



**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
DOCTORADO AVANCES EN MEDICINA Y DERMATOLOGÍA**

TESIS DOCTORAL

**RIBAVIRINA EN MONOTERAPIA PREVIA AL TRATAMIENTO
COMBINADO CON INTERFERÓN-ALFA PEGILADO EN
PACIENTES CON HEPATITIS CRÓNICA C GENOTIPO 1
PREVIAMENTE NO TRATADOS: ESTUDIO DE LA CINÉTICA
VIRAL, NIVELES PLASMÁTICOS DE RIBAVIRINA Y
MUTACIONES DEL VHC**

ALICIA MARTÍN-LAGOS MALDONADO

GRANADA 2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Alicia Martín-Lagos Maldonado
D.L.: GR 2148-2014
ISBN: 978-84-9083-266-0


A mi madre

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

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal Dña. Alicia Martín-Lagos Maldonado sobre el tema "Ribavirina en monoterapia previa al tratamiento combinado con Interferón-alfa pegilado en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 previamente no tratados: estudio de la cinética viral, niveles plasmáticos de Ribavirina y mutaciones del VHC", ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica y científica de su autora, en condiciones tan aventajadas que la hacen acreedora del título de Doctora, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, a 3 de septiembre de 2014



Fdo. Dr. Javier Salmerón Escobar

**LA DRA. PALOMA MUÑOZ DE RUEDA, TÉCNICO SUPERIOR
DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN DE LA UNIDAD DE APOYO
TÉCNICO-EXPERIMENTAL DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO
SAN CECILIO DE GRANADA**

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal Dña. Alicia Martín-Lagos Maldonado sobre el tema “Ribavirina en monoterapia previa al tratamiento combinado con Interferón-alfa pegilado en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 previamente no tratados: estudio de la cinética viral, niveles plasmáticos de Ribavirina y mutaciones del VHC” , ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica y científica de su autora, en condiciones tan aventajadas que la hacen acreedora del título de Doctora, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, a 3 de septiembre de 2014



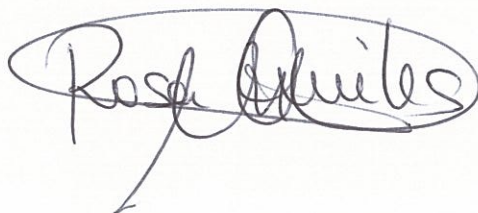
Fdo. Dra. Paloma Muñoz de Rueda

**LA DRA. ROSA QUILES PÉREZ, INVESTIGADORA
CONTRATADA CIBERehb EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO
SAN CECILIO DE GRANADA**

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal Dña. Alicia Martín-Lagos Maldonado sobre el tema “Ribavirina en monoterapia previa al tratamiento combinado con Interferón-alfa pegilado en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 previamente no tratados: estudio de la cinética viral, niveles plasmáticos de Ribavirina y mutaciones del VHC”, ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica y científica de su autora, en condiciones tan aventajadas que la hacen acreedora del título de Doctora, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, a 3 de septiembre de 2014

A handwritten signature in black ink, enclosed in a large, loopy oval. The signature appears to read 'Rosa Quiles'.

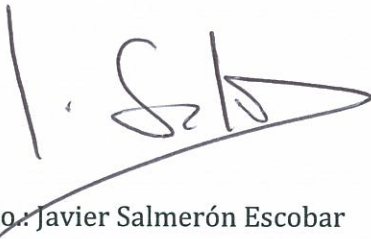
Fdo. Dra. Rosa Quiles Pérez

El doctorando **Alicia Martín-Lagos Maldonado**, y los directores de la tesis el **Dr. Javier Salmerón Escobar**, la **Dra. Paloma Muñoz de Rueda** y la **Dra. Rosa Quiles Pérez**, garantizamos al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis, y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo se han respetado los derechos de otros autores a ser citados cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En Granada, a 3 de septiembre de 2014

Directores de la Tesis :

Doctorando:



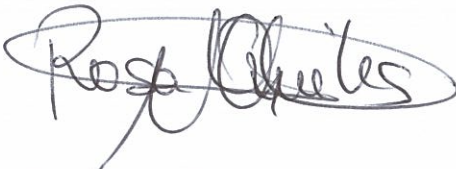
Fdo.: Javier Salmerón Escobar



Fdo.: Alicia Martín-Lagos Maldonado



Fdo: Paloma Muñoz de Rueda



Fdo: Rosa Quiles Pérez

AGRADECIMIENTOS

Como antesala a la lectura de este proyecto de investigación, me gustaría expresar mi agradecimiento más profundo a las personas que han compartido este largo camino de trabajo conmigo, y que de alguna manera han contribuido a la realización de esta tesis. Creo que sin ellas no hubiese sido posible finalizarla.

En primer lugar ***a mis directores de tesis:*** Al Dr. Javier Salmerón, por haber confiado en mi y ofrecerme la oportunidad de realizar una tesis doctoral; a la Dra. Rosa Quiles, por sus largas horas de laboratorio, por su dedicación y su cariño; y a la Dra. Paloma Muñoz de Rueda, por su inmensa paciencia, por su valiosísima implicación y ayuda siempre que la he necesitado, y sobre todo, por ser haber sido capaz de animarme y tranquilizarme en los momentos de agobio que también los ha habido. Gracias a los tres por todo el esfuerzo.

A todos los miembros del Equipo de Investigación CTS-277 del Hospital Universitario San Cecilio de Granada, por acogerme, por su imprescindible labor diaria en el laboratorio, por tantas horas de trabajo en la sombra de cada proyecto, por su cariño; especialmente gracias a Ana Martín por su valiosa participación, a la Dra Ana Gila y al Dr. Luis Rodriguez por su colaboración en la recogida de datos, y a Esther por su amable ayuda con el ordenador. No me puedo olvidar de los compañeros que forman parte de la Plataforma de secuenciación masiva del CIBERehd del Vall d'Hebron Institut de Recerca, por su colaboración y aportación científica a este proyecto.

Al Departamento de Medicina de la Universidad de Granada y al personal de la Escuela de Postgrado, por su atención e información siempre amable y eficaz.

A los pacientes que se ofrecen voluntariamente al servicio de la investigación. Por esta disposición imprescindible para el avance científico.

A mis compañeros y amigos de la Unidad Clínica de Aparato Digestivo del Hospital Universitario San Cecilio. Con vosotros he compartido una etapa maravillosa de mi vida, de la que formareis parte siempre. Gracias por haberme enseñado lo que sé de medicina, por vuestro ejemplo del buen ejercer médico, y por vuestra generosa dedicación en la docencia. Más allá de lo profesional, quisiera agradeceros vuestros consejos y vuestro apoyo: gracias por estar ahí también en los momentos más difíciles. A mi “co-R” Luismi, porque tenerle como compañero “de batallas” ha sido un regalo, y a mi “R mayor” Rosi, por ser siempre “un desahogo” y un ejemplo. Finalmente, a Lola, por todo: por ser tan humana y generosa, por ir “delante de mí” en cualquier cosa que he necesitado, por ayudarme infinita e incondicionalmente; jamás olvidaremos tu apoyo, tú lo sabes.

Y a mi familia gracias infinitas. A mis padres por su amor incondicional y por la educación que me han dado. Gracias a mi padre por ser ejemplo de constancia y templanza, y ser mi referencia; y gracias a mi madre por su fidelidad y confianza ciega en su hija, y por su apoyo infinito. A mi hermana, agradecerle su alegría y preocupación por cada detalle, y a David, gracias por su amor, su paciencia, y por soportarlo todo. Finalmente, gracias, a Irene, Laura, Ana, Raque, Elena e Isa por estar siempre ahí.

Si me olvido de alguien, mis más sinceras disculpas.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	23-26
RESUMEN	27-34
1. INTRODUCCIÓN	35-108
1.1. Epidemiología y vías de transmisión del virus de la hepatitis C	37
1.2. Historia natural y manifestaciones clínicas	38-39
1.3. Virus de la hepatitis C (VHC).....	40-48
1.3.1. Organización genómica	40-44
1.3.2. Clasificación del VHC	44-48
1.3.2.1. Genotipos y subtipos	44-45
1.3.2.2. Cuasiespecies	46-47
1.3.2.3. Dinámica de las cuasiespecies	47-48
1.4. Diagnóstico de la infección por el VHC	49-50
1.5. Tratamiento antiviral	51-75
1.5.1. Candidatos al tratamiento	51-52
1.5.2. Interferón (IFN).....	52-55
1.5.1.1. Tipos de IFN.....	52-53
1.5.1.2. Mecanismos de acción del peg-IFN.....	54-55
1.5.3. Ribavirina	55-73
1.5.3.1. Mecanismos de acción de la RBV.....	55-67
1.5.3.2. Cinética de la RBV	68-70
1.5.3.3. RBV y anemia	71-73
1.5.4. Tratamiento combinado peg-IFN/RBV	74-75

1.6. Respuesta al tratamiento antiviral	76-94
1.6.1. Cinética viral durante el tratamiento	76-78
1.6.2. Factores predictores de respuesta al tratamiento	78-94
1.6.2.1. Factores relacionados con el huésped	78-79
1.6.2.2. Factores relacionados con el tratamiento	79-82
1.6.2.3. Factores virológicos	83-94
1.7. Nuevos tratamientos del VHC	95-108
1.7.1. Inhibidores de la proteasa de 1ª generación	95-96
1.7.2. Nuevas generaciones de DAAs	96-105
1.7.3. Presente y futuro de la RBV con los nuevos DAAs.....	105-108
2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	109-114
2.1. Justificación	111-113
2.2. Hipótesis	113-114
3. OBJETIVOS	115-118
4. PACIENTES Y MÉTODOS	119-138
4.1. Diseño del estudio	121
4.2. Ámbito de estudio	121
4.3. Población de estudio	121-122
4.4. Protocolo de tratamiento	122-123
4.5. Criterios de respuesta	123
4.6. Tamaño de muestra	124
4.7. Variables de estudio	124
4.8. Recogida y análisis de datos	125-129
4.9. Limitaciones y segos	129
4.10 Metodología	130-136
4.11. Análisis estadístico	136-137

4.12. Consideraciones éticas	137-138
5. RESULTADOS I: Cinética viral, tasas plasmáticas de Ribavirina (TPR), niveles de hemoglobina (Hb) y alaninoaminotrasferasas (ALT) y respuesta al tratamiento.....	139-154
5.1. Características de los pacientes y respuesta al tratamiento	141-142
5.2. Cinética viral del VHC durante el tratamiento	143-146
5.3. Estudio de las dosis y tasas plasmáticas de RBV (TPR)	146-149
5.4. Estudio de la anemia	149-150
5.5. Niveles de alanina aminotransferasa (ALT)	151-154
6. RESULTADOS II: Estudio de las mutaciones del VHC	155-188
6.1. Secuenciación directa regiones Core, NS5B, ISDR, PKRbd	157-183
6.1.1. Análisis descriptivo de las mutaciones	157-158
6.1.2. Efecto mutagénico de la RBV	158-169
6.1.3. Mutaciones y respuesta al tratamiento	170-183
6.2. Pirosecuenciación de la región NS5A del VHC	184-188
7. DISCUSIÓN	189-202
8. CONCLUSIONES	203-206
9. ARTÍCULOS Y COMUNICACIONES	207-210
10. BIBLIOGRAFÍA	211-232

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

A: Adenina

Aa: Aminoácido

ALT: Alanina aminotransferasa

Anti-VHC: Anticuerpos frente al virus de la hepatitis C (VHC)

AST: Aspartato aminotransferasa

BOC: Boceprevir

C: Citosina

CICr: Aclaramiento de creatinina

CH: Cirrosis hepática

CHC: Carcinoma hepatocelular

CV: Carga viral

DAA: Agentes antivirales directos (del inglés direct antiviral agents)

EPO: Eritropoyetina

G: Guanina

GPT: Trifosfato de guanosina

Hb: Hemoglobina

HCC: Hepatitis crónica por el virus de la hepatitis C

HVR: Región hipervariable

IC: Intervalo de confianza

IFN: Interferón

IL28: Interleucina 28

IMPDH: inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa

ISDR: Región determinante de la sensibilidad al Interferón

IP: Inhibidores de la proteasa

IPol: Inhibidor de la polimerasa

ISGs: Genes estimulados por el Interferón

FDA: Food and Drug Administration

NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B: Proteínas no estructurales del VHC

nt: nucleótido

NTR: Regiones no traducibles (del inglés *nontranslated regions*)

peg-IFN: Interferón pegilado

PKR: Proteín-kinasa R

PKRbd: Sitio de unión de la proteína kinasa R

RBV: Ribavirina

RC: recidivantes

RdRp: RNA polimerasa viral dependiente de RNA

RNA-VHC: Ácido ribonucleico del virus de la hepatitis C

RT-PCR: Técnica de la transcripción inversa

RVP: Respuesta virológica precoz

RVR: Respuesta virológica rápida

RVS: Respuesta virológica sostenida

SNP: Polimorfismo de un único nucleótido (del inglés *single nucleotide polymorphism*)

TPR: Tasas plasmáticas de RBV

Th1/Th2: Linfocitos T helper-1/-2

TVR: Telaprevir

U: Uracilo

VHC: Virus de la hepatitis C

RESUMEN

RESUMEN

❖ Introducción

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) constituye una de las causas principales de enfermedad hepática crónica a nivel mundial. Se estima que existen aproximadamente unos 170 millones de personas infectadas por el VHC en todo el mundo. La Ribavirina (RBV), un análogo sintético del nucleósido guanosina, ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* una amplia actividad antiviral frente a virus RNA (ácido ribonucleico) y DNA (ácido desoxirribonucleico), y desde hace más de dos décadas constituye un elemento clave en el tratamiento de la hepatitis crónica C (HCC).

Los primeros ensayos clínicos que utilizaron RBV en monoterapia en pacientes con HCC mostraron un efecto beneficioso asociado al descenso de los niveles de ALT y a una mejoría en los hallazgos histológicos de la biopsia hepática, sin embargo, estos efectos no se acompañaron de una respuesta virológica sostenida (RVS) al tratamiento antiviral. Posteriormente, se demostró que la asociación de la RBV al Interferón (IFN) estándar o pegilado (peg-IFN) aumentaba significativamente la probabilidad de alcanzar la RVS frente al uso del IFN en monoterapia, consiguiendo un descenso de los eventos *breakthrough* virales y de la tasa de recidivas. En la actualidad, la RBV mantiene su importancia para el éxito de la triple terapia con Boceprevir o Telaprevir, e incluso, aunque se prevee un futuro próximo con pautas antivirales sin IFN, el abandono de la RBV en las próximos regímenes terapéuticos con nuevas moléculas parece más lejano.

Hasta la fecha, y pese a los esfuerzos invertidos en su conocimiento, el mecanismo de acción de la RBV frente al VHC continúa sin estar completamente

establecido, y se han propuesto varias formas de actuación entre las cuales la posibilidad de su potencial mutagénico ha despertado gran interés. La hipótesis de la “catástrofe error” propone que la RBV se incorpora durante la transcripción viral introduciendo mutaciones en la secuencia de nucleótidos y causando una mutagénesis acelerada que conlleva finalmente a la extinción viral. Estudios llevados a cabo en modelos celulares de otros virus como el poliovirus o el virus de Hantaan, han evidenciado las propiedades mutagénicas de la RBV, sin embargo, los resultados *in vivo* en pacientes infectados por el VHC son más controvertidos. La mayoría de los trabajos desarrollados hasta la fecha sobre el potencial mutagénico de la RBV en pacientes con HCC se han valido de técnicas de secuenciación directa o de clonación de un bajo número de clones, lo cual podría infraestimar el verdadero potencial mutagénico de la RBV al obviar el análisis de mutaciones en las variantes minoritarias de la población viral. Recientemente, el desarrollo de nuevas técnicas de secuenciación masiva o pirosecuenciación, ha supuesto un importante avance en la investigación *in vivo*, al permitir la detección de mutaciones tanto de las quasiespecies mayoritarias como minoritarias, sin embargo, su aplicación en el campo del VHC aún es testimonial. Por otro lado, los estudios con secuenciación directa han demostrado la importancia de las mutaciones en determinadas regiones del genoma viral fundamentales en la respuesta al tratamiento. Si la RBV presentara potencial mutagénico su administración en monoterapia podría inducir la aparición de mutaciones en tales secuencias y condicionar los resultados terapéuticos.

La correlación entre mayores tasas plasmáticas de RBV (TPR) y mejores resultados de respuesta virológica ha sido también demostrada, por lo que el diseño de estrategias dirigidas a aumentar la exposición a la RBV constituye una opción atractiva. La mayoría de los estudios que han incluido una pauta de inducción con RBV en monoterapia antes del tratamiento combinado se han limitado al análisis de su mecanismo de acción, sin analizar la influencia sobre

otros parámetros intracelulares importantes en la valoración de la respuesta al tratamiento.

❖ **Justificación**

Bajo la incógnita de su forma de actuación, nosotros hemos planteado un estudio en el que pacientes con HCC-1 *naive* recibieron RBV en monoterapia 4 semanas antes del tratamiento combinado estándar con peg-IFN/RBV, analizando las mutaciones en la secuencia mayoritaria del genoma viral de la región Core, NS5B y NS5A (ISDR y PKRbd) durante ambos periodos de tratamiento, y valorando la influencia de esta pauta de inducción con RBV en la cinética viral, las TPR, la dinámica de las alaninoaminotransferasas (ALT), el desarrollo de anemia y los resultados terapéuticos. Posteriormente, se ha realizado la secuenciación masiva o pirosecuenciación de la región NS5A, comparando la secuencia del periodo basal y tras un mes con RBV monoterapia, para dilucidar el posible potencial mutagénico letal de la misma.

❖ **Hipótesis**

La RBV en monoterapia previa al tratamiento combinado con peg-IFN/RBV en pacientes con HCC-1 aumenta la predisposición celular al efecto del IFN, y por tanto potencia la susceptibilidad de respuesta viral al tratamiento (disminuyendo la CV y ALT, y aumentando las TPR y el número de mutaciones en regiones importantes para la replicación viral). Además, la RBV podría actuar sobre la población viral aumentando el número de quasiespecies e induciendo la “catástrofe error” .

❖ **Objetivos**

1. Analizar la influencia de la administración de RBV antes del tratamiento combinado con peg-IFN/RBV en la cinética viral, niveles de ALT, anemia, TPR y respuesta al tratamiento antiviral.

2. Analizar el efecto mutagénico de la RBV:

2.1 Estudio de mutaciones en la secuencia mayoritaria de las regiones Core, NS5B, ISDR y PKRbd del genoma del VHC en los periodos basal, tras un mes de RBV monoterapia y tras un mes de peg-IFN/RBV, y su relación con la respuesta al tratamiento antiviral.

2.2 Estudiar las poblaciones genómicas mayoritarias y minoritarias del VHC por pirosecuenciación masiva en la región NS5A en los periodos basal y tras un mes de RBV monoterapia, para demostrar la teoría de la “catástrofe error”.

❖ **Métodos**

Estudio de cohorte prospectivo basado en 27 pacientes de raza blanca, españoles, con HCC-1 *naive*, que recibieron tratamiento con RBV en monoterapia durante 4 semanas previamente al inicio del tratamiento combinado con peg-IFN- α -2a/RBV durante 48 semanas (Grupo A) en el Hospital Universitario San Cecilio (Granada). El Grupo A se ha comparado con otro grupo control histórico (Grupo B) de 54 pacientes (1x2) que fueron seleccionados aleatoriamente mediante el programa SPSS 15.0 de Windows de una base de datos histórica de 119 pacientes con HCC-1 *naive* que recibieron peg-IFN- α -2a/RBV durante 48 semanas en el mismo centro, comprobando que tuviesen muestras de suero en los tiempos de estudio. Se realizaron extracciones de sangre en distintos

momentos del estudio procediendo a la obtención de suero y plasma almacenándose a -80°C . El suero se dividió en 2 alícuotas que se usaron para el estudio virológico (genotipo, RNA-VHC, CV), y dos alícuotas de plasma para el estudio bioquímico y para la TPR. Los momentos del estudio fueron los siguientes:

A. Cinética viral: Grupo A: Basal antes de la RBV en monoterapia y al finalizar la misma (D0), en los días 2, 4, 8 y 15, y en las semanas 4, 12, 24, 48 (final del tratamiento) y 72 (final del seguimiento). Grupo B: antes del inicio del tratamiento combinado (basal), en las semanas 4, 12, 24 y 48 de tratamiento, y en la semana 72 (final del seguimiento).

B. TPR: Al final de la administración de RBV en monoterapia (D0), y en las semanas 4, 8, 12 y 16 del tratamiento combinado en ambos grupos.

C. Niveles de hemoglobina (Hb): antes del inicio del tratamiento (basal), tras completar 4 semanas de RBV en monoterapia en el Grupo A (D0), en las semanas 4, 8, 12, 16, 36, 48 (final del tratamiento) y 72 semanas (final del seguimiento) del tratamiento combinado en ambos grupos.

D. Niveles de ALT: antes del inicio del tratamiento con RBV en monoterapia (basal) y al final del mismo (día 0) en el Grupo A, y en las semanas 4, 12, 24, 36 y 48 (final del tratamiento) y 72 (final del seguimiento) del tratamiento combinado en el Grupo A y B.

En una segunda etapa procedimos al análisis del efecto mutagénico de la RBV en el Grupo A (pacientes que recibieron 4 semanas de RBV en monoterapia). Para ello, se determinaron las mutaciones silenciosas y no silenciosas presentes en la secuencia mayoritaria de las regiones Core, NS5B y NS5A (ISDR y PKRbd) del genoma del VHC por secuenciación directa en el momento basal, tras 4 semanas de RBV en monoterapia y tras 4 semanas de tratamiento combinado con peg-IFN/RBV. Finalmente, se procedió a la secuenciación masiva de la región NS5A completa mediante pirosecuenciación de un paciente del Grupo A seleccionado al azar mediante el programa SPSS para

completar el estudio mutagénico.

❖ **Resultados**

1. Las tasas de respuesta virológica rápida (RVR), respuesta virológica precoz (RVP) y RVS no difirieron entre ambos grupos de tratamiento.

2. Los pacientes que recibieron 4 semanas de RBV en monoterapia (Grupo A) presentaron un mayor descenso del RNA-VHC ($2.3 \log_{10}$ IU/mL vs $1.2 \log_{10}$ IU/mL; $p=0.04$), menores niveles de ALT (23.5 ± 1.33 U/L vs 60.11 ± 18 U/L; $p < 0.001$) y mayores TPR (3.28 ± 1.26 mg/L vs 1.74 ± 0.7 mg/L; $p=0.001$) que los pacientes del Grupo B.

3. No observamos un aumento de las mutaciones de nucleótidos durante la administración de RBV en las regions NS5B, ISDR o PKRbd, y si un descenso de las mutaciones silenciosas (nucleótidos) en la región Core, pudiendo deberse a que un aumento de mutaciones en dicha región, que es muy estable, condicione una selección negativa o que determinadas poblaciones virales se extingan por “error catástrofe” prevaleciendo aquellas menos mutadas.

4. Al separar a los pacientes en RVS y no-RVS, observamos que los pacientes con RVS presentan mayor número de mutaciones en los tres periodos de estudio en las regiones del Core (no silenciosas), y NS5A (ISDR y PKRbd), aunque no encontramos diferencias estadísticamente significativas.

5. La RBV en monoterapia durante 4 semanas no aumenta el número de cuasiespecies de la población viral tras el estudio mediante pirosecuenciación, confirmando la ausencia de su potencial mutagénico

❖ **Conclusiones**

La RBV en monoterapia antes del tratamiento combinado con peg-IFN/RBV no mejora las tasas de respuesta virológica en pacientes con HCC-1 *naive*, pero el mayor descenso de la carga viral y los niveles de ALT, y las mayores TPR, podría reflejar una mayor efectividad del tratamiento posterior con peg-IFN. La RBV no presenta poder mutagénico *in vivo*.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EPIDEMIOLOGÍA Y VÍAS DE TRASMISIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)

El virus de la hepatitis C (VHC) constituye una de las causas más frecuentes de infección viral a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que unos 160 millones de personas están infectadas en todo el mundo, lo que supone aproximadamente un 2.35 % de la población [1]. En España la prevalencia oscila entre el 1,6-2,6%, unos 480.000-760.000 infectados crónicos por el VHC.

Antes de la introducción de los métodos de *screening* para la detección de anticuerpos contra el VHC (anti-VHC), la principal forma de transmisión del VHC era la exposición a sangre contaminada, sobre todo en relación a las transfusiones sanguíneas o del factor antihemofílico, o bien por la exposición en los equipos de hemodiálisis. Sin embargo, desde 1991 el empleo de rutina de los métodos de detección de anti-VHC, supuso el descenso de las hepatitis C postransfusionales, de tal forma que, en la actualidad, el uso de drogas parenterales constituye el principal factor de riesgo de la infección por VHC [1]. Otras formas de transmisión son la exposición accidental con agujas contaminadas (sobre todo entre profesionales sanitarios), y la transmisión vertical madre-hijo (5-10% de los recién nacidos de madres infectadas). Aunque hay datos que indican que la transmisión sexual es posible, sobre todo en personas promiscuas, la vía sexual no constituye una forma muy eficiente de contagio, como tampoco lo es el uso de cocaína intranasal o la lactancia materna.

1.2. HISTORIA NATURAL Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los individuos infectados por el VHC desarrollan inicialmente una hepatitis aguda, caracterizada por su curso silente y tendencia a la cronicidad. La mayoría de los pacientes permanecen asintomáticos, aunque un 25-35% pueden referir síntomas leves e inespecíficos como anorexia, astenia, dolor abdominal o incluso a veces ictericia. La forma fulminante es muy infrecuente.

Entre el 75-85% de los casos la infección progresa a una forma crónica que se define por la persistencia durante más de 6 meses del ácido ribonucleico del VHC (RNA-VHC) en suero. En el grupo restante se produce un aclaramiento espontáneo del virus que determina la curación de la infección, definida por la ausencia de RNA-VHC en suero y la normalización sérica de los niveles de transaminasas. Un 20-30% de los pacientes desarrollan una cirrosis hepática (CH) en un tiempo medio desde el inicio de la infección de 20 años. La **Figura 1** resume la historia natural de la infección por el VHC, y la **Tabla 1** recoge los factores relacionados con una progresión acelerada de la fibrosis hepática [2].

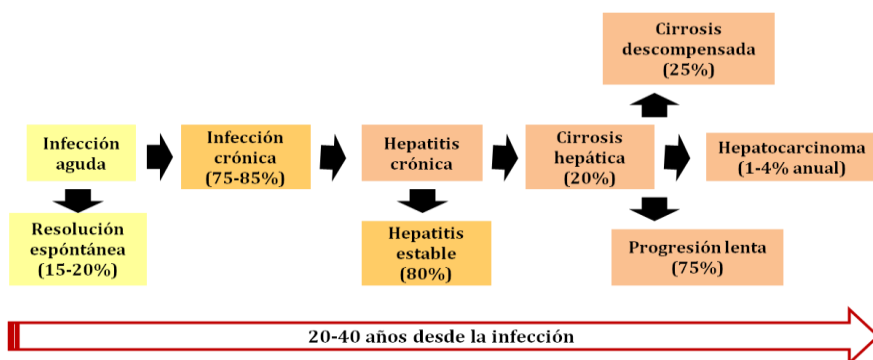


Figura 1. Historia natural de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC)

La CH está ligada a una importante morbilidad derivada de las complicaciones relacionadas con el desarrollo de una hipertensión portal (ascitis, hemorragia digestiva, encefalopatía hepática), registrándose tasas de descompensación hepática del 4% al año durante los primeros 5 años de la infección (**Figura 1**). Por otro lado, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 60% de los hepatocarcinomas (CHC) se relacionan con la CH por VHC, constituyendo en la actualidad la principal indicación de trasplante hepático en adultos a nivel mundial. Otras entidades extrahepáticas como la crioglobulinemia también se asocian a la infección por el VHC.

Tabla 1. Factores asociados a la progresión de fibrosis hepática

Factores relacionados con el huésped

Edad > 40 años en el momento de la infección

Sexo masculino

Raza afroamericana (progresión lenta, peor respuesta al tratamiento)

Polimorfismos genéticos (HLA tipo I y tipo II, citoquinas profibróticas)

Factores metabólicos : EH, DM, obesidad

Nivel elevado ALT

Coinfección VIH, VHB, esquistosomiasis

Coexistencia de hemocromatosis

Factores medioambientales

Alcohol

Tabaco

Tratamiento

Factores virológicos ---- No evidencia definitiva

Genotipo

Carga viral

HLA, complejo mayor de histocompatibilidad; EH, esteatosis hepática; DM, diabetes mellitus; ALT, alanino aminotransferasa; VIH, virus de la inmunodeficiencia humana VHB; virus de la hepatitis B.

1.3. EL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)

1.3.1. ORGANIZACIÓN GENÓMICA

El VHC pertenece a la familia de los *Flaviviridae*, siendo el único miembro del género *Hepacivirus*. Se trata de un pequeño virus envuelto de unos 40-60 nm de diámetro constituido por una única cadena de RNA de sentido positivo de aproximadamente 9.600 nucleótidos (nt) con un solo marco de lectura abierto (ORF del inglés "open reading frame"). El ORF se encuentra flanqueado por dos regiones no traducibles en sus extremos 5' y 3' terminales (*nontranslated regions, NTRs*), y codifica una poliproteína de aproximadamente 3.010 aminoácidos (Aa). Por la acción de diversas proteasas tanto virales como del huésped, la poliproteína es procesada dando lugar a tres proteínas virales estructurales (S) (proteína Core, glicoproteínas de la envuelta E1 y E2), y a siete proteínas virales no estructurales (NS) (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (**Figura 2**) [3].

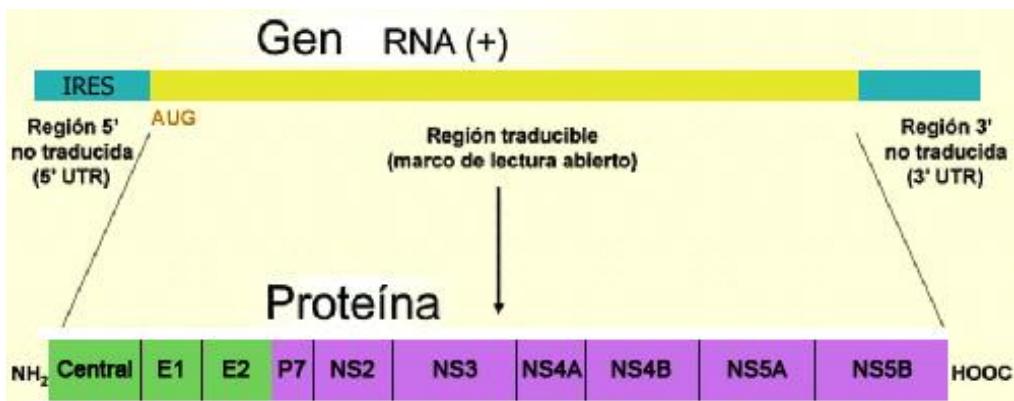


Figura 2. Organización genómica del VHC

Las regiones NTR son zonas muy conservadas que constituyen elementos claves para la replicación y transcripción del genoma viral. El extremo 5'NTR se inicia con una región de unos 340 nt que precede el codón de arranque de la poliproteína. Se trata de una región altamente conservada que contiene el lugar de entrada interno al ribosoma (*internal ribosomal entry site, IRES*) e interactúa directamente con la subunidad 40S ribosomal durante el inicio de la transcripción, permitiendo la traducción de la poliproteína. Por otro lado, el extremo 3'NTR está formado por unos 230 nt y contiene el codón de "stop", también esencial en la replicación.

La proteína Core es una proteína citosólica de membrana que constituye la nucleocápside viral. Se trata de una secuencia de unos 191 Aa altamente conservada. Además de encapsular el RNA viral, su extremo carboxiterminal (C-terminal) está implicado en la señalización para el transporte de la proteína E1 dentro del retículo endoplasmático, e influye en la transcripción celular, el metabolismo lipídico, la apoptosis celular y la respuesta inmune. También ha sido relacionada directa o indirectamente con el desarrollo de esteatohepatitis y CHC [4].

El complejo proteico de la envuelta está constituido por 2 proteínas transmembrana altamente glicosiladas, la E1 y la E2, que juegan un papel fundamental en la entrada a la célula huésped. Cada una de ellas presenta un determinado número de puntos de glicosilación que constituyen regiones muy estables del virus, y que varían en número según el genotipo viral. En el extremo aminoterminal (N-terminal) de la glicoproteína E2 se localizan las regiones más variables de todo el genoma del VHC, las cuales se conocen como regiones hipervariables HVR1 y HVR2. La HVR-1 es el principal determinante de la respuesta de anticuerpos neutralizantes. Numerosos estudios se han referido a la heterogenicidad genética de la región HVR1, que puede permitir que el VHC eluda al sistema inmune facilitando la infección crónica, así como influenciar los

resultados del tratamiento antiviral [5] . La proteína p7, de unos 63 Aa, se localiza entre la región E2 y los genes NS2, formando canales iónicos. Aunque no interviene directamente en la replicación del RNA-VHC, es esencial para la producción de las partículas virales, participando en la unión y liberación de los viriones infectados.

El grupo de las 7 proteínas NS son necesarias para completar el ciclo de replicación viral, aunque sus funciones aún no han sido completamente dilucidadas (**Tabla 2**).

La proteína NS2 parece que interacciona con otras proteínas, tanto estructurales como no estructurales, del VHC. Junto con la proteína NS3 compone la proteasa NS2-3, cuya función es el procesamiento proteolítico de la región no estructural, participando es el ensamblaje del virión; y se asocia a las NS5A y NS5B formando parte del complejo de replicación. La proteína NS3 es una proteína de membrana multifuncional, con actividad nucleótido trifosfatasa (NTPasa) y helicasa, fundamental en la replicación del VHC, y presenta también actividad serín-proteasa. Recientes avances en el poco entendimiento de los mecanismos moleculares de esta enzima se refieren a su inhibición específica como una nueva estrategia antiviral, aunque los estudios con inhibidores de la helicasa están menos desarrollados que los de los inhibidores de la proteasa (IP).

Tabla 2. Proteínas estructurales (S) y no estructurales (NS) del VHC

Proteína	Peso molecular (kDa)	Función
S		
Core	21	Proteína de la nucleocápside
E1	31-35 (21 sin N-glucosilación)	Proteína de la envoltura del virión
E2	68-72 (36 sin N-glucosilación)	Proteína de la envoltura del virión
P7	7	Viroporina (interviene en la maduración y liberación de la partícula vírica)
NS		
NS2	23	Componente de la proteasa NS2-3
NS3	70	Componente de la proteasa NS2-3, serin-proteasa, NTPasa y helicasa
NS4A	8	Cofactor para la serin-proteasa NS3
NS4B	27	Desconocida
NS5A	58	Parece intervenir en la patogenia de la lesión hepática, de la esteatosis, del CHC y en la resistencia al IFN
NS5B	68	RNA-polimerasa RNA dependiente (RdRp)

E, proteína de la envuelta; S, Proteínas estructurales; NS, Proteínas no estructurales.

La proteína NS4A actúa como cofactor de la proteína serina NS3, participando en su orientación hacia la membrana del retículo endoplasmático y contribuyendo al ensamblamiento viral. La actividad proteasa NS3-NS4A es también una diana terapéutica atractiva de los nuevos fármacos IP. En cuanto a la NS4B, aunque su función es más desconocida, se ha relacionado con la renovación de las membranas celulares del huésped, probablemente participando en la selección del lugar de unión de la replicasa viral.

Finalmente, la proteína NS5 contiene la actividad RNA polimerasa, y ha demostrado su papel en la replicación viral y modulación de las vías de señalización celular. La NS5A contiene un dominio I conservado, y un dominio II y III más variables entre genotipos. Participa en la modulación de la respuesta antiviral del huésped mediada por el Interferón (INF), ya que contiene la llamada región determinante de la sensibilidad al INF (del inglés *IFN sensitivity-determining region*, ISDR) y la PKRbd (del inglés *RNA-activated protein kinase binding domain*, dominio de unión a la PKR), cuya heterogenicidad genética ha demostrado un papel fundamental en la predicción de la respuesta al tratamiento con IFN [6, 7]. Asimismo, la variabilidad genética del dominio V3 de la región NS5A también parece relacionarse con la respuesta al tratamiento antiviral. La NS5A se considera determinante en la unión con la proteína Core, y así en el ensamblaje del virus, y se ha propuesto que también actúa como cofactor de la NS5B, que codifica la RNA polimerasa RNA-dependiente (RdRp) viral, enzima de la replicación del VHC.

1.3.2. CLASIFICACIÓN DEL VHC

1.3.2.1. Genotipos y subtipos

Enomoto y cols., en un estudio realizado en pacientes japoneses se refirieron por primera vez a la existencia de varios genotipos mayores y subgenotipos, más tarde identificados como subtipos [8]. Analizando la variabilidad genética del VHC, se han descrito 6 genotipos mayores que como media difieren entre un 30-40% de nucleótidos (nt). Cada grupo principal contiene una serie de subtipos más estrechamente relacionados que difieren unos de los otros entre el 15-25% de la secuencia de nt, y de los que se han descrito al menos 90 [9]. El genotipo mayor se designa por números (1-6; VHC-1,2,3...), mientras que los subtipos son denominados por letras minúsculas (1a y

1b, 2a, 2b y 2b...) (**Tabla 3**). Recientemente se ha identificado un 7^o genotipo en pacientes de África central. Es interesante señalar el descubrimiento de formas recombinantes (RF, del inglés *recombinant forms*) denominados intragenotipos y los intersubtipos, con una baja prevalencia, y cuya relevancia biológica aún está por establecer, pues existe la posibilidad de que se trate de infecciones mixtas más que de nuevas formas virales.

Tabla 3. Clasificación de los genotipos según las secuencias de las regiones Core, E1, NS5A

Similitud secuencias	Denominaciones	Designación
Entre el 60-70%	Genotipos	1-7
Entre 75-85%	Subtipos	a-z
Entre 90-98%	Cuasiespecies	

Aunque todos los genotipos pueden aislarse en cualquier región del mundo, existe cierta distribución geográfica, de tal forma que los genotipos 1a y 1b constituyen el 65-80% de los casos de Occidente, seguido del genotipo 2 y 3. El subtipo 3b es más común en Asia, y el genotipo 4 predomina en África y los países orientales.

No se han encontrado diferencias entre la patobiología del VHC en cada uno de sus genotipos, cursando clínicamente de forma similar y sin claras diferencias en el pronóstico de la enfermedad hepática [10]. No obstante, algunos estudios han demostrado una relación entre el genotipo 3 y la esteatosis hepática, observándose una mejoría de la misma tras la eliminación del virus. La principal propiedad clínica determinada por el genotipo es la diferencia en la susceptibilidad al tratamiento antiviral basado en IFN. En numerosos estudios de distintas áreas geográficas se ha demostrado que el genotipo 1b es el más resistente al IFN, así como al tratamiento combinado con Ribavirina (RBV) [11].

1.3.2.2. Cuasiespecies

El VHC, al igual que otros virus RNA, presenta una amplia heterogeneidad genética, resultado de una alta tasa de mutaciones (aproximadamente 10^4 mutaciones por cada nt incorporado), y que conlleva la aparición de variantes genómicas comúnmente llamadas cuasiespecies [12]. Esta variabilidad es la causante de que el VHC circule en la sangre como una población de variantes genómicas que difieren de la secuencia original de nts entre un 1% y un 5%, y entre sí en uno o más nts (**Figura 3**).

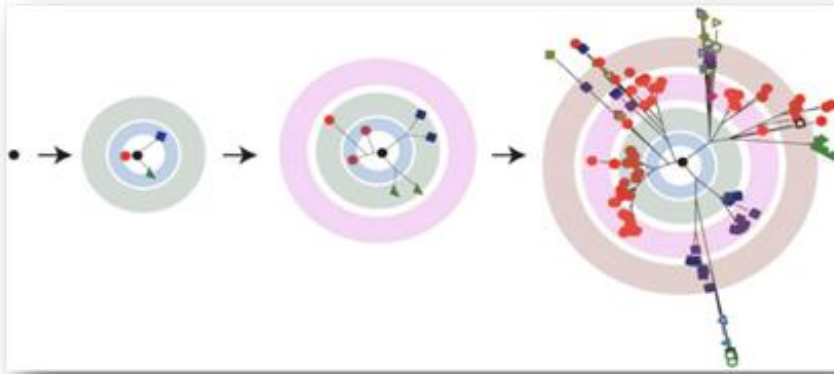


Figura 3. Cuasiespecies. *El VHC muta dando lugar a distintas variantes mutantes en cada ciclo replicativo. Cada brazo representa dos variantes unidas por una mutación, y cada círculo un ciclo replicativo. El resultado es una población de secuencias mutantes rodeando a la secuencia mayoritaria. (Figura modificada de Laurin A y cols. PLoS Pathogens 2010 [12])*

La aparición de mutaciones en el genoma viral surge como consecuencia de varios procesos mutagénicos:

- **Factores virológicos:** el RNA pequeño y compacto del VHC, junto con la alta tasa de replicación viral y la incapacidad de RdRp de corrección de errores, favorecen la aparición de mutantes genómicas cuya frecuencia varía de 1.4×10^3 a 1.9×10^3 sustituciones por nt y por año. La mayoría de las mutaciones son

deletéreas. Las subpoblaciones mejor adaptadas serán seleccionadas transmitiendo la nueva información genética a su progenie.

■ Factores del huésped: En los virus RNA las regiones que varían con mayor frecuencia son aquellas expuestas a la acción del sistema inmune, de tal manera que se ha propuesto que la variación antigénica también es resultado directo de la selección de variantes como respuesta a la inmunidad humoral y celular. Las mutaciones como mecanismo de escape a la presión del sistema inmune contribuyen a la cronificación de la infección y supone un obstáculo en su control terapéutico. Este proceso suele ocurrir en los primeros estadios de la infección.

■ Factores externos: La presión del tratamiento antiviral induce la aparición de mutaciones que pueden determinar la aparición de nuevas cepas virales resistentes al tratamiento, o bien interferir en la replicación viral favoreciendo la eliminación del virus.

1.3.2.3. Dinámica de las cuasiespecies

La dinámica de las cuasiespecies confiere a los virus RNA una gran adaptabilidad. Las variantes mejor adaptadas se seleccionan y transmiten la nueva información genética a su progenie. La cuasiespecie predominante es aquella con una mayor capacidad replicativa en el huésped. Sin embargo, uno de los fundamentos de la teoría de las cuasiespecies, es que la selección de una determinada variante genómica no depende exclusivamente de su adaptabilidad individual, sino también de su relación con las demás mutantes, en lo que se conoce como acoplamiento mutacional. Así, una mutante poco adaptada puede mantenerse con una frecuencia mayor a la esperada por su mayor proximidad genómica con sus variantes vecinas (acoplamiento) seleccionadas positivamente.

Por lo que cada variante contribuye a la adaptabilidad del conjunto de la población, y la selección actúa sobre poblaciones más que individualmente [13].

Durante la infección, el número y la composición de mutantes en la población viral cambian constantemente en relación con las modificaciones del entorno. Cuando las secuencias genómicas presentes en ese momento son las mejor adaptadas existe una baja tasa de mutaciones, y éstas tienden a ser deletéreas y a disminuir la capacidad general de replicación de los genomas que lo portan, sugiriendo una selección negativa que elimina las nuevas variantes manteniendo las establecidas. Este tipo de selección es muy importante para aquellas regiones del genoma viral que contienen motivos genéticos que han de ser preservados. Por el contrario, cuando el conjunto replicativo no está bien adaptado al medio, una tasa de mutaciones elevada se relaciona con la presión selectiva positiva que tiende a seleccionar a las nuevas mutaciones que comporten una ventaja adaptativa al nuevo entorno, de manera que especies minoritarias pueden ser seleccionadas y convertirse en la variante mayoritaria en el nuevo medio.

1.4. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR EL VHC

▪ Test serológicos y moleculares

La mejor estrategia para la detección de la infección del VHC es realizar un *screening* de rutina en personas con algún factor de riesgo identificable y/o una historia de exposición al VHC. Existen 2 tipos de tests usados en el diagnóstico y manejo de la infección por el VHC [11]:

A. Test serológicos: Detectan anti-VHC específicos y constituyen la primera prueba realizada para el diagnóstico de la infección por el VHC. La técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA) usada en la actualidad detecta una mezcla de anticuerpos dirigidos contra varios epítomos de la proteína Core o proteínas NS del VHC, y tiene una especificidad cercana al 99%. La técnica RIBA (*Recombinant Immuno Blotting Assays*) se reserva para diferenciar los falsos positivos de anti-VHC del aclaramiento viral.

B. Test moleculares cualitativos y cuantitativos: Detectan el RNA-VHC. Los métodos de detección cuantitativos identifican la existencia de una infección activa y determinan la carga viral (CV). La técnica de la transcripción inversa (RT-PCR) constituye en la actualidad el método estándar. Su sensibilidad es alta, con límites de detección de hasta 10-50UI/ml, y su especificidad excelente, oscilando entre el 98-99%. Los test cualitativos identifican el genotipo viral previamente al inicio del tratamiento.

Tras una exposición aguda, el RNA-VHC normalmente es detectado antes que los anti-VHC, pero ambos marcadores pueden presentarse en distintas situaciones, y su interpretación debe ser cuidadosa (**Tabla 4**) [11].

Tabla 4. Interpretación de los marcadores del VHC

Anti-VHC	RNA-VHC	Interpretación
+	+	Infección aguda o crónica (valorar contexto clínico)
+	-	Resolución Infección aguda en periodo de baja viremia Falso positivo/Falso negativo
-	+	Infección aguda temprana Infección crónica en inmunodeprimidos Falso positivo
-	-	Ausencia de infección

Anti-VHC, anticuerpos frente al virus de la hepatitis C; RNA-VHC, ácido ribonucleico del virus de la hepatitis C

- **Biopsia hepática**

Aunque se han desarrollado métodos no invasivos (fibrotest, elastografía...), la biopsia hepática continúa siendo el gold estándar para estimar el grado de fibrosis hepática. Sin embargo, se trata de un procedimiento costoso y no exento de riesgos, reservado para determinados casos. Existen tres indicaciones principales: a) obtener información sobre el estadio de afectación hepática, así como sobre otras entidades como la esteatosis hepática que puedan influir en la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento; b) ayudar a la decisión del inicio de la terapia antiviral; y c) determinar la presencia de fibrosis avanzada o cirrosis necesaria en el seguimiento del CHC y/o *screening* de varices.

1.5. TRATAMIENTO ANTIVIRAL

1.5.1. CANDIDATOS AL TRATAMIENTO

El 72-98% de los casos de hepatitis aguda C sintomáticos se curan, y, puesto que estos pacientes pueden aclarar el virus espontáneamente en las primeras 12 semanas, sólo se recomienda tratamiento ante la persistencia de la infección tras este tiempo. En los casos asintomáticos está indicado el inicio del tratamiento precozmente, dado que la probabilidad de eliminar el virus es escasa.

En el casos de hepatitis crónica por el VHC (HCC), todos los pacientes *naïve* (pacientes que no han recibido ningún tratamiento previo), con una edad igual o superior a 18 años, y con una enfermedad hepática compensada (bilirrubina total (BT) suero <1.5 g/dl, INR <1.5, albumina >3.4 g/dl, plaquetas >75.000/mm³, y sin encefalopatía hepática ni ascitis), deberían ser considerados candidatos a tratamiento antiviral salvo existencia de alguna contraindicación **(Tabla 5)**.

Tabla 5: Contraindicaciones del tratamiento de la hepatitis crónica C (HCC)

Contraindicación absolutas	Contraindicaciones relativas
<ul style="list-style-type: none"> • Cirrosis descompensada • Trastorno psiquiátrico no controlado • Condición autoinmune con riesgo de exacerbación por IFN/RBV • Hipertiroidismo no tratado • Comorbilidad severa no controlada (EPOC, HTA severa, fallo cardiaco, coronariopatía, DM mal controlada) • Embarazo o incapacidad para cumplir tratamiento anticonceptivo • Menores de 3 años • Hipersensibilidad fármacos antivirales 	<ul style="list-style-type: none"> • Trasplante de órganos sólidos (salvo hepático) • Hemoglobinopatía • Anemia (Hb <10 g/dl) • Neutrofilos <750/mm³ • plaquetas < 40000/mm³ • Enfermedad cerebro-vascular • Insuficiencia renal avanzada (ClCr < 50 ml/min)

IFN, Interferón; RBV, Ribavirina; HTA, hipertensión arterial; DM, diabetes mellitus; EPOC, enfermedad pulmonar obstructiva crónica; Hb, hemoglobina; ClCr, aclaramiento de creatinina.

1.5.2. INTERFERÓN (IFN)

1.5.2.1. Tipos de IFN

Los IFNs son proteínas o glicoproteínas que producen distintas células como respuesta a estímulos diversos, entre los que destacan las infecciones víricas, y que presentan una gran variedad de acciones. Se diferencian 3 tipos en base a sus características estructurales y biológicas: IFN- α , IFN- β (IFN tipo I) e IFN- γ (IFN tipo II). En la práctica clínica usamos el IFN- α .

El IFN- α se une de forma covalente con la molécula de polietilenglicol formando el IFN- α pegilado (peg-IFN- α). De esta manera se reduce la velocidad de absorción subcutánea, el aclaramiento renal y la degradación del IFN, consiguiendo aumentar su concentración en plasma y su vida media, además de disminuir la inmunogenicidad de la proteína [14]. En la actualidad existen 2

formulaciones de peg-IFN- α aprobadas para el tratamiento de la HCC: peg-IFN- α -2a (Pegasys, de Roche) y peg-IFN- α -2b (Peg-Introm, de Shering-Plough). La **Tabla 6** recoge las principales diferencias entre ambas formulaciones.

Tabla 6. Diferencias entre peg-IFN- α -2a y peg-IFN- α -2b

	peg-IFN- α -2a	peg-IFN- α -2b
Tamaño	Gran molécula ramificada de PEG (40kDa)	Pequeña molécula lineal de PEG (12kDa)
Vida media	80 h (50-140h)	40 h (22-60h)
Dosis	180 μ g/semana sc	1,5 μ g/kg/semana sc
Eficacia *	Mayor	Menor

**En un reciente metaanálisis se ha observado que el peg-IFN- α -2a consigue un leve beneficio en las tasas de RVS frente al peg-IFN- α -2b, probablemente por su mejor perfil farmacocinético, y que factores como el grado de fibrosis, la edad, la resistencia a la insulina o la carga viral pueden influir también en las diferencias entre ambos compuestos [15].*

peg-IFN, Interferón pegilado; PEG, polietilenglicol; sc, subcutáneo; h, horas

Los estudios han demostrado que el IFN- α normaliza los niveles de transaminasas (AST, aspartato aminotransferasa y ALT, alanina aminotransferasa) y consigue tasas de respuesta virológica sostenida (RVS) entorno al 17% tras 12 meses de tratamiento con 3 MU/3 veces a la semana [16]. Sin embargo, su forma pegilada presenta mayor eficacia. Se observó que 180 μ g/semana de peg-IFN α -2a en monoterapia durante 48 semanas aumenta la tasa de RVS frente al IFN- α -2a (30-39% vs 8-19%) [17]. Análogamente, el peg-IFN- α -2b administrado en monoterapia según peso (1.5 μ g/kg/semana) durante 48 semanas también mejora la RVS frente al IFN- α -2b (23% frente al 12%) [18].

1.5.2.2. Mecanismos de acción del peg-IFN- α

El peg-IFN- α ejerce su efecto antiviral fundamentalmente por dos mecanismos distintos pero complementarios:

- **Inhibición de la replicación viral**

El peg-IFN- α tiene un potente efecto antiviral directo al unirse a receptores de la superficie celular activando la vía de señalización de las proteínas activadoras de la transducción (STAT-quinasas) y, finalmente, la expresión de los genes estimulados por el IFN (ISGs, del inglés *interferon-stimulated genes*) y la traducción de numerosas proteínas antivirales. Los ISGs median los efectos biológicos del IFN, como son la inhibición de la replicación viral, la inhibición del crecimiento celular y la apoptosis. Entre las proteínas activadas en el huésped destaca la proteína-quinasa R (PKR), que presenta múltiples funciones celulares: proapoptóticas, de regulación del crecimiento y de diferenciación celular, e inhibición de la síntesis de proteínas en respuesta a la infección viral por inactivación del factor de iniciación de la traducción [19].

- **Efecto inmunomodulador**

El peg-IFN- α estimula la inmunidad innata (células *Natural Killer*, NK) y adquirida (células T CD 4+, CD8+) frente al VHC mediante la inducción de genes que participan en la presentación de antígenos, y la activación de las células T. Consigue así la eliminación de las células infectadas por el VHC. También aumenta la producción del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) HLA (antígeno leucocitario de histocompatibilidad) de clase I y de clase II, y promueve la respuesta de los linfocitos T-helper-1 (Th1) (citotóxica), frente a la respuesta de los linfocitos T-helper-2 (Th2). Todas estas acciones contribuyen a

prevenir el “agotamiento” inmunológico y favorecen que haya una respuesta inmune adaptativa específica contra el VHC [20].

Finalmente, se ha sugerido un papel del IFN en la prevención del CHC, en relación a su efecto anti-proliferativo, anti-angiogénico y/o anti-tumoral, sobre todo en pacientes no cirróticos que consiguen una RVS. Sin embargo, su utilidad como tratamiento de mantenimiento para la prevención de la progresión de la fibrosis y del CHC en pacientes que no responden al tratamiento es más controvertida, aunque existen trabajos recientes que apoyan el tratamiento de mantenimiento con IFN en pacientes con alto grado de fibrosis o CH, y en la prevención de la recidiva del CHC postransplante.

1.5.3. RIBAVIRINA(1-β-D-RIBOFURANOSIL-1,2,4-TRIAZOL-3-CARBOXAMIDA)

La Ribavirina (RBV) es una purina oral sintética análogo del nucleósido guanosina que ha demostrado un amplio espectro de acción en virus DNA (ácido desoxirribonucleico) y RNA, tanto *in vitro* como *in vivo*. *In vivo*, la RBV entra en la célula hepática como un profármaco y se convierte en monofosfato de RBV (RMP), difosfato de RBV (RDP) y trifosfato de RBV (RTP) por la acción secuencial de 3 quinasas celulares.

1.5.3.1. Mecanismos de acción de la RBV

Inicialmente se pensaba que la RBV tenía un efecto “cosmético” disminuyendo sólo los niveles de transaminasas en pacientes infectados por el VHC. En 1991, un estudio piloto demostró que la RBV conseguía una reducción significativa en los niveles de ALT, pero de forma transitoria durante el tratamiento de la HCC, y sin asociar una respuesta virológica [21]. A partir de

entonces, otros trabajos confirmaron el beneficio temporal de la RBV en la actividad inflamatoria hepática [22].

La adicción de la RBV al IFN o peg-IFN aumentó significativamente las tasas de RVS frente a cualquiera de ellos en monoterapia, mediado principalmente por una disminución de las tasas de recaídas [23, 24]. Se podría pensar que la RBV es un adyuvante del IFN, ya que aparentemente no disminuye la CV, presentando un efecto sinérgico, cooperando y potenciando al IFN; sin embargo, el mecanismo por el cual se produce este beneficio aún no se conoce completamente, y son varias las formas de acción propuestas (**Figura 4**) [25, 26, 27].

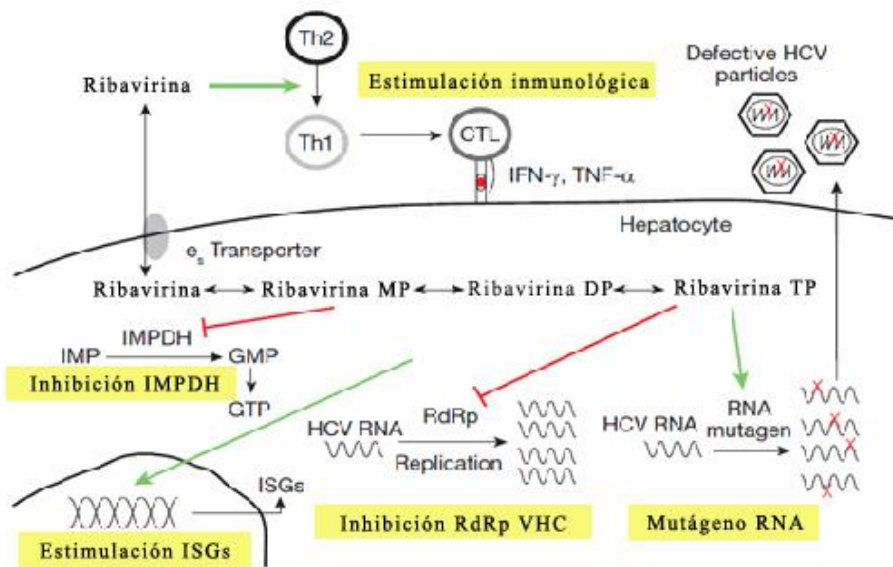


Figura 4: Mecanismos de acción de la RBV frente al VHC

GMP, monofosfato de guanósina; GTP, guanósina trifosfato; IMPDH, inosina monofosfato deshidrogenada; RDP, difosfato de RBV; RdRp, RNA-polimerasa RNA dependiente; RMP, monofosfato de RBV; RTP, trifosfato de RBV; Th1, T helper 1 y Th2, T helper 2. (Figura modificada de Thomas E y cols. Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 2012) [25].

- **Inhibición de la actividad inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH)**

La inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) es una enzima esencial en la conversión de la IMP a xantina 5-monofosfato, un metabolito intermedio del trifosfato de guanosina (GTP) necesario para la replicación viral. Se ha demostrado que el monofosfato de RBV (RMP), un metabolito intracelular menor de la RBV, inhibe de forma competitiva las dos isoformas de la enzima IMPDH, llevando así a una depleción del pool intracelular de GTP, y por ello a una inhibición de la síntesis del RNA viral (**Figura 4**).

Los estudios *in vitro* en líneas celulares hepáticas humanas usando sistemas de replicación subgenómica del VHC, evidenciaron un efecto supresor sobre la replicación viral mediado por la inhibición de la IMPDH con el empleo de RBV en monoterapia [28]. Los resultados en pacientes no corroboraron este beneficio, sin embargo, en un estudio en pacientes *naive* se observó que cuando la RBV se combina con peg-IFN y otro inhibidor de la IMPDH (VX-497) se produjo un descenso de la CV [29]. Parece que la inhibición de la IMPDH aislada no constituye la principal forma de actuación de la RBV frente al VHC, y que este efecto sólo se obtiene en presencia del IFN- α .

Los autores que apoyan esta forma de actuación de la RBV, sugieren que la inhibición de la IMPDH mediada por el descenso del pool de GTP, podría también facilitar su acción mutagénica y/o su efecto inhibidor de la RdRp, y de esta manera, la combinación de la inhibición de la IMPDH sumado al resultado de otro mecanismo de acción directo, podría explicar la eficacia de la RBV.

- **Inhibición de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp)**

Estudios *in vitro* han demostrado que la RBV en su forma trifosforilada (RTP), y con menor afinidad en otras formas fosforiladas, se incorpora como sustrato de la polimerasa viral en lugar de la guanina (G) frente a citosina (C) y uracilo (U), inhibiendo la elongación de la cadena de RNA (“condón de terminación”), o evitando la unión de otros nt endógenos durante la replicación del genoma viral [30].

Uno de los argumentos más fuertes en contra de este mecanismo de acción, es el hecho de que la RBV ha demostrado en los estudios *in vitro* un efecto inhibidor de la RdRp muy débil, y que mantiene su actividad antiviral frente a la mayoría de las cepas del VHC que contienen mutaciones de resistencia en la región NS5B tras el tratamiento con otros inhibidores análogos de nucleósidos [31]. Sin embargo, otros trabajos han identificado mutaciones potenciales en los genes de la RdRp que pueden conferir resistencia a la RBV en pacientes que la recibieron previamente [32]. Los propulsores de este mecanismo de acción reconocen que el efecto inhibitorio de la RBV sobre la RdRp es débil, por lo que no ejerce una presión selectiva suficiente que conduzca a la expansión de cepas resistentes, sin embargo, durante la administración simultánea del IFN, se produce una disminución de la CV que aumenta la importancia de dicho efecto inhibitorio sobre la polimerasa. En cualquier caso, se trata de un efecto antiviral directo, transitorio y precoz, por lo que parece poco probable que las propiedades antivirales directas de la RBV jueguen un papel importante en la eliminación del VHC durante el tratamiento combinado.

- **Efecto inmunomodulador**

La respuesta inmune mediada por los linfocitos Th-1 ha sido asociada con un aclaramiento del VHC, mientras que un predominio de la respuesta de los linfocitos Th-2 favorece el curso crónico de la infección. Se ha demostrado que la RBV ejerce su influencia en la respuesta inmune adaptativa del huésped potenciando la activación de los linfocitos Th1 con una mayor producción secundaria de sus citoquinas (como IL-2, IFN- γ e IFN- α , TNF- α), e inhibiendo la producción de IL-4 por linfocitos Th2, tanto en modelos animales como humanos [33]. Esto deriva en un aumento de la lisis de los hepatocitos infectados y una reducción de la producción de viriones.

Aunque no todos los estudios coinciden, ha sido evidenciado que los pacientes tratados con IFN- α y RBV tienen una mayor respuesta inmune específica comparado con aquellos que reciben IFN en monoterapia, y esto se ha correlacionado con mayores tasas de RVS [34, 35]. El mecanismo por el cual la RBV altera la producción de citoquinas por los linfocitos Th no está del todo aclarado, pero podría existir un nexo entre la RBV y las propiedades inmunomoduladoras del IFN- α/β . Sin embargo, aún existe controversia sobre la contribución de este mecanismo a la respuesta virológica durante el tratamiento combinado.

La observación de que la RBV en monoterapia induce una mejoría bioquímica en los niveles de ALT, sugiere también su papel inmunomodulador. La RBV, por un mecanismo poco aclarado, conseguiría la curación de las células infectadas sin destruirlas (mecanismo no citolítico), y así se explicaría el descenso en los niveles de ALT y el beneficio histológico.

- **Modulación de la expresión de los genes estimulados por el IFN (ISGs)**

Los estudios han evidenciado que la expresión hepática basal de los ISGs es mayor en pacientes que no responden al tratamiento que en respondedores (RVS) [36]. Se ha propuesto que una alta expresión de estos genes resulta en una mayor producción endógena de IFN acompañada de una regulación al alza de las vías inhibitorias del mismo. Por eso, la administración del INF exógeno durante el tratamiento antiviral podría ser menos efectiva en aquellos individuos con mayores niveles de expresión de ISGs basal.

Varios autores han demostrado que la incorporación de la RBV al tratamiento con IFN se opone a la activación de las vías inhibitorias del IFN. Análisis *in vitro* [37] e *in vivo* [38] apoyan que la RBV puede aumentar la expresión de los receptores del IFN- α , sugiriendo una inducción en la cascada de señalización del mismo que resulta en una potenciación de su efecto antiviral. Rotmann y cols. administraron 4 semanas de RBV en monoterapia antes del tratamiento combinado con peg-IFN/RBV y evidenciaron un discreto aumento de la expresión de los ISGs con la asociación de peg-IFN/RBV, pero no con RBV en monoterapia, concluyendo que la RBV puede actuar potenciando la respuesta hepática del IFN [39]. El efecto de la RBV sobre la cascada de señalización STAT en respuesta al IFN- α (exógeno) ha sido también evidenciado recientemente en otro trabajo [40]. No obstante, aún se requieren más estudios que aclaren, entre otros aspectos, si este efecto indirecto sobre los hepatocitos podría justificar también la respuesta bioquímica a la RBV durante el tratamiento.

- **Inhibición del factor de transcripción eIF4E**

Recientemente se ha propuesto como nueva forma de actuación que la RBV podría inhibir el factor de transcripción eIF4E, el cual es necesario para la transcripción dependiente del cap del RNA mensajero [27]. El cap o caperuza es en las células eucariotas el lugar de inicio de la transcripción una vez que el RNA mensajero se encuentra dentro del ribosoma. El genoma del VHC no presenta cap en su extremo 5', sino que es dependiente del IRES para el inicio de la transcripción por la polimerasa. Mediante la inhibición de dicho factor la RBV podría interferir en la transcripción celular, y así en la replicación viral.

- **Efecto mutagénico de la RBV**

La tasa de replicación del VHC es muy elevada, lo que sumado a la carencia de actividad de corrección de errores de su RdRp o "*proof reading*", conlleva la aparición de mutaciones en el genoma viral. Se ha calculado que se produce un error de aproximadamente 1-10 nt de cada genoma en cada generación. Esta tasa de error es la responsable de la generación de variantes genómicas o quasiespecies. Se acepta que existe un umbral de mutaciones toleradas por el virus por encima del cual se compromete la integridad de su genoma, llevando a la pérdida de la viabilidad viral y la extinción de la población (catástrofe error) (**Figura 5**) [41].

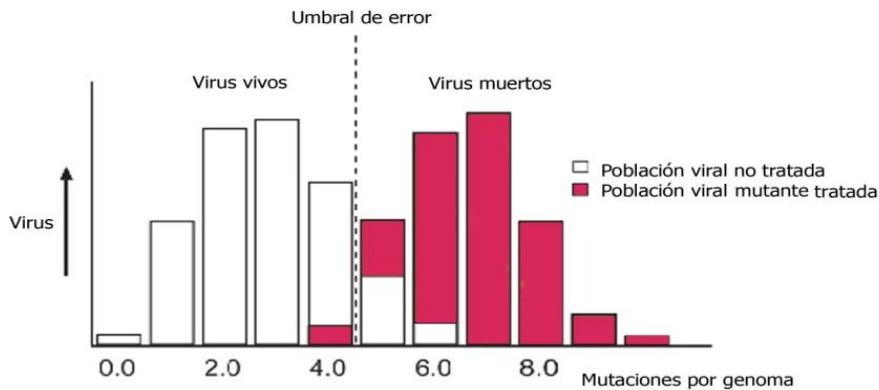


Figura 5. Distribución de las cepas mutantes y umbral de error.

La mayoría de los viriones de la población salvaje (no tratada) tienen pocas mutaciones y son viables. En la población tratada la tasa de mutaciones supera el umbral de error y alcanzar la mutación letal en la mayoría de la población. (Figura modificada de Laurin A y cols. PLoS Pathogens 2010 [12]).

Crotty y cols. demostraron en modelos celulares de poliovirus que la RBV inducía mutaciones genómicas que resultaban en una progenie menos infecciosa, e introdujeron el concepto de mutagénesis letal [41]. La RBV, base analoga de la guanósina, es capaz de incorporarse en su forma trifosforilada al genoma viral durante la replicación determinando la incorporación de una C o U, de manera que su poder mutagénico está ligado a un aumento de las mutaciones de transición G a adenina (A), y/o de C a U. Este efecto mutagénico de la RBV ha sido confirmado también en modelos celulares de otros virus RNA (como el Hantaan o virus del oeste del Nilo entre otros). El aumento acelerado de mutaciones inducido por la RBV conduciría a la mutagénesis letal o catástrofe error (**Figura 5**).

En el caso del VHC, la mayoría de los estudios *in vitro* llevados a cabo en cultivos celulares han apoyado este poder mutagénico de la RBV, y sugieren un efecto dosis-dependiente (**Tabla 7**). Algunos trabajos demostraron este potencial sólo cuando la RBV se asociaba con otro inhibidor de la IMPDH,

reflejando la importancia del pool intracelular de GTP en la adherencia de la RBV a la RdRp NS5B [42]. Otros concluyeron que tal efecto no se observa en modelos celulares tratados con RBV a las bajas concentraciones usadas en la práctica habitual [43].

Tabla 7. Estudios *in vitro* del poder mutagénico de la RBV en el VHC

PODER MUTAGÉNICO DE LA RBV EN EL VHC: ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>		
Estudio	Métodos	Conclusiones
Contreras y cols. [44]	Sistemas de replicación binarios (CV-1 y Hep-G2) tratados con dosis crecientes de RBV. Región 5'UTR, NS5B, Core, E2 HVR-1, NS5A	Efecto mutagénico de la RBV dosis-dependiente
Lanford y cols. [45]	Sistemas de replicación subgenómica: Líneas celulares Huh7 tratadas con dosis crecientes de RBV. Región NS3 y NS5A	Efecto mutagénico de la RBV dosis-dependiente
Zhou y cols. [42]	Sistema replicativos tratados con RBV sólo o combinada con un IMPDH. Región NS5A	RBV induce mutaciones sólo cuando se asocia a un inhibidor de la IMPDH
Tanabe y cols. [46]	Sistema de replicación subgenómica tratados con RBV. Región NS5A	RBV induce mutaciones
Kato y cols. [43]	Sistema de replicación subgenómica tratados con RBV	RBV no induce mutaciones
Brochot y cols. [47]	Sistemas de replicación con células JFH-1 tratados con dosis decrecientes de RBV. Región NS4A.	RBV induce mutaciones a dosis altas
Hofmann y cols. [48] (in vivo/in vitro)	Sistemas de replicación subgenómica tratados con RBV vs Levovirina (control). Región NS5B	RBV induce mutaciones, pero no la Levovirina.

RBV, Ribavirina; VHC, Virus de la hepatitis C; IMPDH, inosina 5'-monofosfato deshidroenasa

La extrapolación de estos resultados a humanos es controvertida, en parte debido a que las dosis usadas y las concentraciones de RBV alcanzadas en los modelos celulares son muy altas (50-1000 μM), llegando a valores que nunca se han observado en humanos y que sobrepasan el umbral de toxicidad tolerado. Además, las diferencias metodológicas y las limitaciones experimentales *in vitro*, no permiten predecir el comportamiento de la RdRp *in vivo*. Shinkel y cols. fueron los primeros en estudiar el poder mutagénico de la RBV en pacientes con infección por el VHC [49] y desde entonces se han sucedido nuevos trabajos al respecto, principalmente centrados en el análisis de pequeñas regiones del genoma viral (NS3, NS5A, NS5B) y con resultados muy contradictorios (**Tabla 8 y 9**).

El efecto antiviral de la RBV frente al VHC en pacientes infectados cuando se administra en monoterapia es escaso, y está ampliamente demostrado que su beneficio se establece en asociación con el IFN. Bull y cols. propusieron que la inhibición de la producción viral conseguida durante el tratamiento simultáneo con IFN aumentaba la concentración relativa de RBV disponible, y así la probabilidad de su incorporación al genoma viral, del aumento de la tasa de mutaciones y del aclaramiento del virus [50]. Dixit y cols., en un modelo matemático realizado en 17 pacientes que recibieron tratamiento combinado (peg-IFN- α /RBV), evidenciaron que en presencia de RBV se generan viriones menos infecciosos y de menor capacidad replicativa, lo que podría llevar al efecto antiviral del tratamiento posterior combinado, justificando que este beneficio se observe sólo cuando la replicación viral está profundamente suprimida por el IFN [51]. De forma alternativa al error catastrófico, la RBV podría inducir la aparición de mutaciones que modifiquen la sensibilidad al tratamiento con IFN.

Tabla 8. Estudios *in vivo* en contra del poder mutagénico de la RBV en el VHC

EVIDENCIA EN CONTRA DEL PODER MUTAGÉNICO DE LA RBV EN EL VHC: ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>		
Estudio	Métodos	Conclusiones
Sookoian y cols. [52]	n=21, tratados con IFN/RBV, Región HVR	Ningún cambio en la variabilidad viral tras tratamiento combinado
Querenghi y cols. [53]	n=35, VHC-1, tratados con RBV vs placebo HVR1, NS5A, NS5B	RBV no aumenta las mutaciones de Aa. Ausencia de cepas resistentes a RBV
Schinkel y cols. [49]	n=6, VHC-1 sin respuesta a IFN- α , posteriormente tratados con IFN- α /RBV. Región NS5A	RBV no aumenta la tasa de mutaciones durante el tratamiento combinado vs IFN- α monoterapia
Bouestín y cols. [54]	n=10, sin respuesta a IFN- α /RBV tratados con IL-2/IFN- α /RBV. Región HVR-1	El tratamiento combinado convencional con IL-2 no aumenta la heterogeneidad genética
Chevaliez y cols. [55]	n=11, VHC-1b tratados con RBV vs IFN- α /RBV vs IFN- α /RBV en régimen de inducción. Región NS5A y NS3	RBV no aumenta la tasa de mutaciones a las dosis usadas <i>in vivo</i> .

n, número de pacientes; VHC, virus de la hepatitis C; RBV, Ribavirina; IFN, Interferón

Tabla 9. Estudios *in vivo* a favor del poder mutagénico de la RBV en el VHC

EVIDENCIA A FAVOR DEL PODER MUTAGÉNICO DE LA RBV EN EL VHC: ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>		
Estudio	Métodos	Conclusiones
Young y cols. [56]	n=15, tratados con RBV vs IFN- α vs placebo. Región NS5B	Débil poder mutagénico de la RBV. Hallazgo <i>in vitro</i> de la mutación F415Y (resistente a RBV monoterapia)
Asahina y cols. [57]	n=34, VHC-1b tratados con RBV 4 semanas en monoterapia seguido de IFN- α /RBV 24 semanas. Región NS5A y NS5B	RBV aumenta la tasa de mutaciones tras 4 semanas de monoterapia. Correlación positiva: tasa de mutaciones NS5A y RVS al tratamiento combinado
Arataki y cols. [58]	n=5, VHC-1b tratados con IFN- α /RBV o IFN- α monoterapia. Región 5'UTR, E1, E2, NS5A y NS5B	El tratamiento combinado con RBV modifica las cuasiespecies, pero no es suficiente para justificar la catástrofe error
Hoffmann y cols. [48]	Estudio <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (n=14) VHC-1b tratados con RBV vs peg-IFN- α /RBV. Región NS5B y NS3	Efecto mutagénico precoz de la RBV, no detectable en combinación con peg-IFN- α . Efecto concentración dependiente
Lutchman y cols [32]	n=31, VHC-1 tratados con RBV vs placebo 48 semanas. 2 ^o fase (fase de cruce): paso de placebo a RBV. Región NS5B	Efecto mutagénico temprano de la RBV (semana 4) pero transitorio (indetectable en la semana 24).
Cuevas y cols. [59]	n=74, VHC-1 sin respuesta a IFN- α /RBV. Región E1, E2 y NS5A	Efecto mutagénico de la RBV transitorio, no detectable a los 12 meses de tratamiento
Ogawa y cols. [35]	Estudio del poder mutagénico e inmunológico de la RBV en pacientes (n=25) tratados con RBV 4 semanas en monoterapia seguidos de INF- α -2b/RBV Región NS5A	RBV aumenta la tasa de mutaciones y la relación Th1/Th2, en pacientes con RVR.
Dietz y cols. [60]	n=12, RBV en monoterapia 4 semanas vs placebo seguido de 48 semanas de peg-IFN/RBV Pirosecuenciación genoma VHC	Efecto mutagénico de la RBV, insuficiente para inducir la catástrofe error

n, número de pacientes; VHC, virus de la hepatitis C; RBV, Ribavirina; IFN, Interferón; Th1, Linfocitos T helper tipo 1; Th2, linfocitos T helper tipo 2; RVS, Respuesta virológica sostenida; RVR, Respuesta virológica rápida

La mayoría de los estudios *in vivo* que han apoyado el poder mutagénico de la RBV se han basado en la demostración de un aumento de las mutaciones de transición asociadas a la RBV en el análisis con técnicas de secuenciación directa o clonación de un número limitado de clones de regiones limitadas del genoma viral. Sin embargo, el estudio del verdadero poder mutagénico de la RBV exigiría el análisis del total de mutaciones en el conjunto de la población viral, tanto mayoritaria como minoritaria, algo difícil de conseguir *in vivo*, entre otros motivos por el rápido recambio viral que impide el análisis genético de todas las variantes del virus. La introducción y el desarrollo actual de nuevas generaciones de plataformas de secuenciación masiva, como las técnicas de pirosecuenciación, ya usadas previamente en otros virus, puede mejorar el conocimiento del poder mutagénico de la RBV durante el tratamiento de la HCC. Estas técnicas permiten determinar las secuencias de todas las variantes genómicas presentes, incluyendo las variantes o quasiespecies minoritarias que a menudo juegan un papel importante en el desarrollo de resistencias a los tratamientos antivirales, incluso cuando se presentan en un porcentaje muy bajo en la población. La aplicación de los nuevos métodos de secuenciación masiva en el campo de la HCC aún es escaso. El empleo de estas técnicas podría contribuir al mejor conocimiento del mecanismo de acción de la RBV y la dinámica de las quasiespecies durante el tratamiento.

1.5.3.2. Cinética de la RBV

- **Farmacocinética y farmacodinámica de la RBV**

El perfil farmacocinético tras la administración oral de una única dosis de RBV se describe en 3 fases: una fase rápida de absorción, alcanzando la tasa máxima (T_{max}) en 1,5 horas; una fase rápida de distribución (3-7 horas); y finalmente una fase larga de eliminación (última concentración medible aproximadamente en 100 horas). Tras múltiples dosis la RBV se acumula gradualmente alcanzando la fase meseta en su concentración entre las 4-12 semanas [61].

En la práctica clínica la RBV se administra ajustada al peso (dosis/kg), sin embargo, existe una amplia variabilidad interindividual en las tasas plasmáticas de RBV (TPR) alcanzadas [62]. El aclaramiento de la RBV es fundamentalmente renal, y se ha sugerido que la dosis de RBV debería ser ajustada al aclaramiento de creatinina (ClCr), aunque en un estudio se observó que el efecto de la función renal fue sólo aparente cuando el ClCr fue < 34 ml/min [63]. Al margen del ClCr, también ha sido señalada la influencia de otros factores como el peso corporal, la edad y el sexo, aunque estas 4 variables sólo explicarían el 27-40% de la variabilidad interindividual en las TPR [64]. La influencia de la función hepática no ha sido confirmada en todos los estudios.

Recientemente se ha evidenciado que diferencias en los niveles de captación celular de la RBV podrían también afectar a sus niveles plasmáticos e intraeritocitarios. Los estudios han mostrado que cambios en la expresión y/o actividad del gen que codifica el transportador 1 de nucleósidos de los eritrocitos podrían influenciar las concentraciones intrahepatocíticas de RBV y, consecuentemente, su efecto antiviral.

- **Dosis y tasas plasmáticas de RBV (TPR): importancia en la respuesta al tratamiento**

El mantenimiento de las dosis óptimas de RBV durante el tratamiento es fundamental para alcanzar la RVS, sobre todo en pacientes con infección por el VHC-1 con peores resultados. Estudios previos sugirieron que reducciones en la dosis de RBV en las primeras 12-20 semanas de tratamiento en pacientes con HCC-1 disminuyeron la probabilidad de alcanzar la RVS [65]. Sin embargo, Shiffman y cols. evidenciaron que dichos descensos pueden no afectar a las tasas de respuesta virológica precoz (RVP) ni RVS mientras se mantuvieran dosis de >80% de la total prevista de peg-IFN durante las primeras 20 semanas [66]; los descensos en la dosis más allá de la semana 20 tampoco influyeron en la probabilidad de respuesta al tratamiento mientras se administrara > 80% de la dosis total peg-IFN y no se interrumpiera la RBV.

Se ha sugerido que mayores dosis medias de RBV preciden altas TPR, sin embargo, dos importantes estudios previos no observaron ninguna correlación entre la dosis/kg y los niveles de RBV alcanzados en plasma en las semanas 4 o 12 del tratamiento combinado; y sí entre menores tasas plasmáticas y peores resultados de RVS [62, 67]. La mayoría de los ensayos han defendido la correlación entre la RVS y mayores TPR, y parece que esta asociación se relaciona principalmente con la fase temprana de la distribución de la RBV, sobre todo en las primeras 8-12 semanas. Tsubota y cols. demostraron la asociación entre las TPR >3 mg/L y la respuesta en la semana 8 al tratamiento combinado [68]. Otros autores han señalado que la monitorización de los niveles de RBV en plasma en fases aún más precoces del tratamiento permitiría el ajuste temprano de su dosis. Loustaud-Ratti y cols. correlacionaron los niveles de RBV en plasma tras la primera dosis (D0) valorada bajo el área bajo la curva (AUC) entre dosis AUC_{0-12 h}, o en su forma abreviada AUC_{0-4 h}, con la RVS, la respuesta virológica rápida (RVR), y en menor medida con la RVP, mientras que no

encontraron diferencias entre pacientes con RVS y pacientes no-RVS en el AUC_{0-12h} ni AUC_{0-4h} en la semana 12 ni en la 24 de tratamiento [69]. Muñoz de Rueda y cols. no hallaron correlación entre las TPR y la RVS en una cohorte de pacientes con HCC-1 *naive*; sin embargo, evidenciaron que concentraciones $\geq 5\text{mg/L}$ antes de la semana 16 predecían la RVS, aunque dichos niveles sólo se alcanzaron en una minoría de los casos, lo que haría poco útil en la práctica la monitorización de las TPR durante el tratamiento [70].

En las discrepancias entre los distintos estudios podría influir la heterogenicidad de los pacientes y los distintos puntos de corte de niveles plasmáticos de RBV establecidos. Sin embargo, los resultados globales apuntan a que la monitorización estrecha e individual de las TPR ocupa un lugar clave en la optimización de los resultados terapéuticos, especialmente en pacientes difíciles de tratar. La **Figura 6** recoge un modelo de monitorización plasmática de la RBV [71].

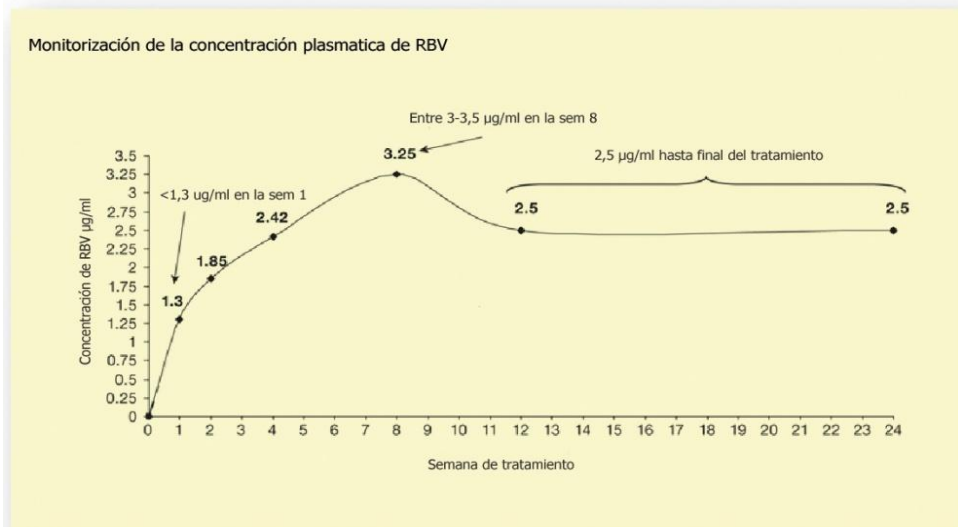


Figura 6. Modelo de monitorización de la concentración plasmática de RBV durante el tratamiento de la HCC.

RBV, Ribavirina; Sem, semana. (Figura modificada de Brochot E y cols. Antiviral Therapy, 2010) [71].

1.5.3.3. RBV y anemia

La anemia constituye un efecto secundario frecuente del tratamiento de la HCC, alcanzando tasas de más del 35% con la combinación de peg-IFN/RBV, e incluso superiores con la administración de los nuevos IP. Aunque el IFN presenta un efecto mielosupresor, la anemia es principalmente secundaria al efecto hemolítico de la RBV, determinando reducciones de su dosis e incluso su interrupción precoz hasta en el 36% de los pacientes, lo cual puede mitigar las posibilidades de curación.

La mayoría de los descensos en las cifras de hemoglobina (Hb) se producen en las primeras 4-6 semanas de tratamiento, y aunque su mecanismo no es del todo conocido, se ha relacionado principalmente con el acúmulo de la RBV en el interior de los eritrocitos y el estrés oxidativo que daña su membrana celular. En un estudio se demostró que el 75% de los pacientes con HCC-1 que recibieron una dosis ≥ 15 mg/kg/día de RBV desarrollaron anemia (Hb<10), frente al 20% tratados con dosis menores; y en pacientes con HCC-2/3 la tasa de anemia aumentó del 3,5% al 10% en tratados con 800 mg/día vs 1000-1200 mg/día RBV respectivamente [72]. No obstante, al margen de la dosis de RBV, se ha reconocido la influencia de otros factores en el desarrollo de anemia durante el tratamiento de la HCC (**Tabla 10**)[73].

Tabla 10. Factores de riesgo asociados al desarrollo de anemia hemolítica inducida por RBV.

Factores de riesgo

Edad >50 años

Sexo femenino

Recuento plaquetario basal bajo (<150000/mm³)

Menor IMC/peso

Concentración de creatinina elevada (ClCr)

Dosis de RBV >12 mg/kg

Descenso rápido de la Hb tras el inicio del tratamiento (>1,5-2 g/dL en 2 semanas)

Polimorfismo genético ITPA

Fenotipo haptoglobina (fenotipo distinto Hp 1-1-anemia)

ClCr, aclaramiento de creatinina; Hb, hemoglobina; RBV, Ribavirina; ITPA, Inosina trifosfato pirofosfatasa.

Pese al impacto negativo de la anemia en la calidad de vida de los pacientes, la magnitud del descenso de las cifras de Hb se ha asociado con una mayor probabilidad de erradicar la infección por el VHC. El análisis retrospectivo del estudio IDEAL demostró que descensos ≥ 3 g/dL del nivel de Hb predicen mayores tasas de RVS, e interesantemente, la tasa de RVS se asoció con el desarrollo temprano de la anemia, pero no con el inicio de la anemia tardía [74]. Frente a estos resultados, Sievert y cols. observaron una correlación positiva entre el descenso de la Hb >3g/dL durante las semanas 5-48 de tratamiento combinado y la RVS, mientras que descensos de la Hb en las primeras 4 semanas o superiores a 6g/dL no mostraron el mismo beneficio en la respuesta virológica [75]. Los estudios con los nuevos IP también han correlacionado el desarrollo de anemia con la RVS [76].

El mecanismo subyacente a la mejoría en las tasas de respuesta al tratamiento en pacientes con anemia no se conoce completamente, pero podría estar relacionado con una mayor exposición individual a RBV. La hemólisis eritrocitaria causante de la anemia llevaría también a una mayor liberación

plasmática de RBV, y así a una mayor exposición de las células infectadas y un potencial aumento de su efecto antiviral [69].

La influencia de otros factores individuales parece jugar también un papel importante en el desarrollo de anemia, y podría justificar el hecho de que no todos los estudios hayan encontrado una asociación entre el descenso de la Hb, las TPR y la respuesta al tratamiento [77]. Recientemente se han identificado dos variantes genéticas del gen Inosina trifosfato pirofosfatasa (ITPA), en el cromosoma 20, la rs1127354 y la rs7270101, que han demostrado un efecto protector frente al desarrollo de anemia asociada a RBV[78].

La evidencia global indica un beneficio del empleo de EPO en el tratamiento de la HCC asociado a un control de la anemia hemolítica que permite mantener, e incluso administrar dosis mayores de RBV, así como mejorar la calidad de vida; sin embargo, los datos sobre su impacto en la RVS son inconsistentes [73]. La mayoría de los estudios han concluido que la relación entre el descenso de la Hb y la RVS no parece estar influida por el empleo de EPO. No obstante, el análisis retrospectivo del estudio CHARIOT demostró un beneficio en las tasas de RVS asociado al empleo de EPO en pacientes que bajaban el nivel de Hb >3g/dl durante las primeras 4 semanas de la terapia [75]. De esta manera, la EPO parece favorecer la respuesta virológica en un limitado subgrupo de pacientes con un rápido desarrollo de anemia o que reciben dosis de RBV superiores a las usuales.

1.5.4. TRATAMIENTO COMBINADO: PEG-IFN Y RBV

Hasta la llegada de los nuevos agentes antivirales directos (DAAs) inhibidores de la proteasa (IP) el tratamiento estándar de la HCC ha sido la terapia combinada con peg-IFN y RBV, alcanzándose tasas de RVS en pacientes *naive* en torno al 70-80% en casos de infección por el VHC genotipos 2 o 3, y del 40-50% en los genotipos 1 o 4 [79]. Los estudios han demostrado que la combinación del peg-IFN y RBV aumenta la respuesta virológica frente al tratamiento con IFN y RBV o peg-IFN en monoterapia [23, 24, 80] (**Tabla 11**).

La duración del tratamiento está determinada por el genotipo del VHC, con independencia de la CV. En un ensayo randomizado multicéntrico todos los pacientes con HCC recibieron tratamiento con peg-IFN- α 2a a dosis de 180 μ g/semana, y fueron aleatorizados a recibir durante 24 o 48 semanas RBV a dosis de 800 mg/día o mayores según peso (1000 o 1200 mg /día) [79]. Se observaron altas tasas de RVS (79-84%) en pacientes con VHC genotipos 2 o 3 con independencia del régimen, sin embargo, en el caso del genotipo 1, las mejores tasas de RVS (52%) se obtuvieron con una duración mayor y dosis plenas de RBV. La dosis de inicio de RBV en pacientes con HCC-1 debería oscilar entre los 13-15 mg/kg/día, sin encontrar mejoría en las tasas de respuesta con dosis superiores a 15 mg/kg. De esta manera se estableció que el tratamiento combinado en pacientes con VHC genotipo 1 lo constituye la administración del peg-IFN- α a dosis fija junto con RBV según peso (1000 mg/día o 1200 mg/día según peso < o \geq 75 kg) durante 48 semanas, mientras que en pacientes infectados con los genotipos 2 o 3 se asocia una dosis fija de 800 mg de RBV al peg-IFN- α durante 24 semanas.

El retratamiento con la terapia combinada en pacientes sin respuesta a un tratamiento previo con peg-IFN y RBV ha mostrado bajas tasas de RVS (<5%) y no está recomendado. En pacientes que recibieron antes INF con o sin RBV,

una segunda pauta de tratamiento con peg-IFN y RBV si podría mejorar las tasas de RVS.

Tabla 11. Estudios con tratamiento combinado: peg-IFN- α y RBV

Estudio	Diseño	Resultados	Conclusiones
Manns y cols. [80]	n=1530 1. IFN- α -2b (3mU/s) + RBV(1000-1200mg/d)48s 2. pegIFN- α 2b(15 μ g/kg/s) + RBV (800 mg/d) 48 s 3. peg-IFN- α -2b(1,5 μ g/kg/s) 4sem, seguido 0,5 μ g/kg/s) + RBV (1000-1200 mg/d)48 s.	<ul style="list-style-type: none"> Mayor RVS con dosis altas de peg-IFN (54%) vs dosis bajas (47%) vs IFN (47%). VHC-1: RVS en grupo 1,2 y 3: 33%, 42% y 34% respectivamente VHC-2/3: RVS similar en todos los grupos (80%) 	<ul style="list-style-type: none"> Dosis óptima de peg-IFN-α-2b:1,5g/kg/s Importancia del ajuste de dosis de RBV según peso en VHC-1.
Fried y cols. [24]	n= 1121 1. peg-IFN- α -2a(180 μ g/s) + RBV (1000 o 1200 mg/d según peso < o > 75 kg) 48s 2. peg-IFN- α -2a/s + placebo 48 s 3. IFN- α -2b(3mUI/3/s) + RBV/d 48 s	<ul style="list-style-type: none"> Mayor RVS y menor recaída con peg-IFN-α-2a y RBV (56%) vs IFN-α-2b +RBV (44%) o peg-IFN-α-2a monoterapia (29%) 	<ul style="list-style-type: none"> Mayor RVS con pegIFN-α 2a (180μg/s) + RBV (1000 o 1200 mg/día según peso)
Hadziyannis y cols. [79]	n= 1311 1. peg-IFN- α -2a (180 μ g/s) + RBV (800 mg/d) 24 s 2. peg-IFN- α -2a (180 μ g/s) + RBV (800 mg/d) 48 s 3. peg-IFN- α -2a (180 μ g/s) + RBV según peso(1000 o 1200 mg/d), durante 24 s 4. peg-IFN- α -2a (180 μ g/s) + RBV según peso(1000 o 1200 mg/d) 48 s	<ul style="list-style-type: none"> VHC-1: Mayor RVS con 48s de peg-IFN-α-2a y dosis altas de de RBV según peso (52%) VHC-2/3: sin diferencias en la RVS en los 4 grupos de tratamiento 	<ul style="list-style-type: none"> La duración y dosis del tratamiento con peg-IFN-α-2a + RBV deben individualizarse según el genotipo viral: -VHC-1: 48 s con RBV ajustada al peso. -VHC-2/3: 24s con dosis bajas de RBV

n, tamaño de muestra; peg-IFN, interferón pegilado; RBV, Ribavirina; s, semana; d, día; RVS, respuesta virológica sostenida

1.6. RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTIVIRAL

1.6.1. CINÉTICA VIRAL DURANTE EL TRATAMIENTO

El estudio de la cinética viral durante el tratamiento de la HCC ha permitido ampliar el conocimiento de los mecanismos de acción del IFN y la RBV, además de constituir un factor predictor de respuesta al mismo.

Tras el inicio del tratamiento con IFN, los niveles de RNA-VHC comienzan a descender generalmente 7-10 horas después, lo cual representa fundamentalmente el tiempo necesario para el inicio de la cascada de señalización del IFN y la estimulación de los ISGs. A continuación se describe un patrón típico de descenso del RNA-VHC en dos fases (**Figura 7**) [20, 81].

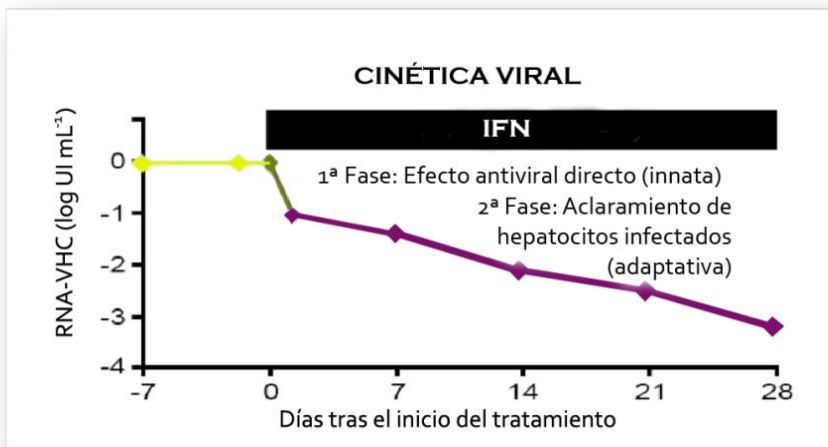


Figura 7: Cinética viral del VHC durante el tratamiento basado en IFN
RNA-VHC, Ácido ribonucleico del virus de la hepatitis C; IFN, Interferón.
(Figura modificada de Feld JJ y cols. Nature 2005 [20]).

La primera fase, de supresión rápida de la replicación viral, comienza pocas horas tras la primera inyección de IFN, y dura 1-2 días. Está mediada por

la inhibición directa de la replicación viral por el IFN, y se asocia con la eliminación de viriones libres, en mayor medida en los genotipos 2 y 3. Se sigue de una segunda fase de supresión lenta de la replicación, más variable, y que conduce gradualmente al aclaramiento del RNA-VHC de las células infectadas. Esta fase se relaciona con la respuesta inmune específica del paciente al tiempo que la replicación viral continúa inhibida por el IFN, y refleja el balance entre la infección *de novo* y la pérdida de células infectadas. Se trata de una etapa que está menos influenciada por la dosis del IFN y el genotipo VHC.

La aproximación mediante el estudio de la cinética viral al entendimiento de mecanismo de acción de la RBV durante el tratamiento combinado, ha aportado resultados más controvertidos que con el IFN. La RBV no actuaría en la primera fase del aclaramiento viral, donde el efecto antiviral directo del IFN probablemente esté poco influido por la acción de aquella [81]. El beneficio de la RBV se evidencia en el aumento de la pendiente de la segunda fase, y sólo en aquellos pacientes que presentan una respuesta parcial inicial al IFN, mientras que no se han apreciado diferencias en la segunda fase con la asociación de RBV entre pacientes con una pobre o nula primera fase de descenso.

Dixit y cols. aplicaron este modelo de cinética viral al estudio del poder mutagénico de la RBV y su efecto sinérgico con el IFN [51]. Observaron que durante la administración del IFN la producción viral está inhibida, lo cual conlleva el aumento de la concentración de RBV disponible por cepa viral y así su potencial mutagénico, mejorando las tasas de respuesta con la administración conjunta de ambos fármacos. La hipótesis del efecto de la RBV en la potenciación de la cascada de señalización del IFN justificaría que el mayor beneficio asociado a la incorporación de RBV al tratamiento combinado tenga como requisito la respuesta inicial al mismo [38]; también se ha observado que el efecto de la RBV durante la segunda fase de la cinética viral es determinante en el aclaramiento del VHC en pacientes que responden peor al IFN frente a aquellos con una

respuesta abrumadora durante la primera fase. La posibilidad del potencial inmunomodulador de la RBV fue reflejada por Herrmann y cols. en un modelo cinético con una tercera fase de descenso viral observada en algunos pacientes, y que estaría mediada por la restauración de la respuesta inmune inducida por la RBV [82].

Durante la triple terapia con los nuevos agentes antivirales directos (DAAs), la mayoría de los pacientes experimentan un retraso abreviado del inicio del descenso de la CV en relación al potente efecto antiviral directo de estos fármacos, seguido del patrón cinético bifásico típico.

1.6.2. FACTORES PREDICTORES DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO

1.6.2.1. Factores relacionados con el huésped y con la enfermedad

- **Factores no genéticos**

La edad (<40-45 años), el sexo femenino, la raza (asiática y blanca frente a la afroamericana e hispana), el índice de masa corporal (IMC <25kg/m²) y la ausencia de resistencia a la insulina, son factores predictores de RVS [83]. Por el contrario, la existencia de comorbilidades como la coinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y/o el virus de la hepatitis B (VHB), el consumo excesivo de alcohol y de drogas de uso intravenoso, o la esteatosis hepática se asocian a peores tasas de RVS [84]. La fibrosis avanzada y la CH constituyen unos de los factores predictores más desfavorables. Asimismo, los niveles de gammaglutamiltransferasa (GGT) se han relacionado con la fibrosis avanzada, la esteatosis hepática y la resistencia a la insulina, mientras que los niveles de ALT constituyen un marcador de daño hepático y, valores más elevados podrían estar

reflejando una respuesta inmune más efectiva frente a los hepatocitos infectados, aunque esta asociación es controvertida.

- **Factores genéticos**

La influencia de los factores genéticos del huésped en la respuesta al tratamiento de la HCC está siendo cada vez más estudiada. Cabe destacar la relación descrita entre varios polimorfismos de un único nucleótido (del inglés *single nucleotide polymorphism*, SNP) presentes cerca del gen de la interleucina 28 (IL28B), en el cromosoma 19, (que codifica el IFN- λ 3). El SNP rs12979860 de la IL28B, donde se sustituye citosina por timina (IL28CC), se ha asociado fuertemente con la RVS al tratamiento combinado con peg-IFN y RBV [85]. La expresión hepática de los ISGs también se ha relacionado directa e indirectamente con la respuesta al tratamiento, habiéndose descrito una sobreexpresión basal de los mismos en pacientes no respondedores. Se están llevando a cabo estudios para determinar el papel predictivo de otros marcadores séricos como los niveles de algunas citoquinas (IP-10).

1.6.2.2. Factores relacionados con el tratamiento

- **Cinética viral**

Numerosos trabajos han comprobado el papel de la cinética viral en la predicción de la respuesta al tratamiento [86]. La **Tabla 12** recoge la clasificación de los tipos de respuesta virológica basados en la cinética viral.

Tabla 12. Tipos de respuesta virológica

Tipo de respuesta	Definición
Respuesta virológica sostenida (RVS)	RNA-VHC indetectable 24 semanas tras el final del tratamiento
Respuesta virológica rápida (RVR)	RNA-VHC indetectable desde la semana 4 de tratamiento
Respuesta virológica precoz (RVP)	Descenso del RNA-VHC $2 \geq \log_{10}$ en la semana 12 de tratamiento (RVP parcial) o RNA-VHC negativo en la semana 12 (RVP completa).
Respuesta virológica al final del tratamiento	RNA-VHC negativo al final de las 24 o 48 semanas de tratamiento
Breakthrough	Reaparición del RNA-VHC en cualquier momento durante el tratamiento después de una respuesta virológica
Recidiva (RC)	Reaparición del RNA-VHC tras finalizar el tratamiento con RNA indetectable
No respondedor	Ausencia de aclaramiento de RNA-VHC tras 24 semanas de tratamiento
Respuesta nula	Ausencia de descenso del RNA-VHC $> 1 \log_{10}$ en la semana 4 de tratamiento o $> 2 \log_{10}$ en la semana 12.
Respondedor parcial	Descenso de $> 2 \log_{10}$ del RNA-VHC en la semana 12 de tratamiento pero detectable en la semana 24.

RNA-VHC, Ácido ribonucleico del virus de la hepatitis

▪Respuesta en la semana 4 de tratamiento. Se ha demostrado que la RVR es altamente predictiva de la RVS (valor predictivo positivo (VPP) del 78% y 92% en VHC-1 y VHC-2 respectivamente) [87]. Por el contrario el valor predictivo negativo (VPN) de la RVR es inferior al 75%, por lo que no alcanzar una RVR no debe ser indicativo de interrumpir el tratamiento.

▪Respuesta en la semana 12 de tratamiento. La ausencia de una RVP es el factor predictor más importante de la no respuesta al tratamiento antiviral (tasas de RVS del 0-3%), recomendándose en estos pacientes la interrupción del

tratamiento. Su papel predictor de RVS es menos preciso (65-72% de los pacientes con RVP alcanzan una RVS).

▪Respuesta en la semana 24 de tratamiento. La detección de RNA-VHC en la semana 24 de tratamiento es un criterio para interrumpirlo, ya que las posibilidades de respuesta son mínimas (RVS 1-3%).

▪Respuesta en la semana 24 postratamiento (6 meses postratamiento). La RVS constituye el mejor predictor de respuesta al tratamiento a largo plazo. Más del 97% de los pacientes con RVS continúan con una CV indetectable en los siguientes 5-14 años. Recientemente se ha propuesto que 12 semanas de seguimiento tras el final del tratamiento es tan relevante como 24 semanas para predecir la RVS.

La llegada de los nuevos IP ha introducido nuevos términos en la valoración de la respuesta al tratamiento. En los estudios en fase III con el IP Telaprevir (TVR) el tratamiento está guiado por la respuesta en las semanas 4 y 12, denominándose respuesta virológica rápida extendida (eRVR) a la ausencia de detección del RNA-VHC en esos momentos [76]. En los estudios en fase III con Boceprevir (BOC) existe una fase denominada fase de *lead-in* con peg-IFN y RBV previa al inicio de la triple terapia. En estos trabajos, la respuesta temprana se refiere a la negativización del RNA-VHC tras 4 semanas de tratamiento con los tres fármacos, que corresponde a la semana 8 desde el inicio de la terapia, y la respuesta tardía a la presencia de RNA-VHC detectable en la semana 8 pero indetectable en la 12 (8 semanas con BOC) [88].

La **Figura 8** recoge el algoritmo terapéutico en el tratamiento combinado con peg-IFN y RBV en la infección por el VHC-1.

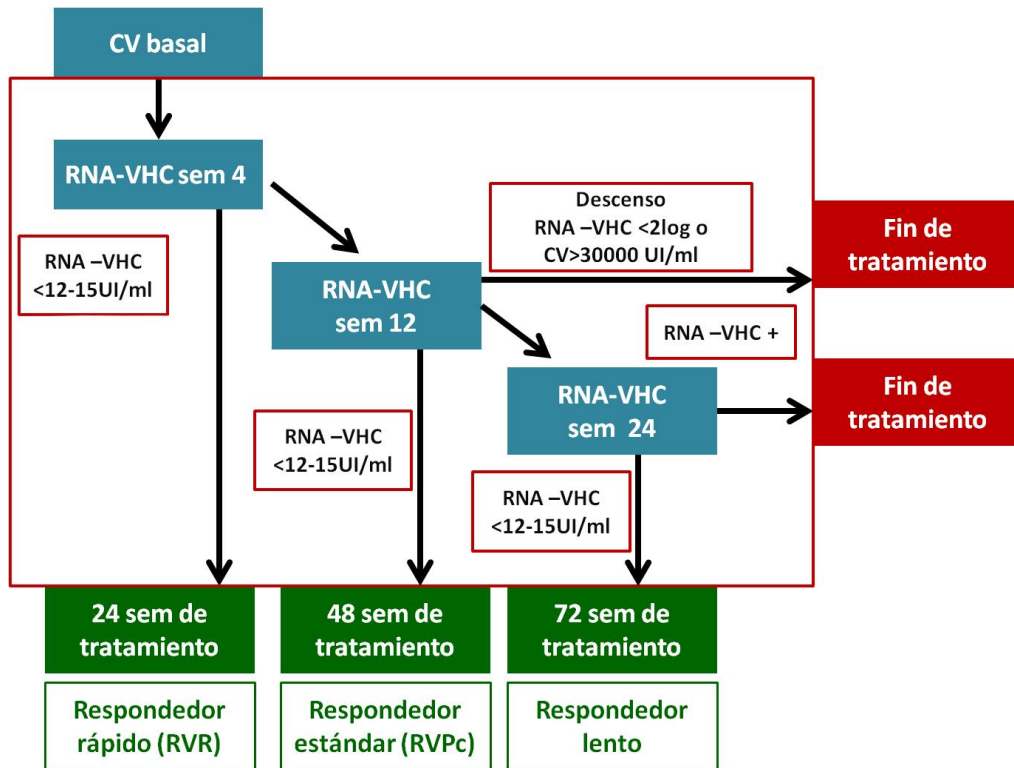


Figura 8. Algoritmo terapéutico en pacientes con infección VHC-1

CV, carga viral; RVR, respuesta virológica rápida; RVPC, respuesta virológica precoz completa; sem, semana

- **Adherencia al tratamiento**

Los estudios han demostrado la importancia de completar al menos el 80% de la dosis y duración del tratamiento con peg-IFN y RBV para alcanzar la RVS.

1.6.2.3. Factores virológicos

- **Genotipo y carga viral (CV)**

El genotipo constituye el factor predictor pre-tratamiento más importante, ya que predice tasas de RVS con peg-INF- α y RBV del 80% en casos de infección por el VHC-2/ 3, y entorno al 40% en infección por el VHC-1. Una mayor CV antes del tratamiento (>600000-800000 UI/ml) se asocia a menor probabilidad de respuesta [89].

- **Diversidad genética viral**

Desde que Okada y cols. en 1992 demostraron una correlación entre la mayor complejidad de cuasiespecies en la región HVR-1 del VHC antes de comenzar el tratamiento antiviral y la ausencia de respuesta a éste, se han sucedido numerosos trabajos centrados en el estudio de la variabilidad genética del VHC como factor predictivo de respuesta [90]. Uno de los primeros estudios fue llevado a cabo por Farci y cols., que clonaron y secuenciaron la región HVR-1 de 23 pacientes con HCC tratados con IFN [91]. Los resultados a las dos semanas de su inicio mostraron que sólo los pacientes con RVS presentaron una disminución significativa en la complejidad y la diversidad de las cuasiespecies paralela a la reducción de la CV, sugiriendo que los cambios precoces de la viremia y de las cuasiespecies pueden predecir la RVS. En los pacientes recidivantes (RC) las cepas salvajes del virus desaparecieron al finalizar el tratamiento, surgiendo nuevas variantes virales posiblemente resistentes al IFN. En los pacientes no respondedores y *breakthrough* persistieron las cepas virales dominantes originales durante todo el tratamiento, lo que sugería la existencia quasiespecies resistentes al IFN.

Estudios posteriores han afianzado el papel predictivo de la composición de las cuasiespecies del VHC en los resultados terapéuticos, y han demostrado su evolución consecuencia de la presión selectiva ejercida por el IFN. Salmerón y cols. comprobaron en pacientes infectados con el VHC-1 tratados con peg-IFN/RBV, la asociación entre la RVS con la menor diversidad en la región HVR-1 basal (≤ 5 bandas), así como con la disminución de la misma durante el tratamiento [92].

La existencia de una mayor diversidad genética antes de comenzar la terapia implica la posibilidad de que entre ellas se encuentren cepas capaces de eludir el efecto antiviral del IFN, por lo que los pacientes no respondedores generalmente tampoco muestran cambios significativos en el nivel de cuasiespecies virales durante y al final del tratamiento, indicando la presencia de pocos clones sensibles al IFN. Estos resultados han sido corroborados en otros estudios, y se ha sugerido que la mayor presión selectiva se produce en las primeras semanas del tratamiento.

La variabilidad genética del VHC también se ha correlacionado con la persistencia viral y el daño hepático. Farci y cols compararon la heterogenicidad genética en pacientes que aclararon el virus con la de otros que desarrollaron una HCC, y sugirieron que la persistencia del VHC fue debida a una alta capacidad mutagénica y compleja composición genética de la población viral que le permite al virus escapar del sistema inmune del huésped [93]. Se observó que en los pacientes que eliminaron el virus la variabilidad genética del VHC durante la fase aguda de la infección tendía a disminuir en los primeros 3 meses, mientras que permanecía estable en aquellos que evolucionaban a hepatitis leve y se incrementaban en los que evolucionaban hacia una HCC severa. Kumar y cols. también estudiaron a 47 pacientes con infección por el VHC, 32 con HCC, 9 con CH y 6 con CHC, y correlacionaron la evolución molecular de las cuasiespecies en la región NS5B con la severidad de la infección, evidenciando

que la complejidad fue mayor (>4 bandas) en los pacientes con CH y CHC que en aquellos con HCC [94].

No todos los trabajos han confirmado el papel predictor de las cuasiespecies en la respuesta al tratamiento. Boo y cols. no encontraron relación entre la variabilidad viral basal y los resultados terapéuticos, aunque su estudio incluyó una muestra pequeña de pacientes, algunos de ellos con infección por el genotipo 3a, donde la RVS es mayor [95], y otro de estos estudios se realizó en pacientes genotipo 1 no respondedores [96]. Incluso Fan y cols. demostraron resultados contrarios, y correlacionaron la RVP con la mayor diversidad en la región HVR-1 en pacientes con HCC-1, sugiriendo una mayor probabilidad de existencia de cepas sensibles al IFN [97].

Las discrepancias entre los distintos estudios probablemente estén influidas por el pequeño tamaño de muestra de muchos de ellos, el análisis de regiones variadas del genoma viral, el empleo de diferentes regímenes de tratamiento, y en general las diferencias metodológicas. Además, la información genética masiva del VHC constituye un obstáculo en el estudio de las cuasiespecies, que se pretende solventar con la reciente introducción de nuevos métodos que permiten la detección de poblaciones virales minoritarias (ultrapirosecuenciación). En este sentido, cabe mencionar que uno de los primeros estudios que han aplicado las nuevas técnicas de pirosecuenciación, ha confirmado que la menor variabilidad viral está asociada a mejor respuesta al tratamiento con peg-IFN/RBV [98].

▪ **Mutaciones del VHC y respuesta al tratamiento**

Se ha intentado explicar la ausencia de respuesta al tratamiento de la HCC por la existencia de determinadas regiones genómicas virales que antagonizan el efecto del IFN. Parece que el mecanismo de escape del VHC está relacionado con la variabilidad de dichas regiones, más que por la existencia de mutaciones concretas. Se ha sugerido que la presión selectiva ejercida por el IFN se distribuye por todo el genoma de forma heterogénea, concentrándose principalmente en las regiones HVR-E1/E2 y la V3 de la NS5A [99]. La mayoría de los estudios se han centrado en el análisis de estas proteínas, mientras que otras regiones más conservadas del genoma del VHC (NS5B, región Core...) han sido menos analizadas. Además, los resultados obtenidos no siempre han sido homogéneos, probablemente debido al establecimiento de complejas interacciones entre la diversidad genética del virus y la respuesta inmune del huésped.

Mutaciones en la región Core

La secuencia genómica de la proteína Core es altamente conservada entre las distintas cepas virales. Ciertos polimorfismos de esta proteína se han relacionado con la resistencia a la insulina, el desarrollo de CHC, y también con la respuesta al IFN [100]. Se ha demostrado que la proteína Core presenta un efecto inhibitorio de la actividad antiviral del IFN- α mediado por la interacción con la proteína celular STAT-1, implicada en la cascada Jak-STAT, y que deriva finalmente en la ausencia de expresión de los ISGs [101]. Sin embargo, el mecanismo molecular exacto que explique esta correlación aún no se conoce del todo. Hasta el momento sólo se han logrado identificar mutaciones específicas en esta región asociadas con el fallo terapéutico.

Akuta y cols. fueron los primeros en observar en pacientes japoneses infectados por el VHC-1b que la presencia de las sustituciones del Aa arginina (R) por glutamina o histidina (Q) en la posición 70 y/o leucina (L) por metionina (M) en la posición 91 de la región Core respecto a la secuencia consenso del subtipo VHC-1b antes de iniciar la terapia combinada, fueron predictores del fracaso terapéutico con peg-IFN/RBV [102, 103]. El papel de la sustitución del Aa 70 de la región Core en pacientes con HCC-1b como factor predictivo negativo de respuesta a peg-IFN/RBV ha sido posteriormente confirmado también por otros autores, pero los resultados en pacientes infectados por genotipos distintos [104] y los resultados de la mutación del Aa 91 son menos contundentes.

La asociación de las variantes mutantes 70 y/o 91 y la respuesta al tratamiento no ha sido corroborada en cepas diferentes al VHB-1b (VHC-1a,-2a,-2b y -4a); y se ha descubierto el papel predictor de respuesta al peg-IFN/RBV de otras mutaciones en las posiciones 4 y 110 de la proteína Core en el genotipo 2a [105]. Por otro lado, hay que mencionar que la mayoría de los estudios que demostraron el papel predictivo de fracaso terapéutico de estas mutaciones se llevaron a cabo en pacientes japoneses, y los únicos 3 estudios que existen en cohortes diferentes tan sólo han corroborado la influencia de la mutación del Aa 70, y no del Aa 91. El factor predictivo negativo de la sustitución en la posición 70 de la glutamina también se ha observado durante la triple terapia con TVR.

La presencia de las variantes mutantes del Aa 70 y/o del Aa 91 del VHC-1b también han sido relacionadas con la resistencia a la insulina, mayores niveles de GTP y menores de plaquetas y albúmina, mayor severidad de la enfermedad hepática y mayor riesgo de CHC. En un estudio reciente se demostró que la mutación del Aa 70 aumenta con la progresión de la HCC, sugiriendo que esta mutación ocurre durante el curso natural de la infección crónica [106]. Sin embargo, la sustitución del Aa 70 por Gln es la única cuya asociación con un mayor riesgo de CHC y ausencia de respuesta al IFN ha sido corroborada en

múltiples estudios [105], por lo que es posible que afecte a la misma vía celular de señalización del IFN implicada en funciones proliferativas y antivirales. Por otro lado, se ha descrito en pacientes que presentan en el gen de la IL 28B un SNP asociado a una respuesta desfavorable al tratamiento combinado, una mayor prevalencia de dicha sustitución y/o mayor evolución de la forma sensible de esta región (ausencia de mutación en el Aa 70) hacia la variante resistente (mutante del Aa 70) durante el tratamiento [106, 107].

■ Mutaciones en la región NS5A

Enomoto y cols. fueron los primeros en estudiar en pacientes japoneses infectados con el VHC-1b las mutaciones de una región de 40 Aa (Aa 2209–2248) de la NS5A, realizando la siguiente clasificación: variante salvaje (VHC-J) (sin mutaciones), intermedia (1-3 mutaciones) y variante mutante (≥ 4 mutaciones) [8]. Demostraron una correlación entre el mayor número de mutaciones de Aa (variante mutante) y la respuesta al IFN- α en monoterapia, denominando a esta región **ISDR (Figura 9)**.

Tras los hallazgos de Enomoto y cols. numerosos estudios japoneses y algunos europeos y americanos, la mayoría realizados en pacientes infectados por el genotipo 1, confirmaron la asociación entre el mayor número de mutaciones de Aa en la región ISDR y la respuesta al tratamiento, tanto con IFN- α en monoterapia como con la combinación IFN y RBV [108, 109, 110]. La importancia de mutaciones específicas en esta secuencia, como la sustitución por histidina en el Aa 2218 de la ISDR, también se correlacionaron con la resistencia al IFN, y ha sido sugerida su correspondencia con puntos críticos de fosforilación de la NS5A que interactúan como factores celulares [8, 108].

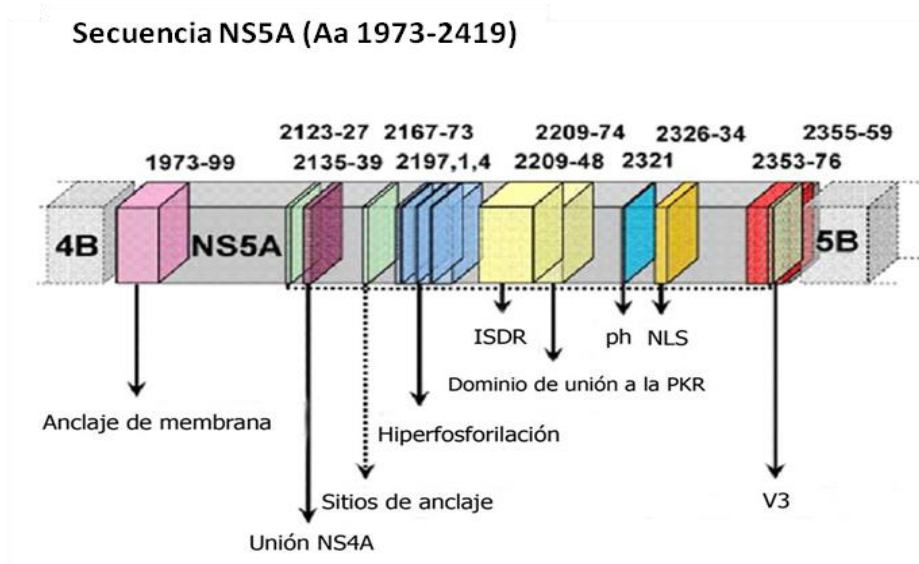


Figura 9. Región NS5A del VHC-1b (modelo de Kato y cols. [111]).

ISDR, Región determinante de la sensibilidad al IFN; NLS, señal de localización nuclear; ph, sitios de fosforilación. Figura modificada de Hofmann y cols, J Clin Virol, 2005 [99]

Inicialmente, la mayoría de los estudios europeos y americanos pusieron en duda la influencia de la ISDR en los resultados terapéuticos [112, 113]. Estas discrepancias podrían ser explicadas por la influencia en la respuesta al tratamiento de factores del huésped (como la raza o el genotipo de la IL 28B) o factores virológicos (como las diferencias geográficas en la variabilidad genómica). En un metaanálisis se evidenció que en pacientes infectados por el VHC-1b, la prevalencia de las secuencias de Aa de la región ISDR de la población viral salvaje, intermedia y mutante, difería significativamente entre las poblaciones virales aisladas en pacientes japoneses (44.1%, 37.6% y 18.3% respectivamente) y europeos (24.8%, 63.4% y 11.8% respectivamente) [114]. La menor prevalencia de las variantes mutantes de la ISDR en Europa puede determinar la ausencia de correlación observada entre las mutaciones en dicha región y la respuesta al IFN. No obstante, los resultados globales han confirmado

la importancia de la variabilidad de esta región en los resultados terapéuticos, al menos en el caso del VHC-1b y 2a, mientras que su papel predictor en otros genotipos/subtipos no se ha corroborado (VHC-2b, -3a o -4a) o estar por analizar [105]. Se ha detectado un descenso de la prevalencia de las cepas con ≥ 4 mutaciones en la ISDR y el ascenso de las de ≤ 3 mutaciones, lo que podría justificar la variabilidad en el umbral de mutaciones definido en sucesivos estudios; en algunos trabajos la presencia de ISDR ≥ 2 mutaciones se ha correlacionado con la respuesta al peg-IFN/RBV, y ≤ 1 con la resistencia al mismo.

Al margen de los factores virológicos, cada vez se reconoce más la influencia de los factores genéticos del huésped en los resultados del tratamiento, y resulta difícil separar el efecto de la presión selectiva ejercida por el IFN exógeno de la ejercida por sistema inmune del huésped. En un estudio reciente en pacientes con HCC-1b se demostró una correlación entre la mayor variabilidad genética en la NS5A y la presencia del polimorfismo rs12979860 de la IL28B asociado a mejor respuesta virológica, en los pacientes con RVS [115].

Algunos estudios que no encontraron correlación entre la región ISDR y la capacidad para inhibir la actividad del IFN, sugirieron que una secuencia adicional de la región NS5A hacia su extremo carboxi-terminal (C-terminal), fuera de la ISDR, era necesaria en la inhibición de la actividad del INF. Gale y cols. demostraron *in vitro* que la proteína NS5A interacciona con la proteína PKR del huésped (implicada en la inhibición de la traducción del RNA viral), y lo hace a través de un dominio de unión a la PKR (**PKRbd**) constituido por la región ISDR y 26 Aa distales a la región ISDR (**Figura 9**) [116]. Dicha región, en su forma salvaje, sin mutaciones, se une a la PKR del huésped, impide su dimerización, y determina la represión de su función (inactiva a la PKR) y la inhibición de la fosforilación del factor de transcripción eIF2. Varios estudios han demostrado que la presencia mutaciones en este dominio PKRbd impediría la anulación de la función antiviral de la PKR, mejorando la respuesta virológica [6, 117].

Muñoz de Rueda y cols. encontraron que la variabilidad genética de la región PKRbd (≥ 4 mutaciones de Aa) fue predictor de la RVP y la RVS en pacientes con HCC-1 tratados con peg-IFN y RBV [6]. Sin embargo, otros estudios no han confirmado esta asociación, sugiriendo un mecanismo de resistencia PKR independiente [118], y otros que tampoco evidenciaron un mayor número de mutaciones entre los pacientes respondedores, si describieron una correlación entre la presencia de sustituciones de Aa específicas en dicho dominio con la respuesta al IFN [119].

Se ha propuesto que la importancia de la NS5A en la resistencia al IFN también podría estar mediado por un mecanismo ISDR-independiente: estudios *in vitro* han evidenciado que la región N-terminal de la NS5A (Aa 1-148) podría inhibir la actividad antiviral de la 2',5'-oligoadenilato sintetasa, y también se ha observado que la NS5A induce la expresión de la IL-8 (conocido factor inhibidor de la vía de señalización del IFN). Existen datos clínicos que han descrito niveles superiores de IL8 antes del tratamiento en los pacientes no respondedores.

En 1992, Inchauspe y cols. identificaron un nuevo dominio en el extremo C-terminal de la NS5A (Aa 2356-2379) denominado **dominio V3 (Figura 9)**[120]. Aunque los estudios sobre esta secuencia son menos numerosos que los centrados en otras regiones de la NS5A, la mayoría han demostrado que se trata de una secuencia muy variable con una alta capacidad de acumular mutaciones [6, 121, 122]. En un trabajo que analizó la región NS5A, los autores comprobaron que el dominio V3 presentaba mayor acúmulo de mutaciones que la ISDR o la PKRbd [122]. La secuencia de nt V3 forma parte de la denominada **región determinante de la resistencia al IFN y a la RBV (IRRDR)** (Aa 2334 al 2379). La mayor variabilidad en V3 y/o IRRDR se ha correlacionado con mejores tasas de respuesta al IFN [112, 121, 123]. El-Shamy y cols. evidenciaron en pacientes con HCC-1b que la presencia en la V3 ≥ 5 mutaciones y en la IRRDR ≥ 6 mutaciones de Aa fueron predictivas de la RVS al tratamiento con peg-IFN/RBV

[123], aunque el punto de corte de este número de mutaciones posiblemente varía según las distintas regiones geográficas. Los datos disponibles sugieren que el valor predictivo de respuesta al tratamiento de la heterogenicidad de esta región se reproduce en distintas zonas geográficas y en distintos genotipos.

El mecanismo molecular subyacente a la implicación de la IRRDR y V3 en la respuesta al IFN es aún desconocido. Se ha propuesto que el dominio C-terminal de la NS5A, que incluye la ISDR y la IRRDR, tienen efectos inhibitorios sobre la vía de señalización del IFN, por lo que la heterogenicidad de la IRRDR participa en la estrategia antiviral de la defensa del huésped mediado por el IFN. Además, la diferencia en sus secuencias de nt han sugerido que la flexibilidad genética y las sustituciones en esta región, podrían ser capaces de modular la actividad antiviral intracelular, o quizás determinar cambios compensatorios en cualquier lugar del genoma viral, afectando a la capacidad global del virus y a la respuesta al IFN [124]. De hecho, algunos estudios no encontraron relación entre el número de mutaciones en la región V3 y la respuesta al tratamiento, pero apuntaron que el acúmulo de sustituciones de Aa podría determinar cambios en la PKRbd y la ISDR [6, 117].

Mutaciones en la región NS5B

La NS5B codifica la RdRp, enzima responsable de la replicación viral. Se trata de una región altamente conservada y mantenida entre los distintos genotipos. Se han descrito mutaciones capaces de modificar su actividad, sin embargo, la mayoría de los estudios de variabilidad genética se han centrado en las regiones estructurales, por lo que los datos disponibles sobre regiones no estructurales como la NS5B son más limitados.

In vitro se han identificado sustituciones concretas de Aa en la NS5B responsables de su actividad RNA polimerasa. Lohmann y cols. demostraron en

sistemas de replicación subgenómica que determinadas mutaciones en el subdominio de la palma de la NS5B inhiben completamente la función de la RdRp, mientras que la sustitución en la posición 345 del Aa arginina a lisina aumentó la eficacia de replicación de las colonias x 500 veces frente a la variant e salvaje [125]. Los resultados *in vivo* también han apoyado la influencia de mutaciones específicas en la capacidad de replicación de la RdRp [126].

Young y cols estudiaron a pacientes con HCC-1a, y aislaron en sistemas de replicación subgenómica Huh7 una mutación resistente al tratamiento con RBV en monoterapia, la F415Y (cambio de fenilalanina a tirosina), sugiriendo que la RBV podría actuar directamente sobre la RdRp [56]. Sin embargo, las secuencias de la NS5B que contienen la sustitución 415F y 415Y no demostraron ninguna desventaja replicativa, y se ha comprobado que la sustitución 415Y está presente en todos los subtipos, salvo el 1a y 6a, por lo que probablemente se trate de un polimorfismo natural del subtipo 1a. No obstante, los resultados de estos trabajos llevaron a plantear si el polimorfismo genético de la NS5B podría influenciar la sensibilidad a la RBV, y así los resultados del tratamiento combinado con IFN. La RBV en su forma trifosforilada se comporta como sustrato de la polimerasa viral, pudiendo introducir mutaciones en esta región del genoma viral que podrían alterar la actividad de la RdRp, incluyendo su capacidad para emplear la RBV, y, de esta manera, modificar la eficacia de replicación del VHC o inducir resistencias a su efecto antiviral.

Algunos estudios en pacientes han demostrado la influencia de las mutaciones en la NS5B en la distinta sensibilidad al tratamiento con IFN y RBV entre los genotipos 2/3 y el 1 [127, 128, 129], y con los recientemente introducimos IP [130]. Kumagai y cols. analizaron la secuencia de la NS5B en pacientes con HCC-1b tratados con IFN y RBV, y observaron que las mutaciones del Aa glutamina a lisina en la posición 124 de la NS5B (E124K) y de isoleucina a valina en la 85 (I85V), se asociaron con el aclaramiento viral en la semana 8 del

tratamiento [131]; sin embargo, dichas mutaciones no influyeron en la respuesta al tratamiento con IFN en monoterapia, sugiriendo la implicación directa o indirecta de la RBV en los resultados de respuesta. Canon y cols. sí encontraron diferencias que confirmaron una mayor variabilidad genética de la RdRp entre los pacientes respondedores frente a los no respondedores al estudiar a sujetos infectados por el VHC sin respuesta previa a IFN en monoterapia y que fueron retratados con IFN y RBV [132]. La hipótesis es que determinadas mutaciones en la región NS5B en los pacientes respondedores predicen un aumento de la incorporación de la RBV, mientras que aquellas detectadas en los no respondedores se asocian a una reducción en su incorporación, por lo que las sustituciones de nt en la NS5B podrían afectar a la capacidad de la RdRp de usar RBV como sustrato, y así a su efecto antiviral.

Los escasos resultados disponibles de la región NS5B no siempre han sido homogéneos. En un estudio reciente, pese a la variabilidad genética detectada en la región NS5B, su secuencia no difirió entre pacientes respondedores y RC al tratamiento con peg-IFN y RBV [133]. Waard y cols. concluyeron que la RBV no selecciona mutaciones resistentes en la RdRp, y que su efecto en la inhibición de la replicación viral es muy débil [134]. Quizás la combinación con IFN ejerza una presión suficiente para prevenir el desarrollo de variantes resistentes a la RBV, cuestionando su significado clínico.

Hasta la fecha pocos estudios han valorado la correlación del polimorfismo de la NS5B con el efecto de la RBV y los resultados del tratamiento combinado, casi todos en pacientes que recibieron IFN, y no peg-IFN. Globalmente se considera a esta región del genoma viral un dominio altamente conservado. La hipótesis del potencial mutagénico de la RBV hace interesante el análisis del comportamiento genético de esta región que contiene la RdRp.

1.7. NUEVOS TRATAMIENTOS DEL VHC

1.7.1. INHIBIDORES DE LA PROTEASA DE 1ª GENERACIÓN: BOCEPREVIR (BOC) Y TELAPREVIR (TVR)

El conocimiento del ciclo viral del VHC ha permitido la identificación de nuevos fármacos con una acción antiviral directa frente a proteínas no estructurales del virus. Entre ellos se encuentran los IP NS3/4A, al que pertenecen el BOC y el TVR, aprobados en 2011 en Europa y en EEUU, y que en la actualidad combinados con peg-IFN y RBV constituyen la triple terapia actual en pacientes con HCC por VHC-1. Recordemos que estos fármacos no tienen indicación en genotipos distintos al 1.

El desarrollo clínico del BOC se llevó a cabo en estudios de fase III en pacientes *naive* (SPRINT-2) y en pacientes sin respuesta a un tratamiento previo (RESPOND-2) [88, 135], demostrándose tasas de RVS combinado con peg-IFN/RBV del 63-66%, con un 9% de recidivas. El desarrollo clínico del TVR en fase III comprende tres estudios, dos en pacientes *naive* (ADVANCE e ILLUMINATE) y un tercero en pacientes sin respuesta previa (REALICE), que evidenciaron una mejoría de la respuesta al tratamiento (RVS 69-75%) y una disminución de la tasa de recidivas (9%) con respecto a la biterapia [76, 136].

Ambos fármacos se combinan junto con el peg-IFN (peg-IFN- α -2a 180 μ g/semana o peg-IFN- α -2b 1.5 μ g/kg/semana) y la RBV (1000-1200 mg/día según peso en el caso del peg-IFN- α -2a, o 800-1400 mg/día en el caso del peg-IFN- α -2b). El BOC se administra en dosis de 800 mg/7-9 horas, y TVR a dosis de 750 mg tres veces al día vía oral (o 1125 mg/12 horas).

En la triple terapia con el BOC la pauta consiste en una fase *lead-in* con peg-IFN/RBV durante 4 semanas, seguidos de 44 semanas más de tratamiento

combinado (peg-IFN/RBV), o 24 en el caso de conseguir una respuesta precoz (RNA-VHC indetectable en la semana 8). Todos los fármacos deberían ser suspendidos si el RNA-VHC es >100 UI/mL en la semana 12, si es detectable en la semana 24 o ante un episodio de *breakthrough* posterior. En la triple terapia con TVR los tres fármacos se administran juntos desde el principio durante 12 semanas, seguidos de otras 36 semanas de biterapia con peg-IFN/RBV, que podrán ser 12 en aquellos pacientes que consigan una eRVR (RNA-VHC indetectable en las semanas 4 y 12). Todos los fármacos deben suspenderse si el RNA-VHC es >1000 UI/mL en las semanas 4 o 12, y si es detectable en la semana 24 o se produce un *breakthrough* posterior. Las pautas de tratamiento durante la triple terapia sólo podrán acortarse en pacientes sin CH, *naive* y RC. En caso de desconocer la respuesta previa al tratamiento este tampoco debe ser abreviado.

1.7.2. NUEVAS GENERACIONES DE AGENTES ANTIVIRALES DIRECTOS (DAAs)

El principal inconveniente de los IP de primera generación (BOC y TVR) es su baja barrera genética (número de mutaciones de Aa que precisa el virus para hacerse resistente al fármaco), y el hecho de que su efectividad es limitada a pacientes infectados por el genotipo 1. En la actualidad los nuevos estudios se han dirigido al desarrollo de DAAs con una mayor potencia antiviral y más alta barrera genética, eficaces frente a múltiples genotipos, y que permitan regímenes de tratamiento más cortos y mejor tolerados [137, 138]. El presente y futuro inmediato del tratamiento de la HCC trae la llegada de nuevos IP de 2ª generación, inhibidores de la polimerasa (IPol) (análogos nucleós(t)idos y no análogos), e inhibidores de la NS5A (**Tabla 13**).

Tabla 13. Agentes antivirales directos (DAAs) frente al virus de la hepatitis C (VHC)

Diana	Fármacos	Cobertura genotípica	Potencia	Barrera genética
NS3/ proteasa	1ª Generación Boceprevir, Telaprevir	1	Alta	Baja-intermedia
	2ª Generación Simeprevir, Asunaprevir, Faldaprevir, Danoprevir, ABT-450/r, MK-5172	Pangenotípica	Intermedia -alta	Alta
IPol	Análogos nucleós(t)idos Sofosbuvir, Mericitabina	Pangenotípica	Intermedia -alta	Alta
	No análogos nucleós(t)idos Deleobuvir, ABT-333, BMS-791325, VX-222	Pangenotípica	Intermedia -alta	Baja
NS5A	Inhibidores NS5A Daclatasvir, Ledipasvir, ABT-267, MK-8742	1	Alta	Baja-intermedia

IPol, Inhibidores de la polimerasa

■ Los **IP de 2ª generación** actualmente en desarrollo presentan por lo general menores efectos secundarios e interacciones, y han demostrado su eficacia frente al VHC-1 incluso en cepas virales aisladas que desarrollaron resistencias frente a los IP de 1ª generación [139, 140], sin embargo, su efecto en genotipos diferentes al 1 es más limitado. En combinación con peg-IFN y RBV consiguen mayores tasas de RVS que la triple terapia con BOC o TVR, con pautas de más fácil administración y posiblemente más seguras. El **asunaprevir** (BS 650032) : su combinación con peg-IFN y RBV ha demostrado mayor eficacia que la biterapia sola, pero los efectos hepatotóxicos de su dosis (600 mg/día) han limitado su uso; no obstante, en la actualidad se está ensayando su combinación en regímenes sin IFN. El **simeprevir** (TMC435), junto con el sofosbuvir son los únicos DAAs que han completado los estudios en fase III y ha sido ya aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el tratamiento del VHC

combinado con peg-IFN y RBV. El desarrollo del **faldaprevir** (BI 201335) asociado con la biterapia (peg-IFN/RBV) se encuentra ya en la actualidad en estudios en fase III, mientras que los resultados con el **MK-5172** aún proceden de ensayos en fase II. El MK-5172 combinado con peg-IF y RBV ha demostrado actividad frente a múltiples genotipos y variantes resistentes a otros IP.

■ Existen dos clases de **IPol. los análogos de los nucleós(t)idos y los inhibidores no nucleós(t)idos.** Los primeros constituyen los DAAs de mayor barrera genética, puesto que imitan el sustrato natural de la polimerasa (una región muy conservada del genoma del virus), y han demostrado ser eficaces frente a los 6 genotipos. El **sofosbuvir** (GS-7977) fue aprobado al final del 2013 por la FDA en pacientes con VHC genotipos 1, 2 o 3; mientras, los estudios en fase II con **mericitabine** asociado a peg-IFN y RBV 24 semanas ha demostrado mejores tasas de RVS en genotipos 1 y 4 que la biterapia estándar durante 48 semanas.

Los inhibidores no análogos de los nucleós(t)idos en monoterapia tienen una potencia y barrera genética más baja, ya que se unen a la RdRp en un lugar distante del centro enzimático. Por este motivo, combinados con peg-IFN y RBV en triple terapia parecen ser menos eficaces frente al VHC-1 que la triple terapia con IP o inhibidores de la NS5A, y tampoco han demostrado utilidad en el resto de genotipos. Su uso se plantea en diferentes combinaciones con otros DAAs. Algunos de estas moléculas se encuentran en ensayos en fase I o II: el **deleobubir** (BI-207127) en combinación con peg-IFN y RBV y en regímenes sin IFN; el **VX-222** en triple terapia con peg-IFN y RBV o cuadruple terapia incorporando también el TVR; o el **setrobuvir** combinado con peg-IFN y RBV. El **tegobuvir** (GS-9110) está también siendo analizado asociado a RBV o a peg-IFN y RBV, o combinados con inhibidores de la NS5A y RBV en regímenes sin IFN.

■ Los principales **inhibidores de la NS5A** (daclatasvir, ledipasvir, ABT-267 y BMS-824393) son fármacos bien tolerados y muy eficaces contra todos los genotipos, sin embargo, su perfil de toxicidad es variable y su barrera genética baja, por lo que deben ser combinados con otros DAAs para evitar la aparición de mutantes resistentes. El **daclatasvir** (BMS-790052), el primer inhibidor de la NS5A investigado, ha demostrado su eficacia en estudios en fase II asociado a peg-IFN y RBV en pacientes genotipo 1 y 4 *naive* [141]. Además, estudios japoneses en fase II y III combinando daclatasvir y asunaprevir en pacientes no respondedores evidenciaron tasas de RVS superiores al 80%, por lo que el daclastavir fue aprobado en 2013 en Japón y recientemente en 2014 por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el tratamiento de la HCC-1 [142]. La Unión Europea autorizó el uso compasivo de daclatasvir combinado con sofosbuvir en pacientes con alto riesgo de descompensación hepática o de muerte en un año sin tratamiento. Puesto que no se han descrito resistencias cruzadas entre daclatasvir y otros DAAs, se trata de un agente atractivo que está siendo ensayado en diferentes combinaciones de DAAs en regímenes sin IFN (por ejemplo daclatasvir y simeprevir, o daclatasvir, asunaprevir y un IPol no nucleósido). El **ABT-267** en asociación con peg-IFN y RBV ha mostrado resultados prometedores, y los resultados de **ledipasvir** (GS-5885) de los estudios en fase III combinado con sofosbuvir aún no están disponibles.

A parte de los DAAs existen otras potenciales dianas terapéuticas que afectan a los factores del huésped necesarios para completar la replicación, y al que pertenecen los **inhibidores de la ciclofilina** (Alisporivir) y los **antagonistas del miR-122** (Miravirsén) que están siendo ensayados en regímenes sin IFN y pautas más cortas de tratamiento, dada su alta barrera genética, la ausencia de resistencias cruzadas con DAAs y su actividad pangénica. Alisporivir ha demostrado su eficacia combinado también con peg-IFN y RBV. Existen otras moléculas con capacidad de inhibir el ciclo del VHC

en fase clínica o preclínica como la silibilina, inhibidores NS4B, pero habrá aún que esperar a conocer los resultados y su papel en futuras terapias frente al VHC.

El IP de 2^a generación simeprevir y el IPol análogo nucleótido sofosbuvir, son los dos únicos DAAs que han completado los ensayos en fase III y fueron aprobados en el año 2013 por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el tratamiento de la HCC en Estados Unidos en diciembre de 2013 y a principios de 2014 en Europa (**Tabla 14**). Más recientemente, el daclatasvir se ha sumado a esta lista y su uso ha sido aprobado también en Europa.

Tabla 14. Guías de tratamientos de la AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases)

Población		Recomendado	FDA*	Alternativa	FDA*
Genotipo 1					
-Naive/RC	Opción IFN	Sofosbuvir+peg-IFN/RBV 12 s	Si	Simeprevir+peg-IFN/RBV 12 s, seguido de peg-IFN/RBV 12 s VHC-1a o1b sin Q80K	Si
	No IFN	Simeprevir Sofosbuvir (con/sinRBV)12s	No	Sofosbuvir+RBV 24 s	Si
-No respuesta previa		Simeprevir Sofosbuvir (con/sinRBV)12s No en fallo de IP	No	-Sofosbuvir 12s + peg-IFN/RBV 12-24s Si en fallo de IP -Simeprevir+ peg-IFN/RBV 12s; seguido de peg-IFN/RBV 36 s VHC-1a o1b sin Q80K No en no respuesta a IP	Si
Genotipo 2					
-Naive/RC		Sofosbuvir+RBV 12 s	Si	Ninguna	
-No respuesta previa		Sofosbuvir+RBV 12 s (valorar 16 si CH)	Si	Sofosbuvir+peg-IFN/RBV 12 s	No
Genotipo 3					
-Naive/RC		Sofosbuvir+RBV 24 s	Si	Sofosbuvir+peg-IFN/RBV 12 s	No
-No respuesta previa		Sofosbuvir+RBV 24 s	Si	Sofosbuvir+peg-IFN/RBV 12 s	No
Genotipo 4					
-Naive/RC	Opción IFN	Sofosbuvir+peg-IFN/RBV 12 s	Si	Simeprevir+peg-IFN/RBV 12 s, seguido de peg-IFN/RBV 36 s	No
	No IFN	Sofosbuvir+RBV 24 s	No		
-No respuesta previa		Sofosbuvir+peg-IFN/RBV 12 s	Si	Sofosbuvir+RBV 24 s	No
Genotipo5/6					
-Naive/RC		Sofosbuvir+peg-IFN/RBV 12 s	No	Peg-IFN/RBV 48 s	Si
Norespuesta previa		Sofosbuvir+peg-IFN/RBV 12 s	No	Ninguna	

RC, recidivantes; peg-IFN, Interferón pegilado; RBV, Ribavirina; Tto, tratamiento; CH, cirrosis hepática. *Aprobación de la FDA

▪ **VHC genotipo 1**

El simeprevir (IP de 2ª generación) ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de los pacientes con HCC-1 *naive* y no respondedores a un tratamiento previo, siendo también activo en los genotipos 2, 4, 5 y 6. El desarrollo clínico del simeprevir se ha llevado a cabo en los estudios QUEST-1 y 2 (HCC-1 *naive*)[143], PROMISE (HCC-1 recidivantes) [144], y ASPIRE (HCC-1 recidivantes, respondedores parciales o nulos)[145]. Se asocia al peg-IFN y RBV durante 12 semanas (el tratamiento continua después con 12 semanas más de peg-IFN y RBV en pacientes *naive* o recidivantes, o 36 en respondedores parciales o nulos). La tasa de RVS alcanzada oscila entorno al 80% en pacientes *naive* o RC, siendo inferiores en los pacientes con CH, sin respuesta a un tratamiento previo y del subgrupo 1b (40-65%). Se administra en una única dosis diaria (150 mg/día) y no debe constituir una opción en pacientes sin respuesta a la triple terapia con IP de 1ª generación.

El sofosbuvir (Ipól análogo nucleótido con actividad pangénোটípica (genotipos 1-6)), ha sido aprobado en pacientes con HCC-1 *naive* y no respondedores a un tratamiento previo (aunque los estudios en genotipo 1 se han llevado a cabo en pacientes *naive*: NEUTRINO [146] y SPARE [147]). En pacientes con VHC-1 debe administrarse combinado con peg-IFN y RBV durante 12 semanas en dosis única (400 mg/día). Las tasas de RVS rondan el 90% en sujetos *naive*, mientras que en los sujetos que fueron considerados no respondedores (pacientes con CH, alta CV y genotipo IL28CC) la respuesta oscila entorno al 71%.

La FDA ha previsto el uso de sofosbuvir asociado a RBV sin IFN, sin embargo, los ensayos con sofosbuvir y RBV en pacientes con HCC-1 han evidenciado tasas subóptimas de RVS tanto en pacientes *naive* (88%) como en no respondedores a un tratamiento previo (11%) (por debajo de las obtenidas

en los genotipos 2 y 3 [148]. Por ello, en pacientes con VHC-1 no candidatos a un régimen con IFN, la estrategia de asociar sofosbuvir con un segundo DAAs se ha convertido en la mejor opción, y esperar la llegada de nuevos regímenes sin IFN sería lo más recomendable en estos casos. En este sentido la combinación de simeprevir y sofosbuvir ha sido propuesta por la AASLD como el tratamiento de elección en pacientes con HCC-1 en los que no es posible usar IFN y en aquellos sin respuesta previa, más aún con fibrosis extensa, al haber demostrado buenos resultados tanto con RBV (96%) como sin RBV (93%) (estudio COSMOS, fase 2a), pero aún no existe un estudio en fase III que aclare el perfil de seguridad, por lo que aún no ha sido aprobado ni en estos pacientes ni en los *naive* [149]. Otra opción planteada es la combinación de sofosbuvir con daclastavir, que ha demostrado tasas de RVS >90% con o sin RBV en pacientes *naive* y sin respuesta a la triple terapia previa con BOC o TVR [150].

Regímenes libres de IFN. Una de las principales limitaciones de la terapia actual de la HCC son los efectos secundarios asociados al IFN, que pueden dificultar la adherencia al tratamiento o causar la descompensación de la CH; de ahí el interés por el desarrollo de regímenes que prescindan del IFN. La rápida inhibición de la replicación del VHC por un DAA puede ser suficiente para restaurar la respuesta inmune adaptativa Th1, de manera que la administración de IFN exógeno puede no ser necesaria. Se han ensayado distintas combinaciones de tratamiento libres del IFN. La asociación de DAAs con distintos mecanismos de acción permite diferentes perfiles de resistencias y una alta actividad antiviral.

Uno de los primeros estudios que exploró la combinación de un IP y un inhibidor análogo nucleós(t)ido de la polimerasa sin IFN fue el estudio INFORM (danoprevir con mericitabina, con o sin RBV), en el que se alcanzaron tasas de RVS en pacientes *naive* del 26% y 71% en VHC-1b y VHC-1a respectivamente, y siendo claramente inferior sin RBV [151]. Para el año 2015 se prevee la llegada

de dos regímenes terapéuticos sin IFN para pacientes con HCC-1 con resultados muy prometedores (RVS>90%). Uno de ellos consiste en la combinación de sofosbuvir con el inhibidor de la NS5A ledipasvir (ELECTRON fase 2, pacientes *naive*) [152], asociando RBV durante 12 semanas en pacientes sin respuesta a la triple terapia con IP (LONDESTAR fase 2)[153]. La otra opción sin IFN ha sido ensayada en sujetos con HCC-1 *naive* y respondedores nulos (estudio AVIATOR), y combina el IP ABT-450, el inhibidor de la NS5A ABT-267, y un IPol no nucleóstido ABT-333 +/- RBV, mostrando tasas de RVS superiores al 90% en todos los grupos [154]. Como hemos comentado, existen otras dos pautas que ya han demostrado excelentes resultados en los estudios en fase III: la combinación de sofosbuvir y daclastavir, presenta una alta eficacia con baja probabilidad de desarrollar resistencias incluso en pacientes sin respuesta previa a la triple terapia con BOC o TVR; por otro lado, la asociación de daclatasvir y asunaprevir también consigue óptimas tasas de RVS en pacientes con HCC-1, y ha abierto la investigación de futuros regímenes orales con daclatasvir.

- **VHC genotipos 2 y 3**

La combinación de sofosbuvir y RBV ha sido aprobada por la FDA para el tratamiento de los genotipos 2 y 3. Se administra durante 12 semanas en pacientes con VHC-2 *naive* (RVS >90%) (pudiéndose valorar su extensión a 16 semanas en sujetos cirróticos con peor respuesta [146, 155]), y durante 24 semanas en el caso del genotipo 3 (tasas de RVS >90% en *naive*) [146, 155]. En pacientes con VHC-3 sin respuesta a un tratamiento previo (más difíciles de tratar, RVS 60%) parece que la asociación de sofosbuvir con peg-IFN y RBV 12 semanas es una potencial alternativa de duración más corta que ha demostrado tasas de RVS del 83% tanto en CH como en no cirróticos. La asociación de sofosbuvir con daclatasvir también ha demostrado óptimos resultados en estos genotipos.

- **Genotipo 4**

La FDA ha incluido al genotipo 4 en el régimen de sofosbuvir con peg-IFN y RBV durante 12 semanas. La posibilidad de un tratamiento con sofosbuvir y RBV durante 24 semanas está siendo evaluada.

- **Genotipos 5/6**

Pese a ser efectivo, el sofosbuvir no se ha aprobado en estos genotipos debido en parte a los pocos estudios existentes. Se espera la aplicación de regímenes sin IFN usando DAAs pangénóticos.

1.7.3. PRESENTE Y FUTURO DE LA RBV CON LOS NUEVOS DAAs

La RBV presenta un efecto sinérgico cuando se administra con el peg-IFN que se traduce en una disminución de la tasa de recidivas y en una mejora de la RVS entorno al 25-30%, algo ya ampliamente demostrado. Los estudios clínicos iniciales evidenciaron que el beneficio asociado a la RBV se mantiene en los tratamientos con los nuevos DAAs [156, 157], aunque datos posteriores han determinado que esto no siempre es así.

La RBV reduce la tasa de recidivas cuando se combina con un DAAs con baja o moderada barrera genética, como el BOC y TVR. Tres ensayos clínicos en fase II fueron diseñados para evaluar el impacto relativo en la respuesta al tratamiento de la RBV en combinación con peg-IFN y estos IP. Los ensayos PROVE II y III randomizaron el tratamiento combinado con peg-IFN y TVR asociando o no RBV, y evidenciaron que ésta reduce el riesgo de seleccionar variantes resistentes al TVR, y así la recaída virológica [76, 158]. La importancia de mantener la RBV a la dosis estándar también ha sido demostrada en los ensayos con BOC (estudio SPRINT-1) [159]. No obstante, en un análisis retrospectivo de estos estudios pilotos se comprobó que la dosis de RBV puede

ser reducida significativamente (a 600 mg/día) sin comprometer la respuesta a la triple terapia, lo que plantea la posibilidad de que en combinaciones con DAAs más potentes la dosis máxima de RBV no sea necesaria.

El futuro inmediato del tratamiento de la HCC señala a regímenes sin IFN, sin embargo, el empleo de RBV combinado con DAAs puede ser aún necesario en la próxima generación de agentes terapéuticos. En los genotipos 2 y 3 la RBV se mantiene en la primera línea de tratamiento asociada al sofosbuvir [160]. En el caso de pacientes más difíciles de tratar con infección por el genotipo 1, la asociación de la RBV con un único DAA no es factible, y en la actualidad existen multitud de estudios en fase II que combinan dos o tres DAAs con RBV.

Los primeros estudios en fase II durante 12-24 semanas en pacientes con HCC-1 mostraron que la eficacia de un tratamiento combinado sin IFN que incluya un IP y un IPol era fuertemente aumentada con la adicción de la RBV [151, 161]. Uno de los principales ejemplos de este efecto beneficioso de la RBV proviene de un ensayo que evaluó la combinación del IP GS-9256 con el IPol GS9190 (Tegobuvir) con o sin RBV, donde un grupo de pacientes *naive* con HCC-1 fueron aleatorizados a recibir tratamiento con los dos DAAs solos, triple terapia con RBV ajustada al peso, o cuádruple terapia añadiendo el peg-IFN [162]. La RBV aumentó la actividad antiviral de los DAAs, incluso en el grupo que no recibió IFN, y se evidenció que la mayoría de los pacientes con recaídas virológicas tuvieron mutaciones resistentes al GS-9256 y/o GS9190. Otros estudios que han combinado un IP con un IPol no análogos nucleósido en pacientes HCC-1 también han demostrado mejores resultados cuando la RBV se incorpora a la pauta de tratamiento [163, 164]. La asociación de RBV con faldaprevir (IP) y deleobuvir (IPol no análogo) aumentó claramente la tasa de RVS en pacientes respondedores nulos (59% con RBV vs 39% sin RBV) [164]. Además, el uso de la RBV en estos regímenes no parece empeorar significativamente la tasa global de efectos adversos.

Estos resultados sugieren que la RBV puede continuar manteniendo su importancia en las nuevas pautas de tratamiento sin IFN reduciendo la tasa de *breakthrough* y/o recidivas (por lo menos cuando se combinan IP con IPol no análogos nucleósidos), sin embargo, combinaciones posteriores con DAAs de mayor barrera genética han demostrado también buenos resultados sin RBV. El estudio INFORM-1 fue uno de los primeros en evidenciar la eficacia antiviral de un régimen de DAAs todo oral sin RBV [151], y tras el se han sucedido nuevos estudios en fase II combinando 2 o 3 DAAs durante 12-24 semanas que han conseguido altas tasas de RVS en genotipos 1, 2 y 3 sin asociar RBV. La combinación de sofosbuvir y daclastavir no demostró ningún beneficio con la incorporación de la RBV ni en pacientes *naive* ni en los previamente tratados (incluso con la triple terapia con BOC o TVR), y si más efectos secundarios [165]. Los estudios ELECTRON [166] y LONESTAR [167] (sofosbuvir y ledipasvir con o sin RBV), han demostrado excelentes resultados con tasas de RVS del 70% (ELECTRON) y del 95% (LONESTAR) en los brazos sin RBV, aunque con esta fueron aún superiores (100%). La combinación de asunaprevir (IP) y daclatasvir (inhibidor de la NS5A) durante 24 semanas fue la primera en demostrar la posibilidad de un tratamiento sin peg-IFN ni RBV en sujetos con HCC-1 respondedores nulos, sin embargo, en estos pacientes difíciles de tratar, la cuádruple terapia incorporando peg-IFN y RBV logró incrementar las tasas de RVS hasta el 100%, lo que refleja el papel relevante de la RBV aún es este grupo de pacientes [168]. No obstante, en un estudio reciente, dicha pauta de tratamiento (asunaprevir y daclastavir) ha mostrado tasas de RVS >80% también en pacientes sin respuesta previa al peg-IFN/RBV, suponiendo una alternativa en pacientes con HCC-1, incluso con CH.

El objetivo ideal del tratamiento de la HCC es un régimen oral pangenotípico, seguro y tolerable, con mínimas resistencias y barato. Aunque los resultados preliminares con combinaciones de inhibidores de la NS5A e IP o IPol de alta barrera genética sin RBV son prometedores, los datos son aún escasos y

proceden de ensayos con un pequeño número de pacientes, más aún en los sujetos más difíciles de tratar sin respuesta a un tratamiento previo. Por ello, posiblemente la RBV continúe siendo parte de tratamientos libres de IFN en los próximos regímenes terapéuticos, sin embargo, en un futuro más lejano, con la llegada de DAAs pangenotípicos más potentes su uso puede llegar a no ser necesario, entre otros motivos debido a que su mecanismo de acción aún no ha sido dilucidado. Al margen de la posibilidad de un tratamiento sin RBV, el planteamiento de pautas con menores dosis de RBV combinados con DAAs, o comparaciones de regímenes más cortos con DAAs y RBV serían otras opciones a estudiar.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

2.1. JUSTIFICACIÓN

La RBV, análogo del nucleósido guanosina, ha demostrado *in vitro* una amplia actividad antiviral frente a virus RNA y DNA (ácido desoxirribonucleico), y desde hace más de dos décadas constituye un elemento clave en el tratamiento de la HCC. Los primeros ensayos clínicos que utilizaron RBV en monoterapia en pacientes con HCC mostraron un efecto beneficioso asociado al descenso de los niveles de ALT y a una mejoría en los hallazgos histológicos de la biopsia hepática, sin embargo, estos efectos no se acompañaron de una RVS al tratamiento antiviral. Posteriormente, se demostró que la asociación de la RBV al IFN estándar o peg-IFN aumentaba significativamente la probabilidad de alcanzar la RVS frente al uso del IFN en monoterapia, consiguiendo un descenso en los eventos *breakthrough* virales y tasa de recidivas. En la actualidad, la RBV mantiene su importancia para el éxito de la triple terapia con BOC o TVR, e incluso, aunque se prevee un futuro inmediato con tratamiento libres de IFN, el abandono de la RBV en las próximos regímenes terapéuticos parece más lejano.

Pese a su amplio uso clínico y los esfuerzos realizados durante años, la forma de actuación de la RBV frente al VHC aún es controvertida, y se han propuesto distintos mecanismos de acción entre los cuales la inducción de los genes ISGs que median las actividades del IFN y la hipótesis de su efecto mutagénico han despertado mayor interés. Estudios *in vitro* han demostrado que la RdRp del VHC incorpora a la RBV durante la transcripción viral introduciendo mutaciones en la secuencia de nt. El acúmulo de esos errores o mutaciones por encima de un umbral determinado conlleva la extinción de la población viral (catástrofe de error). La demostración de esta teoría de la “catástrofe error” de la RBV exige el análisis de cuasiespecies virales, lo que ha limitado los resultados obtenidos en la mayoría de los estudios *in vivo* llevados a

cabo hasta la fecha, que se han valido de técnicas de secuenciación directa o de clonación de un bajo número de clones, y cuyos diseños han sido además muy dispares. Recientemente, el desarrollo de nuevas técnicas de secuenciación masiva o pirosecuenciación ha supuesto un importante avance en la investigación *in vivo* del poder mutagénico de la RBV en el VHC, al permitir el estudio tanto de las variantes mayoritarias como minoritarias, pero su uso en la bibliografía aún es testimonial.

No obstante, está bien establecido que la presencia de mutaciones en determinadas regiones del genoma viral antes de comenzar el tratamiento con peg-IFN y RBV condicionan la respuesta al mismo, lo cual ha sido ampliamente demostrado mediante técnicas de secuencia directa [6, 8, 105]. Si la RBV presentara capacidad mutagénica su administración en monoterapia podría determinar la aparición de nuevas mutaciones en la secuencia de dichas regiones virales, condicionando los resultados de un tratamiento posterior combinado con peg-IFN.

Por otro lado, se conoce que la RBV presenta un perfil farmacodinámico típico, y ha sido demostrada la correlación entre mayores TPR y las tasas de respuesta virológica al tratamiento, de manera que el diseño de estrategias dirigidas a maximizar la exposición a RBV constituye una opción atractiva, aunque limitada por los posibles efectos secundarios. La influencia de una pauta de inducción con RBV en monoterapia antes del tratamiento combinado con peg-IFN y RBV sobre dichos parámetros intracelulares, los resultados de respuesta al tratamiento, y la heterogenicidad genética del VHC apenas ha sido analizada en conjunto, ya que son pocos los trabajos con este diseño, y la mayoría se han centrado únicamente en el estudio del mecanismo de acción de la RBV.

Bajo la incógnita de su forma de actuación, nosotros hemos planteado un estudio en el que pacientes con HCC-1 *naive* recibieron RBV en monoterapia 4

semanas antes del tratamiento combinado estándar con peg-IFN y RBV, analizando las mutaciones en la secuencia mayoritaria del genoma viral de la región Core, NS5B y NS5A (ISDR y PKRbd) durante ambos periodos de tratamiento, y valorando la influencia de esta pauta de inducción con RBV en la cinética viral, las TPR, la dinámica de las ALT, el desarrollo de anemia y los resultados terapéuticos, así como en la aparición de mutaciones en dichas regiones del genoma viral. Posteriormente se ha realizado la secuenciación masiva o pirosecuenciación de la región NS5A comparando la secuencia del periodo basal y tras un mes con RBV monoterapia, para dilucidar la hipótesis de la “catástrofe error”.

2.2. HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis es la siguiente:

La RBV en monoterapia previa al tratamiento combinado con peg-IFN/RBV en pacientes con HCC-1 aumenta la predisposición celular al efecto del IFN, y por tanto potencia la susceptibilidad de respuesta viral al tratamiento (disminuyendo la CV y los niveles de ALT, y aumentando las TPR y el número de mutaciones en regiones importantes para la replicación viral). Además, la RBV podría actuar sobre la población viral aumentando el número de quasiespecies e induciendo la “catástrofe error”.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

1. Analizar la influencia de la administración de RBV antes del tratamiento combinado con peg-IFN/RBV en la cinética viral, niveles de ALT, anemia, TPR y respuesta al tratamiento antiviral.

2. Analizar el efecto mutagénico de la RBV:

2.1. Estudio de mutaciones en la secuencia mayoritaria de las regiones Core, NS5B, ISDR y PKRbd del genoma del VHC en los periodos basal, tras un mes de RBV monoterapia y tras un mes de peg-IFN/RBV, y su relación con la respuesta al tratamiento antiviral.

2.2. Estudiar las poblaciones genómicas mayoritarias y minoritarias del VHC por pirosecuenciación masiva en la región NS5A en los periodos basal y tras un mes de RBV monoterapia, para demostrar la teoría de la “catástrofe error”.

”.

PACIENTES Y MÉTODOS

4. PACIENTES Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio de cohorte prospectivo controlado con una cohorte histórica.

4.2. ÁMBITO DEL ESTUDIO

Hospital Universitario San Cecilio. Granada.

4.3. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Una cohorte de 81 pacientes de raza blanca, españoles, con infección por el VHC-1 previamente no tratados, y diagnosticados en el servicio de Aparato Digestivo del Hospital San Cecilio de Granada, se incluyeron en este estudio piloto. 27 pacientes recibieron entre julio de 2006 y septiembre de 2008 tratamiento con RBV en monoterapia durante 4 semanas previamente al inicio del tratamiento combinado con peg-IFN- α -2a y RBV durante 48 semanas (Grupo A). El Grupo A se ha comparado con otro grupo control histórico (Grupo B) de 54 pacientes (1x2) que fueron seleccionados de una base de datos histórica de 119 pacientes con HCC-1 *naïve* que recibieron tratamiento con peg-IFN- α -2a y RBV durante 48 semanas entre enero de 2002 y agosto de 2004 (comprobando que tuviesen muestras de suero en los tiempos de estudio). Los pacientes fueron seleccionados aleatoriamente mediante el programa SPSS 15.0 de Windows.

Solo en 53 sujetos (17 del Grupo A y 36 del Grupo B) se confirmó el diagnóstico de HCC mediante la realización de una biopsia hepática. El estudio histológico se llevó a cabo según la clasificación histológica de Scheuer's modificada por Caballero y cols. de actividad necroinflamatoria (I0-I8) y del

estadio de fibrosis (F0-F4) [169]. El diagnóstico de HCC se basó en la presencia de niveles aumentados de ALT al menos durante 6 meses, y la detección permanente en suero de RNA-VHC.

Determinamos como criterios de exclusión la coinfección por el virus de la hepatitis B (VHB) o el virus de la inmunodeficiencia adquirida humana (VIH), el hábito alcohólico y la presencia de enfermedad hepática autoinmune o inducida por fármacos. Los criterios de inclusión fueron la infección por el VHC genotipo 1 y ser paciente *naive*.

4.4. PROTOCOLO DE TRATAMIENTO

Los pacientes del Grupo A fueron tratados durante 4 semanas con RBV en monoterapia (dosis ajustada según peso: 800-1200 mg/día según peso <75 kg o ≥75kg respectivamente; Copegus®, de Roche) antes de iniciar el tratamiento combinado. En ambos grupos (Grupos A y B) el tratamiento combinado consistió en 180 µg/semana de peg-IFN-α-2a (Pegasys®, de Roche) asociado a RBV con dosis ajustadas al peso durante 48 semanas (**Figura 10**).

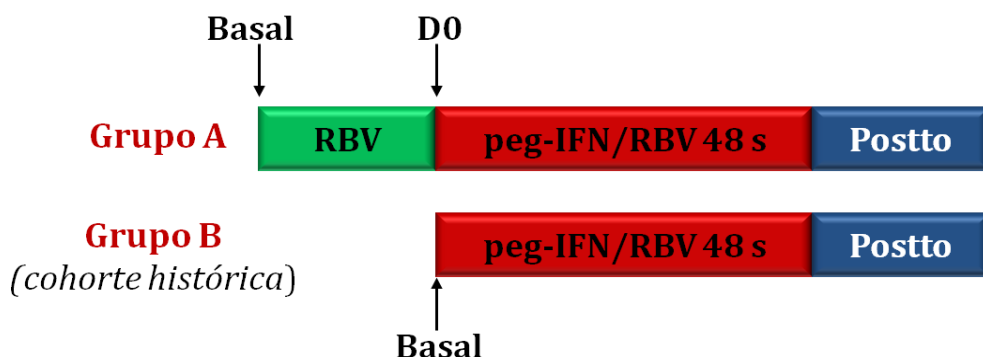


Figura 10. Protocolo de tratamiento

RBV, Ribavirina; peg-IFN, Interferón pegilado; postto, posterior al tratamiento; D0, final de RBV en monoterapia

La anemia se definió como niveles de Hb <10 g/dL. La dosis de RBV fue reducida si la Hb descendía <10 g/dL, y suspendida si alcanzaba niveles <8,5 g/dL. Las reducciones de la dosis diaria de RBV se realizaron con descensos de 200 mg, y se volvía a la dosis inicial cuando se recuperaron los niveles de Hb. Ningún paciente recibió EPO. La dosis acumulada de RBV se determinó calculando el porcentaje de dosis total planificada durante el tratamiento combinado. Las dosis de peg-IFN- α se redujeron cuando el recuento de neutrófilos y plaquetas era inferior a 750/mm³ y <50000/mm³ respectivamente, y fue suspendido en caso de recuentos de neutrófilos y plaquetas <500/mm³ y <25000/mm³ respectivamente. Las modificaciones de dosis semanales de peg-IFN- α se realizaron con descensos de 180 μ g, a 135 μ g, 90 μ g y 45 μ g, volviendo a la dosis inicial ante la recuperación de los niveles de neutrófilos y plaquetas.

4.5. CRITERIOS DE RESPUESTA

Los criterios de respuesta fueron los siguientes:

- RVS: pacientes que mantienen el RNA-VHC negativo más de 6 meses después de finalizar el tratamiento combinado.
- RVR: pacientes con un RNA-VHC negativo en la semana 4 de tratamiento combinado.
- RVP: pacientes con un RNA-VHC negativo o con un descenso $\geq 2 \log_{10}$ de la CV en la semana 12 de tratamiento.
- NR (No Respuesta): pacientes sin RVP (no-RVP). Estos pacientes también fueron considerados no-RVS.
- RC: pacientes que negativizan el RNA-VHC durante el tratamiento pero presentan de nuevo un RNA-VHC positivo al final del mismo o a los 6 meses tras finalizar la terapia. Estos pacientes también fueron considerados como no-RVS.

4.6. TAMAÑO DE MUESTRA

El tamaño de muestra (n) necesario para valorar si el porcentaje de pacientes con mutaciones en las regiones estudiadas es mayor en el caso de RVS al tratamiento que en el caso de no respuesta, para un error $\alpha=0,05$ (5%), una potencia del 90%, y detectar una diferencia en dichos porcentajes de al menos un 25%, debe ser de 24 pacientes. Somos conscientes de que esta “n” es pequeña para hacer un estudio de eficacia al tratamiento antiviral, pero insistimos en que el objetivo principal del proyecto es ver el efecto de la RBV sobre determinados parámetros intracelulares y sobre la población viral (efecto mutagénico de la RBV), y secundariamente con la respuesta al tratamiento.

4.7. VARIABLES DE ESTUDIO

■ Estudio de cinética viral, tasas plasmáticas de Ribavirina (TPR), niveles de hemoglobina (Hb) y de alanino aminotrasferasas (ALT), y respuesta al tratamiento: pacientes del Grupo A y Grupo B

·Variables dependientes: Tipo de respuesta al tratamiento (RVR vs no-RVR; RVP vs no-RVP; RVS vs no-RVS), y TPR, niveles de Hb, de ALT y de RNA-VHC.

·Variable independiente: Tipo de tratamiento (Grupo A vs Grupo B).

■ Estudio de las mutaciones: pacientes del Grupo A

·Variable dependiente: Tipo de respuesta al tratamiento (RVS vs no-RVS).

·Variable independiente: Número de mutaciones.

4.8. RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS

Para la inclusión de los sujetos del Grupo A se recogieron las características clínicas y biológicas de cada paciente (sexo, edad, peso), los datos bioquímicos (ALT, AST, GGT) y datos virológicos (genotipo, RNA-VHC, CV). Todos estos datos se incluyeron en una base de datos realizada para este estudio.

Se realizaron extracciones de sangre en las muestras de los pacientes del Grupo A en distintos momentos del estudio que se indicarán en los apartados siguientes. La base de datos diseñada se fue completando con los resultados obtenidos de los niveles de RNA-VHC, de Hb, de ALT, las TPR y el tipo de respuesta al tratamiento, y se usó posteriormente para el análisis estadístico. En todas las muestras se procedió a la obtención de suero y plasma almacenándose a -80°C. El suero se dividió en 2 alícuotas que se usaron para el estudio virológico (genotipo, RNA-VHC, CV), y dos alícuotas de plasma para el estudio bioquímico y para la TPR. Los diferentes parámetros bioquímicos fueron determinados en el laboratorio de análisis general de nuestro hospital.

Los datos epidemiológicos, bioquímicos, virológicos, TPR y de respuesta al tratamiento de los pacientes del Grupo B se recogieron de una base de datos de la cual fueron seleccionados.

En una segunda etapa procedimos al análisis del efecto mutagénico de la RBV en el Grupo A de estudio, es decir, en los pacientes que recibieron 4 semanas de RBV en monoterapia. Para ello, se determinaron las mutaciones presentes en la secuencia mayoritaria de las regiones Core, NS5B y NS5A (ISDR y PKRbd) del genoma del VHC por secuenciación directa. Finalmente, se procedió a la secuenciación masiva de la región NS5A mediante pirosecuenciación de un paciente del Grupo A seleccionado al azar mediante el programa SPSS, para completar el estudio mutagénico.

■ **Cinética viral**

La cinética viral fue estudiada en los pacientes del Grupo A. Se realizó un análisis cuantitativo del RNA-VHC (CV) justo antes (basal) y al final de la administración de la RBV en monoterapia (día 0, (D0)), y también en los días 2, 4, 8 y 15, y en las semanas 4, 12, 24, 48 (final del tratamiento) y 72 (final del seguimiento) del tratamiento combinado del Grupo A. Así pudimos conocer los distintos tipos de respuesta y hacer los diferentes grupos de estudio.

En el Grupo B la CV se determinó en los momentos habituales durante el tratamiento de la HCC, es decir, justo antes del inicio del tratamiento combinado (basal), en las semanas 4, 12, 24 y 48 de tratamiento, y en la semana 72 (final del seguimiento).

■ **Tasas plasmáticas de RBV (TPR)**

En el Grupo A, las TPR se determinaron antes de la toma de la primera dosis diaria de RBV en 5 puntos distintos del tratamiento: al final de la administración de RBV en monoterapia (D0), y en las semanas 4, 8, 12 y 16 del tratamiento combinado, al igual que se hizo en el grupo B.

■ **Niveles de hemoglobina (Hb)**

Los niveles de Hb se determinaron antes del inicio del tratamiento (basal), tras completar 4 semanas de RBV en monoterapia en el Grupo A (D0), en las semanas 4, 8, 12, 16, 36, 48 (final del tratamiento) y 72 semanas (final del seguimiento) del tratamiento combinado en ambos grupos.

■ Niveles de alanina aminotrasferasas (ALT)

Para analizar el efecto de la RBV en la dinámica de la ALT durante el tratamiento sus niveles fueron determinados justo antes del inicio del tratamiento con RBV en monoterapia (basal) y al final del mismo (día 0) en el Grupo A, y también en las semanas 4, 12, 24, 36 y 48 (final del tratamiento) y 72 (final del seguimiento) del tratamiento combinado en el Grupo A y B.

■ Estudio de la variabilidad genética del VHC: mutaciones

❖ Secuenciación directa de las regiones Core, NS5B, NS5A (ISDR, PKRbd)

Se ha realizado exclusivamente en los pacientes del Grupo A. Se ha determinado el número de mutaciones en la secuencia mayoritaria de cada paciente de las regiones Core, NS5B y NS5A (ISDR, PKRbd), en los puntos definidos antes y durante el tratamiento, los cuales fueron:

1. Antes de comenzar el tratamiento (basal).
2. Al finalizar 4 semanas de RBV monoterapia (D0).
3. Al mes del tratamiento combinado (peg-IFN/RBV).

Las secuencias amplificadas de cada región han sido las siguientes: Core (nt 349-820), NS5B (nt 7730 a 8874), y el dominio PKRbd de la NS5A (nt 6966-7164), que incluye la región ISDR (nt 6966-7086) y los flancos de este dominio.

Las secuencias obtenidas mediante la secuenciación directa de cada región fueron alineadas mediante los programas CLUSTAL X y MEGA 4. Se realizó un alineamiento de las secuencias nucleotídicas para determinar las posibles mutaciones silenciosas (el cambio de un nt no implica el cambio en la

secuencia aminoacídica), y también un alineamiento con las secuencias aminoacídicas para la determinación de las mutaciones no silenciosas (el cambio nt implica un cambio de Aa). Para el cálculo de mutaciones se determinó de la secuencia consenso de nuestra población, y las secuencias mayoritarias de cada región de estudio se compararon con las secuencias de referencia HCV-J. Se consideró mutación como cualquier cambio en las secuencias mayoritarias de nucleótidos (mutaciones silenciosas) o de Aa (mutaciones no silenciosas) que difiera de la secuencia de referencia y de la consenso de la población.

❖ **Pirosecuenciación de la región NS5A completa del genoma del VHC**

Para completar el estudio del efecto mutagénico de la RBV sobre la población viral se realizó la pirosecuenciación de la región NS5A completa (nt 6069 al 7630) de un paciente del Grupo A (selección al azar por el sistema SPSS, VHC-1b). Se realizó un alineamiento de todas las secuencias de lectura, y el posterior recuento de nt de las cuatro posibles bases (A, C, G y T) en cada posición del genoma de referencia del VHC-J. Este alineamiento de nt se comparó en el momento basal y al mes del tratamiento con RBV para investigar un posible aumento del número de sustituciones nucleotídicas inducido por la RBV. El estudio de la variabilidad genética se completó con la determinación de los siguientes parámetros proporcionados por el pirosecuenciador: número haplotipos, número total de mutaciones (Eta), número de sitios polimórficos (S), frecuencia de mutación (Mf), complejidad de cada amplicón determinado por la entropía de Shannon (Sn), número medio de *pairwise nucleotides differences* (K) y diversidad de nt (Pi). Se consideraron mutaciones de transición asociadas a la RBV el cambio de G a A y de C a U [48, 57, 170]. Las definiciones son las siguientes:

- Haplotipo: variantes genéticas o secuencias genómicas mayoritarias y minoritarias encontradas en una población viral, también conocidas como quasiespecies.

- Número total de mutaciones (Eta): número total de mutaciones o sustituciones nucleotídicas encontradas en el total de secuencias amplificadas.

- Sitios polimórficos (S): número de nt más susceptibles de presentar un cambio de base en el genoma viral

- Frecuencia de mutación (Mf): proporción de mutaciones o variantes genómicas encontradas en la población viral.

- Entropía de Shannon normalizada (Sn): diversidad genética de las quasiespecies de una población viral en cada tiempo de estudio analizado.

-Número medio de pairwise nucleótides differences (K): número medio de nt diferentes encontrados por pares de muestra, o número medio de diferencia de nt encontrados por parejas.

- Diversidad de nt (Pi): grado de polimorfismo en una población.

4.9. LIMITACIONES Y SESGOS

La limitación más importante de nuestro trabajo ha sido el pequeño número de pacientes de nuestra población de estudio pese a ajustarse al cálculo del tamaño muestral. Una vez finalizada la recogida de pacientes, y realizado el trabajo experimental y el análisis estadístico, nos ha sido imposible aumentar el tamaño de muestra debido al protocolo de tratamiento aprobado en el Comité de Ética de nuestro hospital exclusivamente para la realización de este estudio. Por otro lado, otra limitación la hemos encontrado en la fase experimental durante el estudio de las mutaciones en la secuencia mayoritaria (secuenciación directa), ya que el alto número de muestras con una baja CV tras el mes de tratamiento con RBV monoterapia y con el tratamiento estándar, ha impedido el análisis de sus secuencias genómicas.

4.10. METODOLOGÍA

■ Análisis cualitativo y cuantitativo de RNA-VHC

Tanto el análisis cualitativo y cuantitativo del RNA-VHC, como la determinación del genotipo viral, se realizaron en el servicio de Microbiología del Hospital Universitario San Cecilio. El genotipo viral se determinó mediante ensayos de hibridación inversa (Inno-LIPA II HCV Innogenetics SA Ghent, Belgium), el análisis cualitativo mediante la técnica COBAS AMPLICOR HCV V2.0 (Roche Diagnostics), y la determinación cuantitativa del RNA por RT-PCR (Ampliprep TaqMan, Roche Molecular System Inc; punto de corte <15UI/mL).

■ Determinación de las tasas plasmáticas de RBV (TPR)

La determinación de las TPR se llevó a cabo mediando un método de cromografía líquida de alta resolución previamente descrito [67, 70]. Se siguió el siguiente protocolo:

- Extracción de unos 6 ml de sangre en un tubo con heparina, y centrifugación posterior durante 5 minutos a 1500 x g a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido (plasma) se almacenó a -20°C hasta su análisis.

- La RBV se extrajo de unos 500 µl de plasma utilizando columnas de PBA (ácido fenil borónico) [100mg/10ml] de Varian (Bond Elut LRC-PBA, 100mg). Una vez extraída se diluyó con ácido fosfórico 0.1M, y finalmente se inyectaron 200 µl en una columna de HPLC Waters M-510 HPLC pump. Se empleó un flujo de 0.7ml/min, y una longitud de onda de 207nm. El límite de detección fue 0.06 mg/L. La precisión fue alta con medidas intradía e interdía desde 2-2.8%.

■ Ampliación y secuenciación directa de las regiones Core, NS5B, NS5A (ISDR, PKRbd)

El procedimiento empleado es el siguiente:

- Extracción del RNA-VHC: El RNA viral de las muestras de los pacientes fue extraído a partir de 300 µL de suero mediante el kit Viral DNA/RNA 300 kit y se lleva a cabo en el aparato robotizado Prepito (PerkinElmer, Chemagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se obtiene un volumen de 50µL de RNA extraído, diluido en agua Milli Q, y se conserva a -80°C hasta su utilización.

- Transcripción inversa (RT): A partir del RNA extraído y conservado a -80°C, mediante la técnica de retro transcripción (RT), se obtuvo el cDNA utilizando el kit qScript Flex cDNA Synthesis Kit (QUANTA Biosciences) siguiendo las indicaciones del fabricante. La reacción de RT tiene lugar en dos etapas, una primera de calentamiento donde se mezcla el tampón de la reacción, GPS Enhancer (10X), con 10 µL de RNA, junto con el correspondiente cebador antisentido de la 1ª PCR a la concentración de 100 nM (específico de cada región de estudio) y los RANDOM primer, durante 5 minutos a 65°C. En una segunda etapa se añade a la mezcla de reacción el tampón qScript Flex reaction mix (5X) junto con la enzima encargada de llevar a cabo la reacción de transcripción inversa, qScript Reverse Transcriptase, hasta un volumen final de 20 µL. El programa térmico de esta etapa final consta de: 10 minutos de preincubación a 25°C, 90 minutos a 42°C (fase de transcripción inversa), 85°C durante 5 minutos (fase de inactivación del enzima) y finalmente refrigeración a 4°C. La reacción de RT se lleva a cabo en el termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems).

▪**Amplificación del DNA:** El cDNA obtenido por RT fue utilizado para la amplificación mediante PCR anillada específicas para cada región de estudio. Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en el termociclador CFX-96 (BioRad) usando el kit SYBR Green Supermix Low ROX (QUANTA). Cada reacción de la 1ª y 2ª PCR, con un volumen final de reacción de 30 y 50 µL respectivamente, consta de 10 µL de reactivo SYBR Green, mezcla de cebadores correspondientes a cada región de estudio a las concentraciones de 100 nM, 5 y 1 µL de cDNA respectivamente y completada con agua milliQ hasta el volumen final. El perfil térmico utilizado para cada reacción de PCR fue el preestablecido en el software CFX Manager Software (BioRad), con la salvedad de la temperatura utilizada para la etapa de hibridación de la PCR, correspondiente a la temperatura óptima de hibridación para cada uno de los cebadores utilizados.

Se ha realizado la amplificación de las cadenas *sense* y *antisense*, de cada una de las regiones a estudiar. En la siguiente **Tabla 15** se representan las secuencias de los cebadores específicos utilizados para la región del Core (nt 349-820), NS5A (nt 6966-7164) y NS5B (nt 7730-8874) en sus RT-PCRs correspondientes.

Tabla 15: Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de las regiones virales de estudio.

Región		Secuencias de cebadores	
NS5A	1ª PCR	Sense	5'-ACAACCTCCCATGCGAGCCCGAGCCGGA-3'
		Antisense	5'-GAGGGGGAGCCGGGGGATCCCGATCTC-3'
	2ª PCR	Sense	5'-TGCTCACCGACCCATCCCACATTACAGCAGA-3'
		Antisense	5'-ATGCCCCCTCTCGAGGGGGAGCCGGG-3'
CORE	1ª PCR	Sense	5'-GACGTCAAGTTCCTGGGCGGTGGTCAGAT-3'
		Antisense	5'-AAAGAGCAACCGGGCAGATTCCCTGTTGC-3'
	2ª PCR	Sense	5'-GGAGTTTACCTGTTGCCGCGCAGGGGCC-3'
		Antisense	5'-GGGGCGCCGACGAGCGGAATGTACCCCAT-3'
NS5B	1ª PCR	Sense	5'-TTCACGGAGGCTATGACTAGGTA-3'
		Antisense	5'-TAAGCTTGGTCCTTACTGCCAG-3'
	2ª PCR	Sense	5'-GCTATGACTAGGTACTCTGCCCC-3'
		Antisense	5'-CTTACTGCCAGTTGAAGAGGTA-3'

▪ Purificación del producto de PCR y determinación de la concentración de DNA amplificado: Una vez realizadas las PCR, el producto de PCR fue purificado mediante el kit de purificación por centrifugación Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez purificado el DNA, se determinó su concentración con el nanofotómetro IMPLEN (bioNova) y finalmente se conservaron a -20°C hasta su preparación para secuenciación directa.

▪ Secuenciación directa: Los productos de PCR purificados fueron enviados al Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neira, CSIC, de Granada, para la realización de la técnica de secuenciación del DNA. El tamaño de los amplicones obtenidos en los productos de PCR, cuyo tamaño está comprendido entre 400-570 pb, se preparan en un

volumen final de 12 μ L, donde se incluye una concentración de DNA de aproximadamente 20 ng junto con el cebador sentido o antisentido de la 2ª PCR a la concentración de 6,4 pmol. Una vez preparadas las muestras, estas fueron secuenciadas por el secuenciador automático 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Posteriormente, las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante los programas informáticos CLUSTAL X y MEGA 4 para obtener el alineamiento múltiple y número de mutaciones en las regiones de interés.

Como hemos comentado anteriormente, algunas muestras no pudieron ser amplificadas debido a la CV baja, y por tanto no se pudieron incluir en el alineamiento de secuencias.

■ Pirosecuenciación de la región NS5A

La técnica de pirosecuenciación se ha llevado a cabo en la plataforma de ultrasecuenciación del Centro de Investigación en Red Biosanitaria de Enfermedades Hepáticas y Digestivas o CIBERehd, utilizando el secuenciador GS-FLX de Roche. El procedimiento a seguir ha sido el siguiente:

- Del Grupo A de estudio se ha seleccionado un paciente al azar, (CV: basal 24×10^6 UI/mL, tras 4 semanas con RBV monoterapia 10.6×10^5 UI/mL). Las extracciones de RNA se han realizado a partir de 140 μ L de suero del paciente usando el Kit QIAamp Viral RNA Mini-Kit de Qiagen. Para la síntesis del cDNA se han realizado triplicados usando el kit Accu-Script PfuUltra II Fusion HS de Stratagene con el primer específico (5Bd7702) y 5 μ L del RNA viral. La amplificación de la región NS5A completa, desde el nucleótido 6069-7630, se lleva a cabo con 5 amplicones superpuestos de PCR (nombrados como p1, p2, p3, p4 y p5) con sus primers específicos *sense* y *antisense* para la nested PCR. En primer lugar se realizan tres PCRs largas (2074 nt), con sus primers específicos

4Bu5632 y 5Bd7702, y de cada una de ellas realizamos las nested para cada fragmento (de unos 400 nt aproximadamente). Al final del proceso obtenemos tres amplificaciones de cada amplicón, unidos a igual volumen y purificados en gel de agarosa al 1% utilizando el kit QIAquick Gel Extraction de Qiagen. Los primers específicos para cada amplicón se detallan a continuación (**Tabla 16**).

Tabla 16. Secuencia de los cebadores usados en la amplificación de la NS5A complete realizada mediante PCR de 5 amplicones superpuestos

	Cebador descripción	Cebador nombre	Secuencia	Posición nt
PCR	Outer			
	Sense	4Bu	5'- ACATGTGGAATTCATCAGCGGGATACA-3'	5632-7702
	Antisense	5Bd	5'- TGGTGACGCAGCAAAGAGTTGCTCA-3'	
Nested-PCR	Inner			
	Sense	p1-4Bu	5'- CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGAGGGGGCAGTGAATGGATGAACCGG-3'	6069-6476
	Antisense	p1-5Ad	5'- CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCTCATGGAACCGTTTTTGACATGTCC-3'	
	Sense	p2-5Au	5'- CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGGTGTGACTGACTTCAAGACCTGGCT-3'	6299-6735
	Antisense	p2-5Ad	5'- CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGTGACGCCACCCCATCCA-3'	
	Sense	p3-5Au	5'- CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGCGGGTGGGGATTTCCACTA-3'	6623-6959
	Antisense	p3-5Ad	5'- CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAACTGGCTAGCTGAAGAGCTGGCC-3'	
	Sense	p4-5Au	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGTCCACCGACCCATCCACATTACAGCAGA-3'	6862-7224
	Antisense	p4-5Ad	5'- CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGGTTGTAATCCGGGCGTGCCCA-3'	
	Sense	p15-5Au	5'- CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCCCCAGCGATGCCCATATGGGC-3'	7186-7630
Antisense	p15-5Ad	5'- CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGGGCGCTGTCCATGTGTAGGACA-3'		

Finalmente, una vez purificados los amplicones, fueron enviados al CIBERehd para su pirosecuenciación en el secuenciador GS-FLX Titanium de Roche. Primeramente se procede a la construcción de las librerías genómicas de DNA, donde los amplicones de partida son analizados en calidad y tamaño por un Bioanalizador (Agilent Technologies) antes de ser fragmentados en los tamaños correspondientes y ligados a los adaptadores o MID (GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kit, Roche Applied Science). A continuación se realiza la PCR de emulsión, donde los fragmentos de DNA que componen la librería se unen a las bolas de captura, y se consigue la amplificación clonal en emulsión. Una vez finalizada esta PCR de emulsión, las muestras están preparadas para su secuenciación en el GS-FLX Titanium. Se realizó una media de lecturas de 13.907,8 lecturas por amplicón de las muestras basales (min.-máx.: 7.078-20.759) y de 9.859 lecturas por amplicón de las muestras 4 semanas RBV monoterapia (min.-máx.: 4.555-14.463). El análisis bioinformático de los resultados obtenidos en el GS-FLX se muestran en el apartado de resultados.

4.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

■ Estudio de la cinética viral, tasas plasmáticas de RBV (TPR), niveles de hemoglobina (Hb) y niveles de alaninoaminotransferasas (ALT)

Las variables cuantitativas se expresaron como valores medios \pm desviación estándar, y las variables cualitativas como valores absolutos con porcentajes.

Las comparaciones entre grupos para variables cualitativas se hicieron usando el test de chi-cuadrado (χ^2) o el test exacto de Fisher, y para variables cuantitativas el test de la t de Student (muestras pareadas y no pareadas), o en caso de variables no normales test no paramétricos (el test de la U de Mann-

Whitney y el test de Wilcoxon). Para el estudio de la dinámica de la ALT durante todo el tratamiento en ambos grupos se ha aplicado el análisis ANOVA de muestras repetidas de dos factores. Para determinados estudios se ha realizado regresión logística, y correlación de Pearson.

El criterio de significación estadística fue $P \leq 0,05$. Los datos de manejo y análisis se obtuvieron usando el SPSS 15.0 para Windows.

■ Estudio de las mutaciones del VHC

Las variables cuantitativas se expresaron como valores medios \pm error típico de la media, y las variables cualitativas como valores absolutos con porcentajes.

Para el estudio de las mutaciones, debido a que las variables no eran normales y al pequeño tamaño de muestra, se han usado test no paramétricos (test de Wilcoxon, test de la U de Mann-Whitney), y el análisis de ANOVA de muestras repetidas de dos factores.

El criterio de significación estadística fue $P \leq 0,05$. Los datos de manejo y análisis se obtuvieron usando el SPSS 15.0 para Windows.

4.12. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Los datos de interés para este estudio fueron recogidos en una base de datos protegida con clave, a la cual sólo accedieron los investigadores implicados en el proyecto. Cabe aclarar que se separan en una segunda base de datos y con diferente clave de acceso los datos identificativos de los pacientes, y que en esta última el acceso estaba permitido sólo al investigador principal. Todos los

investigadores se comprometieron a respetar la confidencialidad de los datos de acuerdo a la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre sobre la Protección de datos de Carácter Personal, y la ley 41/2002 del 14 de noviembre, ley básica reguladora de la autonomía del paciente y derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica.

Cada paciente fue informado de las ventajas e inconvenientes del tratamiento y de los posibles efectos adversos, siendo requisito imprescindible la firma del consentimiento para ser tratados y participar en el estudio. El protocolo de estudio se adaptó a las guías éticas de la Declaración de Helsinki de 1975.

Debido a que la cohorte histórica, eran pacientes retrospectivos, con muestras ya recogidas y almacenadas (2002-2004) en una colección privada perteneciente al grupo de investigación (CTS-227), no se precisó el consentimiento informado de estos pacientes. 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 (2007), con el propósito de no entorpecer su uso para la investigación y 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.

El proyecto, fue aprobado para su financiación, y aprobado por el Comité de Ética de Investigación del Hospital Universitario San Cecilio.

RESULTADOS I

**ESTUDIO DE LA CINÉTICA VIRAL,
NIVELES DE HEMOGLOBINA (HB) Y
ALANINA AMINOTRASFERASA (ALT),
TASAS PLASMÁTICAS DE RBV (TPR) Y
RESPUESTA AL TRATAMIENTO**

5. ESTUDIO DE LA CINÉTICA VIRAL, NIVELES DE HEMOGLOBINA (HB) Y DE ALANINA AMINOTRASFERASAS (ALT), TASAS PLASMÁTICAS DE RBV (TPR) Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO

5.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Todos los pacientes completaron el protocolo de estudio. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las características basales entre ambos Grupos A y B (**Tabla 17**). Ninguna de las variables de estudio mostró una asociación estadísticamente significativa con la respuesta al tratamiento en ninguno de los dos grupos (datos no mostrados).

En el Grupo A, la RVR, RVP, y RVS fueron del 48% (n=13), 89% (n=24), y 52% (n=14) respectivamente, mientras que en el Grupo B fueron del 52% (n=28), 90% (n=49), y 52% (n=28) respectivamente, no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en ningún tipo de respuesta ($P>0.05$) (**Tabla 18**). En el conjunto de pacientes del estudio (n=81) la RVR fue predictiva de RVS (OR=10.1, 95% IC: 3.5-29.4; $P\leq 0.0001$). Lo mismo ocurrió en el Grupo A (OR=66, 95% IC: 5-833; $P=0.001$), y en el Grupo B (OR=5.03, IC 95%:1.4-17.3; $P=0.01$).

Tabla 17. Características basales de los pacientes del Grupo A y B

	Grupo A (n=27)	Grupo B (n=54)	P
Edad (años)	43±11.3	44±10.5	ns
Sexo			
• Hombre	17 (63)	33 (61)	ns
• Mujer	10 (37)	21 (39)	
Peso (Kg)	75±13	70±10	ns
Hb (g/dL)	15.5±1.6	15.3±1.5	ns
ALT (U/L)	74 ± 45	89 ± 65	ns
AST (U/L)	50 ± 23	69 ± 69	ns
GGT (U/L)	66 ± 59	62 ± 67	ns
Estadio fibrosis (n=53)			
• 1-2	10 (59)	28 (78)	ns
• 3-4	7 (41)	8 (22)	
Actividad necroinflamatoria (n=53)			
• 1-4	10 (59)	21 (58)	ns
• 5-8	7 (41)	15 (42)	
Carga viral (UI/mL)			
• ≤600000	3 (11)	13 (24)	ns
• >600000	24 (89)	41 (76)	

Datos expresados en valores absolutos con porcentaje(%) entre paréntesis, y medias±desviación estándar de la media. Test de chi-cuadrado (χ^2) para variables categóricas, test de la t de Student o test de la U de Mann-Whitney para variables continuas; ns: no diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo A y B ($P>0.05$).

ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; GGT, gamma Glutamyltranspeptidasa

Tabla 18: Respuesta al tratamiento en el Grupo A y en el Grupo B

Respuesta al tratamiento	Grupo A	Grupo B	*P
RVR	13 (48%)	28 (52%)	
no-RVR	14 (52%)	26 (48%)	ns
RVP	24 (89%)	49 (90%)	
no-RVP	3 (11%)	5 (10%)	ns
RVS	14 (52%)	28 (52%)	
no-RVS	13 (48%)	26 (48%)	ns

*Datos expresados en valores absolutos con porcentaje entre paréntesis. *Test de chi-cuadrado (χ^2); ns: no diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo A y B ($P > 0.05$).*

RVR, respuesta virológica rápida; RVP, respuesta virológica precoz; RVS, respuesta virológica sostenida.

5.2. CINÉTICA VIRAL DEL VHC DURANTE EL TRATAMIENTO

En ambos Grupos A y B se produjo un descenso medio de los niveles de RNA-VHC desde los valores basales hasta la semana 4 de tratamiento combinado estadísticamente significativo (Grupo A: $6.5 \pm 0.6 \log_{10}$ IU/mL vs $4.2 \pm 1 \log_{10}$ IU/mL; $P < 0.0001$. Grupo B: $6.32 \pm 0.5 \log_{10}$ IU/mL vs $5.1 \pm 0.8 \log_{10}$ IU/mL; $P < 0.01$), siendo mayor en el grupo A (descenso RNA-VHC Grupo A: $2.3 \log_{10}$ IU/mL vs descenso RNA-VHC Grupo B: $1.2 \log_{10}$ IU/mL; $P = 0.04$) (**Figura 11**).

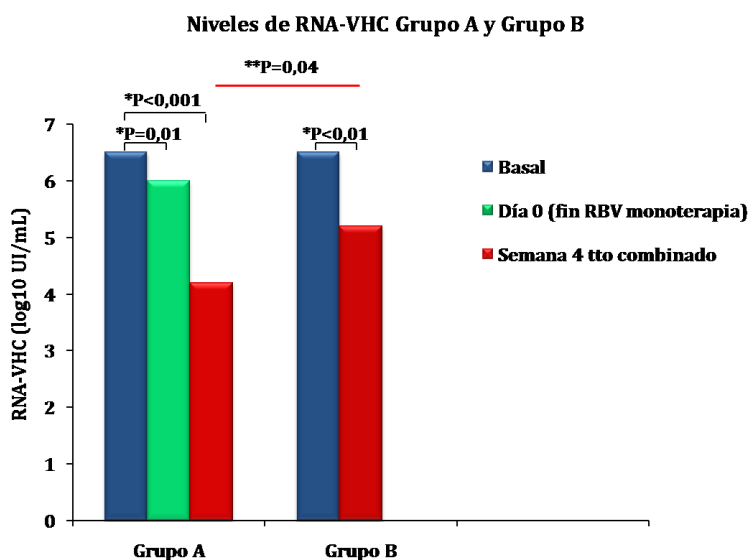


Figura 11. Niveles de RNA-VHC durante el tratamiento en el grupo A y B
 Datos expresados en \log_{10} UI/mL. *Test de la t de Student muestras pareadas;
 **Test de la t de Student muestras no pareadas
 RNA-VHC, Ácido ribonucleico del virus de la hepatitis C; RBV, Ribavirina; D0, final de RBV en monoterapia; S4, semana 4.

En el Grupo A el nivel medio de RNA-VHC en suero disminuyó desde el valor basal de $6.5 \pm 0.6 \log_{10}$ UI/mL a $6.04 \pm 0.8 \log_{10}$ UI/mL al final del tratamiento con RBV en monoterapia (D0) de forma estadísticamente significativa ($P=0.01$), aunque en ningún paciente se consiguió el aclaramiento del RNA-VHC en el D0 (final de RBV monoterapia) (**Figura 11**). El descenso de la CV en el Grupo A al finalizar la administración de RBV monoterapia (**Figura 12**) fue mayor en los pacientes que consiguieron la RVS frente a aquellos en los que no (no-RVS) ($0.85 \log_{10}$ UI/mL vs $0.27 \log_{10}$ UI/mL respectivamente; $P=0.02$); sin embargo, éste no se asoció con la RVR (RVR: $0.4 \log_{10}$ UI/mL vs no-RVR: $0.3 \log_{10}$ UI/mL; $P=0.53$).

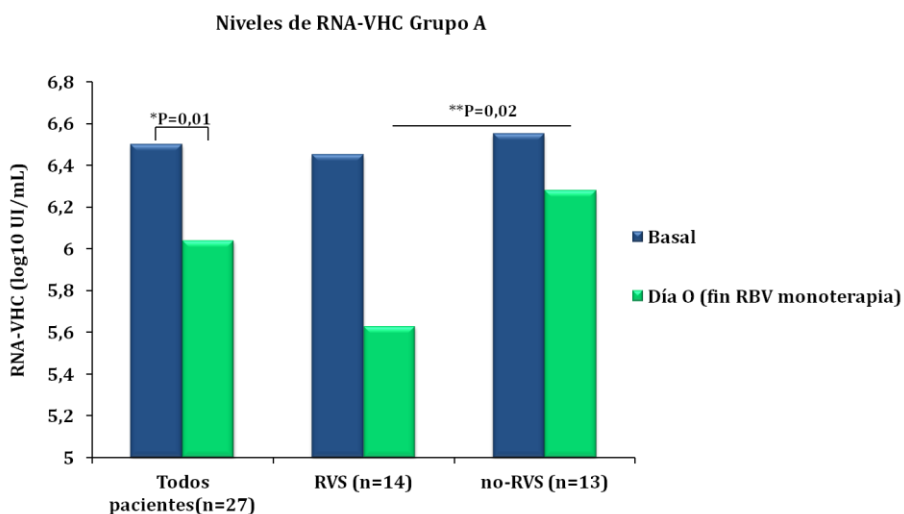


Figura 12. Cinética viral en pacientes del Grupo A según respuesta

Datos expresados en \log_{10} UI/mL. *Test de la t de Student muestras pareadas. **Test de la t de Student muestras no pareadas. RNA-VHC, Ácido ribonucleico del virus de la hepatitis C; RVS, respuesta virológica sostenida; RBV, Ribavirina; D0, final de RBV en monoterapia.

El descenso del RNA-VHC durante el tratamiento combinado con peg-IFN/RBV en los pacientes del Grupo A mostró un patrón bifásico (**Figura 13**). Durante el tratamiento con RBV en monoterapia la CV disminuyó $0.3 \log_{10}$ UI/mL; con el inicio del tratamiento combinado observamos una primera fase de descenso de los niveles de RNA-VHC con una caída de $1.1 \log_{10}$ UI/mL desde D0 hasta el día 2 (primera fase de descenso de la cinética viral), mientras que desde el día 2 hasta la semana 4 el descenso fue de $0.7 \log_{10}$ UI/mL (segunda fase de descenso en la cinética viral).



Figura 13: Patrón de descenso del RNA-VHC durante el tratamiento combinado con peg-IFN/RBV en el Grupo A.

RNA-VHC, Ácido ribonucleico del virus de la hepatitis C

5.3. ESTUDIO DE LA DOSIS Y TASAS PLASMÁTICAS DE RBV (TPR)

Los valores de las dosis medias (dosis/kg) de RBV durante el tratamiento (**Figura 14**) fueron similares entre ambos grupos (Grupo A: 15.3 ± 2.3 mg/kg; Grupo B: 15.4 ± 1.8 mg/kg; $P=0.4$). En 18 pacientes (22%, 7 del Grupo A y 11 del Grupo B) fue necesario reducir la dosis de RBV: en 12 de estos 18 (5 en el Grupo A y 7 en el B) por desarrollo de anemia ($Hb < 10$ g/dL), y en el resto de los casos ($n=6$) por otros efectos adversos inespecíficos, como fatiga, depresión, insomnio o prurito. Las dosis iniciales de RBV fueron restablecidas cuando los efectos adversos se resolvieron. Sólo un paciente del Grupo A interrumpió la RBV debido a la caída del nivel de $Hb \leq 8.5$ g/dL. Sin embargo, la adherencia al tratamiento fue alta y similar en ambos grupos (dosis administrada de RBV $\geq 80\%$: Grupo A: $n=25$ (92%) vs Grupo B: $n=45$ (83%) ($P=0.3$). En ninguno de los dos grupos la

dosis de RBV recibida se asoció con los resultados del tratamiento (Grupo A: RVS: 15.6 ± 1.4 g/dL vs no-RVS: 14.8 ± 2.9 g/dL; $P=0.4$; Grupo B: RVS: 15.2 ± 2 g/dL vs no-RVS: 15.2 ± 2 g/dL; $P=0.9$), ni tampoco ni con las TPR (Grupo A: RVS: 3.1 ± 1 vs no-RVS: 2.99 ± 1.1 ; $P=0.7$; Grupo B: RVS: 2.2 ± 0.9 vs no-RVS: 1.9 ± 0.3 , $P=0.3$).

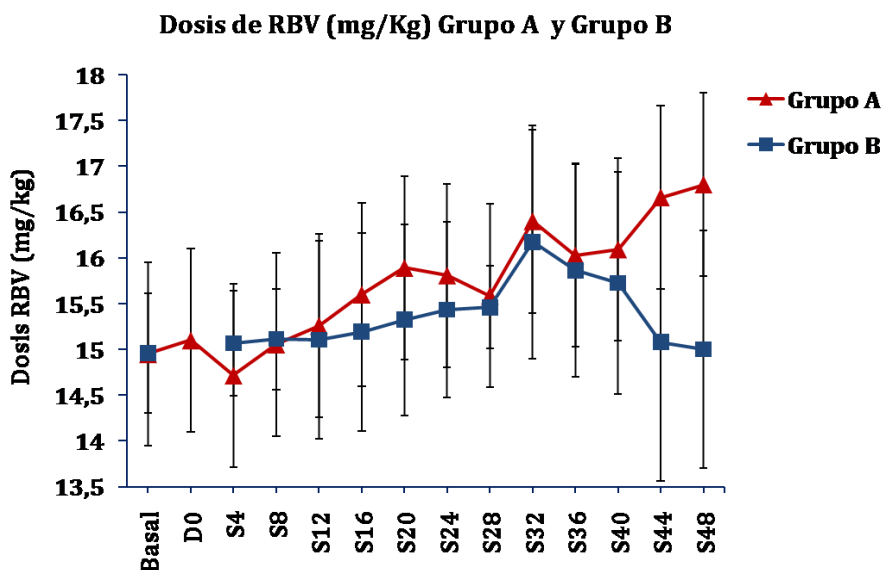


Figura 14. Dosis medias (dosis/kg) de RBV en el Grupo A y B.

Datos expresados en medias \pm desviación estándar de la media; Test de la U de Mann-Whitney ($P > 0.05$).

D0, final de RBV en monoterapia;; S, semana; RBV, Ribavirina.

El estudio de las TPR (**Figura 15**) demostró mayores niveles medios durante los primeros 4 meses de tratamiento combinado en el Grupo A frente al B (Grupo A: 3.05 ± 1 mg/L vs Grupo B: 2.1 ± 0.7 mg/L; $P < 0.0001$). Las TPR fueron superiores en el Grupo A que en el Grupo B en todas las semanas con diferencias estadísticamente significativas (Semana 4: Grupo A: 3.28 ± 1.26 mg/L vs Grupo B: 1.74 ± 0.7 mg/L; $P=0.001$; Semana 8: Grupo A: 3.18 ± 2.0 mg/L vs Grupo B: 2.1 ± 1.05 mg/L; $P=0.021$; Semana 12: Grupo A: 2.9 ± 1.5 mg/L vs Grupo B:

2.07±0.7 mg/L; P=0.021; Semana 16: Grupo A: 3.1±1.6 mg/L vs Grupo B: 2.1±1.6 mg/L; P=0.021). **(Figura 15)**. Inesperadamente en ninguno de los dos grupos se encontró una correlación entre las TPR y la respuesta al tratamiento **(Tabla 19)**.

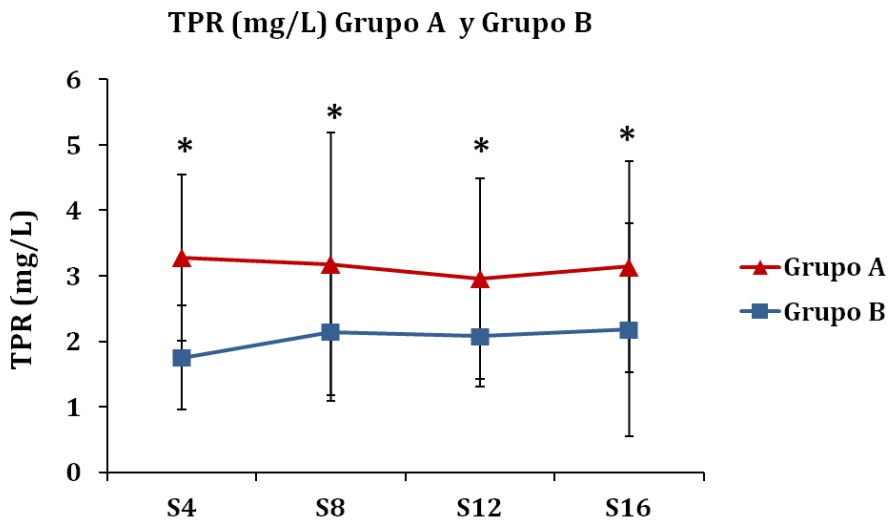


Figura 15. Tasas plasmáticas de RBV (TPR) (mg/L) en el Grupo A y B.
 Datos expresados en medias±desviación estándar de la media; * Test de la U de Mann-Whitney ($P \leq 0.05$).
 TPR, tasas plasmáticas de RBV, S, semana

Las TPR tras un mes de RBV en monoterapia no se correlacionaron con el descenso de ALT ni de la CV durante este periodo (correlación de Pearson, $P=0.2$ y $P=0.4$ respectivamente).

Tabla 19. Relación entre las tasas plasmáticas de RBV (TPR) (mg/L) y la respuesta virológica sostenida (RVS) durante el tratamiento

Grupo	Respuesta	TPR D0	TPR S4	TPR S8	TPR S12	TPR S16
Grupo A	RVS	2.9±1.9	3.3±1.1	2.62±1.1	2.8±1.3	3.6±1.9
	No-RVS	2.6±1	3.2±1.4	3.64±2.5	3.1±1.7	2.6±1.01
Grupo B	RVS		1.7±0.9	2.2±1.2	1.9±0.8	2.3±2.1
	No-RVS		1.7±0.5	2±0.6	2.2±0.7	1.9±0.5

Datos expresados en medias±desviación estándar de la media; Análisis bivariante: U de Mann-Whitney (P>0.05)

TPR, Tasas plasmáticas de RBV; D0, fin de RBV monoterapia; RVS, Respuesta virológica sostenida

5.4. ESTUDIO DE LA ANEMIA

Los niveles de Hb (**Figura 16**) se redujeron durante el tratamiento tanto en el Grupo A como en el B, con un descenso de entre 0,8 y 6,5 g/dL en el Grupo A, y de entre 0,5 y 8.6 g/dL en el Grupo B, y volvieron a los niveles basales a las 6 semanas de finalizar el tratamiento. No hubo diferencias significativas en el descenso medio entre ambos grupos (Grupo A: 3.9±1.4 g/dL vs Grupo B: 3.7±1.4 g/dL; P=0.6).

Los niveles medios de Hb fueron similares durante el tratamiento en ambos grupos (**Figura 16**). La incidencia de anemia (Hb<10g/dl) fue del 18.5% en el Grupo A y 17.6% en el Grupo B (P=0,9). En ningún caso se observó asociación entre la anemia con la respuesta al tratamiento (P>0.05).

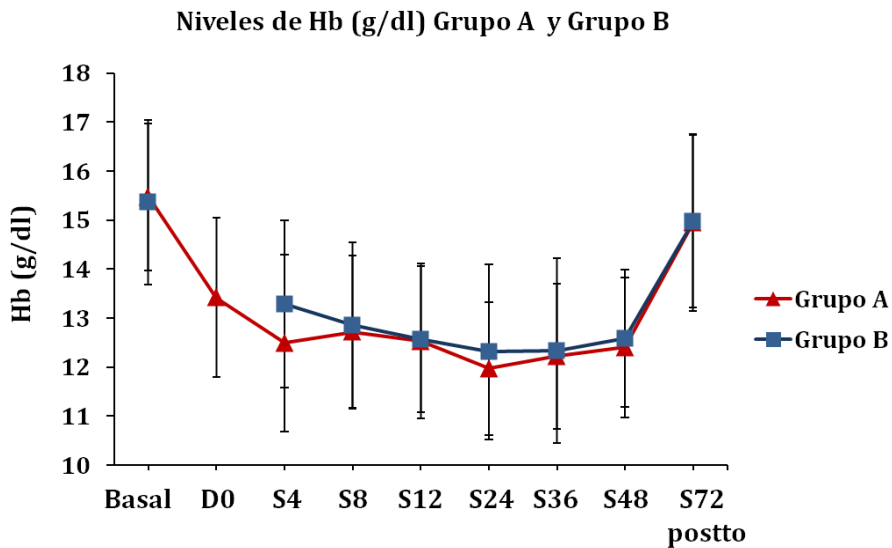


Figura 16. Niveles de hemoglobina (Hb) en el Grupo A y B
 Datos expresados en medias \pm desviación estándar de la media; Test de la U de Mann-Whitney ($P > 0.05$).
 D0, final de RBV en monoterapia; S, semana

Se realizó un análisis multivariante de regresión logística para establecer las diferencias entre ambos grupos y la proporción de anemia: consideramos el grupo (A o B), la Hb basal y las TPR medias variables independientes, y observamos que la Hb basal fue la única variable asociada con la anemia, de manera que una mayor Hb basal, se asoció a menor probabilidad de desarrollar anemia (OR=0.29, 95% CI:0.11-0.73, P=0.009).

5.5. NIVELES DE ALANINA AMINOTRASFERASAS (ALT)

En ambos grupos A y B los niveles de ALT disminuyeron de forma estadísticamente significativa durante el tratamiento ($P < 0,001$, en ambos grupos) (**Figura 17**). Los niveles séricos de ALT fueron menores en el Grupo A frente al B durante todo el tratamiento (**Figura 17**), con diferencias estadísticamente significativas en la semana 4 (Grupo A: 23.5 ± 1.33 U/L vs Grupo B: 60.1 ± 18 U/L; $P < 0.001$), en la semana 12 (Grupo A: 22.9 ± 1.6 U/L vs Grupo B: 51.6 ± 13.1 U/L; $P < 0.002$) y en la semana 24 (Grupo A: 19.2 ± 1.6 U/L vs Grupo B: 43.9 ± 13.2 U/L; $P < 0.0001$).

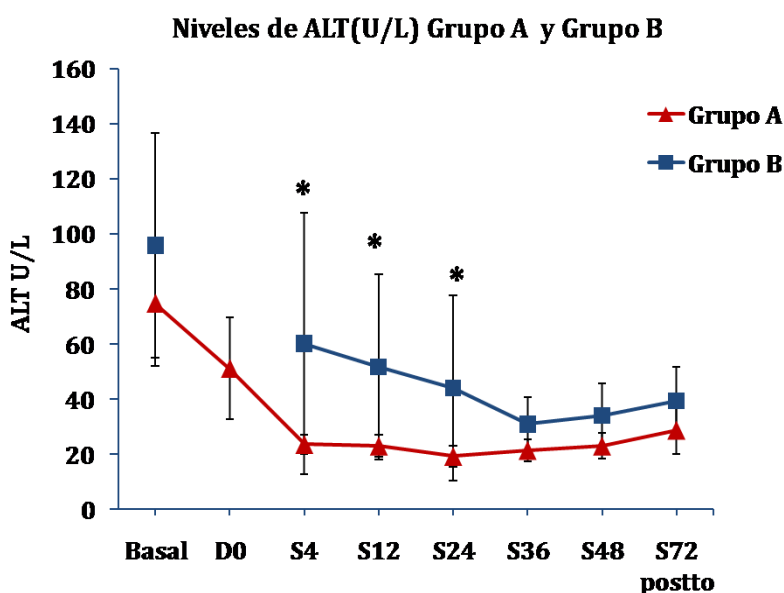


Figura 17. Niveles de ALT durante el tratamiento en el Grupo A y B
 Datos expresados en media \pm desviación estándar de la media, *Test de la U de Mann-Whitney ($P \leq 0.05$).

ALT, alaninoaminotransferasa; D0, final de RBV en monoterapia; S, semana

En el Grupo A durante las 4 semanas del tratamiento con RBV en monoterapia, los niveles de ALT descendieron desde el valor basal de 74 ± 45 U/L a 51 ± 38 U/L en el D0 ($P < 0.0001$) y hasta 23 ± 7 U/L en la semana 4 del tratamiento combinado ($P = 0.01$), permaneciendo < 40 U/L (límite superior de la normalidad) desde la semana 4 de tratamiento combinado hasta después de finalizar el tratamiento (semana 72) (**Figura 18**). Este comportamiento se evidenció tanto en los pacientes con RVS como en los no-RVS (SVR: Basal: 95.5 ± 57 U/L, D0: 70.9 ± 45 U/L, semana 4: 26 ± 7 U/L; $P = 0.03$ y $P = 0.01$, respectivamente. no-SVR: Basal: 58 ± 2 U/L, D0: 32.7 ± 12 U/L, semana 4: 20.7 ± 5 U/L; $P = 0.001$ y $P < 0.0001$, respectivamente) (**Figura 18**).

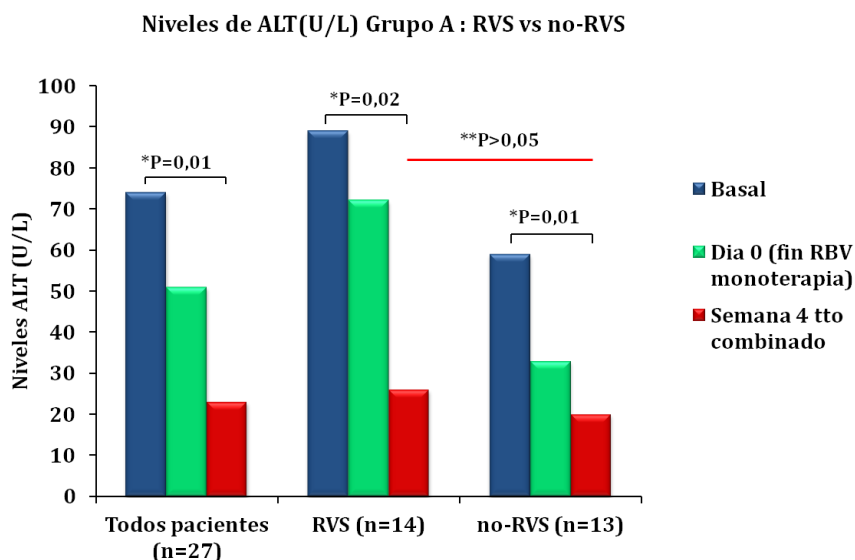


Figura 18. Niveles de ALT en el grupo A según RVS o no-RVS al tratamiento
 Datos expresados en *media ± desviación estándar de la media*, *Test de Wilcoxon **Test de la U de Mann-Whitney
 ALT, alaninoaminotransferasa; D0, final de RBV en monoterapia, S, semana; RVS, respuesta virológica sostenida

En el Grupo B, sin embargo, los niveles de ALT descendieron desde un nivel basal de 89 ± 65 U/L a 52 ± 44 U/L en la semana 4 de tratamiento combinado ($P=0.002$), y no alcanzaron valores <40 U/L hasta la semana 36, cuando volvieron a superar los 40 U/L hasta el final del tratamiento (**Figura 17**). Este comportamiento se observó tanto en pacientes con SVR como en no-RVS (SVR: Basal: 87.5 ± 44 U/L, semana 4: 43.3 ± 28 U/L; $P < 0.0001$. no-SVR: Basal: 91.6 ± 83 U/L, semana 4: 62 ± 96 U/L; $P=0.002$; respectivamente).

El descenso medio de los niveles de ALT durante el tratamiento no se asoció con la RVS ni en el conjunto de pacientes ni en ninguno de los dos grupos por separado (**Tabla 20**). Además, tampoco observamos correlación entre el descenso de los niveles de ALT y RNA-VHC durante la administración de RBV en monoterapia ($P=0.2$).

Tabla 20. Descenso medio de ALT según la respuesta al tratamiento

	Respuesta	ALT (U/L)	P
Grupo A	RVS	39 ± 19	0.1
	No-RVS	30 ± 6	
Grupo B	RVS	42 ± 19	0.3
	No-RVS	63 ± 78	
Total	RVS	41 ± 19	0.9
	No-RVS	52 ± 65	

Datos expresados en medias \pm desviación estándar de la media; Análisis bivalente: U de Mann-Whitney ($P > 0.05$)

ALT, alaninoaminotrasferasa; RVS, Respuesta virológica sostenida

RESULTADOS II

**ESTUDIO DE LAS MUTACIONES DEL VHC:
SECUENCIACIÓN DIRECTA
PIROSECUENCIACIÓN**

6. ESTUDIO DE MUTACIONES DEL VHC

6.1. SECUENCIACIÓN DIRECTA DE LAS REGIONES CORE, NS5B Y NS5A (ISDR Y PKRBD) DEL VHC

6.1.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS MUTACIONES

Se ha estudiado el número de mutaciones de nt y de Aa en las regiones: Core (nt 349-820), NS5B (nt 7730-8874) y NS5A (PKRbd: nt 6966-7164, incluyendo a la ISDR: nt 6966-7086) en las muestras del Grupo A en el momento basal, al mes de RBV monoterapia y al mes del tratamiento combinado con peg-IFN/RBV mediante secuenciación directa (**Tabla 21**).

En la región Core (**Tabla 21**) el análisis de las mutaciones se realizó en los 27 pacientes de la cohorte de estudio. Tras un mes de tratamiento combinado sólo se estudiaron los 14 pacientes que mantuvieron el RNA-VHC positivo. Teniendo en cuenta que la CV de los pacientes tras 1 mes de tratamiento combinado es en general inferior a la basal, se podría esperar que algunos de ellos no hubiesen amplificado la región Core, sin embargo, comprobamos que se trata de una región muy estable que se amplificó en los 14 pacientes con CV detectable en dicho momento del tratamiento.

La región NS5B (**Tabla 21**) fue estudiada en 26 de los 27 pacientes, ya que en un caso no pudo ser amplificada. El análisis de las mutaciones tras un mes de tratamiento con peg-IFN/RBV únicamente incluyó a los 13 pacientes que mantuvieron una CV detectable en tal momento.

Finalmente, tanto la región ISDR como la PKRbd (**Tabla 21**) fueron estudiadas en 23 de los 27 pacientes, ya que su secuencia no pudo ser

amplificada en 4 casos. El análisis de las mutaciones tras un mes de tratamiento con peg-IFN/RBV únicamente incluyó a 5 pacientes. Esto se debe en parte a que 9 de los 14 pacientes con RNA-VHC positivo en este momento tuvieron una CV baja (<2000 UI/L)

Tabla 21. Número de mutaciones de nucleótidos (nt) totales en la región Core, NS5B, ISDR y PKRbd, en el momento basal, tras un mes de RBV en monoterapia y tras un mes de tratamiento combinado (peg-IFN/RBV)

Región	Momento de estudio	n	Nº medio mutaciones	Mínimo-máximo
Core (332 pb)	Basal	27	10.9±1.9	1-42
	RBV 1 mes	27	9.1±1.6	0-35
	peg-IFN/RBV 1 mes	14	10.1±2.2	1-35
NS5B (569 pb)	Basal	26	41.9±5.6	10-101
	RBV 1 mes	26	41.1±5.7	10-101
	peg-IFN/RBV 1 mes	13	36.6±8.3	10-103
ISDR	Basal	23	13.9±1.6	3-32
	RBV 1 mes	23	13.2±1.8	3-32
	peg-IFN/RBV 1 mes	5	11.8±3.1	6-23
PKRbd	Basal	23	25.5±2.7	11-60
	RBV 1 mes	23	24.1±2.9	11-60
	peg-IFN/RBV 1 mes	5	19.6±4.2	13-36

Datos expresados en media±error típico de la media

RBV, Ribavirina, peg-IFN, Interferón pegilado; nt, nucleótido

6.1.2. EFECTO MUTAGÉNICO DE LA RBV

Para evaluar el posible efecto mutagénico de la RBV *in vivo* comparamos las secuencias mayoritarias de las regiones Core, NS5B, ISDR y PKRbd del VHC en las muestras basales y tras 4 semanas con RBV monoterapia, analizando las sustituciones de nt y de Aa, es decir, diferenciando entre mutaciones silenciosas o sinónimas y no sinónimas.

▪ **Región Core**

El estudio de la región Core (**Tabla 22**) evidenció que tras un mes de RBV en monoterapia el número medio de mutaciones de nt totales disminuyó intrapaciente de forma estadísticamente significativa (Basal: 10.9 ± 1.9 mutaciones vs RBV 1mes: 9.1 ± 1.6 mutaciones; $P=0.048$). Al diferenciar entre mutaciones silenciosas y no silenciosas, pudimos comprobar que dicha diferencia fue debida al descenso de las mutaciones silenciosas ($P=0.048$), ya que las no silenciosas no variaron antes y después del tratamiento con RBV en monoterapia ($P=1$) (tasa de fijación de mutaciones no silenciosas constata). El alineamiento de ambos tipos de mutaciones está recogido en las **Figuras 19 y 20**.

Tabla 22. Mutaciones de nucleótidos (nt) totales, silenciosas y no silenciosas en la región Core, NS5B, ISDR y PKRbd en el momento basal y tras RBV en monoterapia

Región (tamaño)	Basal	RBV 1mes	*P
Core			
-Nt totales	10.9 ± 1.9	9.1 ± 1.6	0.048
-Silenciosas	9.8 ± 1.9	7.9 ± 1.5	0.048
-No silenciosas	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1
NS5B			
- Nt totales	41.9 ± 5.6	41.1 ± 5.7	0.7
-Silenciosas	34.5 ± 4.2	33.8 ± 4.4	0.7
-No silenciosas	7.5 ± 1.4	7.2 ± 1.4	0.9
ISDR			
- Nt totales	13.9 ± 1.6	13.2 ± 1.8	0.7
-Silenciosas	10.4 ± 1.3	9.9 ± 1.4	0.5
-No silenciosas	3.6 ± 0.7	3.3 ± 0.7	0.9
PKRbd			
- Nt totales	25.9 ± 2.7	24.1 ± 2.9	0.7
-Silenciosas	18.7 ± 2.3	18.5 ± 2.4	0.5
-No silenciosas	6.7 ± 1.1	5.6 ± 0.9	0.3

*Datos expresados en media ± error típico de la media; *Test de Wilconxon RBV, Ribavirina; nt, nucleótidos*

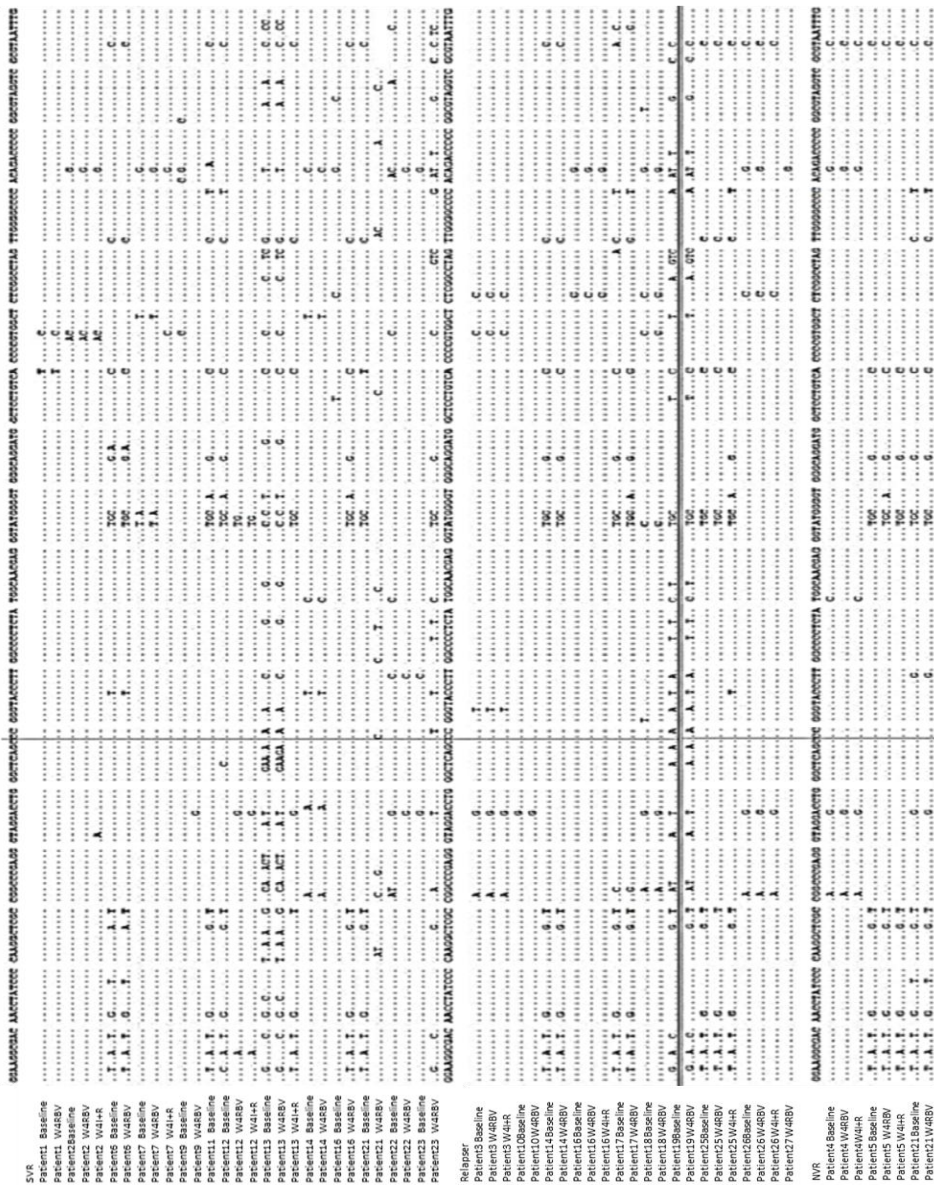


Figura 19. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos (nt) obtenidas por secuenciación directa de la región Core del VHC (programa informático MEGA 4): Comparación de cada secuencia mayoritaria de nt con la secuencia prototipo del VHC-J. **Mutaciones silenciosas.** Las posiciones del primer y último nt de la región Core están indicadas sobre la secuencia del VHC-J. Cada paciente está designado con un número y periodo del tratamiento.

	GRRQPIPKAR	RPEGRITWAQP	GYPWPPLYGNE	GMGWAGWLLS	PRGSRPDSWGF	IDPRRRSRNL
SVR						
Patient1 Baseline						
Patient1 W4RBV						
Patient2Baseline					H	
Patient2 W4RBV					H	
Patient2 W4I+R					H	
Patient5 Baseline				C E		
Patient5 W4RBV				C E		
Patient7 Baseline				L		
Patient7 W4RBV				L		
Patient7 W4I+R						
Patient9 Baseline						P P
Patient9 W4RBV		A				
Patient11 Baseline				C		N
Patient12 Baseline				C		
Patient12 W4RBV		A		W		
Patient12 W4I+R		A		W		
Patient13 Baseline	D	TT KS GK		L		H
Patient13 W4RBV	D	TT KS GR		L		H
Patient13 W4I+R		A		C		
Patient14 Baseline	Q	N		C		
Patient14 W4RBV	Q	N				
Patient16 Baseline						
Patient16 W4RBV				C		
Patient21 Baseline				C		
Patient21 W4RBV	H	A				N
Patient22 Baseline	H	A				N
Patient22 W4RBV		A				
Patient23 Baseline		A				
Patient23 W4RBV		S		C		N I
Relapser						
Patient3 Baseline	Q	A				
Patient3 W4RBV	Q	A				
Patient3 W4I+R	Q	A				
Patient10Baseline		A				
Patient10W4RBV		A				
Patient14Baseline				C		
Patient14 W4RBV				C		
Patient16Baseline						
Patient16 W4RBV						
Patient16W4H+R						
Patient17 Baseline				C	N	
Patient17 W4RBV				C		
Patient18 Baseline		A	W	L		C
Patient18W4RBV		A		L		
Patient19Baseline	S	S		C		N
Patient19 W4RBV	S	S		C		N
Patient25Baseline				C		
Patient25 W4RBV				C		
Patient25 W4H+R				C		
Patient26Baseline	Q	A				
Patient26 W4RBV	Q	A				
Patient26 W4I+R	Q	A				
Patient27 W4RBV						
NVR						
Patient4 Baseline	Q	A				
Patient4 W4RBV	Q	A				
Patient4W4I+R	Q	A				
Patient5 Baseline				C		
Patient5 W4RBV				C		
Patient5 W4I+R				C		
Patient21 Baseline		A		C		
Patient21 W4RBV		A		C		

Figura 20. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos (Aa) obtenidas por secuenciación directa de la región Core del VHC (programa informático MEGA 4): Comparación de cada secuencia mayoritaria de Aa con la secuencia prototipo del VHC-J. **Mutaciones no silenciosas.** Las posiciones del primer y último Aa de la región Core están indicadas sobre la secuencia del VHC-J. Cada paciente está designado con un número y periodo del tratamiento.

- **Región NS5B**

El estudio de la región NS5B (**Tabla 22**) evidenció que el número medio de mutaciones, tanto silenciosas como no silenciosas, fue similar antes de comenzar el tratamiento y tras un mes de RBV en monoterapia, no encontrándose diferencias significativas entre las muestras basales y al mes de la RBV monoterapia (P=0.7 y P=0.9 respectivamente). Las **Figuras 21 y 22** muestran el alineamiento y recuento de mutaciones silenciosas y no silenciosas de la región NS5B.

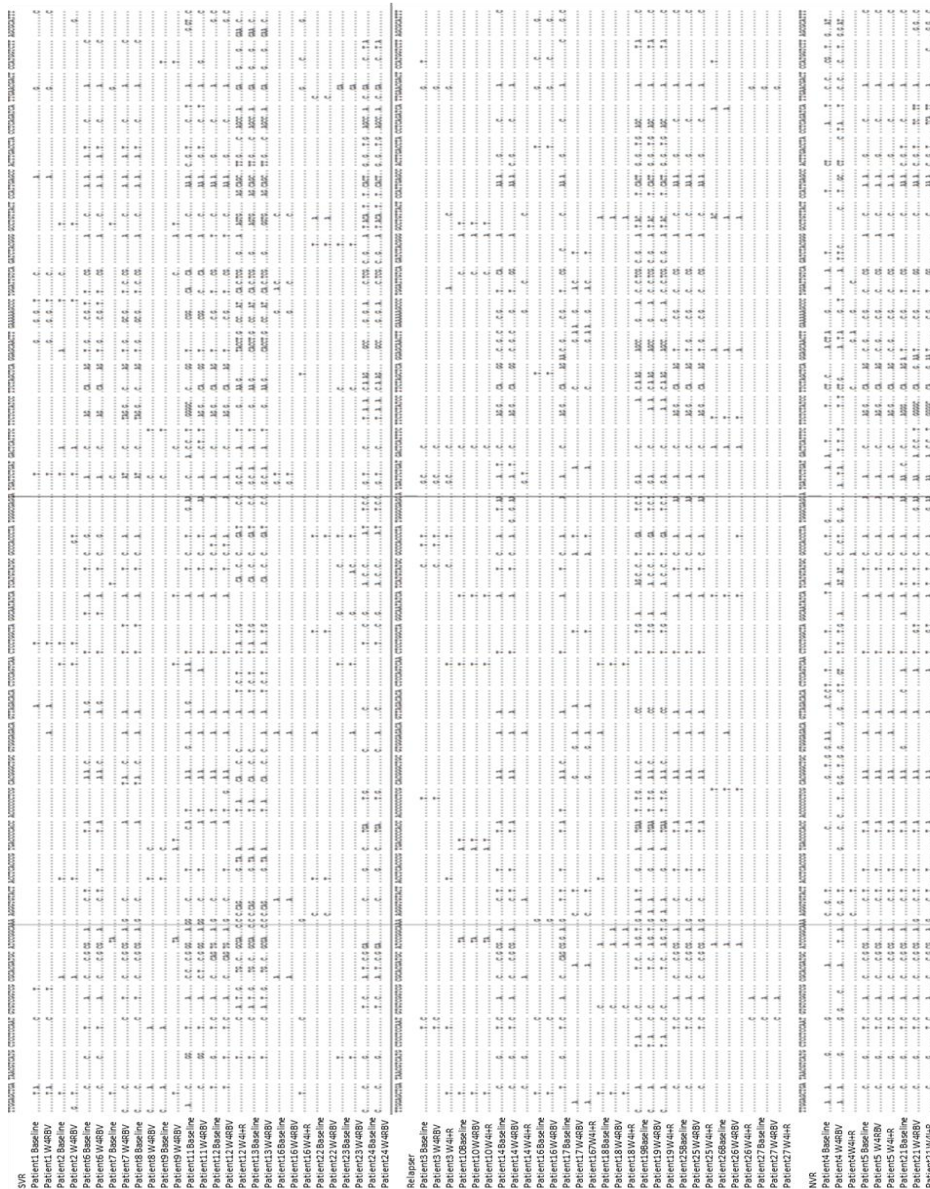


Figura 21. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos (nt) obtenidas por secuenciación directa de la región NS5B del VHC (programa informático MEGA 4): Comparación de cada secuencia mayoritaria de nt con la secuencia prototipo del VHC-J. Mutaciones silenciosas. Las posiciones del primer y último nt de la región NS5B están indicadas sobre la secuencia del VHC-J. Cada paciente está designado con un número y periodo del tratamiento.

SVR	LELITFCSEBN	VYVANDASOK	RIVYIETDPT	TPIDANWEI	VYHTFVBNWL	GNITMYAPLI	MADHMLNTHF	FHLLAQQL	EKALDQCIYG	ACYSIESPIDD	QPIERLNGE	SAFS
Patient1 Baseline												
Patient1 W4RBV						K						
Patient2 Baseline						K						
Patient2 W4RBV												
Patient3 Baseline												
Patient3 W4RBV												
Patient4 Baseline												
Patient4 W4RBV												
Patient5 Baseline												
Patient5 W4RBV												
Patient6 Baseline												
Patient6 W4RBV												
Patient7 Baseline												
Patient7 W4RBV												
Patient8 Baseline												
Patient8 W4RBV												
Patient9 Baseline												
Patient9 W4RBV												
Patient10 Baseline												
Patient10 W4RBV												
Patient11 Baseline												
Patient11 W4RBV												
Patient12 Baseline												
Patient12 W4RBV												
Patient13 Baseline												
Patient13 W4RBV												
Patient14 Baseline												
Patient14 W4RBV												
Patient15 Baseline												
Patient15 W4RBV												
Patient16 Baseline												
Patient16 W4RBV												
Patient17 Baseline												
Patient17 W4RBV												
Patient18 Baseline												
Patient18 W4RBV												
Patient19 Baseline												
Patient19 W4RBV												
Patient20 Baseline												
Patient20 W4RBV												
Patient21 Baseline												
Patient21 W4RBV												
Patient22 Baseline												
Patient22 W4RBV												
Patient23 Baseline												
Patient23 W4RBV												
Patient24 Baseline												
Patient24 W4RBV												
Relaps1 Baseline												
Relaps1 W4RBV												
Patient3 W4HR												
Patient10 Baseline												
Patient10 W4RBV												
Patient11 Baseline												
Patient11 W4RBV												
Patient12 Baseline												
Patient12 W4RBV												
Patient13 Baseline												
Patient13 W4RBV												
Patient14 Baseline												
Patient14 W4RBV												
Patient15 Baseline												
Patient15 W4RBV												
Patient16 Baseline												
Patient16 W4RBV												
Patient17 Baseline												
Patient17 W4RBV												
Patient18 Baseline												
Patient18 W4RBV												
Patient19 Baseline												
Patient19 W4RBV												
Patient20 Baseline												
Patient20 W4RBV												
Patient21 Baseline												
Patient21 W4RBV												
Patient22 Baseline												
Patient22 W4RBV												
NVR												
Patient4 Baseline												
Patient4 W4RBV												
Patient4 W4HR												
Patient5 Baseline												
Patient5 W4RBV												
Patient5 W4HR												
Patient21 Baseline												
Patient21 W4RBV												
Patient21 W4HR												

Figura 22. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos (Aa) obtenidas por secuenciación directa de la región NS5B del VHC (programa informático MEGA 4): Comparación de cada secuencia mayoritaria de Aa con la secuencia prototipo del VHC-J. **Mutaciones no silenciosas.** Las posiciones del primer y último Aa de la región NS5B están indicadas sobre la secuencia del VHC-J. Cada paciente está designado con un número y periodo del tratamiento.

- **Región ISDR**

En el estudio de la región ISDR no se encontraron diferencias significativas en el número de mutaciones entre las muestras basales y al mes de RBV monoterapia, ni en las mutaciones silenciosas ($P=0.5$) ni en las no silenciosas ($P=0.9$) (**Tabla 22**). Las **Figuras 23 y 24** muestran el alineamiento y recuento de mutaciones silenciosas y no silenciosas de la región ISDR.

- **Región PKRbd**

Al estudiar la región PKRbd (**Tabla 22**), al igual que observamos en la región ISDR, no encontramos diferencias significativas en el estudio de las mutaciones entre las muestras basales y tras un mes de RBV en monoterapia, ni en las mutaciones silenciosas ($P=0.5$) ni en las no silenciosas ($P=0.3$). Las **Figuras 25 y 26** muestran el alineamiento y recuento de ambos tipos de mutaciones en esta región.

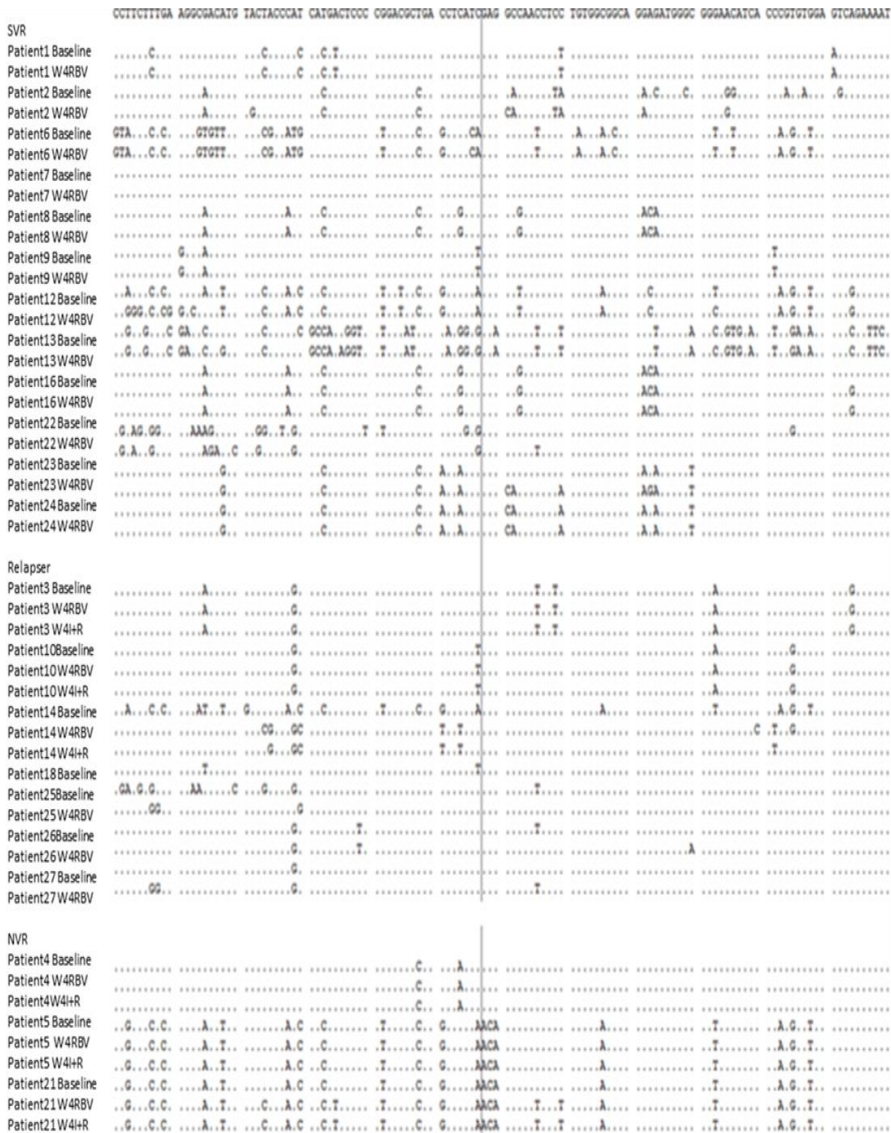


Figura 23. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos (nt) obtenidas por secuenciación directa de la región ISDR del VHC (programa informático MEGA 4): Comparación de cada secuencia mayoritaria de nt con la secuencia prototipo del VHC-J. **Mutaciones silenciosas.** Las posiciones del primer y último nt de la región ISDR están indicadas sobre la secuencia del VHC-J. Cada paciente está designado con un número y periodo del tratamiento

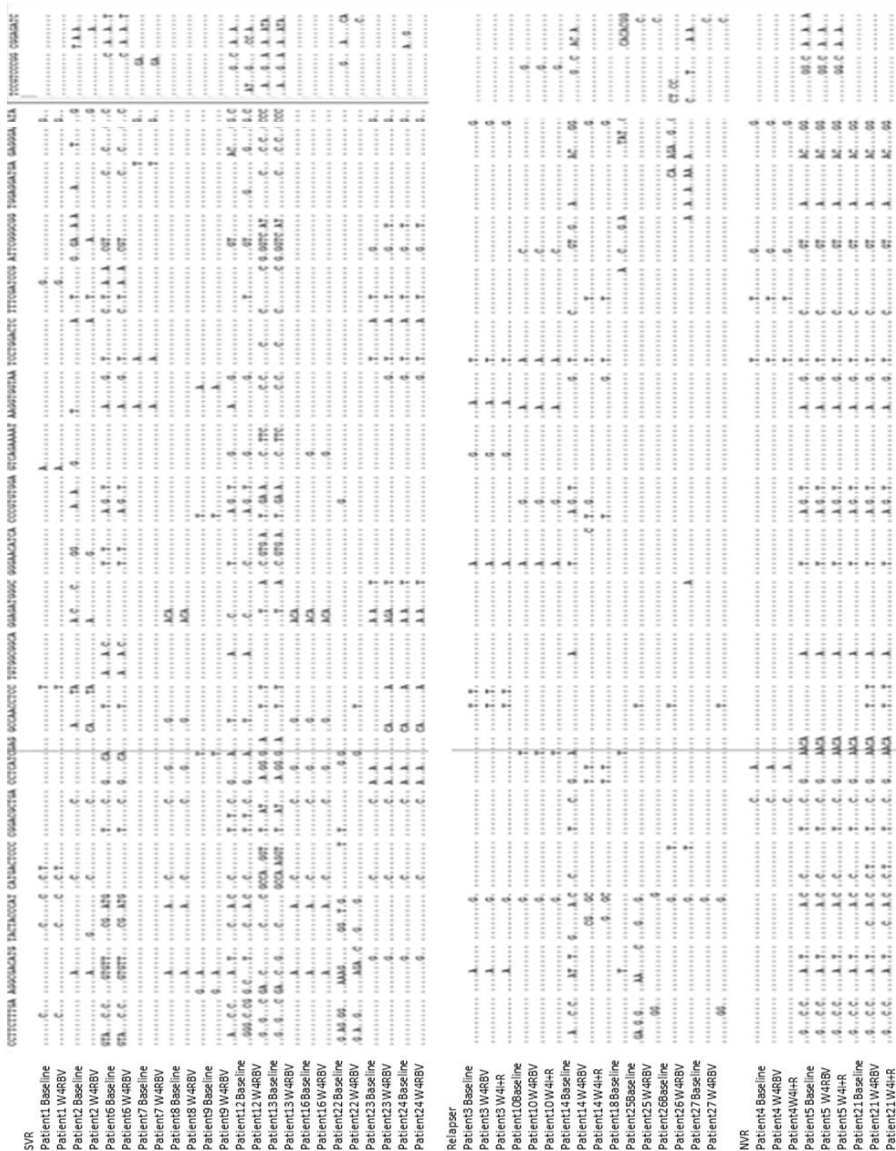


Figura 25. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos (nt) obtenidas por secuenciación directa de la región PKRbd del VHC (programa informático MEGA 4): Comparación de cada secuencia mayoritaria de nt con la secuencia prototipo del VHC-J. Mutaciones silenciosas. Las posiciones del primer y último nt de la región PKRbd están indicadas sobre la secuencia del VHC-J. Cada paciente está designado con un número y periodo del tratamiento.

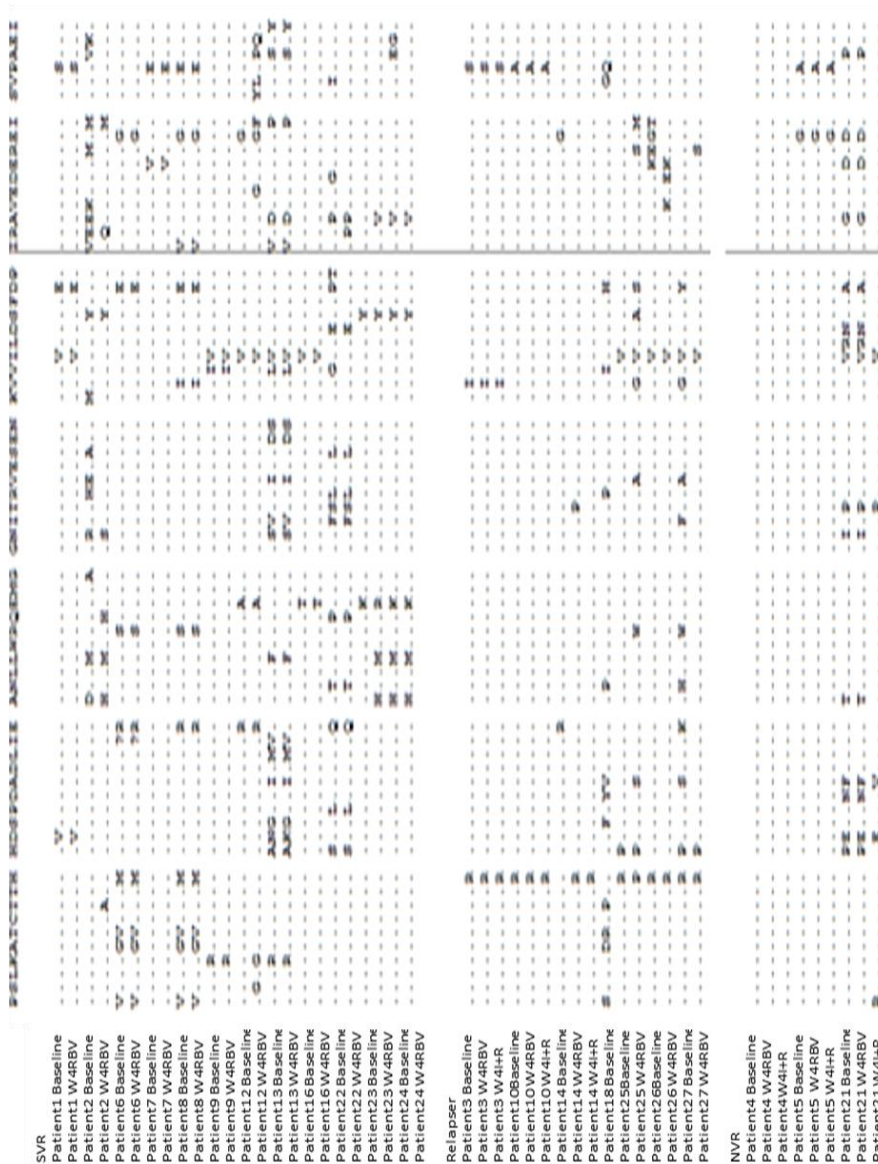


Figura 26. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos (Aa) obtenidas por secuenciación directa de la región PKRbd del VHC (programa informático MEGA 4): Comparación de cada secuencia mayoritaria de Aa con la secuencia prototipo del VHC-J. **Mutaciones no silenciosas. Las posiciones del primer y último Aa de la región PKRbd están indicadas sobre la secuencia del VHC-J. Cada paciente está designado con un número y periodo del tratamiento.**

6.1.3. MUTACIONES Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Para estudiar la relación entre las mutaciones y los resultados terapéuticos, comparamos el número y comportamiento de las mutaciones (silenciosas y no silenciosas) de cada una de las regiones secuenciadas en los sujetos del Grupo A diferenciando entre pacientes con RVS y no-RVS al peg-IFN/RBV, y lo hicimos en el momento basal, al mes de RBV en monoterapia y al mes del tratamiento combinado.

- **Región Core**

Al analizar el número de mutaciones en el momento basal en la región Core del VHC en función de la respuesta al tratamiento combinado (RVS (n=14) y no-RVS (n=13)) (**Figura 27**), observamos que los respondedores presentaron mayor número medio de mutaciones no silenciosas que los no-RVS, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (1.4 ± 2.2 mutaciones vs 0.9 ± 0.3 mutaciones; $P=0.12$); además, comprobamos que la mediana en los pacientes no-RVS coincidía con el primer cuartil, es decir, que el 50% de los pacientes no-RVS no tuvieron ninguna mutación. El número de mutaciones silenciosas (**Figura 27**) fue similar en ambos grupos (RVS: 10.7 ± 2.9 mutaciones vs no-RVS: 8.8 ± 2.4 mutaciones; $P=0.5$).

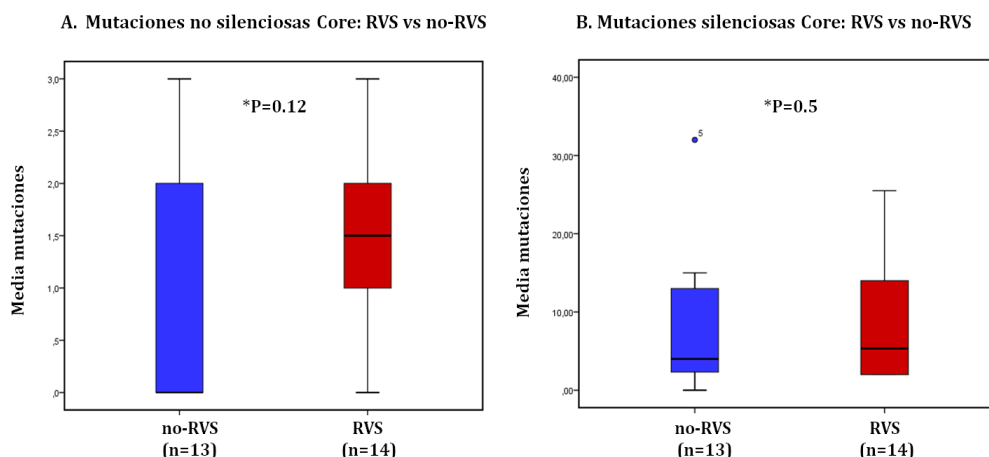


Figura 27. Mutaciones en la región Core en pacientes con RVS y no-RVS.

A. Mutaciones no silenciosas. B. Mutaciones silenciosas.

Datos expresados en media de mutaciones \pm desviación estándar de la meda, *Test U de Mann-Whitney. RVS, respuesta virológica sostenida

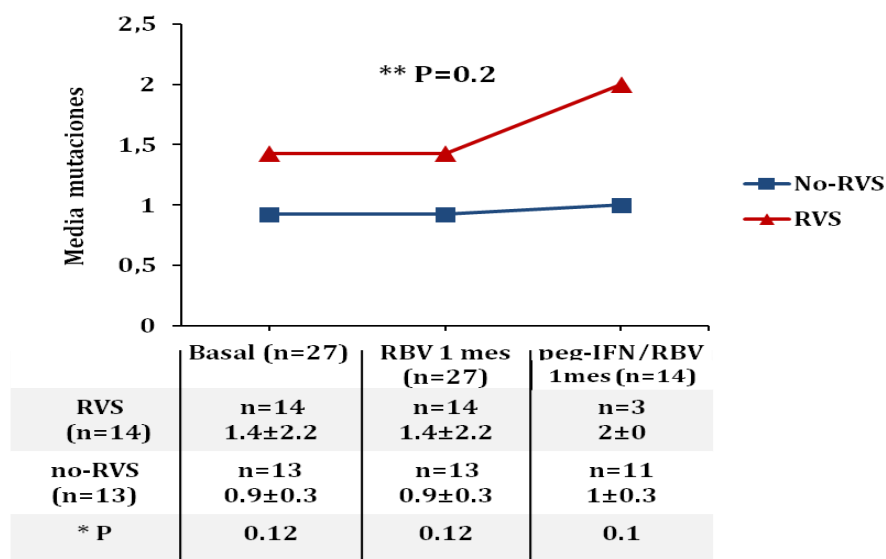
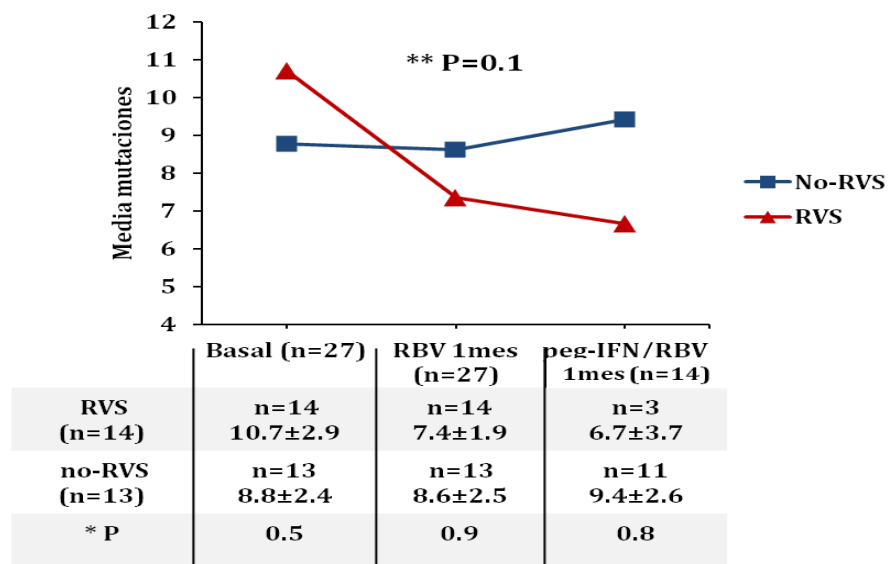
Al observar que el 50% de los pacientes no-RVS no tenían ninguna mutación no silenciosa o aminoacídica en la región Core, comparamos los resultados de respuesta al tratamiento en función de la presencia o ausencia de mutaciones en esta secuencia (**Tabla 23**). El 65% de los pacientes con alguna mutación no silenciosa en la región Core alcanzaron la RVS, mientras que el 70% de los que no presentaron fueron no-RVS ($P=0.12$).

Tabla 23. Respuesta al tratamiento en función de la presencia o ausencia de mutaciones Aa en la región Core antes del inicio del tratamiento

Mutaciones basal	RVS (n=14)	no-RVS (n=13)	*P
Con mutaciones (n=17)	11 (65)	6 (35)	0.12
Sin mutaciones (n=10)	3 (30)	7 (70)	

Datos expresados en valores absolutos con porcentajes entre paréntesis; *Test exacto de Fisher. RVS, respuesta virológica sostenida

Analizando el número de mutaciones en los pacientes con RVS y no-RVS en los tres periodos de estudio (basal, 4 semanas RBV monoterapia y 4 semanas de peg-IFN+RBV) (**Figuras 28 A y B**), observamos que no existieron diferencias significativas ni en el número de mutaciones silenciosas ni en las no silenciosas entre ambos grupos en ningunos de los tres momentos. En la **Figura 28A** se muestra la evolución del número de mutaciones no silenciosas en función de la respuesta. De los 14 pacientes con RNA-VHC positivo al mes del tratamiento combinado sólo 3 alcanzaron la RVS. En la **Figura 28A** podemos observar que estos 3 pacientes aparentemente aumentaron el número de mutaciones no silenciosas, sin embargo, realmente no se produjo ningún cambio intrapaciente sino que estos 3 pacientes con RVS fueron los que mayor número de mutaciones tuvieron en esta región. En la **Figura 28B** se muestra la evolución del número de mutaciones silenciosas en ambos grupos de respuesta. Como hemos comentado anteriormente, no existieron diferencias significativas entre sendos grupos a lo largo del tratamiento. En los pacientes no-RVS la tasa de mutación permanece constante (**Figura 28B**), mientras que el descenso de mutaciones en los pacientes con RVS es debido a los 3 pacientes que llegan con RNA-VHC positivo al mes del tratamiento combinado.

A. Mutaciones no silenciosas Core: RVS vs no-RVS**B. Mutaciones silenciosas Core: RVS vs no-RVS****Figura 28. Mutaciones en la región Core en pacientes con RVS y no-RVS .****A. Mutaciones no silenciosas. B. Mutaciones silenciosas.**

Datos expresados en media de mutaciones \pm error típico de la media; *Test U de Mann-Whitney, **ANOVA de muestras repetidas de dos factores.

RVS, respuesta virológica sostenida; RBV, Ribavirina; peg-IFN, Interferón pegilado

- **Mutaciones Core 70 y Core 91**

Las sustituciones de Aa en las posiciones 70 y 91 de la región Core fueron consideradas mutaciones, en concreto la presencia de glutamina o histidina en la posición 70 y la metionina en la posición 91. En nuestra población, la presencia o ausencia de ambas mutaciones fue constante durante el tratamiento.

De los 27 pacientes sólo 5 (18,51%) presentaron la sustitución del Aa 70 de la región Core y 4 (14,81%) la sustitución del Aa 91 (**Tabla 24**). La mutación Core 70 fue más prevalente en los pacientes no-RVS, aunque no se alcanzó la significación estadística al compararlo con los pacientes con RVS. La presencia de la mutación Core 91 mostró un patrón contrario, siendo más prevalente en los pacientes con RVS, aunque de nuevo sin diferencias significativas entre ambos grupos de respuesta.

Tabla 24. Mutaciones del Aa 70 y 91 de la región Core según respuesta

Mutación	RVS (n=14)	No-RVS (n=13)	*P
Core 70			
mutación (n=5)	2 (40)	3 (60)	0.64
no mutación (n=22)	12 (54.5)	10 (46)	
Core 91			
mutación (n=4)	3 (75)	1 (25)	0.59
no mutación (n=23)	11 (52)	12 (48)	

*Datos expresados en valores absolutos con porcentajes entre paréntesis; *Test exacto de Fisher.*

RVS, respuesta virológica sostenida

▪ Región NS5B

En el caso de la región NS5B del VHC analizamos el número de mutaciones en el momento basal y agrupamos también las muestras amplificadas de los pacientes en dos grupos, RVS (n=13) y no-RVS (n=13) (**Figura 29**). Observamos que tanto la media de mutaciones no silenciosas como silenciosas, fueron superiores entre los pacientes con RVS, aunque sin alcanzar la significación estadística (no silenciosas: RVS: 7.5 ± 2.5 mutaciones vs no-RVS: 7.4 ± 1.7 mutaciones; $P=0.5$. Silenciosas: RVS: 35.5 ± 3.3 mutaciones vs no-RVS= 33.5 ± 6.1 mutaciones; $P=0.4$).

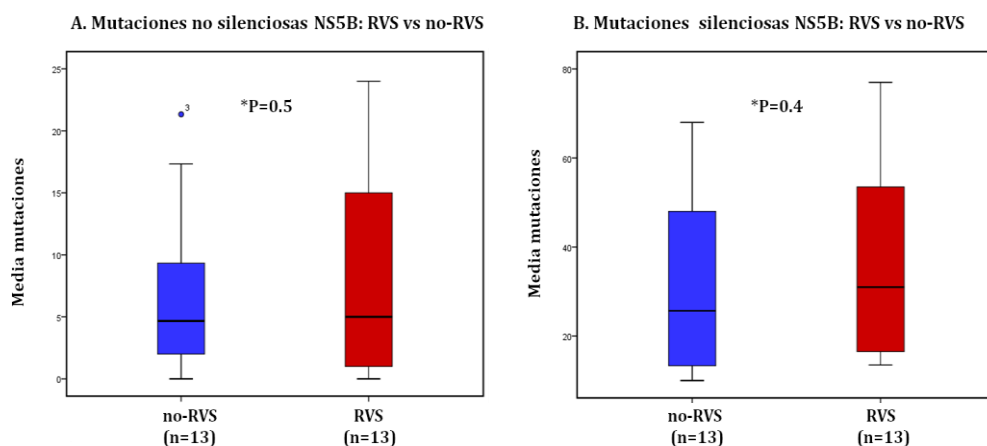


Figura 29. Mutaciones en la región NS5B en pacientes con RVS y no-RVS. A. Mutaciones no silenciosas. B. Mutaciones silenciosas.

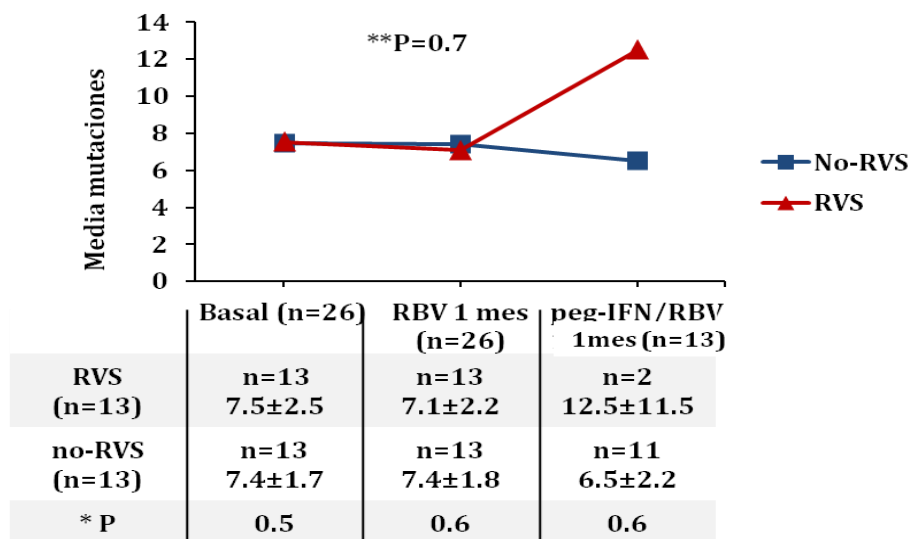
*Datos expresados en media de mutaciones \pm desviación estándar de la meda, *Test U de Mann-Whitney*

RVS, respuesta virológica sostenida

Al separar entre los pacientes con RVS y no-RVS no observamos diferencias significativas ni en el número de mutaciones no silenciosas ni en las silenciosas en ninguno de los tres periodos de estudio (basal, 4 semanas RBV monoterapia y 4 semanas de peg-IFN/RBV) (**Figuras 30 A y B**). Durante el tratamiento con RBV en monoterapia las mutaciones no silenciosas no variaron de forma significativa ni en los pacientes con RVS ni en los no-RVS (**Figura 30A**). Hay que tener en cuenta que tras completar 1 mes de tratamiento con peg-IFN/RBV, de los 13 pacientes que mantuvieron el RNA-VHC positivo sólo 2 alcanzaron la RVS, y observamos que estos si aumentaron su número medio de mutaciones al doble con respecto al basal, aunque sin alcanzar la significación estadística con respecto a los no-RVS (**Figura 30A**). Lo mismo ocurrió con las mutaciones silenciosas (**Figura 30B**), que presentaron un comportamiento similar en ambos grupos de respuesta.

La mutación aminoacídica F415Y (cambio de fenilalanina a tirosina), previamente descrita como resistente al tratamiento con RBV [56], estuvo presente en 2 de nuestros pacientes, uno con RVS y otro no respondedor, tanto en el momento basal como al mes de RBV, sin aumentar su prevalencia tras la administración de RBV en monoterapia.

A. Mutaciones no silenciosas NS5B: RVS vs no-RVS



B. Mutaciones silenciosas NS5B: RVS vs no-RVS

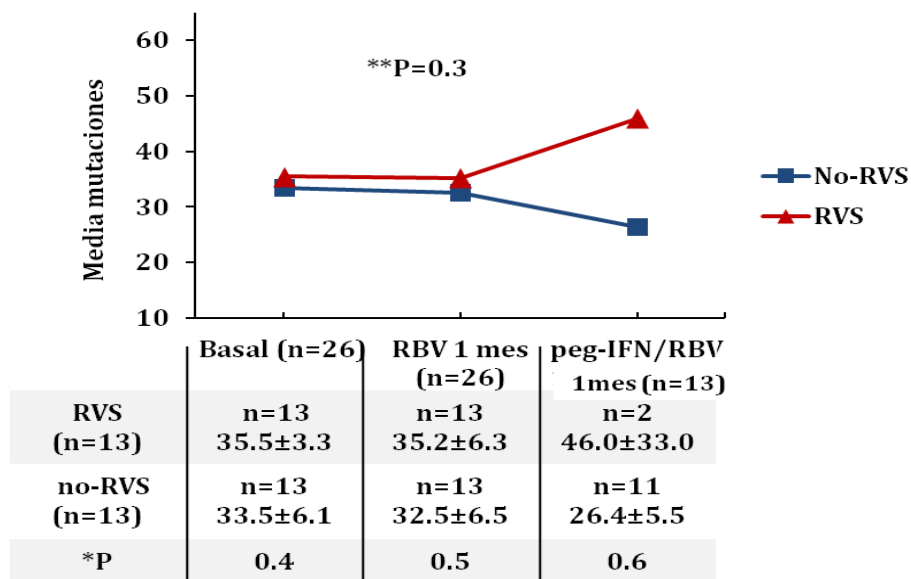


Figura 30. Mutaciones en la región NS5B en pacientes con RVS y no-RVS .

A. Mutaciones no silenciosas. B. Mutaciones silenciosas.

Datos expresados en media de mutaciones \pm error típico de la media; *Test U de Mann-Whitney; ** ANOVA de muestras repetidas de dos factores.

RVS, respuesta virológica sostenida; RBV, Ribavirina; peg-IFN, Interferón pegilado

■Región ISDR

Al separar a los pacientes con RVS (n=12) y no-RVS (n=11) (**Figura 31**), observamos que el número medio de mutaciones en el momento basal no silenciosas y silenciosas fue superior en los RVS, aunque sin encontrar diferencias significativas (no silenciosas: RVS: 4 ± 1.1 mutaciones vs no-RVS: 3.1 ± 0.9 mutaciones; $P=0.8$. Silenciosas: RVS: 11.7 ± 1.9 mutaciones vs no-RVS: 9.0 ± 1.9 mutaciones; $P=0.2$).

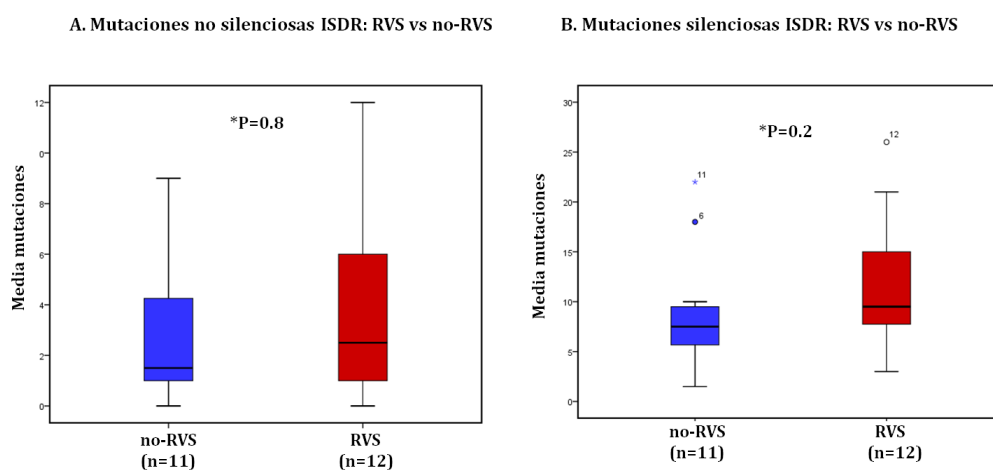


Figura 31. Mutaciones en la región ISDR en pacientes con RVS y no-RVS.

A. Mutaciones no silenciosas. B. Mutaciones silenciosas.

*Datos expresados en media de mutaciones \pm desviación estándar de la media, *Test U de Mann-Whitney*

RVS, respuesta virológica sostenida

Las mutaciones aminoacídicas en esta región han sido descritas como factor predictivo de respuesta, de manera que la presencia de ≥ 4 mutaciones se asocia a la RVS. Quisimos comprobar esta asociación en nuestra población (**Tabla 25**), observando que el 64.3% de los pacientes con ≥ 4 mutaciones de Aa en la ISDR antes del inicio del tratamiento alcanzaron la RVS, siendo esta

probabilidad aún mayor (71.4%) al mes de la RBV en monoterapia, con diferencias casi estadísticamente significativas (P=0.08).

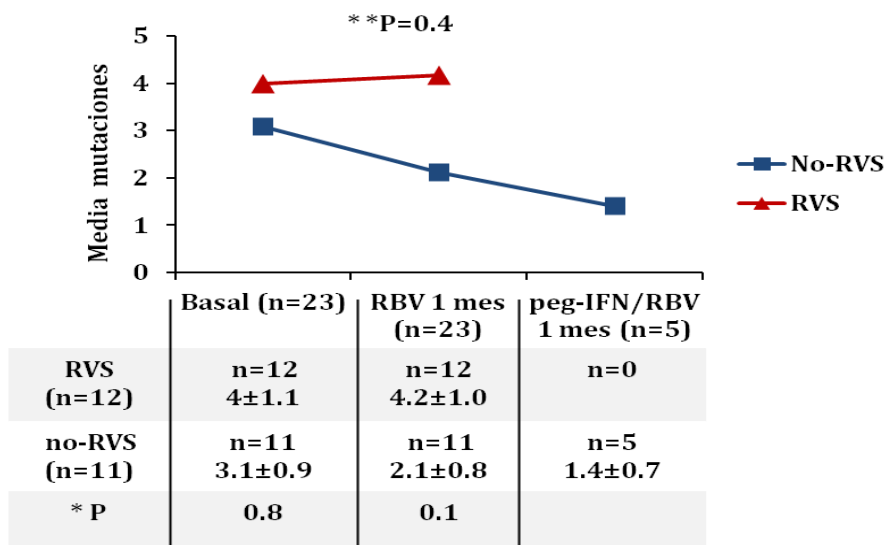
Tabla 25. Mutaciones no silenciosas (aminoacídicas) en la región ISDR en pacientes con RVS y no-RVS

Mutaciones Aa	RVS (n=12)	no-RVS (n=11)	*P
Basal: nº mutaciones			
< 4 mutaciones (9)	3 (33)	6 (67)	0.2
≥ 4 mutaciones (14)	9 (64)	5 (36)	
RBV 1 mes			
< 4 mutaciones (8)	1 (12)	7 (88)	0.08
≥ 4 mutaciones (15)	11 (73)	4 (2)	

*Datos expresados en valores absolutos con porcentajes entre paréntesis; *Test exacto de Fisher*
RBV, Ribavirina; RVS, respuesta virológica sostenida

En el estudio según respuesta (**Figura 32 A y B**) comprobamos que los pacientes con RVS tuvieron más mutaciones de ambos tipos que los no-RVS, aunque, al igual que ocurrió en la región Core y NS5B, no se alcanzó la significación estadística en ningún momento del estudio (basal, 4 semanas RBV monoterapia y 4 semanas de peg-IFN+RBV), ni en el caso de las no silenciosas ni en las silenciosas. Tras un mes de tratamiento con RBV en monoterapia el número de mutaciones tampoco difirió en ninguno de los grupos de respuesta (**Figura 32 A y B**). Al mes del tratamiento combinado únicamente se pudieron amplificar 5 pacientes, siendo los 5 no-RVS. Pudimos comprobar que estos 5 pacientes también mantuvieron el mismo número de mutaciones silenciosas al mes de la RBV y al mes del tratamiento combinado, lo que nos llevó a concluir que fueron los de mayor CV los que mayor número de mutaciones silenciosas tuvieron al mes de la RBV. (**Figura 32B**).

A. Mutaciones no silenciosas ISDR: RVS vs no-RVS



B. Mutaciones silenciosas ISDR: RVS vs no-RVS

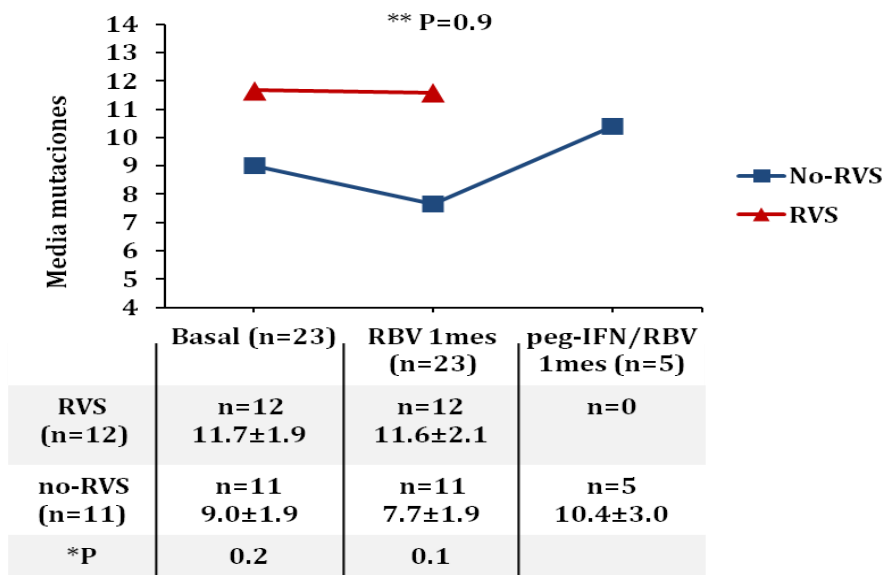


Figura 32. Mutaciones en la región ISDR en pacientes con RVS y no-RVS . A. Mutaciones no silenciosas. B. Mutaciones silenciosas.

Datos expresados en media de mutaciones ± error típico de la media; *Test U de Mann-Whitney; ** ANOVA de muestras repetidas de dos factores.

RVS, respuesta virológica sostenida; RBV, Ribavirina; peg-IFN, Interferón pegilado

▪ Región PKRbd

Los resultados obtenidos en esta región fueron similares a los observados en el estudio de la ISDR. Al separar a los pacientes con RVS (n=12) y los no-RVS (n=11) (**Figura 33**) observamos que en el momento basal el número medio de mutaciones no silenciosas y silenciosas fue superior en los RVS, aunque sin encontrar diferencias significativas (no silenciosas: RVS: 7.5 ± 1.7 mutaciones vs no-RVS: 5.9 ± 1.5 mutaciones; $P=0.4$. Silenciosas: RVS: 20 ± 3.7 mutaciones vs no-RVS: 17.4 ± 2.8 mutaciones; $P=0.9$).

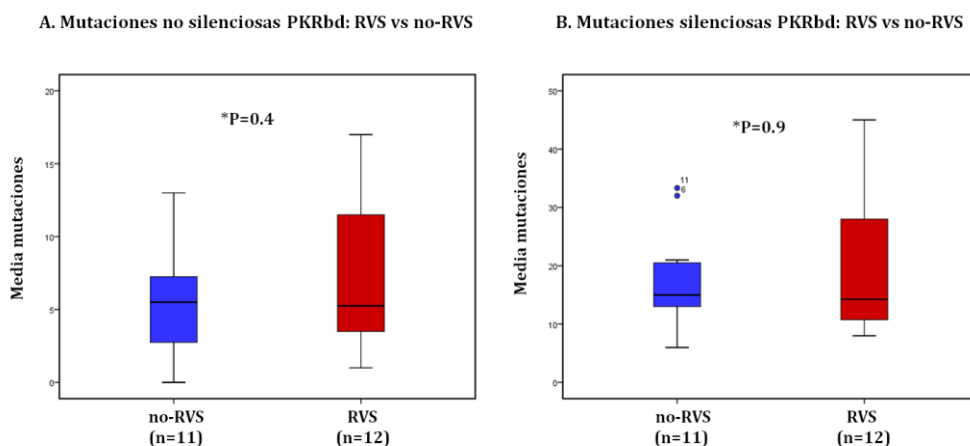


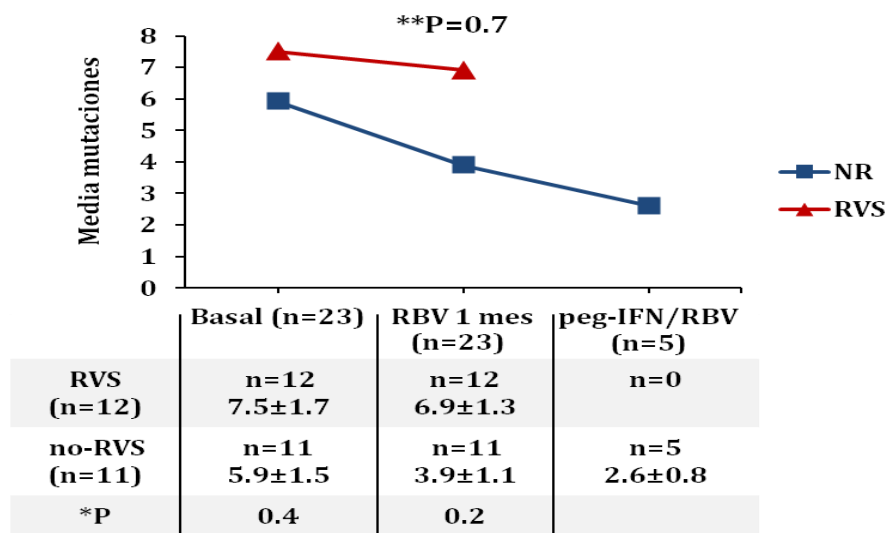
Figura 33. Mutaciones en la región PKRbd en pacientes con RVS y no-RVS. A. Mutaciones no silenciosas. B. Mutaciones silenciosas.

*Datos expresados en media de mutaciones \pm desviación estándar de la media, *Test U de Mann-Whitney*

RVS, respuesta virológica sostenida

Los pacientes con RVS (**Figura 34 A y B**) tuvieron más mutaciones silenciosas y no silenciosas frente a los no-RVS, aunque las diferencias no fueron significativas en ningún momento del seguimiento. La RBV en monoterapia no modificó el número de ninguno de los tipos de mutaciones ni en los pacientes con RVS ni en los no-RVS (**Figura 34 A y B**). Al mes del tratamiento combinado, paralelamente a lo observado en el estudio de la región ISDR, únicamente se pudieron amplificar 5 pacientes, siendo los 5 no-RVS.

A. Mutaciones no silenciosas PKRbd: RVS vs no-RVS



B. Mutaciones silenciosas PKRbd: RVS vs no-RVS

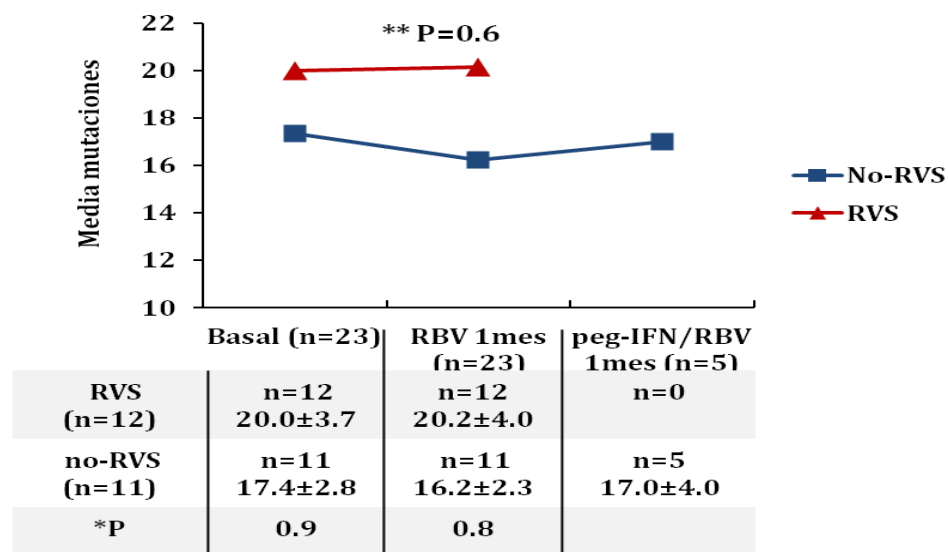


Figura 34. Mutaciones en la región PKRbd en pacientes con RVS y no-RVS . A. Mutaciones no silenciosas. B. Mutaciones silenciosas.

Datos expresados en media de mutaciones \pm error típico de la media; *Test U de Mann-Whitney; ** ANOVA de muestras repetidas de dos factores.

RVS, respuesta virológica sostenida; RBV, Ribavirina; peg-IFN, Interferón pegilado

6.2. PIROSECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN NS5A DEL VHC

Se realizó pirosecuenciación de la región NS5A completa (nt 6069-7630) de un paciente del grupo A, obteniendo una media de 11883.4 lecturas por secuencia (mínimo-máximo: 4555-20759), con una calidad del 88%. El alineamiento de todas las lecturas de secuencias resultó en una media de 36 haplotipos o quasiespecies diferentes. Dicho alineamiento se realiza mediante un análisis y conteo de nt de las cuatro posibles bases (A, C, G y T) en cada posición del genoma de referencia del VHC-J. Este alineamiento de nt fue comparado en dos momentos del seguimiento, a nivel basal y al mes de RBV.

Tras aplicar métodos de corrección de error se calculó: haplotipos, número total de mutaciones (Eta), número de sitios polimórficos (S), frecuencia de mutaciones (Mf), complejidad de cada amplicon determinada por la entropía normalizada de Shannon (Sn), número de medio de *pairwise nucleotide differences* (K) y diversidad de nucleótidos (Pi) **(Tabla 26A)**, no encontrando diferencias estadísticamente significativas en ninguno de ellos al comparar las muestra basal y tras 4 semanas de RBV en monoterapia (D0) de los 5 amplicones secuenciados **(Tabla 26B)**.

Tabla 26A. Parámetros analizados por pirosecuenciación de la NS5A completa en los momentos basal y al mes de RBV, de los 5 amplicones estudiado.

Amplicón	Parámetro	Basal	4 semanas RBV
p1	Nº lecturas	15146	11164
	Haplotipos	40	41
	Eta	19	19
	S	19	19
	Mf	0.015861808	0.015111122
	Sn	0.7537908	0.7652889
	K	6.178261	6.08834
	Pi	0.01745272	0.01719870
p2	Nº lecturas	18581	14228
	Haplotipos	39	42
	Eta	19	25
	S	19	25
	Mf	0.015861808	0.010126309
	Sn	0.7537908	0.8112219
	K	5.58508	5.365992
	Pi	0.01435753	0.01379432
p3	Nº lecturas	20759	14463
	Haplotipos	21	26
	Eta	15	15
	S	15	15
	Mf	0.006077094	0.005096126
	Sn	0.6678762	0.6606877
	K	2.851195	2.474162
	Pi	0.01000419	0.00868127
p4	Nº lecturas	7078	4885
	Haplotipos	35	41
	Eta	33	31
	S	32	30
	Mf	0.013647012	0.013888467
	Sn	0.7504702	0.7706497
	K	5.557369	5.490774
	Pi	0.01792700	0.01771217
p5	Nº lecturas	7975	4555
	Haplotipos	31	42
	Eta	34	37
	S	34	37
	Mf	0.027428364	0.027756786
	Sn	0.8095652	0.8284315
	K	12.58726	12.70283
	Pi	0.03162627	0.03191666

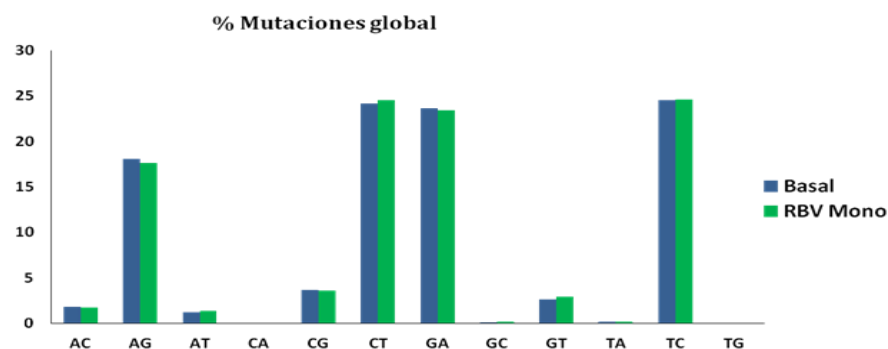
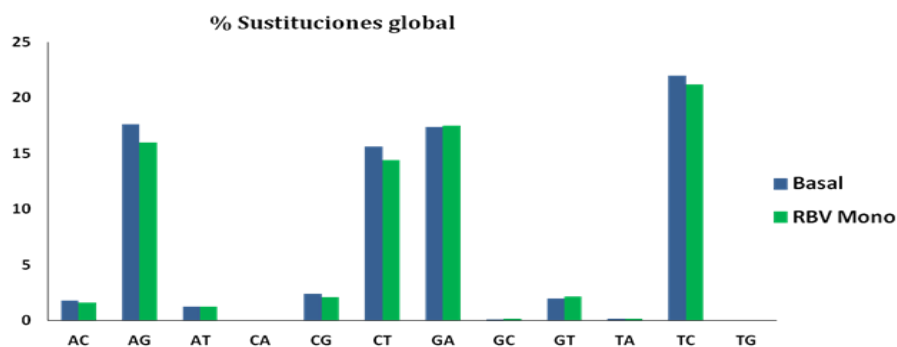
Eta, Número total de mutaciones; *S*, Número de sitios polimórficos; *Mf*, Frecuencia de mutación; *Sn*, Quasiespecies normalizadas entropía de Shannon; *K*, Número medio pairwise nucleotide differences; *Pi*, Diversidad de nucleótidos.

Tabla 26 B. Medias de los 5 amplicones de la pirosecuenciación de la NS5A en los momentos basal y al mes de RBV

	Basal	4 s RBV	*P
Haplotipos	33.2±7.6	35.4±8.6	0.5
Eta	24±8.8	24.6±9.7	0.7
S	23.8±8.5	24.4±9.5	0.7
Mf	0.016±0.007	0.014±0.0084	0.2
Sn	0.74±0.05	0.76±0.06	0.08
K	6.55±3.6	6.42±3.7	0.2
Pi	0.018±0.008	0.017±0.008	0.2

*Medias ±error típico de la media de los 5 amplicones en el momento basal y al mes de Ribavirina (RBV) de: Eta, Número total de mutaciones; S, Número de sitios polimórficos; Mf, Frecuencia de mutación; Sn, Quasiespecies normalizadas entropía de Shannon; K, Número medio pairwise nucleotide differences; Pi, Diversidad de nucleótidos. *Test de la t de Student de muestras pareadas.*

No hubo diferencias significativas en la tasa global de sustituciones de nt en el momento basal y tras 4 semanas de RBV en monoterapia, ni en la tasa global de mutaciones de nt ($P > 0.05$) (**Figura 35**). Las mutaciones de transición asociadas a la RBV (G-A y C-U) no aumentaron. Analizando las distancias genéticas entre las muestras, tampoco se produjo ninguna diferencia ni intramuestra ni intermuestra (**Figura 36**), lo cual refleja que la RBV no acelera la tasa de mutaciones.



BASELINE: GLOBAL SUBSTITUTION FREQUENCIES (%)		BASELINE: GLOBAL MUTATION FREQUENCIES (%)	
	Global		Global
AC	17.689	AC	18.122
AG	176.229	AG	180.547
AT	12.074	AT	12.370
CA	0.0000	CA	0.0000
CG	23.468	CG	36.278
CT	156.375	CT	241.736
GA	173.979	GA	236.493
GC	0.0939	GC	0.1276
GT	19.320	GT	26.262
TA	0.1359	TA	0.1516
TC 2	20.090	TC	245.400
TG	0.0000	TG	0.0000

D0: GLOBAL SUBSTITUTION FREQUENCIES (%)		D0: GLOBAL MUTATION FREQUENCIES (%)	
	Global		Global
AC	15.669	AC	17.324
AG	159.442	AG	176.279
AT	12.420	AT	13.731
CA	0.0000	CA	0.0000
CG	21.016	CG	35.815
CT	143.848	CT	245.141
GA	174.703	GA	233.916
GC	0.1201	GC	0.1608
GT	21.562	GT	28.870
TA	0.1479	TA	0.1716
TC	211.683	TC	245.599
TG	0.0000	TG	0.0000

Figura 35. Sustituciones y mutaciones globales en la región NS5A tras 1 mes de Ribavirina (RBV) en monoterapia D0, fin de RBV monoterapia.

Genetic distances among samples:

	Dx	Dy	Dxy	Da
Ampl.1	6.178.261	6.088.340	6.141.679	0.008378070
Ampl.2	5.585.080	5.365.992	5.481.795	0.006259549
Ampl.3	2.851.195	2.474.162	2.672.137	0.009458495
Ampl.4	5.557.369	5.490.774	5.531.248	0.007177092
Ampl.5	12.587.256	12.702.829	12.658.326	0.013283257

Dx: Nucleitide diversity in sample A
Dy: Nucleitide diversity in sample C
Dxy: Global nucleitide diversity
Da: Nei-Li distance between populations
expressed as $Dxy - (Dx + Dy) / 2$

Figura 36. Distancias genéticas de la población viral

DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

La RBV continúa siendo un elemento esencial en el tratamiento de la HCC, incluso en la próxima generación de los nuevos DAAs [158, 159, 161]. Se ha demostrado que el uso de los nuevos agentes antivirales en monoterapia se asocia con una selección rápida de cepas resistentes al tratamiento, y la asociación con la RBV disminuye esta probabilidad. Sin embargo, y pese a su papel clave frente al VHC durante décadas, su forma de actuación aún no está del todo aclarada. Una de las hipótesis es que actúe como un agente mutagénico del genoma viral, ampliamente evidenciado en estudios *in vitro* [44, 47], pero poco aclarado con los resultados *in vivo*. Por otro lado, la demostración de un perfil farmacocinético típico y de la correlación entre sus mayores niveles plasmáticos con mejores resultados terapéuticos [171], ha llevado al diseño y análisis de pautas de inducción con RBV.

En este estudio nosotros hemos querido investigar la influencia de una pauta de inducción de RBV en determinados parámetros intracelulares y moleculares fundamentales en la valoración de los resultados terapéuticos. Para ello, administramos a pacientes con HCC-1 *naïve* 4 semanas de RBV en monoterapia antes del tratamiento combinado con peg-IFN/RBV. Demostramos que la inducción con RBV en monoterapia induce mayores descensos del RNA-VHC y de los niveles de ALT, y mayores TPR que los obtenidos en el grupo control histórico que recibió el tratamiento convencional, lo que podría reflejar una mejoría en la sensibilidad al IFN tras dicha pauta de inducción. Posteriormente, para elucidar el efecto mutagénico de la RBV en determinadas regiones del VHC y su influencia en los resultados terapéuticos, estudiamos la secuencia mayoritaria del genoma viral de las regiones Core, NS5B, ISDR y PKRbd, sin evidenciar ninguna una modificación significativa en el número de mutaciones asociada al empleo de RBV en monoterapia, datos que fueron

corroborados mediante pirosecuenciación de la región NS5A de uno de nuestros pacientes.

■ **Cinética viral, TPR, niveles de Hb y ALT, y respuesta al tratamiento combinado**

No son muchos los trabajos que han investigado el efecto de la administración de RBV en monoterapia antes de la pauta convencional en combinación con IFN, y la mayoría de ellos se han llevado a cabo para estudiar el mecanismo de acción antiviral de la RBV, sin evaluar la influencia sobre otros parámetros farmacocinéticos ni sobre la respuesta al tratamiento, entre otros motivos por carecer de grupo control [35, 57, 172, 173].

Brillanti y cols. estudiaron a 10 pacientes con HCC-1 no respondedores a un tratamiento previo con peg-IFN y RBV, y comprobaron que con la administración de 4 semanas de RBV antes de una nueva pauta de tratamiento combinado (peg-IFN/RBV) se alcanzaban tasas de RVS del 50% frente al 20% esperado [174]. Este mismo efecto fue observado por Merli y cols. en 13 pacientes trasplantados hepáticos con recurrencia de la infección por VHC, donde la pauta de inducción con RBV 8 semanas consiguió una tasa de RVS del 46% frente al 30% descrito en la bibliografía; además, observaron que descensos del RNA-VHC de 0,5 log₁₀ UI/mL durante la fase de monoterapia fueron predictores de RVR durante el tratamiento combinado, y que el descenso más pronunciado de la CV durante las 8 semanas se produjo en aquellos con mayores TPR, aunque sin alcanzar la significación estadística [175].

En nuestro estudio los resultados mostraron que la pauta de inducción con RBV en monoterapia durante 4 semanas (Grupo A) no implicó un beneficio estadísticamente significativo en las tasas de RVR, RVP ni RVS. Sin embargo, si observamos mayores reducciones de la CV y de los niveles de ALT, así como

mayores TPR en la semana 4 de tratamiento combinado frente al grupo control (Grupo B), lo cual podría reflejar una mayor eficacia del tratamiento posterior con peg-IFN tras la inducción con RBV, sin haber alcanzado la significación estadística en las tasas de respuesta al tratamiento quizás por el pequeño tamaño muestral. Recientemente han sido publicados 2 nuevos estudios controlados en los que la inducción con 4 semanas de RBV en monoterapia tampoco mejoró las tasas de respuesta virológica a la biterapia posterior con peg-IFN/RBV, sin embargo, la influencia de la administración de RBV en monoterapia sobre la respuesta inmune y la estimulación de los ISGs durante el tratamiento combinado posterior fue evidenciada [39, 40].

Pese a no encontrar beneficio en las tasas de respuesta al tratamiento en el grupo que recibió RBV en monoterapia (Grupo A), si comprobamos que estos pacientes consiguieron un descenso significativamente mayor del nivel de RNA-VHC en la semana 4 de tratamiento combinado que los del Grupo B, y que la CV en el D0 (al finalizar el periodo de RBV en monoterapia) fue menor entre los RVS que en los no-RVS, lo cual apoyaría la mayor eficacia del IFN tras la pauta de inducción con RBV.

Existe un estudio piloto en el que 42 pacientes con HCC-1 *naive* fueron aleatorizados a recibir 4 semanas de Taribarina (TBV) (un análogo sintético de la guanósina, profármaco de la RBV) vs placebo, seguidas de tratamiento combinado (peg-IFN/TBV) durante 48 semanas [176]. Los autores, al igual que nosotros, observaron mayores reducciones de los niveles de RNA-VHC a lo largo del tratamiento combinado en el grupo que recibió TBV en monoterapia, y una tendencia hacia mayores tasas de respuesta precoz al mismo, aunque estas diferencias no alcanzaron la significación estadística posiblemente por el pequeño tamaño de muestra. Frente a estos resultados, Mihm y cols. han llevado a cabo el primer estudio aleatorizado y controlado con placebo para analizar específicamente la influencia de la inducción con RBV en monoterapia sobre la

cinética viral durante un tratamiento posterior con peg-IFN/RBV, sin observar ningún beneficio [177]. El valor predictivo de la RVR sobre la RVS, ya ampliamente demostrado [87], fue confirmado también en nuestro estudio en ambos grupos.

Ninguno de nuestros pacientes consiguió el aclaramiento del VHC tras recibir 1 mes de RBV en monoterapia, pero observamos un débil descenso de la CV, lo que explica porque la RBV en monoterapia no es efectiva para la erradicación del VHC [82]. La hipótesis de la mutagénesis letal o catástrofe error, propone que la RBV acelera la tasa de mutaciones en el genoma del VHC causando la extinción viral, o alternativamente disminuyendo el nivel de partículas virales infecciosas producidas en cada paciente, pero sin afectar significativamente a la producción total del RNA-VHC. Esta hipótesis podría justificar el hecho de que ningún paciente de nuestro estudio eliminara el virus al finalizar la RBV en monoterapia, pero el mayor descenso de la CV evidenciado al mes del tratamiento combinado, nos lleva a asumir que muchas variantes virales (cuasiespecies del VHC) fueron eliminadas. Nuestros resultados con la pirosecuenciación no apoyan esta teoría de la “catástrofe error” como veremos más adelante, por lo que pensamos que en la mayor disminución de la CV tras el mes de RBV en monoterapia, podrían estar implicados otros mecanismos de acción de la RBV no estudiados en este trabajo, como su efecto sobre la respuesta inmune. Ogawa y cols. evidenciaron un aumento de la respuesta inmune de los LTh tras la administración de RBV en monoterapia en los pacientes que alcanzaron la RVR durante el tratamiento posterior con peg-IFN y RBV frente a los no-RVR [35].

Se ha demostrado la correlación entre los niveles de RBV alcanzados en plasma y su efecto antiviral, más que con la dosis de RBV recibida [67, 178]. Tras múltiples dosis la RBV alcanza su concentración plasmática máxima (C_{max}) aproximadamente en la semana 4 del tratamiento combinado [75, 178].

Nuestros resultados muestran que la pauta de inducción con RBV consiguió mayores TPR medias en las primeras semanas de tratamiento combinado que en el Grupo B, alcanzando la significación estadística en la semana 4 de la pauta con peg-IFN/RBV. Aunque no conseguimos demostrar la correlación entre las mayores TPR y la RVS, si observamos que este aumento de los niveles plasmáticos de RBV fue paralelo a menores niveles de CV en el Grupo A, pero de nuevo, la ausencia de significación estadística entre la TPR y la respuesta al tratamiento podría estar justificada por el pequeño tamaño muestral.

El beneficio farmacocinético asociado a una mayor exposición a la RBV tras su pauta de inducción en monoterapia también fue sugerido por Merli y cols. [175], que al igual que nosotros, describieron mayores descensos de la CV paralelos a mayores TPR (sin alcanzar tampoco la significación estadística); y más recientemente, Mihm y cols, no evidenciaron en general ningún beneficio en la cinética viral ni en la respuesta al tratamiento tras la inducción con RBV en monoterapia, pero si observaron mayores niveles plasmáticos de RBV (AUC₁₂, semana 12 del tratamiento combinado) frente a los pacientes de su grupo control, y comprobaron que el mayor AUC₁₂ se correlacionó con la RVP y la RVS en un subgrupo de pacientes con genotipo IL28 CT/TT[177]. Los autores concluyeron que la mayor exposición acumulada de RBV podría beneficiar los resultados del tratamiento en este subgrupo de sujetos con una respuesta *a priori* más desfavorable.

La inducción con RBV en nuestro estudio no derivó en un aumento significativo de la tasa de anemia, ni en una mayor necesidad de interrumpir su administración. Aunque se ha relacionado el mayor descenso en los niveles de Hb con mayores TPR y mejores respuesta al tratamiento [74, 179], nosotros no encontramos tal asociación.

Finalmente, observamos una marcada disminución de los niveles de ALT durante el periodo de RBV en monoterapia, algo consistente con lo ya ampliamente observado en estudios previos, donde estos cambios bioquímicos se correlacionaron con una mejoría histológica [21, 180]. El descenso de los niveles de ALT fue independiente del descenso de la CV durante la administración de RBV monoterapia, lo que sugiere la existencia de un mecanismo diferente al discreto efecto antiviral directo que presenta la RBV, algo también descrito por Mihm y Rotman [39, 177]. No obstante, observamos que los pacientes del Grupo A consiguieron una disminución de los niveles de ALT mayor y mantenida tras finalizar el tratamiento combinado que los del Grupo B, donde el descenso fue transitorio y menos marcado. Nuestros datos no demostraron, sin embargo, ninguna correlación entre los niveles de ALT durante el tratamiento y la respuesta al mismo en ninguno de los dos grupos, lo que también apoya la existencia de mecanismos de acción diferentes. Resulta interesante que en su estudio Rotmann y cols. [39] evidenciaron que la respuesta bioquímica alcanzada tras 4 semanas de RBV en monoterapia, y no la respuesta virológica, predijo la probabilidad de responder al tratamiento con peg-IFN/RBV, lo que llevó a los autores a la conclusión de que el beneficio de la RBV estaría más relacionado con mecanismos indirectos antiinflamatorios que con un efecto antiviral directo [39].

En resumen, el conjunto de resultados expuestos demuestran que la inducción con 4 semanas de RBV en monoterapia mejora la exposición celular a la misma, y consigue un mayor descenso de la CV en las primeras semanas del tratamiento combinado con peg-IFN/RBV, pero no observamos un beneficio clínico reflejado en mayores tasas de respuesta al tratamiento. Comprobamos que la RBV presenta un efecto antiinflamatorio mejorando los niveles de ALT, y un débil efecto antiviral directo evidenciado por un discreto descenso de la CV durante su administración en monoterapia. Al margen de la mejoría en la exposición a la RBV, nos planteamos si la mayor disminución de la CV observada

en los pacientes del Grupo A podría estar relacionada con el potencial mutagénico de la RBV. De ahí que uno de nuestros objetivos fuese averiguar si la RBV aumenta las mutaciones en determinadas regiones del genoma viral determinantes de la respuesta al tratamiento, así como determinar si causa un incremento acelerado de la tasa de mutaciones, muchas de las cuales serían letales, conduciendo a la pérdida de estos viriones o reducción de quasiespecies.

■ Estudio del efecto mutagénico de la RBV

Hemos realizado un análisis en los pacientes del Grupo A que recibieron RBV en monoterapia mediante secuenciación directa de tres regiones genómicas independientes del VHC, Core, NS5B y NS5A (ISDR y PKRbd) para comprobar si la RBV es capaz de provocar la aparición de determinadas mutaciones en dichas regiones del genoma viral, de manera que condicionasen la respuesta al tratamiento antiviral [6, 102, 181]. Pudimos comprobar que en general la RBV no aumentó el número de mutaciones en la secuencia mayoritaria de dichas regiones, aunque observamos una tendencia no significativa a la aparición de las mismas en determinadas secuencias que condicionan la RVS, y que discutiremos más adelante. Estos resultados fueron también observados por Chevaliez y cols. [55] al estudiar mediante clonación las regiones NS3 y NS5A durante el tratamiento con RBV y combinado con peg-IFN/RBV, sin observar ningún aumento de las mutaciones asociado a la RBV. Los estudios de Asahina y cols [57], y más tarde de Ogawa y cols [35], si evidenciaron que la RBV en monoterapia precipitaba un aumento en la tasa de mutaciones de nt en las regiones NS5B y NS5A, y en la región ISDR respectivamente, que se asoció a la respuesta al tratamiento combinado posterior.

Se conoce que la tasa de mutación del genoma viral está afectada inherentemente por la selección, de manera que la mayoría de los clones contienen mutaciones deletéreas que pueden ser eliminadas. Es posible que las

mutaciones no silenciosas estén más sujetas a la presión externa del tratamiento y del sistema inmune, mientras que las mutaciones silenciosas (aquellas sustituciones de nt que no codifican un Aa distinto) sufran una selección más neutral que se aproxime más a la verdadera tasa de mutaciones, algo sugerido previamente [59]. No obstante, nuestros resultados fueron similares al diferenciar entre ambos tipos de mutaciones, salvo en la región Core. La proteína Core se localiza en una región del genoma viral poco variable, por lo que su secuencia aminoacídica es altamente conservada en todos los genotipos del VHC [182]. Una de sus principales funciones es inhibir la actividad antiviral del IFN a través de su interacción con proteínas celulares implicadas en la cascada de señalización de las JAK-STAT. Cabe pensar que la disminución que observamos en el número de mutaciones nucleotídicas en la región Core se deba a que un aumento de mutaciones en dicha región muy estable condicione una selección negativa o que determinadas poblaciones virales se extingan por “error catástrofe”, prevaleciendo aquellas menos mutadas [49, 50].

En nuestro estudio observamos que, globalmente y tal y como está descrito [105, 132], los pacientes con RVS tuvieron mayor número de mutaciones tanto silenciosas como no silenciosas en cada una de las regiones estudiadas frente a los no-RVS, aunque sin alcanzar la significación estadística probablemente por el pequeño tamaño muestra. En la región Core, la presencia de la mutante del Aa 70, aunque sin diferencias estadísticamente significativas, fue más prevalente en los pacientes no respondedores, como ya ha sido evidenciado previamente [103]; sin embargo, observamos lo contrario con la variante del Aa91. Por otro lado, resulta interesante que los pacientes con RVS que permanecieron con RNA-VHC positivo en la semana 4 del tratamiento combinado, multipliquen su número de mutaciones en la región NS5B durante este periodo del tratamiento. Se conoce que esta región es crítica para la replicación viral, y por tanto, mutaciones que alteren su función pueden resultar con mayor probabilidad en una selección positiva o negativa. Finalmente, está

bien establecido que la presencia de ≥ 4 mutaciones de Aa en la región ISDR en la muestra basal es predictivo de RVS [6], y aunque sin diferencias significativas esta asociación fue también observada en nuestro estudio. Además, encontramos que tras 4 semanas de RBV en monoterapia el número de mutaciones en la ISDR aumento entre los pacientes con RVS.

Según la hipótesis de la "catástrofe error" el aumento de mutaciones por encima de un umbral tolerado por el virus puede conducir a la extinción viral (mutagénesis letal) [183, 184]. El estudio en modelos de poliovirus demostró que la RBV, al ser un análogo de la purina guanosina, media la incorporación de citidina y uridina, conduciendo a un efecto mutagénico incrementando las mutaciones de transición G-A y C-U, y disminuyendo así la infectividad viral [170]. En el caso del VHC, los resultados *in vitro* avalan el potencial mutagénico de la RBV [44, 47], sin embargo, los resultados *in vivo* no son concluyentes, y el diseño de los estudios ha sido muy dispar.

Para estudiar la teoría de "catástrofe error" de la RBV es necesario analizar las secuencias de variantes minoritarias, algo complicado de conseguir *in vivo*, donde el rápido recambio viral dificulta la detección y el recuento de la tasa real de mutaciones. De hecho, los estudios llevados a cabo en pacientes que han apoyado el poder mutagénico de la RBV se han basado en técnicas de secuenciación directa de la secuencia mayoritaria, o bien de clonación, lo que podría justificar resultados tan dispares. La técnica de pirosecuenciación permite llevar a cabo la secuenciación masiva del genoma viral, detectando con alta sensibilidad variantes genómicas minoritarias de una población viral, y, de esta manera, consigue un análisis mucho más exacto del efecto mutagénico de la RBV. El empleo de este método ha sido aplicado con éxito en otros virus como el VIH, y en la actualidad ofrece una nueva aproximación, aún poco explorada, en la investigación del VHC [185, 186].

Nosotros hemos realizado la pirosecuenciación de la región NS5A completa de la muestra basal y a las 4 semanas de RBV monoterapia de un paciente elegido al azar (seleccionado por el paquete SPSS). Numerosos estudios ya han demostrado la variabilidad de esta región y la relación entre su tasa de mutaciones y la respuesta virológica al tratamiento con pegIFN y RBV [6]. Nuestros resultados determinan que la RBV no produce cambios significativos ni en el número de haplotipos, ni en la tasa de mutaciones, ni en complejidad de las quasiespecies. Las distancias genéticas entre las poblaciones virales de las muestras comparadas fueron prácticamente nulas, y tampoco encontramos incremento de las mutaciones de transición G-A y C-U. En nuestro estudio el paciente elegido para la secuenciación masiva fue un no-RVS, lo cual podría plantear que está fuera la causa de que no observáramos la “catástrofe error”, sin embargo, en el único estudio que existe en la literatura que ha aplicado dicha técnica con este objetivo [60], sus autores realizaron la pirosecuenciación del genoma completo del VHC en 6 pacientes con distintos perfiles cinéticos tratados con RBV monoterapia durante 6 semanas, y tampoco evidenciaron un incremento en el número de mutaciones en ningún caso, aunque si encontraron un acúmulo de las mutaciones de transición asociadas a la RBV distribuidas a lo largo del genoma viral, y no concretadas en las regiones NS3/NS5B como se había sugerido. Los autores concluyeron que la RBV puede tener un leve poder mutagénico, pero en cualquier caso, no induciría a la catástrofe error *in vivo*.

Es evidente que el estudio de un único paciente con pirosecuenciación limita llegar a una conclusión firme sobre el potencial mutagénico de la RBV. No obstante, nuestros resultados han observado una mejoría de los niveles de ALT con su administración en monoterapia que sería independiente de un potencial efecto mutagénico, por lo que deben existir otros mecanismos antivirales indirectos que influyan en el ambiente inflamatorio del hígado. Es posible que el efecto clínico de la RBV durante el tratamiento combinado posterior esté mediado, al menos en parte, por mecanismos inmunes [40, 173] y relacionados con la inducción de la respuesta al IFN en el hígado [39]. Este efecto podría ser

consistente con la contribución de la RBV a las nuevas terapias con DAAs al promover una respuesta inmunitaria innata efectiva.

Resumiendo lo anteriormente expuesto, podemos concluir que la RBV en monoterapia no presenta un potencial mutagénico, y por tanto, detrás del beneficio en los parámetros intracelulares observado en nuestro estudio deben existir otros mecanismos antivirales indirectos que puedan justificar su efecto en los futuros regímenes sin IFN. El mejor entendimiento del mecanismo de acción de la RBV podría permitir su uso selectivo en la era de los nuevos DAAs.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

■ La administración de RBV en monoterapia durante 4 semanas antes del tratamiento combinado con peg-IFN/RBV no mejora las tasas de RVS en pacientes con HCC genotipo 1 *naive*. No obstante, es posible que los menores niveles de RNA-VHC y de ALT, así como las mayores TPR en la semana 4 del tratamiento combinado conseguidos con la inducción con RBV, reflejen una mayor predisposición celular al efecto del IFN y un aumento en la susceptibilidad de respuesta viral al tratamiento.

■ La RBV en monoterapia no modifica el número de mutaciones en la secuencia mayoritaria de las regiones NS5B, ISDR ni PKRbd; sin embargo, encontramos que se produce una disminución de las mismas en la mutaciones silenciosas de la región Core. Esto se puede deber a que un aumento de mutaciones en dicha región, que es muy estable, condicione una selección negativa, o que determinadas poblaciones virales se extingan por “error catástrofe”, prevaleciendo aquellas menos mutadas.

■ Al separar a los pacientes en RVS y no-RVS, observamos que los pacientes con RVS presentan mayor número de mutaciones en los tres periodos de estudio en las regiones del Core (no silenciosas), y NS5A (ISDR y PKRbd), aunque no encontramos diferencias estadísticamente significativas.

■ Aquellos pacientes que presentan ≥ 4 mutaciones de Aa tanto en la muestra basal como al mes de la RBV monoterapia en la región ISDR, tienen mayor probabilidad de responder, aumentando la misma (71.4%; $P=0.06$) tras un mes de RBV en monoterapia.

■ Mediante técnicas de secuenciación masiva no hemos encontrado “catástrofe error” en la región NS5A tras una pauta de inducción de 4 semanas con RBV en monoterapia, confirmando la ausencia de su potencial mutagénico letal *in vivo*.

CONCLUSIÓN FINAL

La RBV en monoterapia previa al tratamiento combinado con peg-IFN/RBV en pacientes con HCC-1 mejora la predisposición celular al efecto del IFN, pero no aumenta las tasas de RVS. El estudio de la secuencia mayoritaria y tras la pirosecuenciación nos lleva a la conclusión de que la RBV en monoterapia durante 4 semanas no presenta un poder mutagénico *in vivo*.

ARTÍCULOS Y COMUNICACIONES

7. ARTÍCULOS Y COMUNICACIONES

Hasta la fecha, derivados de este proyecto de investigación han sido presentados los siguientes artículos y comunicaciones:

✓ Artículos

■ Quiles Pérez R, Muñoz-de-Rueda P, **Martín-Lagos Maldonado A**, Gila A, Martín-Alvárez A, Pavón-Castillero E, Quer J, Esteban JI, Ruiz-Escolano E, Jimenez Ruiz S, Ruiz-Extrema E, Salmerón J. Effects of ribavirin monotherapy on the viral population in patients with CHC-1: direct sequencing and pyrosequencing of the HCV regions. Aceptado y próxima publicación en *Journal of clinical Virology*.

✓ Comunicaciones

■ **Martín-Lagos Maldonado A**, Gila Jimenez, A Alcázar Jaén LM, Quiles Pérez R, Muñoz de Rueda P, Selfa Muñoz A, López Segura RDP, Florido García M, Barrientos Delgado A. La ribavirina (RBV) en monoterapia previa al tratamiento estándar no aumenta la tasa de respuesta virológica sostenida (RVS) en pacientes con hepatitis crónica por VHC (HCC) genotipo 1 previamente no tratados. Estudio de la cinética viral. *Congreso anual de la Sociedad Española de Patología Digestiva (SEPD). Semana de las Enfermedades Digestivas. Bilbao, del 3 al 5 de junio de 2012. Comunicación póster*. Rev Esp Enferm Dig 2012; 104 (Supl. I): 202-203.

■ **Martín-Lagos Maldonado A**, Quiles Pérez R, Alcázar Jaén LM, Muñoz de Rueda P, Ruiz Escolano, Gila Medina A, Florido García M, Salmerón Escobar J. Impacto de la administración de Ribavirina antes del tratamiento combinado con interferón pegilado en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1 naive: cinética viral, anemia y concentraciones plasmáticas de Ribavirina. **Congreso anual de la Sociedad Española de Patología Digestiva (SEPD). Semana de las Enfermedades Digestivas. Murcia, del 1 al 4 de junio de 2013. Comunicación póster.** Rev Esp Enferm Dig 2013; 105 (Supl. I): 183-184.

■ Muñoz-de-Rueda P, **Martín-Lagos A**, Quiles R, Gila Medina A, Martín A, Pavón E, Ruiz-Escolano E, Ruiz-Escolano E, Ruiz-Extremera A, Salmerón J. Ribavirin priming pegylated-Interferon combination therapy in chronic hepatitis C patients: study of plasma Ribavirin through concentrations, anaemia, viral kinetic and genetic variability. **64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. November 1-5 2013; Washington, DC.**

■ Quiles Pérez R, Muñoz-de-Rueda P, **Martín-Lagos Maldonado A**, Gila A, Martín-Alvárez A, Pavón-Castillero E, Quer J, Esteban JI, Ruiz-Escolano E, Jimenez Ruiz S, Ruiz-Extrema E, Salmerón J. Efecto de la Ribavirina en monoterapia sobre la población viral en pacientes con hepatitis crónica C (HCC) genotipo 1: análisis por secuenciación directa y pirosecuenciación de las regiones virales. **XXXIX Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Comunicación póster.** Gastroenterol Hepatol 2014; 37, Especial Congreso 1: 83-84.

BIBLIOGRAFÍA

BILIOGRAFÍA

1. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol*;60:392-420.
2. Alazawi W, Cunningham M, Dearden J, et al. Systematic review: outcome of compensated cirrhosis due to chronic hepatitis C infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;32:344-55.
3. Suzuki T. Morphogenesis of infectious hepatitis C virus particles. *Front Microbiol* 2012;3:38.
4. Hourieux C, Patient R, Morin A, et al. The genotype 3-specific hepatitis C virus core protein residue phenylalanine 164 increases steatosis in an in vitro cellular model. *Gut* 2007;56:1302-8.
5. Sheridan I, Pybus OG, Holmes EC, et al. High-resolution phylogenetic analysis of hepatitis C virus adaptation and its relationship to disease progression. *J Virol* 2004;78:3447-54.
6. Munoz de Rueda P, Casado J, Paton R, et al. 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;82:6644-53.
7. Murphy MD, Rosen HR, Marousek GI, et al. Analysis of sequence configurations of the ISDR, PKR-binding domain, and V3 region as predictors of response to induction interferon-alpha and ribavirin therapy in chronic hepatitis C infection. *Dig Dis Sci* 2002;47:1195-205.
8. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest* 1995;96:224-30.
9. Nakano T, Lau GM, Sugiyama M, et al. An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region. *Liver Int* 2012;32:339-45.

10. Chayama K, Hayes CN. Hepatitis C virus: How genetic variability affects pathobiology of disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26 Suppl 1:83-95.
11. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 2009;49:1335-74.
12. Lauring AS, Andino R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog* 2010;6:e1001005.
13. Fishman SL, Branch AD. The quasispecies nature and biological implications of the hepatitis C virus. *Infect Genet Evol* 2009;9:1158-67.
14. Chen CH, Yu ML. Evolution of interferon-based therapy for chronic hepatitis C. *Hepat Res Treat* 2010;2010:140953.
15. Rumi M, Aghemo A, Prati GM. Comparative trials of peginterferon alpha2a and peginterferon alpha2b for chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2012;19 Suppl 1:37-41.
16. Myers RP, Regimbeau C, Thevenot T, et al. Interferon for interferon naive patients with chronic hepatitis C. *Cochrane Database Syst Rev* 2002:CD000370.
17. Reddy KR, Wright TL, Pockros PJ, et al. Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon alpha-2a compared with interferon alpha-2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001;33:433-8.
18. Lindsay KL, Trepo C, Heintges T, et al. A randomized, double-blind trial comparing pegylated interferon alfa-2b to interferon alfa-2b as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001;34:395-403.
19. Gale M, Jr. Effector genes of interferon action against hepatitis C virus. *Hepatology* 2003;37:975-8.
20. Feld JJ, Hoofnagle JH. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 2005;436:967-72.
21. Reichard O, Andersson J, Schvarcz R, et al. Ribavirin treatment for chronic hepatitis C. *Lancet* 1991;337:1058-61.

22. Di Bisceglie AM, Conjeevaram HS, Fried MW, et al. Ribavirin as therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1995;123:897-903.
23. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998;339:1485-92.
24. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;347:975-82.
25. Thomas E, Ghany MG, Liang TJ. The application and mechanism of action of ribavirin in therapy of hepatitis C. *Antivir Chem Chemother* 2012;23:1-12.
26. Te HS, Randall G, Jensen DM. Mechanism of action of ribavirin in the treatment of chronic hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 2007;3:218-25.
27. Paeshuyse J, Dallmeier K, Neyts J. Ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C virus infection: a review of the proposed mechanisms of action. *Curr Opin Virol* 2011;1:590-8.
28. Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, et al. Mechanism of action of ribavirin in a novel hepatitis C virus replication cell system. *Virus Res* 2011;157:61-70.
29. Marcellin P, HY, Nevens F, Grange JD, Bronowicki JP, Vetter D, Knox S, McNair L, Moseley S, Alam J. A phase II, placebo-controlled study of merimepodib (VX-497), in combination with pegylated interferon-alfa, and ribavirin in patients with chronic hepatitis C non-responsive to previous therapy with interferon-alfa and ribavirin. *J Hepatol* 2004;40:492.
30. Maag D, Castro C, Hong Z, et al. Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. *J Biol Chem* 2001;276:46094-8.
31. Nakamura M, Saito H, Ikeda M, et al. Possible molecular mechanism of the relationship between NS5B polymorphisms and early clearance of hepatitis C virus during interferon plus ribavirin treatment. *J Med Virol* 2008;80:632-9.

32. Lutchman G, Danehower S, Song BC, et al. Mutation rate of the hepatitis C virus NS5B in patients undergoing treatment with ribavirin monotherapy. *Gastroenterology* 2007;132:1757-66.
33. Cramp ME, Rossol S, Chokshi S, et al. Hepatitis C virus-specific T-cell reactivity during interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2000;118:346-55.
34. Fujita N, Kaito M, Tanaka H, et al. Hepatitis C virus free-virion and immune-complex dynamics during interferon therapy with and without ribavirin in genotype-1b chronic hepatitis C patients. *J Viral Hepat* 2006;13:190-8.
35. Ogawa K, Hige S, Nakanishi M, et al. Immunological and mutagenic actions of ribavirin monotherapy preceding combination therapy with interferon for patients with chronic hepatitis C. *Antivir Ther* 2009;14:513-22.
36. Chen L, Borozan I, Feld J, et al. Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology* 2005;128:1437-44.
37. Thomas E, Feld JJ, Li Q, et al. Ribavirin potentiates interferon action by augmenting interferon-stimulated gene induction in hepatitis C virus cell culture models. *Hepatology* 2011;53:32-41.
38. Feld JJ, Nanda S, Huang Y, et al. Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: Identifying molecular pathways for treatment response. *Hepatology* 2007;46:1548-63.
39. Rotman Y, Nouredin M, Feld JJ, et al. Effect of ribavirin on viral kinetics and liver gene expression in chronic hepatitis C. *Gut* 2014; 63: 161-169.
40. Werner JM, Serti E, Chepa-Lotrea X, et al. Ribavirin improves the IFN-gamma response of natural killer cells to IFN-based therapy of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2014;00:000-000.
41. Crotty S, Cameron CE, Andino R. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:6895-900.

42. Zhou S, Liu R, Baroudy BM, et al. The effect of ribavirin and IMPDH inhibitors on hepatitis C virus subgenomic replicon RNA. *Virology* 2003;310:333-42.
43. Kato T, Date T, Miyamoto M, et al. Detection of anti-hepatitis C virus effects of interferon and ribavirin by a sensitive replicon system. *J Clin Microbiol* 2005;43:5679-84.
44. Contreras AM, Hiasa Y, He W, et al. Viral RNA mutations are region specific and increased by ribavirin in a full-length hepatitis C virus replication system. *J Virol* 2002;76:8505-17.
45. Lanford RE, Guerra B, Lee H, et al. Antiviral effect and virus-host interactions in response to alpha interferon, gamma interferon, poly(i)-poly(c), tumor necrosis factor alpha, and ribavirin in hepatitis C virus subgenomic replicons. *J Virol* 2003;77:1092-104.
46. Tanabe Y, Sakamoto N, Enomoto N, et al. Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by combination of ribavirin and interferon- alpha. *J Infect Dis* 2004;189:1129-39.
47. Brochot E, Duverlie G, Castelain S, et al. Effect of ribavirin on the hepatitis C virus (JFH-1) and its correlation with interferon sensitivity. *Antivir Ther* 2007;12:805-13.
48. Hofmann WP, Polta A, Herrmann E, et al. Mutagenic effect of ribavirin on hepatitis C nonstructural 5B quasispecies in vitro and during antiviral therapy. *Gastroenterology* 2007;132:921-30.
49. Schinkel J, de Jong MD, Bruning B, et al. The potentiating effect of ribavirin on interferon in the treatment of hepatitis C: lack of evidence for ribavirin-induced viral mutagenesis. *Antivir Ther* 2003;8:535-40.
50. Bull JJ, Sanjuan R, Wilke CO. Theory of lethal mutagenesis for viruses. *J Virol* 2007;81:2930-9.
51. Dixit NM, Layden-Almer JE, Layden TJ, et al. Modelling how ribavirin improves interferon response rates in hepatitis C virus infection. *Nature* 2004;432:922-4.

52. Sookoian S, Castano G, Frider B, et al. Combined therapy with interferon and ribavirin in chronic hepatitis C does not affect serum quasispecies diversity. *Dig Dis Sci* 2001;46:1067-71.
53. Querenghi F, Yu Q, Billaud G, et al. Evolution of hepatitis C virus genome in chronically infected patients receiving ribavirin monotherapy. *J Viral Hepat* 2001;8:120-31.
54. Boulestin A, Sandres-Saune K, Alric L, et al. Evolution of hepatitis C virus quasispecies during therapy with IL2 combined to alpha interferon and ribavirin. *Antivir Ther* 2005;10:499-504.
55. Chevaliez S, Brillet R, Lazaro E, et al. Analysis of ribavirin mutagenicity in human hepatitis C virus infection. *J Virol* 2007;81:7732-41.
56. Young KC, Lindsay KL, Lee KJ, et al. Identification of a ribavirin-resistant NS5B mutation of hepatitis C virus during ribavirin monotherapy. *Hepatology* 2003;38:869-78.
57. Asahina Y, Izumi N, Enomoto N, et al. Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2005;43:623-9.
58. Arataki K, Kumada H, Toyota K, et al. Evolution of hepatitis C virus quasispecies during ribavirin and interferon-alpha-2b combination therapy and interferon-alpha-2b monotherapy. *Intervirology* 2006;49:352-61.
59. Cuevas JM, Gonzalez-Candelas F, Moya A, et al. Effect of ribavirin on the mutation rate and spectrum of hepatitis C virus in vivo. *J Virol* 2009;83:5760-4.
60. Dietz J, Schelhorn SE, Fitting D, et al. Deep sequencing reveals mutagenic effects of ribavirin during monotherapy of HCV genotype 1-infected patients. *J Virol* 2013.
61. Jen J, Laughlin M, Chung C, et al. Ribavirin dosing in chronic hepatitis C: application of population pharmacokinetic-pharmacodynamic models. *Clin Pharmacol Ther* 2002;72:349-61.

62. Jen JF, Glue P, Gupta S, et al. Population pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Ther Drug Monit* 2000;22:555-65.
63. A, Lindahl K, Schvarcz R, et al. Dosage of ribavirin in patients with hepatitis C should be based on renal function: a population pharmacokinetic analysis. *Ther Drug Monit* 2002;24:701-8.
64. Wade JR, Snoeck E, Duff F, et al. Pharmacokinetics of ribavirin in patients with hepatitis C virus. *Br J Clin Pharmacol* 2006;62:710-4.
65. McHutchison JG, Manns M, Patel K, et al. Adherence to combination therapy enhances sustained response in genotype-1-infected patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;123:1061-9.
66. Shiffman ML, Ghany MG, Morgan TR, et al. Impact of reducing peginterferon alfa-2a and ribavirin dose during retreatment in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2007;132:103-12.
67. Larrat S, Stanke-Labesque F, Plages A, et al. Ribavirin quantification in combination treatment of chronic hepatitis C. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:124-9.
68. Tsubota A, Hirose Y, Izumi N, et al. Pharmacokinetics of ribavirin in combined interferon-alpha 2b and ribavirin therapy for chronic hepatitis C virus infection. *Br J Clin Pharmacol* 2003;55:360-7.
69. Loustaud-Ratti V, Alain S, Rousseau A, et al. Ribavirin exposure after the first dose is predictive of sustained virological response in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2008;47:1453-61.
70. Munoz-de-Rueda P, Ruiz-Extremera A, Candel JM, et al. Plasma ribavirin trough concentrations during treatment of chronic hepatitis C in genotype-1 patients. *J Clin Gastroenterol* 2011;46:328-33.
71. Brochot E, Castelain S, Duverlie G, et al. Ribavirin monitoring in chronic hepatitis C therapy: anaemia versus efficacy. *Antivir Ther* 2010;15:687-95.

72. Snoeck E, Wade JR, Duff F, et al. Predicting sustained virological response and anaemia in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon alfa-2a (40KD) plus ribavirin. *Br J Clin Pharmacol* 2006;62:699-709.
73. Stickel F, Helbling B, Heim M, et al. Critical review of the use of erythropoietin in the treatment of anaemia during therapy for chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2012;19:77-87.
74. Sulkowski MS, Shiffman ML, Afdhal NH, et al. Hepatitis C virus treatment-related anemia is associated with higher sustained virologic response rate. *Gastroenterology* 2010;139:1602-11, 11 e1.
75. Sievert W, Dore GJ, McCaughan GW, et al. Virological response is associated with decline in hemoglobin concentration during pegylated interferon and ribavirin therapy in hepatitis C virus genotype 1. *Hepatology* 2011;53:1109-17.
76. Hezode C, Forestier N, Dusheiko G, et al. Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med* 2009;360:1839-50.
77. Breilh D, Foucher J, Castera L, et al. Impact of ribavirin plasma level on sustained virological response in patients treated with pegylated interferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;30:487-94.
78. D'Avolio A, Ciancio A, Siccardi M, et al. Inosine triphosphatase polymorphisms and ribavirin pharmacokinetics as determinants of ribavirin-associate anemia in patients receiving standard anti-HCV treatment. *Ther Drug Monit* 2012;34:165-70.
79. Hadziyannis SJ, Sette H, Jr., Morgan TR, et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004;140:346-55.
80. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001;358:958-65.
81. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 1998;282:103-7.

82. Herrmann E, Lee JH, Marinos G, et al. Effect of ribavirin on hepatitis C viral kinetics in patients treated with pegylated interferon. *Hepatology* 2003;37:1351-8.
83. Kau A, Vermehren J, Sarrazin C. Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *J Hepatol* 2008;49:634-51.
84. Chevaliez S, Asselah T. Mechanisms of non-response to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011;35 Suppl 1:S31-41.
85. De Rueda PM, Lopez-Nevot MA, Saenz-Lopez P, et al. Importance of host genetic factors HLA and IL28B as predictors of response to pegylated interferon and ribavirin. *Am J Gastroenterol* 2011;106:1246-54.
86. Jacobson IM, Poordad F, Brown RS, Jr., et al. Standardization of terminology of virological response in the treatment of chronic hepatitis C: panel recommendations. *J Viral Hepat* 2012;19:236-43.
87. Yu JW, Wang GQ, Sun LJ, et al. Predictive value of rapid virological response and early virological response on sustained virological response in HCV patients treated with pegylated interferon alpha-2a and ribavirin. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:832-6.
88. Poordad F, McCone J, Jr., Bacon BR, et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011;364:1195-206.
89. Yu ML, Dai CY, Chen SC, et al. A prospective study on treatment of chronic hepatitis C with tailored and extended interferon-alpha regimens according to pretreatment virological factors. *Antiviral Res* 2004;63:25-32.
90. Okada S, Akahane Y, Suzuki H, et al. The degree of variability in the amino terminal region of the E2/NS1 protein of hepatitis C virus correlates with responsiveness to interferon therapy in viremic patients. *Hepatology* 1992;16:619-24.
91. Farci P SA, De Gioannis, Peddis G et al. Evolution of HCV quasispecies of the different patterns of response to interfeon therapy in chronic hepatitis C. *Procedins of the 6th International Simposium on hepatitis C and related viruses.* 1999:99.

92. Salmeron J, Casado J, Rueda PM, et al. 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;41:264-9.
93. Farci P, Shimoda A, Coiana A, et al. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 2000;288:339-44.
94. Kumar D, Malik A, Asim M, et al. Influence of quasispecies on virological responses and disease severity in patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2008;14:701-8.
95. Boo I, Fischer AE, Johnson D, et al. Neutralizing antibodies in patients with chronic hepatitis C infection treated with (Peg)-interferon/ribavirin. *J Clin Virol* 2007;39:288-94.
96. Thelu MA, Baud M, Leroy V, et al. Dynamics of viral quasispecies during interferon therapy in non responder chronic hepatitis C patients. *J Clin Virol* 2001;22:125-31.
97. Fan X, Mao Q, Zhou D, et al. High diversity of hepatitis C viral quasispecies is associated with early virological response in patients undergoing antiviral therapy. *Hepatology* 2009;50:1765-72.
98. Wang W, Zhang X, Xu Y, et al. High-resolution quantification of hepatitis C virus genome-wide mutation load and its correlation with the outcome of peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy. *PLoS One* 2014;9:e100131.
99. Hofmann WP, Zeuzem S, Sarrazin C. Hepatitis C virus-related resistance mechanisms to interferon alpha-based antiviral therapy. *J Clin Virol* 2005;32:86-91.
100. Khaliq S, Jahan S, Pervaiz A. Sequence variability of HCV Core region: important predictors of HCV induced pathogenesis and viral production. *Infect Genet Evol* 2011;11:543-56.
101. Lin W, Kim SS, Yeung E, et al. Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain. *J Virol* 2006;80:9226-35.

102. Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, et al. Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C virus genotype 1b high viral load and non-virological response to interferon-ribavirin combination therapy. *Intervirology* 2005;48:372-80.
103. Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, et al. Predictive factors of early and sustained responses to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b: amino acid substitutions in the core region and low-density lipoprotein cholesterol levels. *J Hepatol* 2007;46:403-10.
104. El-Shamy A, Shoji I, Kim SR, et al. Sequence heterogeneity in NS5A of hepatitis C virus genotypes 2a and 2b and clinical outcome of pegylated-interferon/ribavirin therapy. *PLoS One* 2012;7:e30513.
105. El-Shamy A, Hotta H. Impact of hepatitis C virus heterogeneity on interferon sensitivity: An overview. *World J Gastroenterol* 2014;20:7555-69.
- 106 Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, et al. Influence of amino-acid polymorphism in the core protein on progression of liver disease in patients infected with hepatitis C virus genotype 1b. *J Med Virol* 2010;82:41-8.
107. Miura M, Maekawa S, Kadokura M, et al. Analysis of viral amino acids sequences and the IL28B SNP influencing the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Hepatol Int* 2011.
108. Schiappa DA, Mittal C, Brown JA, et al. Relationship of hepatitis C genotype 1 NS5A sequence mutations to early phase viral kinetics and interferon effectiveness. *J Infect Dis* 2002;185:868-77.
109. Sarrazin C, Berg T, Lee JH, et al. Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy. *J Hepatol* 1999;30:1004-13.
110. Murayama M, Katano Y, Nakano I, et al. A mutation in the interferon sensitivity-determining region is associated with responsiveness to interferon-ribavirin combination therapy in chronic hepatitis patients infected with a Japan-specific subtype of hepatitis C virus genotype 1B. *J Med Virol* 2007;79:35-40.

111. Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, et al. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:9524-8.
112. Veillon P, Payan C, Gaudy C, et al. [Mutation analysis of ISDR and V3 domains of hepatitis C virus NS5A region before interferon therapy with or without ribavirin]. *Pathol Biol (Paris)* 2004;52:505-10.
113. Duverlie G, Khorsi H, Castelain S, et al. Sequence analysis of the NS5A protein of European hepatitis C virus 1b isolates and relation to interferon sensitivity. *J Gen Virol* 1998;79 (Pt 6):1373-81.
114. Pascu M, Martus P, Hohne M, et al. 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;53:1345-51.
115. Hayashi K, Katano Y, Honda T, et al. Association of interleukin 28B and mutations in the core and NS5A region of hepatitis C virus with response to peg-interferon and ribavirin therapy. *Liver Int* 2011;31:1359-65.
116. Gale MJ, Jr., Korth MJ, Tang NM, et al. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 1997;230:217-27.
117. Bouzgarrou N, Hassen E, Mahfoudh W, et al. NS5A(ISDR-V3) region genetic variability of Tunisian HCV-1b strains: Correlation with the response to the combined interferon/ribavirin therapy. *J Med Virol* 2009;81:2021-8.
118. Podevin P, Sabile A, Gajardo R, et al. Expression of hepatitis C virus NS5A natural mutants in a hepatocytic cell line inhibits the antiviral effect of interferon in a PKR-independent manner. *Hepatology* 2001;33:1503-11.
119. Yahoo N, Sabahi F, Shahzamani K, et al. Mutations in the E2 and NS5A regions in patients infected with hepatitis C virus genotype 1a and their correlation with response to treatment. *J Med Virol* 2011;83:1332-7.

120. Inchauspe G, Zebedee S, Lee DH, et al. Genomic structure of the human prototype strain H of hepatitis C virus: comparison with American and Japanese isolates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:10292-6.
121. Veillon P, Payan C, Le Guillou-Guillemette H, et al. Quasispecies evolution in NS5A region of hepatitis C virus genotype 1b during interferon or combined interferon-ribavirin therapy. *World J Gastroenterol* 2007;13:1195-203.
122. Puig-Basagoiti F, Fornis X, Furcic I, et al. Dynamics of hepatitis C virus NS5A quasispecies during interferon and ribavirin therapy in responder and non-responder patients with genotype 1b chronic hepatitis C. *J Gen Virol* 2005;86:1067-75.
123. El-Shamy A, Sasayama M, Nagano-Fujii M, et al. Prediction of efficient virological response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy by NS5A sequences of hepatitis C virus and anti-NS5A antibodies in pre-treatment sera. *Microbiol Immunol* 2007;51:471-82.
124. Jain MK, Yuan HJ, Adams-Huet B, et al. Pegylated interferon and ribavirin promote early evolution of nonstructural 5A protein in individuals with hepatitis C who demonstrate a response to treatment. *J Infect Dis* 2009;200:866-76.
125. Lohmann V, Korner F, Dobierzewska A, et al. Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol* 2001;75:1437-49.
126. Kim DW, Lee SA, Kim H, et al. Naturally occurring mutations in the nonstructural region 5B of hepatitis C virus (HCV) from treatment-naive Korean patients chronically infected with HCV genotype 1b. *PLoS One* 2014;9:e87773.
127. Hamano K, Sakamoto N, Enomoto N, et al. Mutations in the NS5B region of the hepatitis C virus genome correlate with clinical outcomes of interferon-alpha plus ribavirin combination therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:1401-9.
128. Jaspe RC, Sulbaran YF, Sulbaran MZ, et al. Prevalence of amino acid mutations in hepatitis C virus core and NS5B regions among Venezuelan viral isolates and comparison with worldwide isolates. *Virology* 2012;9:214.

129. Watanabe K, Yoshioka K, Yano M, et al. Mutations in the nonstructural region 5B of hepatitis C virus genotype 1b: their relation to viral load, response to interferon, and the nonstructural region 5A. *J Med Virol* 2005;75:504-12.

130. McCown MF, Rajyaguru S, Kular S, et al. GT-1a or GT-1b subtype-specific resistance profiles for hepatitis C virus inhibitors telaprevir and HCV-796. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:2129-32.

131. Kumagai N, Takahashi N, Kinoshita M, et al. Polymorphisms of NS5B protein relates to early clearance of hepatitis C virus by interferon plus ribavirin: a pilot study. *J Viral Hepat* 2004;11:225-35.

132. Cannon NA, Donlin MJ, Mayes LM, et al. Evidence for action of ribavirin through the hepatitis C virus RNA polymerase. *J Viral Hepat* 2009;16:595-604.

133 Cao F, Donlin MJ, Turner K, et al. Genetic and biochemical diversity in the HCV NS5B RNA polymerase in the context of interferon alpha plus ribavirin therapy. *J Viral Hepat* 2011;18:349-57.

134. Ward CL, Dev A, Rigby S, et al. Interferon and ribavirin therapy does not select for resistance mutations in hepatitis C virus polymerase. *J Viral Hepat* 2008;15:571-7.

135. Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, et al. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011;364:1207-17.

136. Sherman KE, Flamm SL, Afdhal NH, et al. Response-guided telaprevir combination treatment for hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2011;365:1014-24.

137. Au JS, Pockros PJ. Novel therapeutic approaches for hepatitis C. *Clin Pharmacol Ther* 2014;95:78-88.

138. Muir AJ. The rapid evolution of treatment strategies for hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2014;109:628-35; quiz 36.

139. Wendt A, Adhoute X, Castellani P, et al. Chronic hepatitis C: future treatment. *Clin Pharmacol* 2014;6:1-17.

140. Manns MP, Gane E, Rodriguez-Torres M, et al. Vaniprevir with pegylated interferon alpha-2a and ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C: a randomized phase II study. *Hepatology* 2012;56:884-93.

141. Hezode C HG, Ghesquiere W, et al. . Daclatasvir an NS5A replication complex inhibitor, combined with peginterferon alfa-2a and ribavirin in treatment naive HCV genotype 1or 4 subjects: phase 2b COMMAND-1 SVR12 results [abstract]. . *Hepatology* 2012;56(Suppl):553A.

142. Manns M, Pol S, Jacobson IM, et al. All-oral daclatasvir plus asunaprevir for hepatitis C virus genotype 1b: a multinational, phase 3, multicohort study. *Lancet* 2014.

143. Jacobson I DG, Foster GR et al. . Simeprevir (TMC435) with peginterferon/ribavirin for chronic HCV genotype-1 infection in treatment naive patients: results from QUEST-1, a phase III trial. *J Hepatol* 2013;58:S574.

144. Lawitz E FX, Zeuzem S et al. Simeprevir (TMC435)with peginterferon/ribavirin for treatment of chronic HCV genotype 1 infection in patients who relapsed after previous interferon-based therapy: results from PROMISE, a phase III Trial. *Gastroenterology* 2013;144:S151.

145. Zeuzem S, Berg T, Gane E, et al. Simeprevir increases rate of sustained virologic response among treatment-experienced patients with HCV genotype-1 infection: a phase IIb trial. *Gastroenterology* 2014;146:430-41 e6.

146. Lawitz E, Gane EJ. Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. *N Engl J Med* 2013;369:678-9.

147. Osinusi A, Meissner EG, Lee YJ, et al. Sofosbuvir and ribavirin for hepatitis C genotype 1 in patients with unfavorable treatment characteristics: a randomized clinical trial. *JAMA* 2013;310:804-11.

148. Marino Z, van Bommel F, Fornis X, et al. New concepts of sofosbuvir-based treatment regimens in patients with hepatitis C. *Gut* 2014;63:207-15.

149. Jacobson I GR, Rodriguez-Torres M, Younossi ZM, Corregidor A, Sulkowski MS et al. . SVR results of a once-daily regimen of Simeprevir (TMC435) plus Sofosbuvir (GS-7977) with or without Ribavirin in cirrhotic and non-cirrhotic HCV genotype 1 treatment naive and prior null responder patients: The COSMOS study. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2013.

150. Asselah T. Daclatasvir plus sofosbuvir for HCV infection: an oral combination therapy with high antiviral efficacy. *J Hepatol* 2014;61:435-8.

151. Gane EJ, Roberts SK, Stedman CA, et al. Oral combination therapy with a nucleoside polymerase inhibitor (RG7128) and danoprevir for chronic hepatitis C genotype 1 infection (INFORM-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Lancet* 2010;376:1467-75.

152. Gane EJ SC, Hyland RH et al. Once daily sofosbuvir/ledipasvir fixed dose combination with or without ribavirin: the ELECTRON trial. *Hepatology* 2013;58:243A.

153. Lawitz E PF, Hyland RH et al. Once daily sofosbuvir/ledipasvir fixed dose combination with or without ribavirin resulted in >95% sustained virologic response in patients with HCV genotype 1, including patients with cirrhosis: the LONESTAR trial. *Hepatology* 2013;58:315A-6A.

154. Kowdley KV LE, Poordad F et al. Safety and efficacy of interferon-free regimens of ABT-450/r, ABT 267, ABT-333 +/-ribavirin in patients with chronic HCV GT1 infection: results from the AVIATOR study. *J Hepatol* 2013;58:S2.

155. Jacobson IM, Gordon SC, Kowdley KV, et al. Sofosbuvir for hepatitis C genotype 2 or 3 in patients without treatment options. *N Engl J Med*;368:1867-77.

156. Clark V, Nelson DR. The role of ribavirin in direct acting antiviral drug regimens for chronic hepatitis C. *Liver Int* 2011;32 Suppl 1:103-7.

157. Koh C, Liang TJ. What is the future of ribavirin therapy for hepatitis C? *Antiviral Res* 2014;104C:34-9.

158. McHutchison JG, Manns MP, Muir AJ, et al. Telaprevir for previously treated chronic HCV infection. *N Engl J Med* 2010;362:1292-303.

159. Kwo PY, Lawitz EJ, McCone J, et al. Efficacy of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-naive patients with genotype 1 hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial. *Lancet* 2010;376:705-16.

160. Gane EJ, Stedman CA, Hyland RH, et al. Nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus ribavirin for hepatitis C. *N Engl J Med* 2013;368:34-44.

161. Zeuzem S, Asselah T, Angus P, et al. Efficacy of the protease inhibitor BI 201335, polymerase inhibitor BI 207127, and ribavirin in patients with chronic HCV infection. *Gastroenterology* 2011;141:2047-55; quiz e14.

162. Zeuzem S BP, Agrawal K, et al. Dual, triple, and quadruple combination treatment with a protease inhibitor (GS -9256) and a polymerase inhibitor (GS -9190) alone and in combination with ribavirin (RBV) or PegIFN/RBV for up to 28 days in treatment naive, genotype 1 HCV subjects. The 61th annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, October 29-November 2, Boston, MA, USA, 2010) 2010.

163. Zeuzem S, Buggisch P, Agarwal K, et al. The protease inhibitor, GS-9256, and non-nucleoside polymerase inhibitor tegobuvir alone, with ribavirin, or pegylated interferon plus ribavirin in hepatitis C. *Hepatology* 2012;55:749-58.

164. Zeuzem S, Soriano V, Asselah T, et al. Faldaprevir and deleobuvir for HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2013;369:630-9.

165. Sulkowski M GD, Lawitz E, Hinestrosa F, Nelson D, Thuluvath P, et al. . Potent viral suppression with all-oral combination of daclatasvir (NS5A inhibitor) and GS-7977 (NS5B inhibitor), +/- ribavirin, in treatment naive patients with chronic HCV GT1, 2 or 3. *J Hepatol* 2012;56:560.

166. Gane EJ, Stedman CA, Hyland RH, et al. Efficacy of nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus the NS5A inhibitor ledipasvir or the NS5B non-nucleoside inhibitor GS-9669 against HCV genotype 1 infection. *Gastroenterology* 2014;146:736-43 e1.

167. Lawitz E PF, Pang PS, Hyland RH, Ding X, Mo H, Symonds WT, McHutchison JG, Membreno FE. Sofosbuvir and ledipasvir fixed-dose combination with and without ribavirin in treatment-naive and previously treated patients with genotype 1 hepatitis C virus infection (LONESTAR): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet* 2014;383:515-23.
168. Lok AS, Gardiner DF, Lawitz E, et al. Preliminary study of two antiviral agents for hepatitis C genotype 1. *N Engl J Med* 2012;366:216-24.
169. Caballero T, Perez-Milena A, Masseroli M, et al. Liver fibrosis assessment with semiquantitative indexes and image analysis quantification in sustained-responder and non-responder interferon-treated patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001;34:740-7.
170. Crotty S, Maag D, Arnold JJ, et al. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med* 2000;6:1375-9.
171. Loustaud-Ratti V, Carrier P, Rousseau A, et al. Pharmacological exposure to ribavirin: a key player in the complex network of factors implicated in virological response and anaemia in hepatitis C treatment. *Dig Liver Dis* 2011;43:850-5.
172. Tox U, Schulte S, Heindl B, et al. Ribavirin priming in patients with chronic hepatitis C and normal ALT: a pilot study. *Hepatogastroenterology* 2008;55:1666-70.
173. Furusyo N, Kubo N, Toyoda K, et al. Helper T cell cytokine response to ribavirin priming before combined treatment with interferon alpha and ribavirin for patients with chronic hepatitis C. *Antiviral Res* 2005;67:46-54.
174. Brillanti S BF, Feletti V, et al. Ribavirin priming enhances efficacy of chronic hepatitis C re-treatment in patients who had not responded to previous combination therapy. *Hepatology* 2009;50:32.
175. Merli M, Giannelli V, Gentili F, et al. Ribavirin priming improves the virological response to antiviral treatment in transplanted patients with recurrent hepatitis C: a pilot study. *Antivir Ther* 2011;16:879-85.

176. Palmer M, Rubin R, Rustgi V. Randomised clinical trial: pre-dosing with taribavirin before starting pegylated interferon vs. standard combination regimen in treatment-naive patients with chronic hepatitis C genotype 1. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;36:370-8.
177. Mihm U, Welker MW, Teuber G, et al. Impact of ribavirin priming on viral kinetics and treatment response in chronic hepatitis C genotype 1 infection. *J Viral Hepat* 2014;21:42-52.
178. Van Vlerken LG, van Oijen MG, van Erpecum KJ. Ribavirin concentration is a more important predictor of sustained viral response than anemia in hepatitis C patients. *Gastroenterology* 2012;140:1693-4; author reply 4.
179. Amanzada A, Schneider S, Moriconi F, et al. Early anemia and rapid virological response improve the predictive efficiency of IL28B-genotype for treatment outcome to antiviral combination therapy in patients infected with chronic HCV genotype 1. *J Med Virol* 2012;84:1208-16.
180. Bodenheimer HC, Jr., Lindsay KL, Davis GL, et al. Tolerance and efficacy of oral ribavirin treatment of chronic hepatitis C: a multicenter trial. *Hepatology* 1997;26:473-7.
181. Enomoto N, Maekawa S. HCV genetic elements determining the early response to peginterferon and ribavirin therapy. *Intervirology* 2010;53:66-9.
182. Kumthip K, Pantip C, Chusri P, et al. Correlation between mutations in the core and NS5A genes of hepatitis C virus genotypes 1a, 1b, 3a, 3b, 6f and the response to pegylated interferon and ribavirin combination therapy. *J Viral Hepat* 2011;18:e117-25.
183. Eigen M. The origin of genetic information: viruses as models. *Gene* 1993;135:37-47.
184. Anderson JP, Daifuku R, Loeb LA. Viral error catastrophe by mutagenic nucleosides. *Annu Rev Microbiol* 2004;58:183-205.
185. Nasu A, Marusawa H, Ueda Y, et al. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus in association with antiviral therapy determined by ultra-deep sequencing. *PLoS One* 2011;6:e24907.

186. Caraballo Cortes K, Zagordi O, Laskus T, et al. Ultradeep pyrosequencing of hepatitis C virus hypervariable region 1 in quasispecies analysis. *Biomed Res Int* 2013;2013:626083.

