P < 0.026). 32 of 142 (23%) infants born to HCV-RNA positive mothers acquired HCV infection, but only 13 (9%) were still infected by the end of follow-up. The rate of HCV transmission was higher for infants of mothers with higher HCV viremia (P < 0.05). No transmission was noted in women without HCV-RNA. Neither mothers and child's IL-28 status, or types of birth, or breast-feeding were associated with increased risk of HCV vertical transmission. IL28B rs12979860 CC child genotype (OR = 17; 95%CI: 1.2-250; P < 0.05) and Breast-Fed Infants (OR = 2.7; 95%CI: 1.1-200; P < 0.05) were predictors of spontaneous clearance of childhood HCV infected with viral genotype 1.

**Conclusions:** High maternal viral load was the only variables predictive of the VT. Breast-Feeding and IL28B are factors associated independently with spontaneous clearance of childhood HCV infected.

**1343**  
**COMBINATION OF IL28B RS12979860 GENOTYPE WITH PRETREATMENT SERUM IP-10 LEVELS IS THE BEST PREDICTOR OF SVR TO PEGINTERFERON/RIBAVIRIN THERAPY IN CHRONIC HEPATITIS C GT1 PATIENTS**

K. Rutter<sup>1</sup>, J. Aberle<sup>2</sup>, A. Stattermayer<sup>1</sup>, S. Beinhart<sup>1</sup>, T.M. Scherzer<sup>1</sup>, H. Holzmann<sup>2</sup>, H. Hofer<sup>1</sup>, P. Steindl-Munda<sup>1</sup>, P. Ferenci<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Gastroenterology and Hepatology, <sup>2</sup>Clinical Virology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria  
 E-mail: karoline.rutter@medunivien.ac.at

**Background and Aims:** In patients with chronic hepatitis C IL28B polymorphism together with serum levels of interferon-γ Inducible Protein-10 (IP-10) may be useful baseline predictors of response to antiviral therapy. The aim of this study was to validate these

findings and to investigate the role of IP-10 to predict SVR and RVR in treatment naive GT1 patients.

**Methods:** SNP rs12979860 were identified by real-time polymerase chain reaction (Applied Biosystems, Foster City, USA). For pre-chain reaction (Applied Biosystems, Foster City, USA) was used. Patients were treated with 180 µg pegylated interferon-α2a and 1000-1200 mg ribavirin/day. Treatment duration was 24-72 weeks.

**Results:** 159 treatment naive GT1 patients completing therapy according to protocol [m/f: 102/57; age (mean±SD) 43.6±10.9; baseline viral load: 2.48±3.05 MIU/ml; F0-2: 102 (70.3%), F3-4: 43 (29.6%)] were tested. The distribution of IL28B genotypes was: C/C: 59 (37.1%), C/T: 78 (49%), T/T: 22 (13.8%). 93/159 had a SVR (88% vs. 49.3%; p < 0.001). Mean IP-10 levels were lower in patients with SVR (421.8±196.8 pg/ml) than without SVR (500.8±240.7, p = 0.03). By ROC analysis the best cut off point for IP-10 was 400 pg/ml. RVR and SVR rates of the IL28B genotype and IP-10 levels are shown in the table. SVR rates in CC patients with IP-10 < 400 pg/ml were higher than those in the remaining patients (88% vs. 49.3%; p < 0.001). The positive predictive values (PPV) were: CC: RVR 47.5%, SVR 79.7%; IP-10 < 400 pg/ml: RVR 27.5%, SVR 65.2%; CC + IP10 < 400: RVR 48%, SVR 88%.

Table 1

	IL28 CC		IL28 non-CC	
	IP-10 < 400	IP-10 > 400	IP-10 < 400	IP-10 > 400
RVR, N (%)	12/25 (48)	16/34 (47)	7/44 (15.9)	8/56 (14.3)
4 week log drop (mean±SD)	3.32±1.93	3.08±2.23	3.30±1.93	2.59±2.11
SVR, N (%)	22/25 (88)	25/34 (73.5)	23/44 (52.3)	23/56 (41.1)

**Conclusions:** Pretreatment IP-10 levels in combination with IL28B genotype improve prediction of SVR but not of RVR in patients with HCV infection.

**1344**  
**POLYMORPHISM (SNP) RS12979860 OF IL28B IN MEXICAN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C AND ITS ASSOCIATION WITH VIROLOGICAL RESPONSE TO PEG-IFN ALPHA 2B AND RIBAVIRIN**

S. Sixtos-Alonso<sup>1</sup>, R. Avalos-Martínez<sup>1</sup>, M. Dehesa-Violante<sup>2</sup>, R. Sandoval-Salas<sup>3</sup>, A. Chavez-Ayala<sup>1</sup>, I. Garcia-Juarez<sup>1</sup>, A. Dominguez-Lopez<sup>1</sup>, F. Vargas-Vorackova<sup>1</sup>, J.F. Sanchez-Avila<sup>1</sup>, M. Uribe<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Gastroenterology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, <sup>2</sup>Gastroenterology, IMSS, Mexico DF, Mexico  
 E-mail: frsanchez@prodigy.net.mx

**Background and Aim:** Chronic hepatitis C (CHC) is the second cause of liver cirrhosis in Mexico. Recently, and based on genome-wide associated studies, a strong association between a single nucleotide polymorphism (SNP) (rs12979860) of interleukin 28B (IL-28B) and spontaneous or treatment-induced HCV clearance has been described. Subjects with CC polymorphism show at least twofold greater probability to achieve Sustained Virological Response (SVR) with current antiviral therapy compared with those with TT polymorphism. However, frequency of these variant is heterogeneous across ethnic groups and it is most prevalent in HCV patients of European ancestry. The aim of this study was to explore the frequency of rs12979860 of IL28B in a cohort of HCV Mexican patients and their association with response to Peg-IFN alpha 2b and RBV therapy.

**Methods:** Eighty patients (30 men and 50 women, age: 51.5±11.35 years) with CHC whose received standard treatment with Peg-IFN alpha 2b/RBV according to viral genotype (60 G1 and

4.- Congreso Sociedad Española de Virología (SEV), presentado como poster en Granada, 2011.



**PALABRAS CLAVE:** Hepatitis crónica C, Citoquinas, Respuesta virológica sostenida

#### CP125

### Estudio del factor genético IL-28B en la transmisión vertical del virus de la hepatitis C y en la evolución hacia la cronicidad de los niños infectados

Ruiz-Extremera A\*<sup>(1)</sup>, Muñoz-Gómez JA<sup>(2)</sup>, Quilez-Perez R<sup>(3)</sup>, Salmerón-Ruiz MA<sup>(4)</sup>, Muñoz de Rueda P<sup>(5)</sup>, Casado J<sup>(6)</sup>, Carazo A<sup>(7)</sup>, Gila A<sup>(8)</sup>, Martín A<sup>(9)</sup>, Pavón EJ<sup>(10)</sup>, León J<sup>(11)</sup>, Sanjuán-Núñez L<sup>(12)</sup>, Salmerón J<sup>(13)</sup>

Hospital Universitario San Cecilio, CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas<sup>(1)</sup>, Hospital Universitario San Cecilio, Granada<sup>(2)</sup>, Hospital Materno Infantil La Paz, Madrid<sup>(3)</sup>, Departamento de Medicina, Universidad de Granada<sup>(4)</sup>

**Introducción:** La transmisión vertical del virus de la hepatitis C es la principal ruta de infección por VHC en niños, pero los factores de riesgo involucrados en la transmisión vertical del VHC permanecen sin determinar.

**Objetivos:** Este estudio pretende analizar el papel de la IL28B en la transmisión vertical del VHC así como en el aclaramiento espontáneo del virus en niños verticalmente infectados.

**Pacientes y Métodos:** Entre 1991 y 2008, 133 madres han sido incluidas en el estudio. De estas, 100 madres fueron VHC-RNA+vo y tuvieron 128 niños, y 33 madres fueron VHC-RNA-vo/VHC anticuerpos+vo, con 43 niños. Los recién nacidos fueron seguidos al nacimiento y a los 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 y 24 meses y anualmente a los 3, 4, 5 y 6 años analizando el ARN-VHC y en los positivos se determinó el genotipo viral. IL28B (single nucleotide polymorphism rs12979860) fue determinado en las madres y en sus hijos. Se asumió transmisión vertical cuando los niños presentaron VHC-RNA+vo en

dos muestras de sangre consecutivas. Los niños infectados fueron clasificados como: (A) niños con viremia transitoria con posterior VHC-RNA-vo y sin seroconversión; (B) niños con infección permanente o crónica que mantuvieron el VHC RNA- positivo de forma permanente y con seroconversión.

**Resultados:** De las 31 madres con polimorfismo CC de la IL28B, 19 madres (61%) fueron VHC-RNA+vo mientras que entre las 68 madres con polimorfismo no-CC, 56(82%) fueron VHC-RNA+vo (OR=2,95; 95%CI: 1.1-7,7; P<0,026). Los niños nacidos de madres VHC-RNA-vo y anticuerpos VHC+vo no presentaron transmisión vertical. 22 de los 128 (17%) niños nacidos de madres VHC-RNA+vo adquirieron la infección pero solo 8 (6%) fueron infectados crónicamente. La tasa de transmisión vertical fue más elevada en los hijos de madres con alta carga viral (>600.000 U/ml; OR=9; 95%CI: 1.1-88; P<0,05). El polimorfismo de la IL28B de las madres y de los niños no se asoció con un incrementado riesgo de transmisión vertical. Sin embargo, en el aclaramiento viral espontáneo del VHC en los niños verticalmente infectados, el genotipo CC de la IL28B del niño así como el genotipo viral no-1 se asociaron con el aclaramiento viral. La regresión logística multivariante mostró que la única variable asociada de forma independiente con el aclaramiento espontáneo fue el polimorfismo CC de la IL28B en los niños infectados verticalmente con VHC genotipo 1 (OR=17,95%CI:1.2-250;P<0,05). **Conclusiones:** la carga viral alta de la madre es el único factor de riesgo asociado a transmisión vertical del VHC. El polimorfismo de la IL28B no juega ningún papel en transmisión vertical, sin embargo, el genotipo CC de la IL28B del niño está asociado independientemente con aclaramiento espontáneo del VHC en niños infectados con genotipo 1.

**PALABRAS CLAVE:** VHC, IL28B, Transmisión Vertical

## **5 Discusión**





La historia natural de la infección crónica por VHC durante el embarazo así como los factores de riesgo de transmisión vertical no han sido claramente establecidos. Nuestro objetivo principal en la realización de la presente tesis fue profundizar en el conocimiento de estos aspectos que consideramos de gran importancia para poder efectuar una profilaxis en el futuro de la transmisión vertical del VHC.

La infección por VHC es un problema de salud global ya que su elevada prevalencia y su alta tasa de cronicidad determinan un impacto considerable en los sistemas sanitarios actuales, además de los problemas que presenta para el enfermo y la familia. La prevalencia de la infección por VHC en la población general en países desarrollados está estimada en torno al 1%, cifra muy similar a la que se presenta en mujeres embarazadas [58]. La transmisión vertical del VHC es la forma predominante de contagio a los niños después de la implantación del control de los productos sanguíneos y sus derivados y se estima que tendrá un impacto económico importante en décadas futuras [59].

En el capítulo I del presente estudio se evalúan los cambios en los niveles séricos de ALT y carga viral durante la gestación, parto y puerperio así como su implicación en transmisión vertical en gestantes infectadas crónicamente por VHC. Se ha descrito que estas pacientes embarazadas suelen presentar un descenso en sus valores séricos de transaminasas y un aumento de la carga viral en los últimos meses de embarazo [60]. En nuestro estudio no se disponían de datos clínicos o muestras anteriores al embarazo, pero sí que observamos niveles séricos de ALT relativamente bajos ( $<40$  U/L) en las determinaciones realizadas durante la gestación, de hecho, no se observaron diferencias significativas en sus niveles con respecto al grupo control de madres gestantes con anticuerpos frente al VHC pero ARN-VHC-vas.

La información bibliográfica relativa al puerperio es muy reducida y casi inexistente y se limita a documentar que transcurrido cierto tiempo tras el parto (generalmente más de un año), los niveles de transaminasas son iguales a los valores anteriores a la gestación [61]. Nuestros datos examinan el puerperio y muestran que se produce un pico en los niveles de ALT entre los 3 y 6 meses tras el parto y que dicho pico es debido a la infección por VHC al no presentarse dicho

aumento en el grupo de madres control. Además este incremento se vio acompañado temporalmente con un descenso en su carga viral. Por otro lado, este incremento está asociado a la gestación ya que se ha descrito en otros estudios [61] que los pacientes con infección crónica por VHC pueden sufrir fluctuaciones en la carga viral y en las transaminasas en periodos de tiempo, pero estos cambios suelen ser poco importantes, en las gestantes que presentan estas oscilación en el postparto recuerdan al comportamiento de las infecciones agudas

Pero todas las gestantes infectadas crónicamente no se comportaron de la misma forma. Así, hemos descrito por primera vez un subgrupo de madres, denominadas tipo B, en las que no se presenta esta variación post-parto en sus niveles de ALT ni carga viral. Estas mujeres presentaron preferentemente, niveles bajos en su carga viral en el parto (<600.000 UI/mL), lo que nos sugiere que los niveles de la carga viral son importantes para que se produzcan cambios significativos en los niveles séricos de ALT, aun que no explicaría el grupo de madres tipo B que tienen alta carga viral.

El por qué se producen estos cambios en los niveles de ALT y de la carga viral durante la gestación y puerperio y por qué no se producen en todas las gestantes infectadas crónicamente con VHC, son aspectos desconocidos. Estas son dos cuestiones muy interesantes que pretendemos abordar experimentalmente, a través del estudio de factores genéticos, hormonales e inmunológicos en esta cohorte de gestantes. Es conocido desde hace mucho tiempo que durante el embarazo se producen importantes cambios sistémicos no específicos que regulan la respuesta inmune maternal para proteger al feto pero nada se ha estudiado con respecto a este tema inmunológico relacionado con el VHC y gestación y estos cambios en la respuesta inmune viral de Th1 a Th2 durante la gestación y el posterior paso a las condiciones iniciales Th1 en el puerperio podrían explicar en parte estos cambios observados en los niveles de ALT y carga viral pero no terminan de explicar el grupo de madres tipo B encontradas en nuestro estudio [62]. Además durante el embarazo se producen alteraciones hormonales importantes. Así, los niveles séricos de estrógenos y progesterona se incrementan progresivamente y alcanzan un máximo durante el tercer trimestre de gestación.

Con las perspectivas de trabajo comentadas anteriormente pretendemos profundizar en el estudio de la respuesta inmune y hormonal en esta cohorte de madres y así tratar de justificar la diferente evolución descrita en este trabajo de la enfermedad hepática en las madres tipo A y B. Además, hemos encontrado cerca de un 5% de aclaramiento viral espontáneo durante el puerperio que junto con la reducción general observada en los niveles de la carga viral nos hacen pensar que el puerperio puede ser un buen punto de inicio de tratamiento viral con los fármacos clásicos o con los de nueva generación y con prometedoras tasas de respuesta debido a estas particulares condiciones tras la gestación.

Finalmente, en relación a la transmisión vertical del VHC hemos observado una tendencia en la que el 80% de los niños infectados verticalmente proceden de madres tipo A y si tenemos en cuenta ambos criterios (carga viral y tipo de madre en función de los niveles de ALT), se ha identificado por primera vez, un grupo de madres (madres tipo B con carga viral baja) con menor riesgo de transmisión vertical (5%) en relación al resto de madres. Además, en nuestra cohorte de estudio se ha observado que la infección por VHC no produce efectos deletéreos en el feto ni anomalías durante el proceso de gestación, no observándose un incremento en el riesgo de complicaciones obstétricas.

En el capítulo 2 del presente estudio se evalúan los factores de riesgo asociados a transmisión vertical y cronificación de VHC en niños. Como se ha comentado en apartados anteriores, la cronificación del VHC representa la principal causa de infección pediátrica por VHC actualmente, así como la principal causa de enfermedad hepática crónica en niños. Por otro lado se conoce que entre el 10 y el 15% de los pacientes infectados crónicamente por VHC desarrollan cirrosis y carcinoma hepatocelular, por lo que la transmisión vertical de este virus es un tema de vital relevancia e investigación biomédica. En la actualidad, no existen recomendaciones de tratamientos antivirales durante la gestación ni guías para la prevención de la transmisión vertical [63]. Se ha descrito que las tasas de transmisión persistente de la infección (niños con VHC crónico) está entorno al 4-8%, sin embargo la transmisión vertical transitoria en los niños es mucho más elevada, adquiriendo valores cercanos al 18% [64, 65]. Por lo tanto, la transmisión materno-infantil es más frecuente que lo generalmente descrito, ya que la mayoría

de los estudios evalúan a los lactantes trascurrido cierto tiempo tras el parto (generalmente más de 1 año) y por lo tanto no tienen en cuenta el aclaramiento viral espontáneo que se ha descrito que es más común entre los niños que en los adultos, luego los datos bibliográficos disponibles presentan datos limitados [66].

Existe mucha controversia en cuanto a los factores de riesgo asociados a la transmisión vertical del VHC, algunos estudios han mostrado que la alta concentración sérica de ARN-VHC, así como la coinfección con VIH presentan una mayor probabilidad de transmisión [63, 67]. No obstante otros estudios no han encontrado tales asociaciones [68, 69]. En nuestro estudio, encontramos que tanto la carga viral alta en el momento del parto ( $>600.000$  UI/mL) y la coinfección con VIH están asociadas con un mayor riesgo de transmisión vertical. Otro aspecto poco claro en la literatura científica, es el momento de la infección. Se sabe que tras la exposición al virus, se puede conocer si hay infección o no transcurridos solamente unos pocos días tras la exposición, debido a la alta sensibilidad de las técnicas de detección modernas. Nuestros datos indican que la transmisión materno-fetal, no ocurre durante la gestación, ya que en el momento del parto así como en meses posteriores los valores de ARN-VHC generalmente fueron negativos y solo se convirtieron en positivos en aquellos niños verticalmente infectados trascurridos más de tres meses del momento del parto. La mayoría de los niños infectados fueron asintomáticos a pesar del aumento de ALT, valores compatibles con una viremia aguda. Por otro lado, los niños que aclararon el virus recuperaron los niveles normales de ALT. En cuanto al tipo de parto, los datos bibliográficos son heterogéneos. Así un reciente meta-análisis que incluye los resultados de 8 estudios y 641 partos sugiere que el parto por cesárea no disminuye el riesgo de transmisión vertical del VHC [70]. Nuestros datos están en consonancia con este reciente estudio y no encontramos diferencias en relación al nacimiento por cesárea frente a aquellos hijos que nacieron por vía vaginal. El estudio del genotipo viral mostró que no presenta relación con transmisión vertical, sin embargo, cuando se analizó su influencia en el aclaramiento espontáneo (niños con viremia transitoria) frente a niños crónicamente infectados, encontramos una asociación entre genotipo viral 1 y cronificación, confirmando los datos presentados previamente por Bortolotti y colaboradores [71].

Hay que comentar que muy pocos resultados han sido publicados en cuanto a los factores inmuno-genéticos de la transmisión vertical y cronificación, limitándose casi exclusivamente a los polimorfismos de HLA clase II y otros factores deberían ser analizados con más detalle. Con este claro objetivo partimos en nuestro estudio. En pacientes adultos, se ha puesto de manifiesto en estos últimos años, que variaciones genéticas en posiciones cercanas al gen de la IL28B están asociadas con la respuesta viral al tratamiento estándar así como con el aclaramiento viral espontáneo en el genotipo viral 1 [72, 73].

Debido a estos datos en adultos nos propusimos analizar la importancia de los SNPs de la IL28B descritos en adultos en transmisión vertical y en cronificación. Los resultados obtenidos fueron los primeros publicados en relación a este tema y muestran que el genotipo de la IL28B, tanto el materno como el del infante, no tienen influencia en transmisión vertical. Sin embargo, hemos puesto de manifiesto por primera vez que el polimorfismo CC de la IL28B del niño está asociado estadísticamente con aclaramiento viral espontáneo en los niños verticalmente infectados con VHC genotipo viral 1. Así, el 83% de los recién nacidos con genotipo CC de la IL28B infectados verticalmente aclararon el virus frente a solo el 22% de los niños no-CC. Por otro lado, el genotipo de la IL28B de la madre no tuvo influencia en la cronificación viral en el hijo. Como se ha comentado anteriormente, este es el primer estudio que pone de manifiesto tal asociación y por tanto son necesarios más estudios que traten de dilucidar el mecanismo subyacente a este evento así como el impacto clínico que dicho polimorfismo puede tener sobre la infección por VHC en el niño verticalmente infectado. Finalmente, los datos aportados en la presente tesis sugieren que las características maternas son de especial relevancia para la transmisión vertical de VHC, y sin embargo, son las características inmunológicas del hospedador (el niño), las importantes en cuanto al aclaramiento viral espontáneo. Por lo tanto, habría que hacer una distinción clara entre factores de riesgo de transmisión vertical y no confundirlos con factores de riesgo de cronificación.



## **Conclusiones**





El análisis y discusión crítica del conjunto de observaciones y resultados experimentales contenidos en esta memoria nos ha permitido formular las siguientes conclusiones:

## **CAPÍTULO 1**

1. La mayoría de las mujeres VHC-RNA+vas en el puerperio, sufren un aumento de ALT con descenso de la carga viral, posiblemente por la restitución de la inmunidad Th1.
2. Existe una relación directa entre alta carga viral en el parto e incremento en los niveles de ALT.
3. Las madres tipo B con carga viral baja presentan la tasa de transmisión vertical más baja.

## **CAPÍTULO 2**

1. La carga viral alta de la madre es el único factor de riesgo asociado a transmisión vertical del VHC.
2. El polimorfismo de la IL28B no juega ningún papel en transmisión vertical, sin embargo, el genotipo CC de la IL28B del niño está asociado independientemente con aclaramiento espontáneo del VHC en niños infectados con genotipo 1.
3. Existe una alta tasa de aclaramiento viral en los niños, superior a la descrita para los adultos infectados con VHC.
4. Las mujeres con polimorfismo CC de la IL28B tienen mayor probabilidad de ser ARN-VHC negativo.
5. Las mujeres coinfectadas con VIH muestran mayor riesgo de TV-VHC a sus hijos.
6. Los niños nacidos de madres coinfectadas con VIH presentan menor aclaramiento viral espontáneo.

## **CONCLUSIÓN FINAL**

El embarazo modifica la cinética viral y el comportamiento de las transaminasa en las mujeres infectadas crónicamente por VHC. La transmisión vertical del virus está relacionada con factores virales de la madre (carga viral en el parto) y la cronificación o aclaramiento viral espontáneo con las características del niño (genotipo CC de la IL28B).

## **PERSPECTIVAS**

Aún permanecen aspectos de la transmisión vertical del VHC desconocidos, por lo que pretendemos continuar investigando otros factores como los antígenos de histocompatibilidad de la clase HLA 1 y 2, en la madre y el niño. También conocer el papel que pueden jugar las células mononucleares como reservorio del VHC y el estudio de la dinámica de poblaciones del VHC en la gestación y en el puerperio: su importancia en la transmisión vertical y en el curso de la infección en las madres y en los recién nacidos

## **7 Bibliografía**



1. Lauer GM, Walter BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2001;345(1):41-52.
2. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995; 15: 41-54.
3. García-Retortillo M, Forns X. Variabilidad genómica e historia natural de la infección por el virus de la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol* 2002; 25 (8): 514-520.
4. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. *J Clin Invest* 1995; 96:224-230.
5. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, 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.
6. Sáiz JC, López-Labrador FX, Ampurdanès S, Dopazo J, Forns X, Sánchez-Tapias JM, et al. The prognostic relevance of the nonstructural 5A gene interferon sensitivity determining region is different in infections with genotype 1b and 3a isolates of hepatitis C virus. *J Infect Dis* 1998; 177: 839-47.
7. Muñoz de Rueda, J. Casado, R. Patón, D. Quintero, A. Palacios, A. Gila, R. Quiles, J. León, A. Ruiz-Extremera, and J. Salmerón. Mutations in E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR, and NS5A-V3 of Hepatitis C Virus Genotype 1 and Their Relationships to Pegylated Interferon-Ribavirin Treatment Responses. *J Virol*. 2008;82(13): 6644–6653.
8. Liang TJ, Rehermann B, Seeff LB, Hoofnagle JH. Pathogenesis, natural history, treatment and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med* 2000; 132: 296-305.
9. Wasley A, Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis* 2000; 20: 1-16.
10. Ruiz Extremera A, López-Garrido MA, Barranco E, Quintero MD, Ocete-Hita E, Muñoz de Rueda P, Gila A, Salmerón J. Activity of hepatic enzymes from week sixteen of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2005 Dec; 193(6): 2010-6.

11. Muñoz-Almagro C , Juncosa T , Fortuny C , Guillén J J , González-Cuevas A, Latorre C . Prevalence of hepatitis C virus in pregnant women and vertical transmission. *Med Clin (Barc)* 2002; 118(12): 452-4.
12. Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 107–115.
13. Kamal SM. Acute Hepatitis C: A Systematic Review. *Am J Gastroenterol* 2008;103:1283–1297.
14. Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, Wakita T. Molecular biology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 2007; 42 :411-423.
15. Orland JR, Wright TL, Cooper S. Acute hepatitis C. *Hepatology*. 2001; 33:321-7.
16. Micaleff JM, Kaldor JM, Dore GJ. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *J Viral Hepat*. 2006;13:34-41.
17. Resti M, Jara P, Hierro L , Azzari C, Giacchino R, Zuin G, Zancan L, Pedditzi S, Bortolotti F. Clinical features and progression of perinatally acquired hepatitis C virus infection. *J Med Virol*. 2003; 70; 373-7.
18. Bortolotti F, Resti M, Marcellini M, Giacchino R, Verrucchi G, et al, The Italian Observatory for Hepatitis C in children. Hepatitis C virus genotypes in 373 Italian children with HCV infection: changing distribution and correlation with clinical features and outcome. *Gut*. 2005; 54; 852-857.
19. Guido M, Rugge M, Jara P, Hierro L, Giacchino R, et al. Chronic hepatitis C in children: the pathological and clinical spectrum. *Gastroenterology*. 1998;115(6):1525-9.
20. The European Pediatric Hepatitis C Virus Network European Paediatric Hepatitis C Virus Network. A significant sex – but not elective cesarean section – effect on mother-to-child transmission of hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2005; 192(11): 1872–1879.

21. Arshad M, El-Kamary SS, Jhaveri R. Hepatitis C virus infection during pregnancy and the newborn period – are there opportunities for treatment?. *Journal of Viral Hepatitis*, 2011; 18; 229–236.
22. Bruguera M, Bañares R, Córdoba J, Jardí R, González L, Joch J, et al. Documento de consenso de la AEEH sobre el tratamiento de las infecciones por los virus de las hepatitis B y C. *Gastroenterol Hepatol*. 2006;29 Supl:216-30.
23. Gao B, Hong F, Radaeva S. Host factors and failure of interferon- $\alpha$  treatment in hepatitis C. *Hepatology* 2004; 39: 880-890.
24. Awad T, Thorlund K, Hauser G, Stimac D, Mabrouk M, Gluud C. Cochrane Hepato-Biliary Group. Peginterferon alpha-2a may achieve higher sustained virological response than peginterferon alpha-2b in chronic hepatitis C: a Cochrane systematic review of randomized clinical trials. *Hepatology* 2009; 50(suppl): 707-708A.
25. Ascione A, De Luca M, Tartaglione MT, Tartaglione MT, Lampasi F et al. Peginterferon alpha-2a plus ribavirin is more effective than peginterferon alpha-2b plus ribavirin for treating chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2010, 138: 116-122.
26. Hoofnagle JH, Seef LB. Peginterferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *N Engl J Med*. 2006; 355: 2444-2451.
27. Salmerón J, Gila A, Muñoz P. Nuevos tratamientos de hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol*. 2011;34(Espec Congr 1):58-65.
28. Herrmann E, Lee JH, Marinos G, Mondini M, Zeuzem S. Effect of ribavirin on hepatitis C viral kinetics in patients treated with pegylated interferon. *Hepatology* 2003; 37: 1351-8.
29. Fried MW, Hadziyannis SJ, Shiffman M, Messinger D, Zeuzem S. Rapid viral response is more important predictor of sustained virologic response (SVR) than genotype in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2008; 48 (Suppl. 2): 5A.



30. Davis GL, Wong JB, McHutchinson JG, Manns MP, Harvey J, Albretch J. Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 645-652.
31. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, et al. Peginterferon alfa 2b plus ribavirin compared with interferon alfa2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2001;358:958-65.
32. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçales FL Jr, et al. Peginterferon alfa 2a plus ribavirin for Chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002;347:975-82.
33. Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, et al. Peginterferon alfa-2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. A randomised study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med*. 2004; 140: 346-355.
34. Shiffman ML, Di Bisceglie AM, Lindsay KI, Morishima C, Wright EC, Everson GT, et al. Peginterferon alfa-2a and ribavirin in patients with chronic hepatitis C who have failed prior treatment. *Gastroenterology*. 2004;126(4):1015-23.
35. Hierro L, Jara P. Hepatitis crónica C. Tratado de gastroenterología, hepatología y nutrición pediátrica aplicada de la SGHNP. Ergón. 2011; 534-541.
36. Mangia A, Santoro R, Minerva N, Ricci GL, Carretta V, Persico M et al. Peginterferon alfa-2b and ribavirin for 12 vs. 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med* 2005; 352:2609-17.
37. Salmeron J, De Rueda PM, Ruiz-Extremera A, Casado J, Huertas C, Bernal Mdel C, Rodriguez L, Palacios A. Quasispecies as predictive response factors for antiviral treatment in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci*. 2006;51:960–967.
38. Salmerón J, Casado J, Muñoz De Rueda P, Lafuente V, Diago M, Romero-Gómez M, Palacios A, León J, Gila A, Quiles R, Rodriguez L, Ruiz-Extremera A. Quasispecies as predictive factor of rapid, early and sustained virological responses

in chronic hepatitis C, genotype 1, treated with peginterferon-ribavirin. *J Clin Virol.* 2008 Apr;41(4):264-9.

39. Pascu M, Martus P, Höhne M, Wiedenmann B, Hopf U, Schreier E, Berg T. Sustained virological response in hepatitis C virus type 1b infected patients is predicted by the number of mutations within the NS5A-ISDR: a meta-analysis focused on geographical differences. *Gut.* 2004 Sep;53(9):1345-51.

40. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; 461: 399-401.

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

42. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N 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.

43. 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; 41: 1338-45.

44. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'huigin C et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis Nature. 2009;461(7265):798-801.

45. Di Martino V, Lebray P, Myers RP, Pannier E, Paradis V, Charlotte F, et al. Progression of Liver Fibrosis in Women Infected With Hepatitis C: Long-Term Benefit of Estrogen Exposure. *Hepatology* 2004; 40:1426 –1433.

46. Lutz P, Wasmuth JC, Nischalke HD, Vidovic N, Grünhage F, Lammert F, et al. Progression of liver fibrosis in HIV/HCV genotype 1 co-infected patients is related to the T allele of the rs12979860 polymorphism of the IL28B gene *Eur J Med Res.* 2011 Aug 8;16(8):335-41.

47. Lindh M, Lagging M, Färkkilä M, Langeland N, Mørch K, Nilsson S, et al. Interleukin 28B gene variation at rs12979860 determines early viral kinetics during

treatment in patients carrying genotypes 2 or 3 of hepatitis C virus. *J Infect Dis*. 2011 Jun 15;203(12):1748-52.

48. Knapp S, Warshow U, Ho KM, Hegazy D, Little AM, Fowell A, Alexander G, Thursz M, Cramp M, Khakoo S. IA polymorphism in IL28B distinguishes exposed, uninfected individuals from spontaneous resolvers of HCV infection. *Gastroenterology*. 2011 Jul;141(1):320-5.

49. de Rueda PM, López-Nevot MÁ, Sáenz-López P, Casado J, Martín-Casares A, Palomares P, et al. Importance of host genetic factors HLA and IL28B as Predictors of Response to Pegylated Interferon and Ribavirin. *Am J Gastroenterol*. 2011 Jul;106(7):1246-54.

50. Ruiz-Extremera A, Salmerón J, Torres C, De Rueda PM, Giménez F, Robles C, Miranda MT. Follow-up of transmission of hepatitis C to babies of human immunodeficiency virus-negative women: the role of breast-feeding in transmission. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19(6): 511-6.

51. Ceci O, Margiotta M, Mareello F, Francavilla R, Loizzi P, Francavilla A, et al. Vertical transmission of hepatitis C virus in a cohort of 2,447 HIV-seronegative pregnant women: a 24-month prospective study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 33(5): 570-5.

52. Pembrey L, Newell ML, Tovo PA; EPHN Collaborators. The management of HCV infected pregnant women and their children European paediatric HCV network. *J Hepatol* 2005; 43: 515-25.

53. Azzari C, Indolfi G, Betti L, Moriondo M, Massai C, Becciolini L et al. Vertical hepatitis C virus transmission is not related to mother-child class-I HLA concordance. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol* 2007; 20, 827–831.

54. Bosi I, Ancora G, Mantovani W, Miniero R, Verucchi G, Attard L et al. HLA DR13 and HCV vertical infection. *Ped. Res* 2002; 51: 746–749.

55. Martinetti M, Pacati I, Cuccia M, Badulli C, Pasi A, Salvaneschi L, et al. Hierarchy of baby-linked immunogenetic risk factors in the vertical transmission of hepatitis C virus. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol* 2006; 19: 369–378.

56. Bevilacqua E, Fabris A, Floreano P, Pembrey L, Newell ML, Tovo PA, Amoroso A, and EPHN collaborators. Genetic factors in mother-to-child transmission of HCV infection. *Virology* 2009; 390: 64–70.
57. Billington WD. Transfer of antigens and antibodies between mother and fetus. In: Coulam, C, Faulk, W, McIntyre, J (Eds.), *Immunological obstetrics* 1992. Norton, New York, p. 290.
58. Indolfi G, Resti M. Perinatal Transmission of Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Medical Virology*. 2009; 81:836-843.
59. Jhaveri R, Grant W, Kauf TL, McHutchison J. The burden of Hepatitis C Virus infection in children: estimated direct medical costs over a 10-year period. *J Pediatr*. 2006; 148:353-358.
60. Moran-Sanchez S, Pons-Miñano JA, Baños-Madrid R, Ramirez P, Parrilla-Paricio A. Falso hepático agudo por el virus de la hepatitis C en el puerperio. *Gastroenterol Hepatol*. 2005; 28(8): 447-9.
61. Gervais A, Bacq Y, Bernuau J, Martinot M, Auperin A, Boyer N, Kilani A, Erlinger S, Valla D, Marcellin P. Decrease in serum ALT and increase in serum HCV RNA during pregnancy in women with chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*. 2000; 32: 293-299.
62. Sargen IL. Maternal and fetal immune responses during pregnancy. *Exp. Clin Immunogenet* 1993; 10: 85-102.
63. Valladares G, Chacaltana A, Sjogren MH. The management of HCV-infected pregnant women. *Ann Hepatol* 2010; 9: 92-97.
64. Shebl FM, El-Kamary SS, Saleh DA, Abdel-Hamid M, Mikhail N, Allam A, et al. Prospective cohort study of mother-to-infant infection and clearance of hepatitis C in rural Egyptian villages. *J Med Virol* 2009; 81:1024-1031.
65. Hayashida A, Inaba N, Oshima K, Nishikawa M, Shoda A, Hayashida S, et al. Re-evaluation of the true rate of hepatitis C virus mother-to-child transmission and its novel risk factors based on our two prospective studies. *J Obstet Gynaecol Res* 2007; 33:417-422.

66. Yeung LT, To T, King SM, Roberts EA. Spontaneous clearance of childhood hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2007;14:797-805.
67. Claret-Teruel G, Noguera-Julian A, Esteve C, Muñoz-Almagro C, Sánchez E, Jiménez R, Fortuny C. Impact of human immunodeficiency virus coinfection on the progression of mother-to-child transmitted hepatitis C virus infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2011 Sep;30(9):801-4.
68. Resti M, Azzari C, Galli L, Zuin G, Giacchino R, Bortolotti F, Marchellini M, Moriondo M, de Martino M, Verucchi A; Italian Study Group on Mother-to-Infant Hepatitis C Virus Transmission. Maternal drug use is a preeminent risk factor for mother-to-child hepatitis C virus transmission: results from a multicenter study of 1372 mother-infant pairs. *J Infect Dis*. 2002;185(5):567-72.
69. Mast EE, Hwang LY, Seto DS, Nolte FS, Nainan OV, Wurtzel H, Alter MJ. Risk factors for perinatal transmission of hepatitis C virus (HCV) and the natural history of HCV infection acquired in infancy. *J Infect Dis* 2005;192:1880-1889.
70. Ghamar Chehreh ME, Tabatabaei SV, Khazanehdari S, Alavian SM. Effect of cesarean section on the risk of perinatal transmission of hepatitis C virus from HCV-RNA+/HIV- mothers: a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2011;283(2):255-60.
71. Bortolotti F, Verucchi G, Camma C, Cabibbo G, Zancan L, Indolfi G, Giacchino R, et al. Long-term course of chronic hepatitis C in children: from viral clearance to end-stage liver disease. *Gastroenterology* 2008;134:1900-1907.
72. Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, et al. Amino acid substitution in hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin. *Hepatology* 2010;52:421-429.
73. Ahlenstiel G, Booth DR, George J. IL28B in hepatitis C virus infection: translating pharmacogenomics into clinical practice. *J Gastroenterol* 2010;45:903-910.