

El polimorfismo *rs12979860 C>T* en el gen *Interferón lambda 4* no está asociado a riesgo de fibrosis hepática en pacientes chilenos con hepatitis crónica por virus C

JAVIER BRAHM¹, ALVARO URZÚA¹, JAIME PONIACHIK¹, DANTE D. CÁCERES^{2,a}, LAURA CARREÑO^{3,b}, MAURICIO VENEGAS^{1,c}

Interferon Lambda 4 RS12979860 C>T polymorphism is not associated with liver fibrosis in patients with hepatitis C

Background. Host genetic predispositions may be important determinants of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C (CHC). The association between Interferon-L 4 (IFNL4) *rs12979860 C>T* polymorphism and risk of liver fibrosis in CHC is contradictory. **Aim:** To evaluate the impact of IFNL4 *rs12979860* polymorphism on the risk of fibrosis in patients with CHC. **Material and Methods:** One hundred fifty patients with CHC aged 50 ± 11 years (89 females) were genotyped for IFNL4 *rs12979860* using real time PCR. Fibrosis present in liver biopsies was assessed using the METAVIR score, comparing patients with either no fibrosis, mild fibrosis, or intermediate fibrosis (F0+F1+F2, $n = 96$), with patients with severe fibrosis or cirrhosis (F3+F4, $n = 54$). **Results:** In F0-F2 patients the distribution of *rs12979860* genotypes was 22 CC, 57 CT and 17 TT, whereas in patients F3-F4 the distribution was 10, 29 and 15, respectively. No association between IFNL4 *rs12979860* genotype and risk of fibrosis was observed in uni or multivariate analyses. **Conclusions:** IFNL4 *rs12979860 C>T* polymorphism is not associated with risk of liver fibrosis in this group of patients with CHC.

(Rev Med Chile 2018; 146: 823-829)

Key words: Fibrosis; Hepatitis C, Chronic; Polymorphisms, Genetic.

La infección crónica con el virus de hepatitis C (VHC) es una importante causa de morbilidad y mortalidad¹, estimándose que a nivel mundial hay 185 millones de pacientes infectados². La infección persistente con VHC puede llevar a una hepatitis crónica, cirrosis hepática, desarrollo de hepatocarcinoma, falla hepática y fallecimiento³. La progresión de la enfermedad hepática en pacientes con infección crónica es muy variable entre los pacientes infectados. Varios factores son ampliamente conocidos

como causantes de la progresión a fibrosis en la infección por VHC, incluyendo la edad, alcoholismo, obesidad, coinfección con virus hepatitis B (VHB) o el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la esteatosis hepática⁴⁻⁶. Debido a que la progresión de la fibrosis aún es variable entre pacientes con similares riesgos, se ha sugerido que la predisposición genética del hospedero puede ser otro factor importante de riesgo para el desarrollo de fibrosis^{7,8}. Al respecto, existe evidencia de que particularmente variantes genéticas en los

¹Sección de Gastroenterología, Departamento de Medicina, Hospital Clínico Universidad de Chile. Santiago, Chile.

²Programa de Salud Ambiental, Escuela de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

³Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Clínico Universidad de Chile. Santiago, Chile.

^aMédico Veterinario, MSc.

^bPhD.

^cBioquímico, MSc.

Financiamiento: Proyecto OAIC 394/10.

Recibido el 30 de enero de 2018, aceptado el 26 de junio de 2018.

Correspondencia a:

Dr. Mauricio Venegas
Sección de Gastroenterología,
Departamento de Medicina,
Hospital Clínico Universidad de Chile,
Santos Dumont 999,
Independencia, Santiago, Chile.
mvenegas@hucuch.cl

genes que controlan las vías de respuesta inmune e inflamatoria pueden influir en la aparición de fibrosis en infección crónica por VHC⁹⁻¹¹. En este contexto, el descubrimiento del polimorfismo de nucleótido único *rs12979860* C>T cercano al gen *Interferon lambda 3* (*IFNL3*, inicialmente llamado IL28B), representó un hallazgo importante en la investigación en hepatitis C, llegando a ser el factor del hospedero más fuerte asociado con la eliminación viral mediada por la terapia basada en interferón alfa^{12,13}. Considerando que el polimorfismo *rs12979860* está realmente localizado en el intrón 1 del recientemente descubierto gen *IFN lambda 4* (*IFNL4*)¹⁴, éste será mencionado en este estudio como polimorfismo *IFNL4 rs12979860*.

Hasta ahora, existen resultados controversiales respecto a la asociación entre el polimorfismo *IFNL4 rs12979860* y el riesgo de fibrosis en pacientes con infección crónica por VHC¹⁵⁻¹⁷. Al parecer, los resultados dependen de la distribución geográfica de la población estudiada¹⁸.

El objetivo de este estudio fue evaluar la asociación entre el polimorfismo *IFNL4 rs12979860* y el riesgo de fibrosis hepática en pacientes chilenos con infección crónica por VHC.

Material y Método

Muestras de pacientes

Se analizaron en forma retrospectiva muestras de sangre de 150 pacientes chilenos con infección crónica por VHC obtenidas entre marzo de 2000 y agosto de 2014 en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile (Santiago, Chile). Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico Universidad de Chile con certificado de aprobación N° 394/10 y todos los pacientes firmaron el consentimiento informado en el momento de tomarles las muestras de sangre y realizarles la biopsia hepática. Los criterios de inclusión fueron: i) pacientes mayores de 18 años; ii) Diagnóstico de infección crónica por VHC basado en la detección anticuerpos anti VHC y RNA positivos por al menos 6 meses; iii) disponibilidad de biopsia hepática previa a tratamiento antiviral y iv) disponibilidad de muestra de sangre almacenada a -80°C obtenida concomitantemente con la biopsia hepática. Los criterios de exclusión fueron: i) Abuso de alcohol (> 30 g/día para hombres y > 20 g/día para mujeres por al menos 5 años); ii) diagnóstico de hepatitis

autoinmune; iii) co-infección con VHB y/o VIH y iv) pacientes trasplantados de hígado.

Los datos clínicos como parámetros bioquímicos, diagnóstico de diabetes mellitus e índice de masa corporal (IMC), fueron obtenidos de la ficha clínica de los pacientes.

Genotipificación del VHC y determinación de carga viral

Para la genotipificación del VHC se utilizaron las técnicas de transcripción reversa, seguida por reacción en cadena de la polimerasa (RCP) anidada de la región 5' no codificante y posterior ensayo de polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción. Esta técnica permite identificar los genotipos de VHC mediante el uso de enzimas de restricción específicas que cortan los productos de ADN obtenidos en la RCP, generando fragmentos de ADN característicos de cada genotipo y los cuales se visualizan en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Este método fue diseñado y validado con la técnica comercial de hibridación con sondas INNO Lipa y mediante secuenciación directa en el Instituto Pasteur de Francia¹⁹.

La carga viral fue medida mediante RCP en tiempo real usando el test comercial COBAS® TaqMan® HCV (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA).

Clasificación histológica

El porcentaje de esteatosis y el grado de fibrosis fue analizado por un patólogo, quien desconocía los parámetros del estudio. La presencia de esteatosis fue analizada considerando criterios previamente establecidos²⁰: Grado 0 (ausencia) < 5%, Grado 1 = 5% - 33%, Grado 2 = 34% - 66% y Grado 3 > 66%. Debido al pequeño número de pacientes con esteatosis grado 2 y 3 (solo 2 pacientes en nuestro estudio), nosotros analizamos la esteatosis como una variable cualitativa (< 5% = ausencia, ≥ 5% = presencia). La fibrosis fue expresada de acuerdo al sistema de clasificación METAVIR (F0 = ausencia de fibrosis, F1 = fibrosis leve, F2 = fibrosis moderada, F3 = fibrosis severa y F4 = cirrosis).

Genotipificación del polimorfismo *IFNL4 rs12979860*

El DNA genómico fue preparado en duplicado a partir de linfocitos de sangre periférica usando el kit commercial High Pure System Nucleic Acid kit

(Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA). El genotipo de *rs12979860* fue realizado mediante PCR en tiempo real usando el kit LightMix® Kit IL28B *rs12979860* de TIB MOLBIOL (GmbH, Berlin, Germany) y procesado en el instrumento LightCycler® 2.0 de Roche.

Asociación entre el polimorfismo *IFNL4 rs12979860 C>T* y fibrosis hepática

La asociación entre los genotipos CC, CT o TT de *IFNL4 rs12979860* con fibrosis fue analizada comparando pacientes con clasificación METAVIR F0, F1 o F2, con pacientes con METAVIR F3 o F4.

Análisis estadístico

Las variables categóricas fueron registradas como frecuencia y porcentaje, mientras que las variables continuas fueron tabuladas como promedio \pm desviación estándar. Se utilizó el test estadístico de Shapiro-Wilk para evaluar normalidad. Las variables categóricas fueron analizadas mediante el test de χ^2 de dos colas y las variables cuantitativas mediante el test no paramétrico Kruskal-Wallis o mediante análisis de varianza cuando fuera apropiada. Se realizaron modelos de regresión logística múltiple para evaluar la asociación entre el genotipo de *IFNL4 rs12979860* y fibrosis a través del odd ratio (OR) como medida del efecto de riesgo, ajustando previamente con variables clínicamente relevantes asociadas a fibrosis (edad, género, índice de masa corporal, diabetes y presencia de esteatosis). Se utilizó el programa computacional STATA version 12.0 para el análisis estadístico, considerándose un $p < 0,05$ como diferencia estadísticamente significativa.

Resultados

De los 150 pacientes con infección crónica por VHC estudiados, 61 eran hombres y 89 mujeres, con una edad promedio de 50 ± 11 años. El genotipo 1 de VHC fue encontrado en 125 pacientes (83,3%), el genotipo 3 en 16 pacientes (10,7%), el genotipo 2 en 4 pacientes (2,7%) y los genotipos 4 y 5, cada uno en 1 paciente respectivamente (0,7%). En 3 casos el genotipo no fue determinado (1,9%). El total de pacientes con presencia de esteatosis fue 79 (52,6%) y se encontró fibrosis severa o cirrosis en 54 pacientes (36%).

La distribución del genotipo de *IFNL4 rs12979860* fue 32 pacientes CC (21,3%), 86 CT (57,3%) y 32 TT (21,3%).

Los 32 pacientes con genotipo CC de *IFNL4 rs12979860* fueron similares a los 86 pacientes con genotipo CT y los 32 pacientes con genotipo TT en cuanto a las características como edad, género, IMC, presencia de diabetes, parámetros bioquímicos y clasificación de fibrosis (Tabla 1). Los pacientes con genotipo *IFNL4 rs12979860 CT* presentaron más alta tasa de esteatosis en la biopsia que los pacientes con genotipo CC ($p = 0,048$).

Además, realizamos un análisis de regresión logística uni y multivariable para riesgo de fibrosis que consideró el genotipo homocigoto CC de *IFNL4 rs12979860* como referencia e hicimos la corrección con los factores de riesgo conocidos (Tabla 2). En el análisis univariable, el genotipo de *IFNL4 rs12979860* no se asoció a riesgo de fibrosis. La edad, el IMC, la presencia de diabetes y presencia de esteatosis fueron factores independientes asociados a fibrosis. En el análisis multivariable, la edad y presencia de esteatosis se mantuvieron como únicos factores de riesgo asociados a fibrosis (Tabla 2).

Al realizar el mismo análisis para los 125 pacientes con genotipo 1 de VHC, la regresión logística univariable mostró que no existe asociación entre el genotipo de *IFNL4* y riesgo de fibrosis. Los factores edad, IMC, presencia de diabetes y esteatosis también fueron factores independientes asociados a fibrosis. En el análisis multivariable, solo la edad y la esteatosis mostraron asociación con riesgo de fibrosis (Tabla 3). Este análisis no fue realizado para los demás genotipos debido al reducido número de muestras.

Discusión

La asociación entre el polimorfismo *rs12979860* en el gen *IFNL4* y riesgo de fibrosis en pacientes con infección crónica por VHC es muy controversial. Existen reportes que han demostrado una asociación entre los distintos genotipos de *IFNL4* e inflamación hepática, pero que han fallado en demostrar un efecto sobre el grado de fibrosis hepática relacionada a VHC^{16,21}. Por otro lado, un estudio multicéntrico internacional con 3.129 en pacientes caucásicos provenientes de 5 países (España, Reino Unido, Australia, Alemania e Italia),

Tabla 1. Características de los 150 pacientes chilenos con hepatitis crónica C de acuerdo al genotipo *IFNL4 rs12979860*

Variable	<i>IFNL4</i> CC, n = 32	<i>IFNL4</i> CT, n = 86	<i>IFNL4</i> TT, n = 32	p value
Edad (años, promedio ± DE)	52,0 ± 12,5	49,7 ± 9,9	53,9 ± 10,7	0,079
Género (hombre/mujer)	18/14	33/53	14/18	0,219
Diabetes (n, %)	6 (18,8)	10 (11,6)	7 (21,9)	0,324
IMC (kg/m ² , promedio ± DE)	25,57 ± 3,6	27,00 ± 4,38	26,04 ± 4,36	0,235
Plaquetas (x10 ³ U/L, promedio ± DE)	178 ± 61	196 ± 88	170 ± 70	0,217
ALT (IU/L, promedio ± SD)	164 ± 160	108 ± 84	124 ± 77	0,062
Colesterol total (mg/dL, promedio ± DE)	171 ± 29	169 ± 30	173 ± 34	0,8173
Carga Viral (n, %)				
> 600.000 IU/mL	22 (68,8)	46 (53,5)	22 (68,8)	0,361
< 600.000 IU/mL	10 (31,2)	13 (46,5)	10 (31,2)	
Genotipo (n, %)				
1	25 (78,1)	74 (86,0)	26 (81,3)	0,361
2	1 (3,1)	3 (3,5)		
3	6 (18,8)	8 (9,3)	2 (6,25)	
4			1 (3,1)	
5			1 (3,1)	
No determinado		1 (1,2)	2 (6,25)	
Esteatosis (n, %)				
< 5%	18 (56,3)	36 (41,9)	17 (53,1)	0,048*
≥ 5%	14 (43,7)	50 (58,1)	15 (46,9)	
Fibrosis (n, %)				
F0-F2 (n=96)	22 (68,8)	57 (66,3)	17 (53,1)	0,341
F3-F4 (n=54)	10 (31,2)	29 (33,7)	15 (46,9)	

Abreviaciones: IMC, índice de masa corporal; ALT, alanina aminotransferasa; DE, desviación estándar. *p value < 0,05 es considerado estadísticamente significativo.

Tabla 2. Análisis de regresión logística univariable y multivariable del efecto del genotipo de *IFNL4 rs12979860* sobre el riesgo de fibrosis en los 150 pacientes con hepatitis crónica por VHC

Fibrosis (F0-F2 versus F3-F4)	Univariable			Multivariable		
	OR	95% CI	p value	OR	95% CI	p value
<i>IFNL4 rs12979860</i> CC	1,00					
<i>IFNL4 rs12979860</i> CT	1,11	0,46-2,68	0,800	1,30	0,48-3,52	0,605
<i>IFNL4 rs12979860</i> TT	1,94	0,68-5,50	0,203	2,01	0,66-6,12	0,221
Edad (años)	1,06	1,02-1,09	0,002*	1,05	1,01-1,10	0,014*
Género (femenino)	1,20	0,62-2,36	0,583	1,65	0,76-3,61	0,207
IMC (Kg/m ²)	1,08	1,00-1,17	0,047*	1,03	0,94-1,13	0,479
Diabetes	3,38	1,35-8,47	0,009*	2,09	0,78-5,65	0,144
Esteatosis (≥ 5%)	2,79	1,39-5,64	0,004*	2,46	1,14-5,32	0,022*

Abreviaciones: IMC: Índice de masa corporal; IC: intervalo de confianza; OR: odds ratio. *p-value < 0,05 es considerado estadísticamente significativo.

Tabla 3. Análisis de regresión logística univariable y multivariable del efecto del genotipo de *IFNL4* rs12979860 sobre el riesgo de fibrosis en 125 pacientes con hepatitis crónica por VHC, genotipo 1

Fibrosis (F0-F2 versus F3-F4)	Univariable			Multivariable		
	OR	95% CI	p value	OR	95% CI	p value
<i>IFNL4</i> rs12979860 CC	1,00					
<i>IFNL4</i> rs12979860 CT	0,68	0,26-1,74	0,416	0,5	0,15-1,65	0,256
<i>IFNL4</i> rs12979860 TT	1,29	0,42-3,96	0,660	0,85	0,24-3,07	0,809
Edad (años)	1,08	1,03-1,12	0,001*	1,07	1,01-1,12	0,013*
Género (Femenino)	1,04	0,49-2,18	0,916	1,37	0,55-3,37	0,500
IMC (Kg/m ²)	1,10	1,01-1,21	0,027*	1,06	0,96-1,18	0,232
Diabetes	4,06	1,55-10,67	0,004*	2,19	0,75-6,46	0,151
Esteatosis (≥ %5)	3,69	1,68-8,09	0,001*	3,84	0,53-9,67	0,004*

Abreviaciones: IMC: Índice de masa corporal; IC: intervalo de confianza; OR: *odds ratio*. *p-value < 0,05 es considerado estadísticamente significativo.

concluyó que en pacientes con hepatitis crónica por VHC, el genotipo CC en *IFNL4* rs12979860 se asocia a desarrollo y progresión de fibrosis, siendo mayor el impacto de este polimorfismo en pacientes jóvenes y en genotipo 3 de VHC¹⁵. Por el contrario, existen múltiples estudios que relacionan el alelo T de *IFNL4* rs12979860 con fibrosis hepática en VHC. Fabris et al. describieron una mayor prevalencia del alelo T en pacientes con cirrosis por VHC que en otra etiología y que en pacientes con hepatitis crónica leve por VHC²². De igual forma, De la Fuente et al. encontraron que en comparación con pacientes cirróticos alcohólicos, el genotipo TT es más frecuente en pacientes con cirrosis por VHC²³. Con respecto a este último punto, es interesante señalar que el estudio más grande que se ha realizado para evaluar la relación entre el polimorfismo *IFNL4* rs12979860 y cirrosis o transición a cirrosis fue multicéntrico internacional en que se enrolaron 2.916 pacientes y que describió que el genotipo TT se asocia significativamente a fibrosis sólo en pacientes con genotipo 1 de VHC. Esta asociación fue evidente en población caucásica europea, pero no en pacientes de origen Asiático, Medio Oriente y Latinoamérica¹⁸. Al respecto, los autores mencionan que la falta de asociación en estos últimos pacientes puede deberse al bajo número de pacientes estudiados, que en el caso de Latinoamérica era de 139 pacientes, provenientes de 5 países (Argentina, Chile, México, Perú y Venezuela). Sin embargo,

no descartan que pudieran existir factores étnicos que pudieran explicar sus resultados.

En el presente estudio, nosotros no encontramos asociación entre el polimorfismo *IFNL4* rs12979860 y riesgo de fibrosis hepática en 150 pacientes chilenos con infección crónica por VHC. De igual forma, no observamos esta asociación en los 125 pacientes con el genotipo 1 de VHC. Estos resultados son concordantes con los que se describen para población latinoamericana, pero que en este caso incluye un mayor número de pacientes de un solo país. Esto refuerza la idea de posibles factores étnicos involucrados en el desarrollo de fibrosis en nuestra población. En la literatura se describen otros polimorfismos en los genes PNPLA3 y TM6SF2 como variantes genéticas asociados esteatosis y fibrosis en pacientes con hepatitis crónica por VHC^{24,25}. En población chilena, el polimorfismo en PNPLA3 rs738409 C<G (I148M) es muy frecuente y se asocia a riesgo de esteatosis hepática pero no a fibrosis en pacientes con VHC²⁶. Por otro lado, el polimorfismo TM6SF2 rs58542926 C>T (E167K), es muy poco frecuente en nuestra población y no se asocia a riesgo de esteatosis o fibrosis en estos pacientes²⁶.

En nuestra cohorte, se excluyeron pacientes con consumo crónico de alcohol, factor ampliamente conocido de estar asociado a fibrosis y cirrosis hepática⁵. Por ello, la edad de los pacientes y presencia de esteatosis fueron los únicos factores de riesgo asociados a fibrosis.

En conclusión, el presente trabajo representa el primer estudio realizado en un país latinoamericano con un alto número de pacientes con infección crónica por VHC, en donde se demuestra que no existe asociación entre el polimorfismo *IFNL4 rs12979860 C>T* y riesgo de fibrosis hepática. Sería interesante conocer si en otros países de la región, esta situación se replica.

Referencias

- Cooke GS, Lemoine M, Thursz M, Gore C, Swan T, Kamarulzaman A, et al. Viral hepatitis and the global burden of disease: a need to regroup. *J Viral Hepat* 2013; 20 (9): 600-1.
- Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* 2013; 57 (4): 1333-42.
- Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001; 345 (1): 41-52.
- Huang CF, Chuang WL, Yu ML. Chronic hepatitis C infection in the elderly. *Kaohsiung J Med Sci* 2011; 27 (12): 533-7.
- Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997; 349 (9055): 825-32.
- Wright M, Goldin R, Fabre A, Lloyd J, Thomas H, Trepo C, et al. Measurement and determinants of the natural history of liver fibrosis in hepatitis C virus infection: a cross sectional and longitudinal study. *Gut* 2003; 52 (4): 574-9.
- Missiha SB, Ostrowski M, Heathcote EJ. Disease progression in chronic hepatitis C: modifiable and nonmodifiable factors. *Gastroenterology* 2008; 134 (6): 1699-714.
- Patin E, Kutalik Z, Guergnon J, Bibert S, Nalpas B, Jouanguy E, et al. Genome-wide association study identifies variants associated with progression of liver fibrosis from HCV infection. *Gastroenterology* 2012; 143 (5): 1244-52.
- Romero-Gómez M, Eslam M, Ruiz A, Maraver M. Genes and hepatitis C: susceptibility, fibrosis progression and response to treatment. *Liver Int* 2011; 31 (4): 443-60.
- Patel K, Norris S, Lebeck L, Feng A, Clare M, Pianko S, et al. HLA class I allelic diversity and progression of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2006; 43 (2): 241-9.
- Knapp S, Yee LJ, Frodsham AJ, Henning BJ, Hellier S, Zhang L, et al. Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of MxA, OAS-1 and PKR. *Genes Immun* 2003; 4 (6): 411-9.
- 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 (7262): 399-401.
- Eslam M, Leung R, Romero-Gómez M, Mangia A, Irving WL, Sheridan D, et al. IFNL3 polymorphisms predict response to therapy in chronic hepatitis C genotype 2/3 infection. *J Hepatol* 2014; 61 (2): 235-41.
- Prokunina-Olsson L, Muchmore B, Tang W, Pfeiffer RM, Park H, Dickensheets H, et al. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat Genet* 2013; 45 (2): 164-71.
- Eslam M, Hashem AM, Leung R, Romero-Gómez M, Berg T, Dore GJ, et al. Interferon-L rs12979860 genotype and liver fibrosis in viral and non-viral chronic liver disease. *Nat Commun* 2015; 6: 6422.
- Marabita F, Aghemo A, De Nicola S, Rumi MG, Cheroni C, Scavelli R, et al. Genetic variation in IL28B gene is not associated with fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C and known date of infection. *Hepatology* 2011; 54 (4): 1127-34.
- Falletti E, Bitetto D, Fabris C, Cussigh A, Fornasiere E, Cmet S, et al. Role of Interleukin 28B rs12979860 C/T Polymorphism on the Histological Outcome of Chronic Hepatitis C: Relationship with Gender and Viral Genotype. *J Clin Immunol* 2011; 31 (5): 891-9.
- Mangia A, De Ledinghen V, Bailly F, Brahm J, Keiss J, Valantinas J, et al. IL28B genotype is associated with cirrhosis or transition to cirrhosis in treatment-naive patients with chronic HCV genotype 1 infection: the international observational Gen-C study. *Springerplus* 2016; 5 (1): 1990.
- Thiers V, Jaffredo F, Tuveri R, Chodan N, Bréchet C. Development of a simple restriction fragment length polymorphism (RFLP) based assay for HCV genotyping and comparative analysis with genotyping and serotyping tests. *J Virol Methods* 1997; 65 (1): 9-17.
- Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* 2015; 41 (6): 1313-21.
- Noureddin M, Wright EC, Alter HJ, Clark S, Thomas E, Chen R, et al. Association of IL28B genotype with fibrosis progression and clinical outcomes in patients with chronic hepatitis C: a longitudinal analysis. *Hepatology* 2013; 58 (5): 1548-57.

22. Fabris C, Falleti E, Cussigh A, Bitetto D, Fontanini E, Bignulin S et al. IL-28B rs12979860 C/T allele distribution in patients with liver cirrhosis: role in the course of chronic viral hepatitis and the development of HCC. *J Hepatol* 2011; 54 (4): 716-22.
23. de la Fuente S, Citores MJ, Duca A, Cisneros E, Baños I, Vilches C, et al. Interleukin-28B TT genotype is frequently found in patients with hepatitis C virus cirrhosis but does not influence hepatocarcinogenesis. *Clin Exp Med* 2017; 17 (2): 217-23.
24. Trepo E, Pradat P, Potthoff A, Momozawa Y, Quertinmont E, Gustot T, et al. Impact of patatin-like phospholipase-3 (rs738409 C>G) polymorphism on fibrosis progression and steatosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2011; 54 (1):60-9.
25. Liu Y-L, Reeves HL, Burt AD, Tiniakos D, McPherson S, Leathart JB, et al. TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nat Commun* 2014; 5: 4309.
26. Urzúa A, Mezzano G, Brahm J, Poniachik J, Miranda J, Cáceres DD, et al. TM6SF2 rs58542926 Polymorphism is not Associated With Risk of Steatosis or Fibrosis in Chilean Patients With Chronic Hepatitis C. *Hepat Mon* 2017; 17 (4): e12307.