



**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

***MUTACIONES EN LAS REGIONES E2-PePHD, NS5A-
PKRBD, NS5A-ISDR Y NS5A-V3 DEL VIRUS DE LA
HEPATITIS C GENOTIPO 1 Y SU RELACIÓN CON LA
RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON INTERFERÓN
PEGILADO Y RIBAVIRINA.***

**ROBERTO PATÓN ARENAS
GRANADA 2009**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Roberto Patón Arenas
D.L.: GR. 3034-2009
ISBN: 978-84-692-5085-3

D. 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 D. Roberto Patón Arenas sobre el tema “Mutaciones en las regiones E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR y NS5A-V3 del virus de la hepatitis C genotipo 1 y su relación con la respuesta al tratamiento con interferón pegilado y ribavirina“ ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica y científica de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, a 2 de Junio de 2009

Fdo. D. Javier Salmerón Escobar

D.^a ÁNGELA RUIZ EXTREMERA, PROFESORA TITULAR DE PEDIATRÍA
DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal D. Roberto Patón Arenas sobre el tema “Mutaciones en las regiones E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR y NS5A-V3 del virus de la hepatitis C genotipo 1 y su relación con la respuesta al tratamiento con interferón pegilado y ribavirina“ ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica y científica de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, a 2 de Junio de 2009

Fdo. D.^a Ángela Ruiz Extremera

D.^a PALOMA MUÑOZ DE RUEDA, DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA Y TÉCNICO SUPERIOR DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIONES MÉDICAS MORA LARA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO SAN CECILIO DE GRANADA

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal D. Roberto Patón Arenas sobre el tema “Mutaciones en las regiones E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR y NS5A-V3 del virus de la hepatitis C genotipo 1 y su relación con la respuesta al tratamiento con interferón pegilado y ribavirina“ ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica y científica de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, a 2 de Junio de 2009

Fdo. D.^a Paloma Muñoz de Rueda

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento:

A mis directores de tesis: Dr. Javier Salmerón por haberme brindado la oportunidad de llevar a cabo este proyecto de investigación, sin su apoyo y rigor científico esta tesis no podría haberse realizado. Dra. Ángela Ruiz Extremera por su aportación científica. Dra. Paloma Muñoz de Rueda por su ayuda, constancia y dedicación para que este trabajo fuera posible.

A los miembros del Laboratorio de Investigaciones Médicas Mora Lara del Hospital Universitario San Cecilio de Granada, en especial a Jorge y Luís por su colaboración en la recogida y análisis de los datos de los pacientes.

A mis compañeros de la Unidad Clínica de Digestivo del Hospital Universitario San Cecilio de Granada por haber contribuido no solo a mi formación científica sino también personal.

Al Departamento de Medicina de la Universidad de Granada por haberme facilitado la realización de esta tesis doctoral.

A la Fundación Hospital Clínico por el soporte institucional prestado.

A todas aquellas personas que me han prestado su apoyo facilitándome, de alguna manera, la realización de esta tesis.

A María y Ana.

“Por estar siempre ahí
...a pesar de las circunstancias”

A mis padres.

“Por su confianza en mí”

De este trabajo se han presentado las siguientes comunicaciones y publicaciones.

1. COMUNICACIONES:

- **Patón R, Gila A, Casado J, Muñoz de Rueda P, Palacios A, Quintero D, et al.** Estudio prospectivo de las mutaciones en las regiones E2-PePHD, NS5-PKRDB, NS5A-ISDR y NS5A-V3 del virus de la hepatitis C (VHC) y su relación con la respuesta al tratamiento con interferón pegilado y ribavirina. LXV Congreso Anual de la Sociedad Española de Patología Digestiva. Granada (19-23 Junio) 2006. Revista Española de Enfermedades Digestivas 2006; 98 (Supl. 1): 9-10.
- **Salmerón J, Muñoz de Rueda P, Casado J, Palacios A, Patón R, Gila A, et al.** Prospective studies of mutations in the E2-PEPHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR and NS5A-V3 regions of hepatitis C virus and their relationship to peginterferon and ribavirin treatment response. The 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Boston. Octubre 2006. Hepatology 2006; 44, n°4 (Supl. 1):334-335.
- **Casado J, Muñoz de Rueda P, Gila A, Patón R, Quintero D, Rodríguez L, et al.** Estudio prospectivo de las mutaciones en las regiones E2-PEPHD, NS5-PKRDB, NS5A-ISDR y NS5A-V3 del virus de la hepatitis C (VHC) genotipo 1, y su relación con la respuesta al tratamiento con interferón pegilado (IFN-PEG) y ribavirina (RBV). XXXII Congreso Nacional anual de la Fundación y Asociación Española para el Estudio del Hígado. Madrid. Febrero 2007. Gastroenterol Hepatol. 2007; 30 (Supl. 1): 129-130.

2. PUBLICACIONES (ANEXO):

- **Muñoz de Rueda P, Casado J, Patón R, Quintero D, Palacios A, Gila A, 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 Jul; 82 (13): 6644-6653.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EPIDEMIOLOGÍA E HISTORIA NATURAL DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C.....	3
1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA	3
1.1.2. HISTORIA NATURAL	5
1.2. EL VIRUS DE LA HEPATITIS C	8
1.2.1. ORGANIZACIÓN GENÓMICA.....	8
1.2.2. HETEROGENIDAD GENÉTICA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C	12
1.2.3. GENOTIPOS VIRALES.....	14
1.3. TRATAMIENTO ANTIVIRAL	17
1.3.1. INTERFERÓN	17
1.3.1.1. Tipos de interferón	17
1.3.1.2. Interferones pegilados	20
1.3.1.3. Eficacia del interferon	21
1.3.1.4. Mecanismos de acción del interferón.....	24
1.3.2. RIBAVIRINA	26
1.3.2.1. Mecanismos de acción de la ribavirina	27
1.3.3. TRATAMIENTO COMBINADO CON INTERFERÓN MÁS RIBAVIRINA	31
1.3.3.1. No respondedores.....	38
1.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C AL TRATAMIENTO ANTIVIRAL	40
1.4.1. FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTIVIRAL	40
1.4.1.1. Factores relacionados con el tratamiento	41
1.4.1.2. Factores relacionados con el huésped	44

1.4.1.3. Factores relacionados con la enfermedad.....	47
1.4.1.4. Factores virales.....	48
1.4.1.4.1. Carga viral.....	48
1.4.1.4.2. Genotipo viral.....	48
1.4.1.4.3. Importancia de las cuasiespecies en la resistencia del virus de la hepatitis C.....	49
1.4.1.4.5. Importancia de las mutaciones del virus de la hepatitis C en los mecanismos de resistencia	53
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	61
2.1. HIPÓTESIS.....	63
2.2. OBJETIVOS.....	65
3. PACIENTES Y METODOLOGÍA.....	67
3.1. PACIENTES	69
3.1.1. SUJETOS DEL ESTUDIO	69
3.1.2. VARIABLES DEL ESTUDIO.....	69
3.1.3. RECOGIDA DE LOS DATOS	70
3.1.4. ANÁLISIS DE LOS DATOS	72
3.2. METODOLOGÍA	74
3.2.1. DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO.....	74
3.2.2. DETECCIÓN DEL ARN-VHC	74
3.2.3. DETERMINACIÓN DE LA CARGA VIRAL.....	74
3.2.4. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LAS REGIONES NS5A y E2-PePHD	74
3.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	80
4. RESULTADOS.....	81

4.1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES Y DIFERENTES RESPUESTAS AL TRATAMIENTO CON INTERFERÓN PEGILADO MÁS RIBAVIRINA.....	83
4.2. ANÁLISIS DE LOS FACTORES ASOCIADOS CON MUTACIONES EN LA REGIÓN NS5A-PKRBD	87
4.3. ANÁLISIS DE LOS FACTORES ASOCIADOS CON MUTACIONES EN LA REGIÓN NS5A-ISDR Y SUS FLANCOS	91
4.4. ANÁLISIS DE LOS FACTORES ASOCIADOS CON LAS MUTACIONES EN LA REGIÓN NS5A-V3 Y SUS FLANCOS	93
4.5. ESTUDIO EVOLUTIVO.....	98
4.6. ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	100
5. DISCUSIÓN.....	103
6. CONCLUSIONES	115
7. BIBLIOGRAFÍA	119
ANEXO	153

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EPIDEMIOLOGÍA E HISTORIA NATURAL DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C

1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA

El virus de la hepatitis C (VHC) fue identificado y caracterizado en 1989 después de múltiples investigaciones para la detección del genoma del virus de las hepatitis “no-A, no-B” (NANB), reconociéndose como la causa mayor de este tipo de hepatitis y una causa importante de las hepatitis crónicas¹.

El VHC infecta aproximadamente a 170 millones de personas en todo el mundo, lo que representa una pandemia viral. La prevalencia de la infección por el VHC presenta una gran variabilidad geográfica, calculándose la seroprevalencia mundial en un 3%; con el mayor número de infecciones registradas en Egipto. En Estados Unidos, el 1,8% de la población es positiva para los anticuerpos contra el VHC², mientras que en nuestro país se estima que existen unas 800.000 personas infectadas (Figura 1).

En el mundo se pueden identificar tres patrones epidemiológicos diferentes: 1) en países como EEUU y Australia la mayor parte de las infecciones por VHC aparecen en personas entre 39 y 40 años, lo que indica que la principal transmisión de VHC ocurrió en el pasado, en forma predominante entre adultos jóvenes infectados a través de drogadicción intravenosa, 2) en áreas como Japón o el sur de Europa la prevalencia de infección por VHC es mayor en personas de edad avanzada, lo que sugiere que el riesgo de transmisión del VHC era más elevado en el pasado lejano (hace más de 30 años). En estos países los procedimientos de atención a la salud, en particular las prácticas de inyección insegura con reutilización de jeringas de vidrio contaminadas y las

prácticas médicas alternativas, pueden haber desempeñado un papel principal en la diseminación del virus y 3) en países como Egipto se observan tasas elevadas de infección en todos los grupos etarios, lo que sugiere que el alto riesgo de adquirir el VHC continúa³.

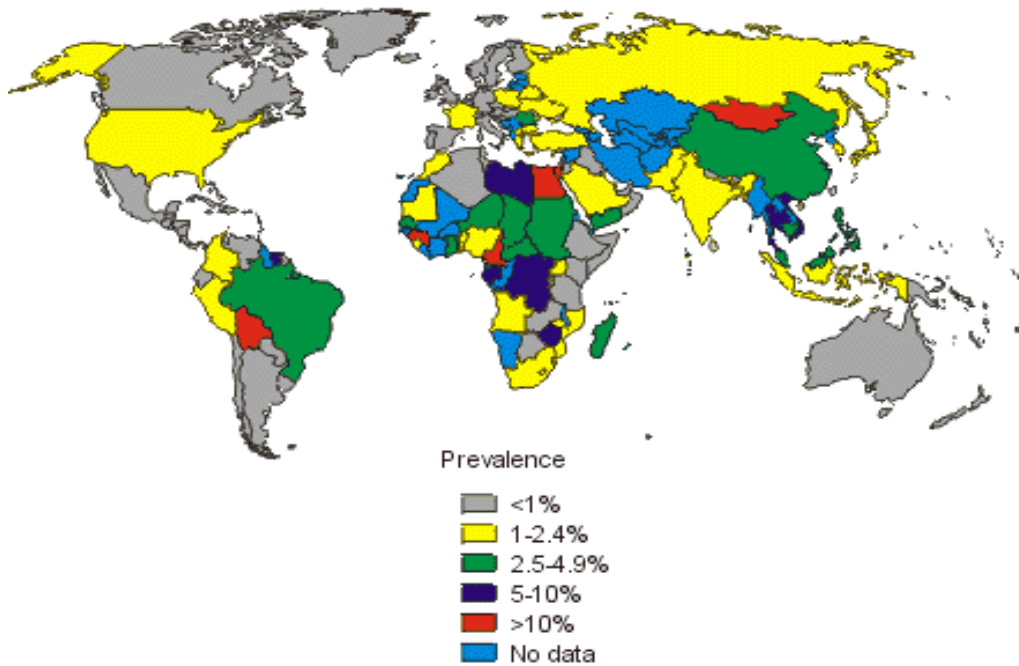


Figura 1. Prevalencia de la infección por VHC según área geográfica.

En los países industrializados, el VHC es el agente causal del 20% de las hepatitis agudas, 70% de las hepatitis crónicas, 40% de las cirrosis hepáticas, 60% de los casos de carcinoma hepatocelular (CHC) y del 30% de las causas de trasplante hepático, constituyendo en nuestro medio la causa más frecuente de cirrosis hepática de etiología viral y una de las principales indicaciones de trasplante hepático en la actualidad.

Los principales vías de transmisión de la infección son parenterales: la transfusión de hemoderivados y el consumo de drogas por vía endovenosa⁴. Otras vías de transmisión menos eficaces son la transmisión vertical materno-fetal (alrededor de un 5% de embarazos en madres portadoras; la coinfección VIH y la carga viral superior a 10^6 copias/ml se relacionan con un mayor riesgo). Las relaciones sexuales no se consideran una vía efectiva de transmisión, debido a los bajos niveles del virus en los fluidos y tejidos genitales. Los datos disponibles sobre la posibilidad del contagio del VHC mediante la convivencia en el hogar y la lactancia materna no sugieren que estas vías de transmisión sean efectivas. Los trabajadores sanitarios constituyen un grupo de riesgo, aunque la incidencia de infección tras pinchazo accidental es tan solo del 5-10%^{5,6}.

En nuestro medio, aproximadamente un 40% de los pacientes con hepatitis crónica por VHC (HCC) no presentan ningún factor de riesgo parenteral⁷. La principal hipótesis que explicaría este hecho es la exposición parenteral inaparente (inyecciones intramusculares no estériles, tatuajes, cirugía).

1.1.2. HISTORIA NATURAL

La infección aguda por el VHC cursa en la mayoría de los casos de forma asintomática (60-75 %). Entre un 20 % y un 30 % de los pacientes desarrollan ictericia y un 10-20 % presentan síntomas como fatiga, náuseas y vómitos que aparecen antes de que se produzca la seroconversión. El desarrollo de hepatitis fulminante es extremadamente infrecuente. El intervalo de tiempo entre la infección y la aparición de anticuerpos contra el

VHC es de unos 50 días aunque la seroconversión puede documentarse tan tarde como a los 9 meses⁸.

Un 15-20 % de los pacientes son capaces de eliminar el virus y llegar de este modo a la curación de la infección. La completa resolución de la infección se define como la ausencia de ARN-VHC en suero acompañado de la normalización de los niveles de transaminasas. No se sabe con certeza de qué factores depende que unos pacientes sean capaces de aclarar por completo el virus y, por contra, en la mayoría (80 %) persista de forma crónica^{9,10}.

La evolución de la infección depende de la interacción de determinados factores tanto virológicos como relativos al huésped. Los factores asociados con el aclaramiento espontáneo del virus incluyen sexo femenino, menor edad en el momento de la infección, raza caucásica, presencia de síntomas o ictericia durante la infección aguda, y el estado inmune¹¹.

El hecho más notable de la infección por el VHC es su capacidad para persistir aún en presencia de una buena respuesta inmune humoral y celular del huésped, debido tanto a la alta tasa de mutaciones (cuasiepecies) que facilita mecanismos de escape, como a la elevada producción y aclaramiento de viriones del VHC, la cual se produce a un ritmo de 10^{12} viriones/día, con una vida media del virión de 2,7 h^{12,13}.

La infección crónica se diagnostica cuando el ARN del VHC persiste en sangre durante al menos 6 meses. El 20-30 % de los pacientes con HCC desarrollará cirrosis hepática en un período de 20-30 años¹⁴. A su vez, la incidencia estimada de CHC en este último grupo se sitúa entre el 1-4% anual¹⁵ (Figura 2).

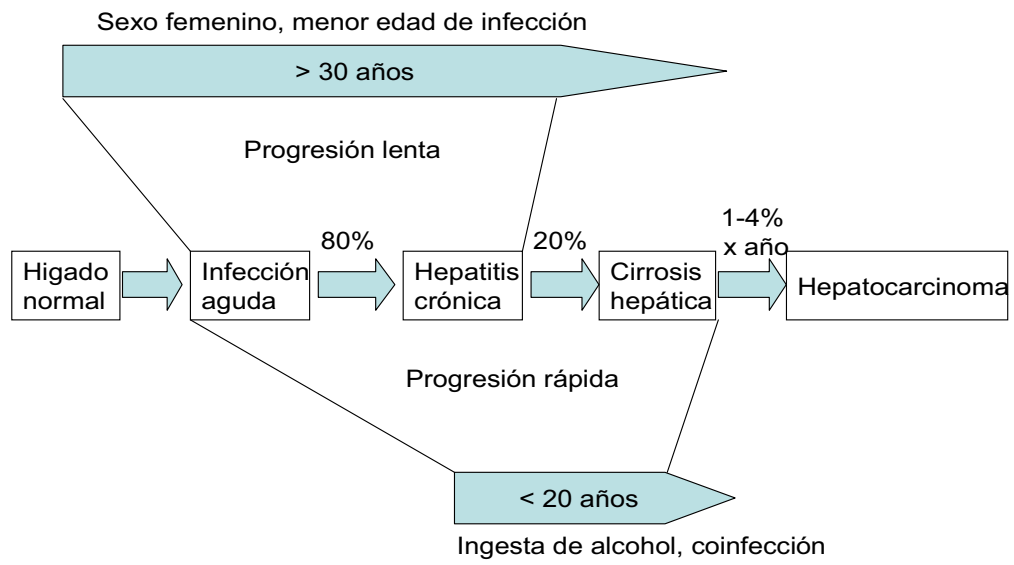


Figura 2². Historia natural de la infección por el VHC.

1.2. EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

El VHC es un virus ARN de cadena sencilla positiva clasificado dentro del género *hepacivirus*, con estructura genómica similar a la de los *pestivirus* y los *flavivirus*, todos ellos pertenecientes a la familia *Flaviviridae*¹⁶.

1.2.1. ORGANIZACIÓN GENÓMICA

El virión del VHC tiene un genoma ARN positivo, rodeado por una cápside icosaédrica (core) y una envoltura que contiene 2 glicoproteínas, E1 y E2. Las partículas virales tienen 50 nm aproximadamente de diámetro y el core entorno a los 30 nm¹. El genoma está constituido por una cadena única de ARN de polaridad positiva, de aproximadamente 9600 nucleótidos, con una única estructura de lectura (ORF, *open reading frame*) que expresa una proteína de 3.011 aminoácidos aproximadamente. El ARN funciona como mensajero y su traducción conduce a un precursor poliproteico a partir del cual se producen las distintas proteínas funcionales, estructurales y no estructurales, por la acción de proteasas celulares y de codificación vírica.

Los genes estructurales (core, C; envoltura, E1 y E2), están localizados en la zona próxima al extremo 5' del genoma, mientras que los genes no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) son adyacentes a 3' (Figura 3). Los extremos 5' y 3' son secuencias no codificadoras (NTR, *non-translated region*) que flanquean la ORF^{17,18}.

La porción 5'-NTR se inicia con una región de unos 340 nucleótidos que precede el codón de arranque de la poliproteína. Esta secuencia, muy bien

conservada, con analogías superiores al 98 % entre todas las cepas hasta ahora secuenciadas, probablemente contiene importantes lugares para la traducción, replicación y ensamblaje del genoma. Su principal función es permitir la unión del ribosoma de la célula huésped al ARN vírico en la estructura conocida como IRES (*internal ribosome entry site*). La región codificadora del VHC termina en un único codón final seguido por la región no codificadora 3'-NTR, de 230 nucleótidos, en la que se encuentran elementos esenciales para la transcripción y replicación virales¹⁹ (Figura 3).

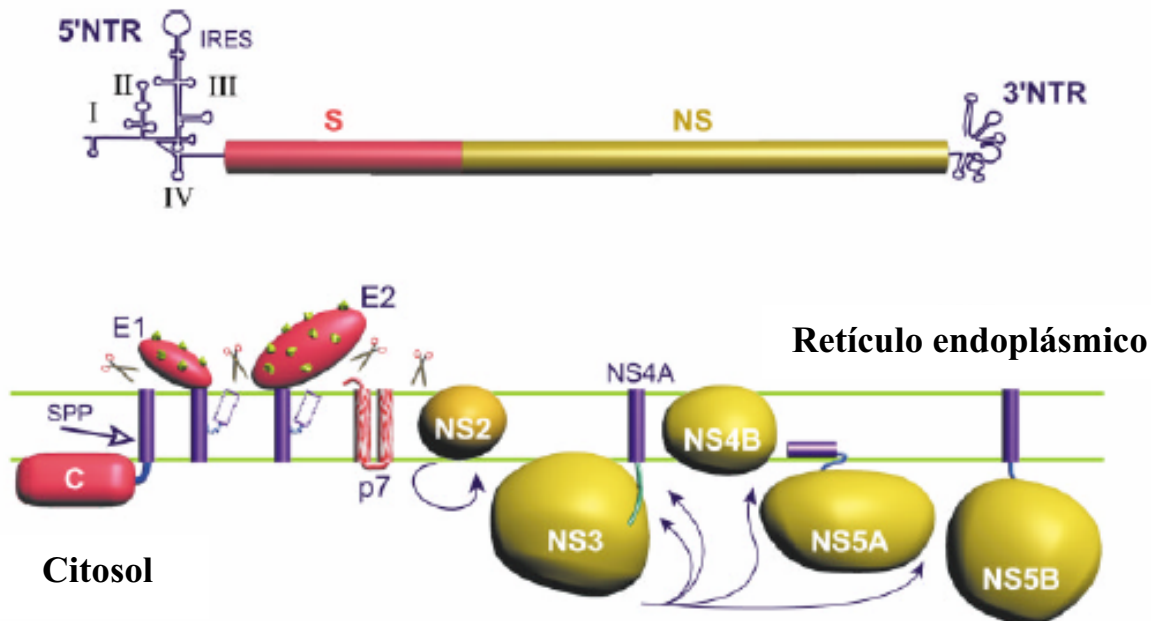


Figura 3¹⁷. Organización del ARN genómico del VHC (superior) y procesamiento en poliproteínas (inferior). S y NS son las regiones que codifican las proteínas estructurales y no estructurales, respectivamente. Las tijeras representan el lugar de acción de las peptidasas y el punteado verde sobre E1 y E2 indica la glucosilación de las proteínas de la envoltura.

A las distintas proteínas codificadas del VHC se les adjudican distintas funciones (Tabla 1). El gen C codifica una proteína de la nucleocápside, compuesta por una secuencia altamente conservada de 191 aminoácidos con una masa molecular de unos 21 kDa. El extremo carboxiterminal de esta proteína contiene una región hidrofóbica, la cual actúa como una secuencia señal para el transporte de E1 dentro del retículo endoplasmático y para el procesamiento dependiente de membrana del core¹⁹. Estudios *in vitro* han demostrado que esta proteína del core podría interactuar con protooncogenes de las células del huésped, implicándola en el desarrollo de CHC en pacientes con HCC²⁰.

Los genes E1 y E2 codifican las proteínas de la envoltura del virión: gp35 y gp70. Ambas proteínas forman heterodímeros no covalentes que desempeñan un papel importante en la patogenia del virus. Se caracterizan por una marcada variabilidad, incluso dentro de un mismo individuo, especialmente en 2 regiones hipervariables (HVR-1 y HVR-2) localizadas en la región E2/NS1. La proteína ARF/F²¹ es una proteína de 160 aminoácidos que se codifica en una fase de lectura abierta alternativa de la región codificante del core. Ha sido recientemente descrita, y su función no ha sido todavía descubierta, si bien se ha sugerido que no es esencial para el proceso de replicación viral. La proteína p7, con una longitud de 63 aminoácidos que forma hexámeros con actividad de canal de iones, se piensa que está implicada en el proceso de ensamblaje, y que no es esencial para la replicación viral.

Las proteínas NS2 y NS3 son componentes de la proteasa NS2-3, cuya función es el procesamiento proteolítico de la región no estructural. La proteína NS2 participa en el ensamblaje del virión y forma parte del complejo

de replicación junto con NS5A y NS5B. La proteína NS3 presenta 2 actividades enzimáticas: una NTPasa helicasa, localizada en el extremo C-terminal, indispensable para la replicación del ARN, encontrándose potencialmente relacionada con procesos de desenrollamiento de intermediarios replicativos, o resolución de estructuras secundarias. Esta importancia funcional hace de esta actividad enzimática una potencial diana terapéutica. Asimismo, la NS3 presenta actividad serín-proteasa.

La proteína codificada por NS4A actúa como cofactor de la proteína-serina de NS3, siendo la función de la p27 derivada del gen NS4B desconocida¹⁷.

La proteína NS5A parece estar involucrada en la modulación de la respuesta antiviral del huésped mediada por el interferón (IFN), apreciándose que la acumulación de mutaciones en una determinada región de NS5A (codones 2209-2248) conocida como ISDR (*interferon sensitivity determining region*) se relaciona con una mejor respuesta al interferón en pacientes Japoneses infectados por el genotipo 1b del VHC²². La proteína NS5B tiene actividad de polimerasa de ARN dependiente de ARN, esencial para la replicación del genoma del VHC. Debido a que la actividad NS5B es central en el proceso replicativo viral, ha sido la diana terapéutica específica más importante en el desarrollo de nuevos fármacos.

Proteína	Peso molecular (kDa)	Función
C	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	Desconocida
NS2	23	Componente de la proteasa NS2-3
NS3	70	Componente de la proteasa NS2-3, serínproteasa, NTPasa y helicasa
NS4A	8	Cofactor para la serínproteasa NS3
NS4B	27	Desconocida
NS5A	58	Desconocida, involucrada en la resistencia al interferón
NS5B	68	ARN-polimerasa dependiente de ARN

Tabla 1. Proteínas estructurales y no estructurales del VHC.

1.2.2. HETEROGENIDAD GENÉTICA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C

Una de las características más importante de la infección por el VHC es la gran variabilidad genética, es decir, el alto grado de heterogeneidad en las secuencias genómicas y, por lo tanto, de las proteínas codificadas. Esta característica tiene implicaciones en la patogenia y persistencia del virus, diseño de vacunas, selección de mutantes resistentes durante el tratamiento, y diseño e interpretación de los métodos diagnósticos. Además, da lugar a una población de genomas con variantes del ARN conocida como cuasiespecies.

La rapidez de la replicación viral y la incapacidad de la ARN polimerasa viral para corregir errores introducidos en el genoma del VHC favorecen la aparición frecuente de mutantes genómicas. 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 nucleótidos entre un 1% y un 5%, denominadas “cuasiespecies”, es decir, una secuencia mayoritaria o secuencia máster, rodeada de secuencias mutantes que difieren entre sí en uno o más nucleótidos (Figura 4). La cuasiespecie predominante sería aquella que contara con una mayor capacidad replicativa en el huésped. Durante la infección, el número y la composición de mutantes en la población viral cambian constantemente en relación con los cambios de su entorno, lo que constituye una gran ventaja adaptativa para el virus. Cuando el conjunto replicativo está bien adaptado a su entorno, las mutaciones nuevas tienden a ser deletéreas y a disminuir la capacidad general de replicación de los genomas que lo portan. Cuando, por el contrario, el conjunto replicativo no está bien adaptado, las nuevas mutaciones pueden ser ocasionalmente ventajosas, empujando a la selección a una nueva distribución en el espacio de secuencias virales²³.

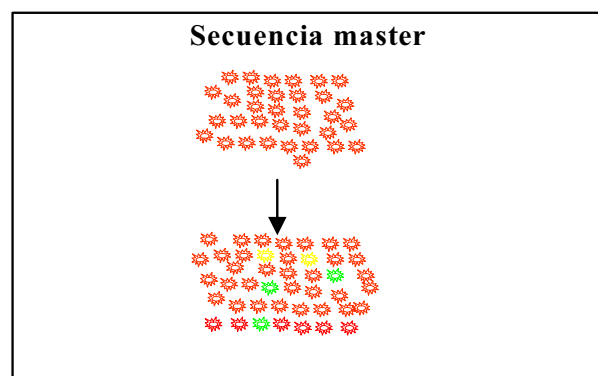


Figura 4. Representación esquemática de una cuasiespecie viral. A partir de una secuencia original, cada ciclo replicativo da lugar a la aparición de secuencias mutantes. De esta manera, la población viral se compone de una secuencia máster, con mayor representación, y un espectro de mutantes estrechamente relacionadas.

Sin embargo, la variabilidad genética no parece ser igual en todas las áreas del genoma, hay unas partes del genoma que están bien conservadas, mientras que otras muestran distintos grados de variabilidad. En la región codificadora, los genes de envoltura E1 y E2, sobre todo la secuencia de este último, conocida como región hipervariable 1 (HVR-1), muestran la mayor variación genética, por lo que ha sido utilizada para la identificación de las distintas variantes virales o cuasiespecies de los individuos infectados con el VHC, mientras que el gen de la proteína core es el más altamente conservado. La región 5'-NTR y porciones de 3'-NTR también están conservadas²⁰.

La región HVR-1 es, probablemente, el mayor epítipo de neutralización del VHC y las mutaciones que se acumulan en ésta región permiten al virus evitar la neutralización contribuyendo al establecimiento de infecciones persistentes, y en la respuesta deficiente al tratamiento con IFN.

La diversidad de las cuasiespecies del VHC puede, por tanto, contribuir al desarrollo de cronicidad durante la infección debido a los rápidos cambios que suceden en las proteínas de la envoltura viral como mecanismo de escape a la presión inmune ejercida por el huésped. Sin embargo, el escape inmunitario no parece ser el único mecanismo que utiliza el virus para persistir en el huésped.

1.2.3. GENOTIPOS VIRALES

Basándose en la secuencia de nucleótidos y en el análisis filogenético, se han definido seis grupos mayores del VHC, llamados genotipos, designándose

éstos por números (genotipos 1 al 6). Estos genotipos, se han subdividido en subgenotipos (o subtipos) y se designan con letras minúsculas. Los genotipos tienen aproximadamente un 65 % de homología entre sí, mientras que los subtipos muestran de un 77-79 %²⁴. Aunque los diferentes genotipos se pueden encontrar repartidos por todo el mundo, hay claras diferencias en cuanto a su distribución geográfica, incluso entre los diferentes grupos de población de una misma área geográfica (Figura 5). Así pues, los genotipos 1a, 1b, 2a, 2b, 2c y 3a se encuentra en el 90 % de las infecciones por el VHC en América del Norte y en Sudamérica, Europa, Rusia, China, Japón, Australia y Nueva Zelanda; el 1b produce la mayoría de las infecciones del Este y Sur de Europa, China y Japón. El genotipo 3 es muy frecuente en América y en Europa, y los otros genotipos se encuentran en Asia o África²⁵,

26.

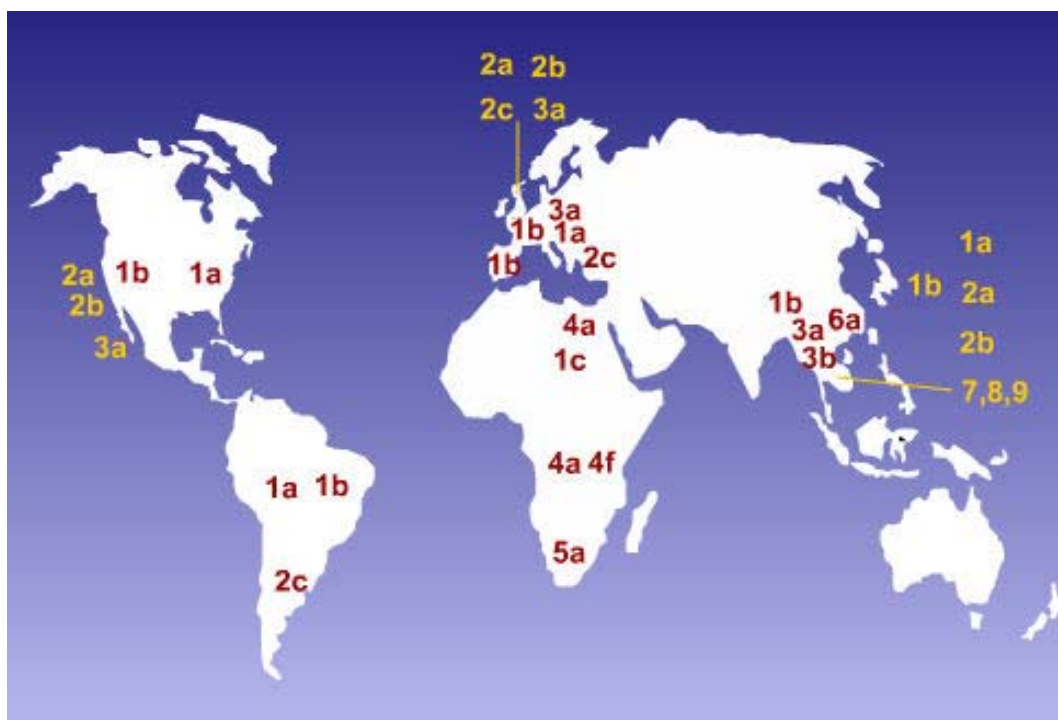


Figura 5. Distribución geográfica de los diferentes genotipos del VHC.

INTRODUCCIÓN

Los diferentes genotipos se han asociado con la tasa de respuesta al tratamiento con IFN y también a la combinación de INF y ribavirina (RBV). Así pues, los pacientes infectados con virus del genotipo 1, en particular el subtipo 1b, responden peor al tratamiento que los infectados con genotipos 2 ó 3. En nuestro medio, el 80-90 % de las infecciones se deben al genotipo 1b. También las personas infectadas con virus de los genotipos 4 y 5 tienen un bajo índice de respuesta. Por el contrario, las mejores respuestas se producen en los infectados por los genotipos 2 y 3 que se han distribuido con mayor frecuencia en el subgrupo de pacientes con antecedentes de adicción a drogas por vía endovenosa²⁷.

1.3. TRATAMIENTO ANTIVIRAL

1.3.1. INTERFERÓN

Desde el primer estudio piloto, realizado por Hoofnagle y cols.²⁸ en 1986, numerosos ensayos clínicos han demostrado la eficacia del IFN en la HCC y establecido como estándar la pauta de 3 MU, tres veces por semana, durante 12 meses. Sin embargo, los resultados del tratamiento con IFN α han sido pobres, de manera que sólo entre el 15-20 % de los pacientes tratados durante un año negativizaban el ARN-VHC, es decir, presentaban respuesta virológica sostenida (RVS). Aproximadamente un 25 % de los pacientes tratados respondían de forma transitoria, recidivando la enfermedad al suspender el tratamiento y la mayoría, un 50 %, no respondían al tratamiento. Se comenzaron a emplear pautas terapéuticas diversas, tanto en tiempo de tratamiento como en dosis empleadas, periodicidad de administración y el carácter fijo o variable de la misma, sin conseguir modificar de forma sustancial la respuesta.

1.3.1.1. Tipos de interferón

Los IFNs son proteínas o glicoproteínas que producen distintos tipos celulares como respuesta a estímulos diversos entre los que destacan las infecciones víricas. Se distinguen tres clases de IFNs según sus características estructurales y biológicas:

- IFN α (conocido antiguamente como IFN leucocitario)
- IFN β (conocido antiguamente como IFN fibroblástico)

- IFN γ (conocido antiguamente como IFN inmunitario)

Los IFNs α , de los que se han identificado diversos subtipos, son polipéptidos no glicosilados con pesos moleculares entre 16 y 23 kD mientras que los interferones β y γ son polipéptidos glucosados.

Los interferones α son producidos por monocitos, leucocitos, linfocitos B en respuesta a virus y otros estímulos denominados inductores de tipo I que comprenden otros microorganismos, componentes microbianos y diversos compuestos sintéticos. Tienen un importante papel en la respuesta a las infecciones virales agudas, como mediadores de la respuesta viral inespecífica que precede a la respuesta inmune específica, así como en la modulación de dicha respuesta inmune y como inmunomodulador en general. Tienen también acciones antiproliferativas y por ello se han desarrollado usos terapéuticos de los IFNs α para algunos procesos antineoplásicos²⁹.

Al menos 18 genes distintos (incluidos 4 seudogenes) son conocidos para los IFNs humanos α ; en comparación, solo hay 1 gen para el IFN β y otro para el γ ^{30,31}.

Los IFNs α han sido profundamente estudiados en el tratamiento de pacientes con HCC, B y D. El IFN tiene un efecto directamente antiviral; estimulando la respuesta celular inmune.

4 tipos de IFN α han sido evaluados en grandes ensayos clínicos en pacientes con HCC³². En la actualidad y en nuestro medio, sólo están disponibles como medicamentos los IFNs α obtenidos por tecnología de ADN recombinante:

1. IFN α -2b (Intron A, Schering) es producido mediante técnicas de ADN recombinante. Se aprobó en los Estados Unidos para el

tratamiento de pacientes con infección por VHC a dosis de 3 MU subcutáneas 3 veces en semana durante 24 meses. También está aprobado su uso en muchos otros países; en la Unión Europea, las dosis recomendadas es de 3 MU subcutáneas 3 veces en semana durante 12 meses, aunque debiendo ampliarse la duración a 18 meses en determinados pacientes.

2. IFN α -2a (Roferon, Roche) es otro IFN α recombinante. Se diferencia del IFN α -2b por un único aminoácido. Sin embargo, son posibles otras diferencias como resultado del proceso de elaboración, dado que una elevada proporción de pacientes tratados desarrollan anticuerpos neutralizantes frente al IFN α -2a, pero no al α -2b. La mayoría de las personas producen IFN α -2b lo que probablemente explique la elevada tasa de formación de anticuerpos cuando se administra IFN α -2a. Su uso está aprobado en los Estados Unidos en el tratamiento de pacientes con HCC a dosis de 3 MU subcutáneas 3 veces en semana durante 12 meses. Las dosis aprobadas en la Unión Europea es de 3 a 6 MU subcutáneas o intramusculares 3 veces en semana durante 6 meses, seguidas de 3 MU 3 veces en semana durante otros 6 meses. Este régimen de tratamiento fue aprobado en base a estudios que sugerían que la respuesta mejoraba con mayores dosis de inducción.
3. IFN alfacon-1 o consensus IFN (Infergen, Amgen) es un IFN recombinante no natural, el cual fue desarrollado examinando subtipos de IFN α y asignando el aminoácido más frecuentemente observado en cada posición hasta formar una molécula consenso. Fue aprobado su uso en los Estados Unidos a dosis de 9 μ g subcutáneos tres veces por semana durante 6 meses. Los pacientes quienes toleraron previamente la terapia con IFN y no respondieron o recayeron tras suspender el tratamiento deben ser tratados con 15 μ g

tres veces por semana durante 6 meses, aunque estas dosis no son recomendadas como tratamiento inicial.

4. IFN α -n1 (Wellferon, Glaxo-Wellcome) es una mezcla de 9 subtipos de IFN procedente de líneas celulares linfoblásticas B humanas. Su uso no está aprobado para el tratamiento de la infección por el VHC en los Estados Unidos, pero si lo está en Europa a dosis de 5 MU subcutáneas o intramusculares 3 veces por semana durante 48 semanas. Ha demostrado ser dosis equivalente con el IFN α -2b³³.

1.3.1.2. Interferones pegilados

La pegilación de una proteína consiste en su unión a una molécula de polietilenglicol (PEG). La unión de una proteína farmacológicamente activa a una molécula de PEG persigue disminuir su aclaramiento y así prolongar su permanencia tras la administración. También ocasiona cambios en la absorción y en la distribución y podría suponer cambios en la inmunogenicidad del IFN o en su actividad biológica.

Los dos IFNs pegilados actualmente disponibles difieren de forma considerable en su estructura: el IFN pegilado α -2a está unido a una molécula de PEG ramificada de 40 kDa de peso molecular mientras que el IFN pegilado α -2b lo hace a una cadena lineal de 12 kDa. Esta diferente estructura justifica las diferencias farmacocinéticas que existen entre ellos. Los aminoácidos que constituyen los puntos de unión a la molécula de PEG son distintos en las dos moléculas y también su tipo de unión, lo que puede variar su modo de interacción con el receptor y su actividad antivírica. El IFN pegilado α -2a tiene una vida media más larga y un menor volumen de

distribución corporal en comparación con el IFN pegilado α -2b. Esta última forma es metabolizada principalmente por vía renal, mientras que la primera lo hace por vía hepática²⁹.

1.3.1.3. Eficacia del interferón

Muchos estudios no controlados y más de 70 estudios controlados y randomizados han documentado la eficacia del IFN para el tratamiento de la HCC³⁴. Aproximadamente el 40 % de los pacientes responden durante el tratamiento con una temprana normalización de los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) y pérdida del ARN viral detectable, generalmente en las primeras 8 a 12 semanas³⁵.

En comparación con los pacientes no tratados, el IFN administrado a dosis de 3 MU tres veces en semana durante 12 meses aumenta la probabilidad de RVS en pacientes *naive*. La tasa total de RVS a estas dosis y tiempo de administración fue de 17 %. La dosis de 6 MU fue más efectiva que la de 3 MU administrada durante 12 meses de tratamiento o más vs 6 meses. Sin embargo, los efectos adversos eran más comunes con mayores dosis y con tratamientos más prolongados³⁶.

Con el desarrollo de las formas de IFN pegilado se ha conseguido prolongar la vida media plasmática del fármaco hasta varios días, permitiendo la administración del fármaco una vez por semana y obteniendo una mejoría considerable en tanto en la farmacocinética como en la farmacodinámica, con una mayor y más eficaz supresión de la actividad antiviral en comparación con la administración del IFN estándar tres veces por semana (Figura 6).

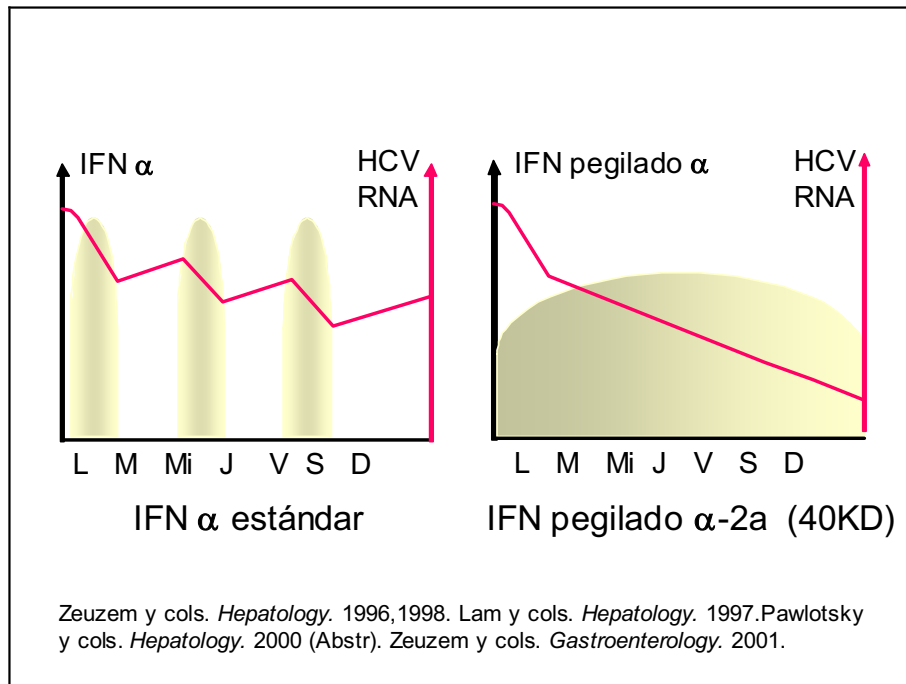


Figura 6. Farmacocinética y dinámica del IFN α estándar frente al IFN pegilado α -2a.

A pesar de estas diferencias, la eficacia de ambos fármacos es bastante similar en los estudios publicados, especialmente cuando son empleados en combinación con RBV. En estos estudios el IFN pegilado fue comparado frente a IFN estándar, tanto en monoterapia como en tratamiento combinado. Los resultados de los principales ensayos clínicos están representados en la tabla 2³⁷.

Los estudios con monoterapia³⁸⁻⁴⁰ indican claramente que ambas formas de IFN pegilado fueron significativamente superiores al IFN estándar en relación con las tasas de respuesta virológica precoz (RVP) y RVS. La tasa de RVS con IFN pegilado α -2a fue del 39 % comparado con el 19 % con IFN estándar³⁸. En un estudio similar, distinta dosificación de IFN pegilado α -2b, ajustada en función del peso del paciente y administrada una vez por semana fue comparada con 3 MU, tres veces por semana de IFN α -2b. El tratamiento

fue administrado durante un año, obteniendo una tasa de RVS del 12 % con IFN α -2b, del 18 % con 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{semana}$ de IFN pegilado α -2b, 25 % con 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{semana}$ y del 23 % con 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{semana}$ ⁴⁰. En pacientes con fibrosis en puentes o cirrosis hepática la tasa de RVS fue del 30 % con 180 μg de IFN pegilado α -2a y del 8 % con IFN estándar³⁹.

AUTOR	PAUTA TERAPÉUTICA	N ^(*)	RFT (IC 95%)	RVS (IC 95%)
Zeuzem y cols.,2000	IFN- α 2a, 6 mU/día durante 12 semanas, luego 3 mU durante 36 semanas	264	28% (22-33)	19% (14-24)
	IFN pegilado α 2a, 180 $\mu\text{g}/\text{semana}$ durante 48 semanas	267	69% (63-75)	39% (33-45)
Heathcote y cols.,2000	IFN- α 2a 3 mU/día durante 48 semanas	88	14% (8-23)	7% (4-16)
	IFN pegilado α 2a, 90 $\mu\text{g}/\text{semana}$ durante 48 semanas	96	42% (32-52)	15% (9-23)
	IFN pegilado α 2a, 180 $\mu\text{g}/\text{semana}$ durante 48 semanas	87	44% (34-54)	30% (21-40)
Lindsay y cols.,2001	IFN- α 2b, 3 mU/día durante 48 semanas	303	24% (20-29)	12% (9-16)
	IFN pegilado α 2b, 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{semana}$ durante 48 semanas	315	33% (28-39)	18% (14-23)
	IFN pegilado α 2b, 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{semana}$ durante 48 semanas	297	41% (35-46)	25% (20-30)
	IFN pegilado α 2b, 1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{semana}$ durante 48 semanas	304	49% (43-55)	23% (19-28)

(*) N: número de pacientes; RFT: respuesta virológica al final del tratamiento; RVS: respuesta virológica sostenida

Tabla 2. Ensayos aleatorizados con IFN e IFN pegilado en monoterapia.

1.3.1.4. Mecanismos de acción del interferón

Los IFNs están relacionados con las citocinas e inducen acciones antivirales e inmunomoduladoras en las células dianas. El tipo I está formado por 21 subtipos de IFN α , un subtipo de IFN β , un subtipo de IFN ω e IFN tau. El IFN tipo II se conoce también como IFN γ . El IFN α se puede unir a dos receptores en la superficie celular, el receptor 1 (IFNAR1) y el receptor 2 (IFNRA2c). La unión con estos receptores conduce a la activación de la señal Jak-STAT, a través de la acción de Jak 1 y la proteinkinasa Tyk 2, que conduce a la activación de las proteínas de transcripción (STAT): STAT 1 y STAT 2^{41,42}. Se piensa que la STAT 3 y STAT 5 también responden a este tipo de señales. En el núcleo de la célula, la STAT 1 y 2 se unen a p48/IRF-9 y forman el gen factor 3 estimulado por el IFN (ISGF3). La unión de ISGF3 con los elementos de respuesta del IFN-estimulado (ISRE), se conoce como los genes que son estimulados por el IFN (ISGs).

Los productos ISGs representan la acción terapéutica primaria del IFN contra el VHC. La razón de la limitada eficacia del IFN no está clara, aunque probablemente dependa de factores virales y del huésped, que en definitiva afectan la expresión y la función de ISGs inducido durante el tratamiento con IFN⁴³. La unión del IFN con su receptor induce, a través de estos mecanismos, la producción de proteínas antivirales, las más importantes son: la 2', 5' oligoadenilato sintetasa, la proteína MxA y sobre todo la proteinkinasa dependiente de ARN de cadena doble (PKR). La PKR tiene muchas funciones celulares, como las proapoptóticas, el control del crecimiento celular, la actividad en la diferenciación celular y, por supuesto, la inhibición de la síntesis de proteínas en respuesta a la infección viral por inactivación del factor de iniciación de la traducción (eIF2 α). Estudios con

microarray indican que el genoma humano codifica cientos, si no miles, de diversas formas funcionales de ISGs. Algunos de estos genes inducidos por el IFN α han sido estudiados por su papel en la resistencia del VHC al IFN, ya que hay evidencias que sugieren que el VHC interfiere con las vías de señalización del IFN y la expresión de ISGs. Una lista corta de 123 ISGs fueron identificadas, cuya expresión se incrementa *in vivo* e *in vitro* a las 3 horas del tratamiento con IFN⁴⁴, precediendo al comienzo de la primera fase de disminución del ARN-VHC después del IFN. Pero el IFN α no solo tiene una acción antiviral induciendo estos productos que interrumpen la replicación viral en los hepatocitos, sino que también ejerce una acción moduladora del sistema inmune⁴⁵. El IFN α estimula la inmunidad innata (células NK) y adquirida (CD4+ CD8+ células T) frente al VHC, mediante la inducción de genes que participan en la presentación de antígenos y en la activación de las células T.

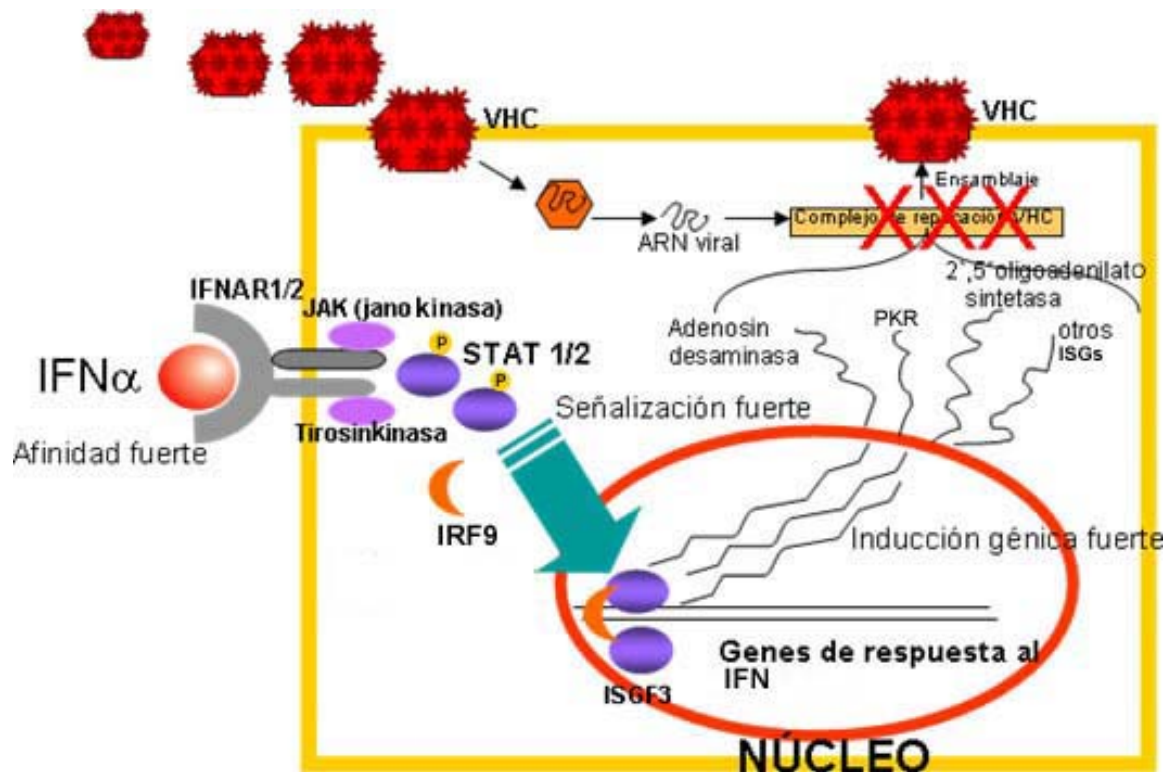


Figura 7⁴⁶. Transducción de la señal del IFN α . El IFN α se une a los receptores de la membrana superficial de los hepatocitos, provocando su dimerización (IFNAR1–IFNAR 2) y la activación de la Jano kinasa (JAK) y la tirosinkinasa, que fosforilan los transductores de señales citoplasmáticos y las proteínas activadoras de la transcripción (STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription). STAT1 y STAT2 se unen al factor 9 regulador del IFN α (IRF9), formando un gran complejo (ISGF3) que se transloca al núcleo, actuando sobre el ADN, transcribiendo genes que salen del núcleo y codifican la producción de proteínas que interferirán en la replicación viral, en su síntesis proteica y ensamblaje.

1.3.2. RIBAVIRINA

Los análogos de los nucleósidos y nucleótidos han demostrado su efecto antiviral y se usan en el tratamiento de las hepatitis virales. La RBV, que fue sintetizada en el año 1970, es un nucleósido análogo de la guanosina, usada principalmente en el pasado para el tratamiento de la infección respiratoria severa por el virus respiratorio sincitial en niños. En un principio se pensó que la RBV tenía un efecto “cosmético”, disminuyendo solo las

transaminasas. En 1995 se publicó un estudio aleatorizado en 58 pacientes con HCC, comparando la RBV a una dosis de 1.200 mg/día durante 48 semanas con placebo. La reducción de ALT fue del 54 % en el grupo de RBV, mientras que en los controles era del 5 %. En cambio, no modificaba la carga viral del VHC ni durante el tratamiento ni después del mismo⁴⁷. Esto significa que la RBV no tiene un efecto antiviral propio frente al VHC y no es eficaz en monoterapia.

1.3.2.1. Mecanismos de acción de la ribavirina

Se podría pensar que la RBV es un adyuvante del IFN α , ya que aparentemente no disminuye la carga viral. La realidad es que la RBV tiene un efecto sinérgico, y actúa cooperando y potenciando al IFN α . Aunque su mecanismo de acción no se conoce con exactitud, recientemente se ha demostrado que tiene una leve acción sobre la replicación viral y que es un mutágeno del VHC.

La RBV entra en la célula hepática como un profármaco y es convertida en monofosfato, difosfato y trifosfato de ribavirina, a través de una acción secuencial de 3 kinasas celulares. Hasta este momento se han propuesto los siguientes mecanismos de acción. (1) Favorece la inmunidad del huésped frente al VHC potenciando una respuesta Th1 con aumento de citocinas como IFN γ y TNF α e IL-2, que aumenta la lisis de los hepatocitos infectados y reduce la producción de viriones. (2) Inhibición de IMPDH (inosina monofosfato deshidrogenasa), una enzima que transitoriamente depleciona el pool intracelular de trifosfato de guanósina, que es esencial para la transcripción viral y la replicación de los virus ARN. No obstante,

otros inhibidores específicos de IMPDH como el merimepodib (VX-497) no han demostrado de una manera clara un efecto antiviral frente al VHC. (3) Tampoco parece que la RBV sea un potente inhibidor de la ARN polimerasa, ya que sólo produce una leve disminución de la carga viral ($<0,5 \log_{10}$), y no aumenta la pendiente de la primera fase de reducción del ARN-VHC. (4) Por último, la RBV actuaría como un mutágeno del VHC al incorporarse dentro de los nuevos genomas sintetizados, dando lugar a mutaciones inducidas por la RBV en el genoma viral y originando un “error catastrófico” de la replicación (mutaciones suicidas). El resultado final es que los viriones infecciosos van desapareciendo, y se evita que el virus ataque a los hepatocitos sanos.

Se ha comprobado, que la administración de RBV en monoterapia produce una precoz y leve reducción de la carga viral. Este efecto es transitorio y desaparece al cuarto día. Por tanto, la RBV actúa en esta primera fase reduciendo la carga viral. Estos datos se confirmaron en un estudio posterior administrando RBV en monoterapia durante 4 semanas seguido de IFN α y RBV. Durante el periodo de administración de RBV la reducción de la carga viral fue sólo de $0,34 \log_{10}$. Al añadir el IFN α la reducción diaria de la carga viral en la primera fase fue de $2 \log_{10}/\text{día}$, y en la segunda fase de $0,15 \log_{10}/\text{día}$ ⁴⁸.

El efecto mutagénico de la RBV se ha demostrado *in vitro*. No obstante, la extrapolación de los resultados no es fácil, ya que la concentración de RBV era muy alta, y nunca se ha observado esas concentraciones plasmáticas en humanos. Los estudio *in vivo* son escasos y en cierta manera contradictorios. Estudiando la región NS5B en pacientes tratados con RBV en monoterapia, Young y cols.⁴⁹ observaron un incremento de las mutaciones no

estadísticamente significativo de 3 veces su valor con respecto al periodo basal. En un estudio más reciente, Asahina y cols.⁴⁸ siguen a 34 pacientes infectados por el VHC genotipo 1 por un tiempo variable antes del tratamiento, después administran RBV en monoterapia durante 4 semanas, seguido de IFN α y RBV durante 24 semanas, secuencian la región NS5A y NS5B antes y después de las 4 semanas de tratamiento con RBV. De los 34 pacientes 10 mostraron nuevas mutaciones en la región NS5A después del tratamiento con RBV en monoterapia, y 8 en la región NS5B. En estos pacientes la tasa de mutaciones fue significativamente mayor después de la RBV comparada con el periodo de observación (proporción de mutaciones en NS5A antes de RBV $0,6 \times 10^{-2}$, después $2,9 \times 10^{-2}$, $P = 0.02$; NS5B antes $0,24 \times 10^{-2}$ y después $1,3 \times 10^{-2}$, $P = 0.02$). También la proporción de pacientes que presentaron mutaciones en la región NS5A con la monoterapia fue mayor entre los que tenían una RVS que en los no respondedores (NR) (80 % y 8 %, respectivamente, $P < 0.001$). Estos datos, si son confirmados, indican que la RBV favorece las mutaciones del genoma viral y que progresivamente inactiva al virus.

Se ha intentado probar el efecto mutagénico de la RBV en un modelo matemático hipotético y muy complejo. Este modelo también intenta demostrar el aumento de la respuesta al final del tratamiento (RFT) y de la RVS en el tratamiento combinado (Figura 8)⁵⁰. Los hepatocitos infectados producen una liberación de viriones infecciosos y no infecciosos. El IFN inhibe la producción del VHC, y la RBV introduce mutaciones dentro del genoma VHC e incrementa la producción de viriones no infecciosos. Se piensa que el IFN y la RBV favorecen la respuesta inmunológica a través de los NK y linfocitos T, consiguiendo la muerte de las células infectadas por el VHC. También la RBV puede actuar a través de un mecanismo no citolítico,

curando las células infectadas sin destruirlas. Esto explicaría por qué la RBV tiene ese efecto llamado “cosmético” y normaliza las transaminasas.⁴⁷ Las células dianas del virus, que son los hepatocitos sanos, pueden ser atacadas por los viriones infecciosos pero no por los no infecciosos. También las células que han sido curadas por el IFN α y la RBV, son potencialmente una diana del VHC si persiste la infección activa. Además, este modelo, intenta explicar el aumento de la RFT y RVS al añadir la RBV, que aumenta la disminución de la carga viral en la segunda fase. El efecto de la RBV depende de la capacidad del IFN α al bloquear la producción de viriones. Cuando la efectividad del IFN es máxima, como en la hepatitis C aguda, el tratamiento con IFN α en monoterapia es suficiente. Si la efectividad del IFN α es adecuada, como en el genotipo no-1, la RBV probablemente tiene un efecto algo menor, ya que la producción de viriones está bloqueada por el IFN α ; en estos casos una dosis más baja de RBV (800 mg/día) puede ser eficaz. En cualquier caso la RBV es necesaria, ya que la RVS fue en el genotipo no-1 del 29 % en los tratados con IFN α y del 66 % con IFN α y RBV, ambos durante 48 semanas⁵¹. En pacientes difíciles de tratar, como en el genotipo 1, la efectividad del IFN α es menor, y es cuando las dosis máximas de RBV (1.000-1.400 mg/día) son más necesarias para aumentar la RVS. En resumen, la RBV tiene un efecto antiviral leve. No obstante, actúa sinérgicamente con el IFN α a través de su probable acción mutagénica, disminuyendo la proporción de recidivas y aumentando la tasa de RVS, especialmente en aquellos pacientes difíciles de tratar.

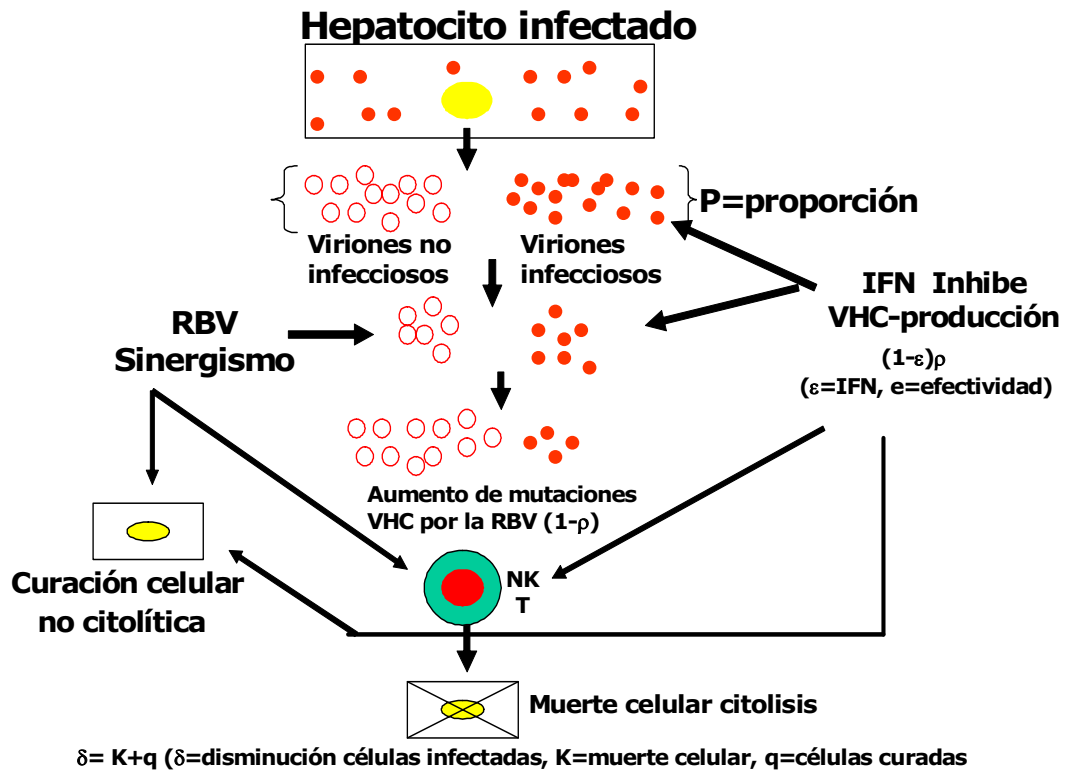


Figura 8. Mecanismo de acción del IFN y RBV.

1.3.3. TRATAMIENTO COMBINADO CON INTERFERÓN MÁS RIBAVIRINA

El tratamiento para la HCC ha mejorado en los últimos años. Las tasas de RVS han aumentado de forma significativa gracias a la introducción del IFN pegilado en asociación con la RBV (Figura 9).

En un ensayo aleatorizado muy importante, publicado en NEJM en 1998, en un muestra de 912 pacientes con HCC, se comparó la eficacia del IFN α en monoterapia o en combinación con RBV (1.000-1.200 mg/día) durante 24 ó 48 semanas. Este estudio demostró claramente que el tratamiento combinado

durante 48 semanas era el más efectivo: la RVS con IFN fue del 6 % en el tratamiento corto y del 13 % en el largo, mientras que la RVS con el tratamiento combinado fue del 31 % y del 38 %, respectivamente. Pero quizás el aspecto más significativo fue que la proporción de pacientes recidivantes con IFN α fue mayor que con el tratamiento combinado: al suspender el tratamiento, se observó una tasa de recidivas del 46 % en el grupo de IFN α frente al 24 % con IFN α y RBV⁵¹. Por tanto, la mayor tasa de RVS con el tratamiento combinado estaba relacionada con una mayor RFT y una menor proporción de recidivas. La contribución de la RBV en el tratamiento del VHC es que consigue una mayor tasa de RVS al disminuir la proporción de recidivas. Hay que destacar este punto, pues hasta que no se descubran nuevos fármacos capaces de curar a los NR al tratamiento, que son muy resistentes, la única oportunidad que tenemos para mejorar nuestros resultados es conseguir reducir la tasa de pacientes que parece que van a responder, sin embargo, cuando se suspende el tratamiento se reactivan.

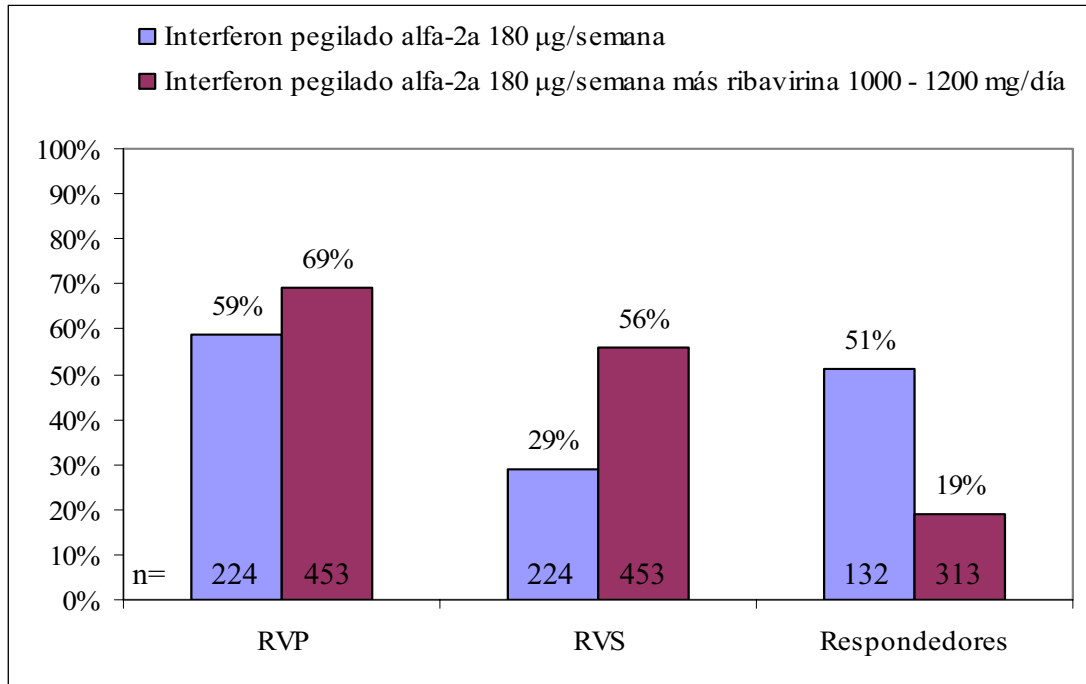


Figura 9⁵². Aumento de las tasas de RVS por la prevención de recaídas en pacientes con HCC tras la adición de RBV durante 48 semanas al tratamiento con INF pegilado α -2a.

Tres grandes estudios han evaluado la combinación de IFN pegilado más RBV⁵²⁻⁵⁴ cuyos resultados se resumen en la tabla 3. Las principales conclusiones fueron las siguientes:

En primer lugar, las tasas de RVS fueron casi idénticas con IFN pegilado α -2b (54 %) que con IFN pegilado α -2a (56 %) en combinación con RBV, y fueron significativamente más elevadas que cuando se empleaba IFN estándar más RBV.

En los estudios realizados con IFN pegilado α -2b se demostró que las tasas de RVS eran dependientes de la dosis de RBV, estableciendo la dosis de 10.6 mg/kg como la recomendada.

También se observó que el beneficio terapéutico aportado por la combinación de IFN pegilado y RBV (en comparación con IFN estándar más RBV) difería según los distintos subgrupos de pacientes; así, cuando se empleaba IFN pegilado α -2b aumentaba significativamente la tasa de RVS en pacientes con genotipo 1 y baja carga viral, pero no en aquellos con genotipos 2 ó 3 y elevada carga viral, mientras que cuando se empleaba IFN pegilado α -2a los incrementos en las tasas de RVS eran más limitados en comparación con el IFN α -2a estándar.

En uno de los estudios se administró IFN pegilado α -2a en combinación con RBV durante 24 o 48 semanas⁵⁴, observando que en los pacientes con genotipo 1 se obtenían tasas de RVS significativamente mayores cuando eran tratados durante más tiempo, independientemente de la carga viral al comienzo del tratamiento, mientras que tales diferencias no se objetivaron con pacientes infectados por genotipos 2 ó 3, independientemente de la carga viral pretratamiento. Además, una dosis fija de 800 mg/día de RBV fue suficiente para maximizar las tasas de respuesta sostenida en pacientes con genotipos 2 ó 3, mientras que los pacientes con genotipo 1 respondían mejor a dosis más elevadas (1.000-1.200 mg/día) de RBV.

Autor	Pauta terapéutica	N^(*)	RFT (IC 95%)	RVS (IC 95%)	
Manns y cols.,2001	IFN- α 2b, 3 mU/día + RBV (1.000-1.200mg) durante 48 sem	505	54%(49-58)	47% (42-51)	
	IFN pegilado α 2b, 1,5 μ g/kg/sem + RBV (1.000-1.200mg) durante 4 sem y luego 0,5 μ g/kg/sem + RBV (1.000-1.200mg) durante 44 sem	514	56%(52-60)	47% (43-52)	
	IFN pegilado α 2b, 1,5 μ g/kg/sem + RBV (800mg/día) durante 48 sem	511	65%(61-69)	54% (49-58)	
Fried y cols.,2002	IFN- α 2b, 3 mU/día + RBV (1.000-1.200mg) durante 48 sem	444	52%(47-57)	44% (40-49)	
	IFN- α 2a, 180 μ g/sem + placebo durante 48 sem	224	59%(53-66)	29% (24-36)	
	IFN- α 2a, 180 μ g/sem + RBV (1.000-1.200mg) durante 48 sem	453	69%(65-73)	56% (52-61)	
Hadziyannis y cols., 2002	IFN- α 2a, 180 μ g/sem + RBV (800 mg) durante 24 sem	207	No disponible	Genotipo1 29%(21-38)	Genotipo2/3 78%(70-85)
	IFN- α 2a, 180 μ g/sem + RBV (800mg) durante 48 sem	361	No disponible	40%(34-46)	73% (64-80)
	IFN- α 2a, 180 μ g/sem + RBV (1.000-1.200mg) durante 24 sem	280	No disponible	41%(32-50)	78% (71-84)
	IFN- α 2a, 180 μ g/sem + RBV (1.000-1.200mg) durante 48 sem	436	No disponible	51%(45-57)	77% (70-83)

(*) N: número de pacientes; RFT: respuesta fin de tratamiento, RVS: respuesta virológica sostenida.

Tabla 3. Ensayos aleatorizados con IFN pegilado más RBV.

En base a los resultados de estos estudios, ambas formas de IFN pegilado fueron aprobadas en los Estados Unidos y en Europa para el tratamiento de la HCC. La recomendación actual es emplear la combinación de IFN pegilado más RBV en todos los casos de HCC, excepto en aquellas situaciones en las que la RBV esté contraindicada. La dosis recomendada de IFN pegilado α -2a

es 180 µg/semana, independientemente del peso corporal, mientras que la dosificación de IFN pegilado α -2b se debe ajustar al peso, debiendo administrar 1,5 µg/kg/semana. La dosis de RBV y la duración del tratamiento debería decidirse en función del genotipo viral. Pacientes “fáciles de tratar” (genotipos 2 ó 3) deberían recibir una dosis fija de 800 mg/día de RBV durante 24 semanas, mientras que aquellos “difíciles de tratar” (genotipo 1 y, probablemente el 4) deberían recibir una dosis completa de RBV (1.000-1.200 mg/día según el peso sea superior o inferior a 75 kg) y durante 48 semanas (Tabla 4)

Genotipo	Dosis de IFN pegilado	Dosis de RBV	Duración (semanas)
1	INF pegilado α -2a 180 µg/semana	<75 kg: 1000 mg/día ≥75 kg: 1200 mg/día	48
	IFN pegilado α -2b 1,5 µg/kg/semana	<65 kg: 800 mg/día 65-85 kg: 1000 mg/día 86-105 kg: 1200 mg/día >105 kg 1400 mg/día	48
2/3	INF pegilado α -2a 180 µg/semana	800 mg/día	24
	IFN pegilado α -2b 1,5 µg/kg/semana	800 mg/día	24

Tabla 4. Tratamiento de la HCC.

Recientemente se han dado a conocer los resultados del estudio IDEAL. Tres mil setenta pacientes con genotipo 1 del VHC fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos de tratamiento: IFN pegilado α -2b (1,5 µg/kg/semana) y RBV (800-1.400 mg/día), IFN pegilado α -2b (1 µg/kg/semana) y RBV (800-1.400 mg/día) y, por último, IFN pegilado α -2a (180 µg/kg/semana) y RBV (1.000-1.200 mg/día) durante 48 semanas y un periodo de seguimiento de 24 semanas tras el tratamiento. En este estudio se

han comparado dos dosis distintas de IFN pegilado α -2b (1 μ g/kg/semana y 1,5 μ g/kg/semana) y no se han observado diferencias en los parámetros de eficacia y seguridad entre ellas. Estos hallazgos son interesantes, ya que podrían abrir perspectivas futuras de planteamiento terapéutico a menor dosis con IFN pegilado α -2b. Por otro lado, la tasa de RFT (en la semana 48) fue mayor con IFN pegilado α -2a, aunque no hubo diferencias significativas desde el punto de vista estadístico en la respuesta viral sostenida entre los dos IFNs pegilados, dado que la tasa de recidivas fue mayor con IFN pegilado α -2a. Estas diferencias no pudieron ser explicadas por una distinta exposición a RBV entre ambos grupos de tratamiento⁵⁵.

También se ha comenzado a evaluar la posible eficacia del IFN pegilado en los pacientes con cirrosis hepática. Las tasas de RVS con IFN estándar en los pacientes con cirrosis son de alrededor del 6 %, mientras que el IFN pegilado incrementa las tasas de RVS al 29 %⁵⁶, si bien los estudios realizados con este subgrupo de pacientes son aún escasos. Distintos estudios han comunicado resultados que sugieren que en los pacientes cirróticos tratados con IFN puede disminuir la progresión de la fibrosis hepática, incluso en los pacientes NR, y evitar el desarrollo de CHC. La mayoría de los estudios son retrospectivos y no controlados por lo que parece necesario esperar a la realización de ensayos clínicos aleatorizados con un número suficiente de pacientes para establecer definitivamente la influencia del tratamiento con IFN en el desarrollo del CHC.

1.3.3.1. No respondedores

En los pacientes que no respondieron o recayeron tras la monoterapia con IFN estándar, el retratamiento con dosis adecuadas de IFN pegilado más RBV puede lograr una RVS en alrededor del 20-40 % de los casos⁵⁷.

Si los pacientes habían recibido tratamiento combinado con IFN estándar más RBV, la respuesta que puede esperarse al retratamiento con IFN pegilado y RBV es inferior, de alrededor del 15 % para los pacientes con genotipo 1 y del 30 % en los pacientes con genotipo 3. En los pacientes incluidos en el estudio HALT-C, NR a monoterapia con IFN estándar o en combinación con RBV, y que tenían una fibrosis avanzada o cirrosis, el retratamiento con IFN pegilado α -2a y RBV logró una RVS global del 18 %, que incluye un 12 % en los tratados inicialmente con tratamiento combinado y a un 28 % a los que habían recibido monoterapia^{58,59}.

La exploración de la efectividad del retratamiento con IFN pegilado, en este caso α -2b, y RBV es objetivo de un estudio⁶⁰, en el que se han incluido a 2333 pacientes NR o que recidivaron tras un tratamiento con IFN estándar y RBV, presentando RVS en un 14 % de los NR y un 38 % de los recidivantes.

Un estudio reciente ha analizado la eficacia y la seguridad del retratamiento con IFN pegilado α -2a y RBV en pacientes que no habían respondido al tratamiento con INF pegilado α -2b y RBV⁶¹. El estudio incluyó a 950 pacientes, de los que más del 90 % estaban infectados por el genotipo 1. Los pacientes fueron aleatorizados en 4 grupos para recibir tratamiento durante 48 o 72 semanas con dosis estándar (180 μ g/ semana) de IFN pegilado o con una dosis doble (360 μ g/ semana) durante las primeras 12 semanas. Se administró

una dosis de 1.000-1.200 mg/día de RBV. Aunque la respuesta a las 12 semanas fue superior en los pacientes tratados con una dosis inicial elevada de IFN, la RFT fue similar en todos los grupos. Sin embargo, la tasa de recaída fue menor en los pacientes tratados durante 72 semanas. La diferencia alcanzó significación estadística cuando se agruparon los pacientes según la duración del tratamiento.

Un estudio ha explorado la eficacia y la seguridad del retratamiento de pacientes NR al IFN pegilado y RBV utilizando dosis diarias de IFN consenso y RBV⁶². El 94 % estaban infectados por genotipo 1 y el 59 % tenía fibrosis hepática avanzada. Los pacientes recibieron tratamiento durante 48 semanas con RBV y con dosis de 9 o 15 µg/día de IFN consenso y la tasa de RVS fue baja, del 5 y el 10 % respectivamente.

Todos los estudios precedentes indican que la probabilidad de conseguir erradicar la infección en los pacientes que no han respondido a un primer tratamiento es realmente baja.

1.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C AL TRATAMIENTO ANTIVIRAL

El objetivo del tratamiento en la hepatitis crónica por VHC es lograr una RVS, definida esta como la normalización de la ALT y negativización del ARN viral después de 24 semanas tras finalizar el tratamiento. La resistencia del VHC se define como la persistencia del ARN-VHC tras el tratamiento. La incidencia de resistencia del VHC a las terapias con IFN varía de acuerdo con el régimen de administración. Casi en el 60 % de los pacientes falla el tratamiento tras recibir el régimen basado en 3 MU de IFN α 3 veces por semana más RBV, 1.000 a 1.200 mg/día, durante 24 a 48 semanas. La administración semanal de IFN pegilado α parece asociarse con una incidencia de un 60 a 75 % de resistencias del VHC según los programas terapéuticos y la población tratada⁶³⁻⁶⁵. En pacientes que alcanzaron RVS tras tratamiento con IFN estándar, se objetivó recidiva viral en tan solo un 2-4 % tras 5 años de seguimiento, y no se objetivó recaída después de 5-10 años de seguimiento⁶⁶. La durabilidad de 5 años de la RVS se elevaba a más del 99 % en pacientes tratados con IFN pegilado^{67,68}. La incidencia de resistencias en los pacientes tratados con IFN pegilado α y RBV es del orden del 50 %.

1.4.1. FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTIVIRAL

Las causas de resistencia al tratamiento con IFN son multifactoriales. La mayor parte de las veces son combinadas en un mismo paciente y debidas al régimen de tratamiento, factores del huésped, forma de presentación o severidad de la infección por el VHC, o factores virales⁶⁹.

1.4.1.1. Factores relacionados con el tratamiento

Cinética de replicación viral. En la etapa crónica de la infección, la cinética de replicación viral es estable^{65,70,71}. Esto significa que la producción viral por las células infectadas es compensada por la destrucción periférica del virus, mientras que la células infectadas *de novo* se compensa por la muerte de las células infectadas. Esta etapa se caracteriza por una vida media estimada del virión libre de 3 horas, y una tasa de producción-aclaramiento diaria de 10^{12} partículas virales por día⁷⁰.

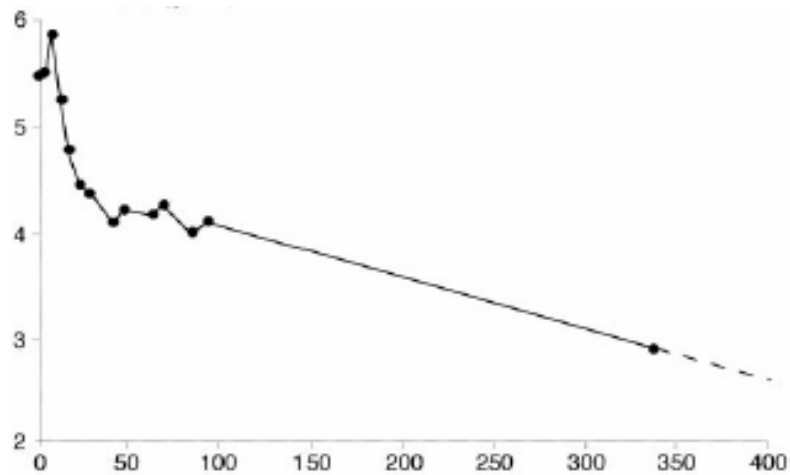
La administración diaria de IFN α y semanal de IFN pegilado α induce una típica declinación bifásica de la replicación viral (Figura 10)⁶⁹: en una primera fase, en las primeras 24 horas tras la administración, se observa una rápida disminución de la carga viral debida a la inhibición directa del IFN sobre la producción viral. Esta disminución se observa tanto en los pacientes que al final del tratamiento conseguirán una RVS como en los que no.

Mayor relación tiene con la respuesta la segunda fase de descenso de la carga viral, más paulatina, que se corresponde con la muerte de las células infectadas por el VHC con participación de la respuesta inmune específica, en la que el IFN tiene por supuesto un papel, en el contexto de la eficaz inhibición de la producción viral, y conduce al aclaramiento del ARN viral en una gran proporción de pacientes^{65,70,72,73}.

Recientemente se ha propuesto una tercera fase de cinética viral que representa la eliminación de viriones de células infectadas mediada por mecanismos inmunitarios celulares^{74,75}. Esta fase ha sido definida a partir de

un estudio que ha investigado recientemente los efectos sobre la cinética viral de la combinación de IFN pegilado más RBV. La disminución de la viremia en esta tercera fase fue más importante en los pacientes que habían recibido tratamiento combinado con IFN pegilado y RBV. Probablemente esta fase represente un aumento de la degradación de células infectadas causada por la potenciación de la respuesta inmune que produce la RBV asociada al IFN pegilado.

Carga viral (\log_{10} UI/ml)



Horas tras el inicio de la terapia

Figura 10⁶⁹. Ejemplo de cinética viral en un paciente que recibió 3 MU/día de IFN α . La disminución de la carga viral siguió un patrón bifásico, con una primera fase de descenso rápido en las 48 horas iniciales, seguido de una segunda fase más lenta y mantenida a partir del segundo día.

La duración del tratamiento influye significativamente en la respuesta al mismo. Tratamientos prolongados disminuyen significativamente la incidencia de recaída en los pacientes con aclaramiento del ARN viral durante el mismo. En la mayoría de los estudios en los que se usaba el mismo

régimen de tratamiento, durante un periodo fijo de tiempo, la duración de la fase de mantenimiento variaba considerablemente dependiendo de la duración de la fase de inducción. Esto es explicado en parte por el aclaramiento temprano del ARN en sangre, por lo que una corta fase de inducción seguida de una larga fase de mantenimiento, es predictivo de RVS^{51,76}.

Evaluación de la respuesta tras 4 semanas de tratamiento. La respuesta virológica rápida (RVR), definida como ARN-VHC indetectable en la semana 4 de tratamiento está cada vez más reconocida como uno de los factores predictivos de RVS independientes más importantes. En un reciente análisis retrospectivo de 1383 pacientes, demostró que el logro de RVR se correlaciona con una elevada probabilidad de alcanzar RVS (86-100 %) al tratamiento combinado con IFN pegilado y RBV, independientemente del genotipo viral⁷⁷.

Evaluación de la respuesta tras 12 semanas de tratamiento. Durante muchos años, la RVP, definida como disminución de la carga viral $\geq 2 \log_{10}$ o ARN indetectable en la semana 12, se ha utilizado como el principal factor para tomar decisiones acerca del tratamiento, de forma que el 0-3 % de los pacientes con un descenso menor de $2 \log_{10}$ en la carga viral en la semana 12 de tratamiento alcanzaban RVS, lo que llevó a suspender el tratamiento en los pacientes sin RVP independientemente del genotipo^{53, 78}.

Recientemente se ha demostrado que pacientes infectados con el genotipo 1 del VHC con RVP parcial (descenso de la carga viral $> 2 \log_{10}$ pero con ARN detectable en la semana 12) lograban RVS en un 17-29 % con IFN pegilado/RBV durante 48 semanas, beneficiándose este subgrupo de

pacientes respondedores lentos de una ampliación de la duración del tratamiento combinado a 72 semanas^{79,80}.

Evaluación de la respuesta tras 24 semanas de tratamiento. Los pacientes que cumplen criterios de RVP pero que mantienen ARN viral detectable en la semana 24 no alcanzan RVS en 98-100 % de los casos, por lo que se recomienda la interrupción del tratamiento en esta situación^{52, 78, 80}.

Importancia de la inhibición de la unión del interferón con su receptor en la respuesta al tratamiento. Se han identificado algunas sustancias que inhiben la unión del IFN a su receptor celular y afecta la señalización en cascada que ya se ha descrito. La activación de estas sustancias puede originar un fallo en el tratamiento. Destaca los supresores de la señalización de las citocinas (SOCS)⁸¹. Se sabe que muchas citocinas como la interleukina 6 (IL-6), IL-1, IL-10 y factor de necrosis tumoral α (TNF- α), inducen la expresión de SOCS, que inhibe las vías de señalización del IFN y su acción antiviral⁸². Se ha demostrado que niveles altos de TNF- α en el hígado y células mononucleares favorecen la resistencia al tratamiento⁸³. También se ha descrito que altos niveles de IL-10 se correlacionan con una pobre respuesta al tratamiento⁸⁴. Por último, la expresión de IFNAR1 y IFNAR2c es muy importante para que el IFN consiga una actividad antiviral, niveles altos de estos receptores se correlacionan con la respuesta virológica⁸⁵.

1.4.1.2. Factores relacionados con el huésped

La edad en la que se contrae la infección parece ser un factor de relieve. En todos los grandes estudios con IFN pegilado y RBV los pacientes más

jóvenes se correlacionan significativamente con RVS cuando se evaluó por análisis univariante y multivariante, presentando los pacientes menores de 40-45 años las mejores tasas de respuesta^{52, 53, 86}.

El sexo masculino se ha asociado con peor evolución de la infección en los estudios llevados a cabo por numerosos autores⁸⁶⁻⁸⁹. En el estudio de Poynard y cols.⁸⁷ se sugiere que la aparición y la progresión de la fibrosis dependen en mayor medida de factores del huésped más que de factores virales. De entre todas las variables estudiadas, tres se correlacionaron de forma clara con la progresión de la fibrosis: el sexo, el consumo de alcohol y la edad en el momento de la infección. Sin embargo, no se encontró ninguna relación entre el grado de lesión histológica y la carga viral o el genotipo.

Las características del paciente tales como mayor edad, sexo masculino y raza (Africano o Hispano frente Caucásico o Asiático) se han asociado con peores tasas de RVS, por lo que factores genéticos, hormonales y/o inmunológicos son determinantes para la sensibilidad del VHC al IFN α ^{51,76, 90}.

El peso corporal también parece influir en la tasa de respuesta por la modificación del volumen de distribución del fármaco y los niveles de concentración. En un estudio prospectivo, un índice de masa corporal (IMC) $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ se asoció significativamente con progresión a fibrosis⁹¹. Un menor peso corporal ($\leq 75\text{-}80 \text{ kg}$) se asoció significativamente con mayores tasas de RVS en tratamiento combinado con ambos IFNs pegilados más RBV^{52,53, 92}.

En el estudio de Romero-Gómez y cols.⁹³ el índice HOMA se ha relacionado con la respuesta al tratamiento en pacientes infectados por el genotipo 1 tratados con IFN pegilado más RBV. En este estudio, pacientes con un índice HOMA normal (<2) presentaron RVS en un 60.5 % comparado con tasas de RVS de un 40 % en pacientes con resistencia insulínica moderada (HOMA 2-4) y tan solo un 20 % de RVS en pacientes con resistencia severa a la insulina (HOMA >4). El mecanismo mediante el que la resistencia insulínica y la obesidad contribuyen a la falta de respuesta al IFN es a través de la regulación de SOCS3. SOCS3 bloquea la señalización del IFN y puede incrementar la resistencia a la insulina promoviendo la degradación mediada por ubiquitina del sustrato del receptor de la insulina (IRS) 1 y 2. Se están realizando ensayos clínicos para determinar si la adición de sintetizadores farmacológicos de la insulina, como las tiazolidinedionas, al tratamiento estándar del VHC incrementaría la RVS⁹⁴.

En los pacientes que inicialmente responden al tratamiento, la inducción de anticuerpos anti-IFN por el IFN recombinante parece ser responsable de más del 50% de los fallos de respuesta al tratamiento^{95,96}. Algunos comportamientos, tales como alcoholismo activo o uso de drogas intravenosas, se asocian con menores tasas de respuesta⁹⁷⁻⁹⁹.

Varios estudios han investigado los patrones genéticos del huésped que pueden estar asociados con la probabilidad de respuesta virológica al tratamiento con IFN. Investigaciones sobre el tejido hepático sugieren que los pacientes NR tienden a presentar elevada expresión de los ISGs como una parte de la cascada de regulación del IFN y esto puede tener valor predictivo en el tratamiento del VHC. Elevados niveles de PKR mRNA en células mononucleares de sangre periférica y hepáticas se correlacionan con ausencia

de respuesta. Además, la ausencia de respuesta se asoció con pequeños cambios en la expresión génica en células mononucleares de sangre periférica en contraposición a grandes cambios hallados en respondedores al tratamiento. Polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) de diferentes genes se han asociado con los resultados del tratamiento. El polimorfismo del gen HFE (ambas mutaciones C282Y y H63D) podría influir positivamente en la respuesta al tratamiento con IFN, como se ha demostrado en recientes ensayos clínicos¹⁰⁰. Finalmente la adherencia al tratamiento parece ser uno de los más importantes factores determinantes de su resultado.

1.4.1.3. Factores relacionados con la enfermedad

En la HCC, la progresión hacia fibrosis es variable y parece depender de la edad y de la duración de la infección¹⁰¹. La presencia de fibrosis hepática avanzada y cirrosis se ha relacionado, desde hace tiempo, con menores tasas de RVS al tratamiento con IFN^{51,86,101}, estando el tratamiento contraindicado en pacientes con cirrosis descompensada¹⁰².

Los pacientes coinfectados por el VIH también presentan menores tasas de respuesta, sobre todo aquellos con bajos niveles de CD4¹⁰³. Los NR a tratamientos previos con IFN o combinación de IFN más RBV presentan menores tasas de RVS tras el tratamiento¹⁰⁴.

1.4.1.4. Factores virales

1.4.1.4.1. Carga viral

Aunque la cuantificación del ARN viral no ha demostrado ser un factor predictivo para el desarrollo de lesión hepática asociada al VHC o de progresión de la enfermedad, la evaluación de la carga viral antes, durante y tras el tratamiento es una importante herramienta para predecir los resultados del tratamiento. Una baja carga viral basal (<600.000-800.000 UI/ml) ha demostrado ser un factor predictivo de RVS independientemente del genotipo viral en numerosos estudios. El efecto de la carga viral como factor predictivo se consideró no lineal. Mientras que para concentraciones de ARN-VHC de hasta aproximadamente 400.000 UI/ml se demostró correlación lineal con la RVS; para niveles mayores, se apreciaron tasas de RVS relativamente estables, sin un nuevo descenso significativo, en pacientes tratados con IFN pegilado más RBV¹⁰⁰.

1.4.1.4.2. Genotipo viral

El genotipo del VHC es el factor predictivo basal más importante para la respuesta al tratamiento basado en IFN α . En numerosos estudios el genotipo 1b del VHC respecto al resto de genotipos se ha mostrado como factor de mal pronóstico y se ha relacionado con una peor evolución de la infección^{52,53,105-107}. Las tasas de RVS para pacientes con genotipo 1 varían del 41 al 52 % de los pacientes tratados con terapia combinada durante 48 semanas, mientras que los pacientes con genotipo 2 y 3 alcanzan tasas de RVS del 76 al 84 % de los pacientes tratados con IFN pegilado y RBV. En un estudio llevado a cabo en Japón con 140 pacientes infectados por el VHC y con un seguimiento

medio de 10 años, se produjo una progresión histológica en el 68 % de los pacientes con genotipo 1 comparado con el 42 % de los del genotipo 2. Además en este mismo estudio se observó que la carga viral de los pacientes con genotipo 1 fue significativamente mayor que la de los pacientes infectados por el genotipo 2¹⁰⁸.

1.4.1.4.3. Importancia de las cuasiespecies en la resistencia del virus de la hepatitis C

Se ha demostrado que el extremo amino terminal de la región E2 del VHC es el que mayor heterogeneidad presenta y más concretamente la región HVR 1¹⁰⁹. Debido a su alto grado de variabilidad, la región HVR 1 ha sido utilizada para la identificación de las distintas variantes virales o cuasiespecies de los individuos infectados con el VHC, esto no quiere decir que no exista heterogeneidad en el resto del genoma del virus¹¹⁰.

Se ha intentado correlacionar el grado de variabilidad viral con la respuesta al tratamiento¹¹¹⁻¹¹⁵, la persistencia viral^{116,117} y el daño hepático^{118,119}. Estudiando la posible relación entre la evolución de la infección y la evolución genética del virus en el huésped a partir de la comparación entre pacientes en los que se resolvió la infección frente a los que progresaron a hepatitis crónica^{117,120}, se ha sugerido que la persistencia del VHC se debe a su alta capacidad mutagénica y a su compleja composición en cuanto a cuasiespecies, lo que le permitiría escapar del sistema de vigilancia inmunológica del huésped^{121,122}. Entre aquellos que resolvieron la infección, la variabilidad genética del virus durante la fase aguda de la infección tendía a disminuir en los primeros 3 meses, permanecía estable en aquellos que

evolucionaban a hepatitis leve y se incrementaba en los que evolucionaban hacia la hepatitis crónica severa¹¹⁷.

Desde que Okada y cols. en 1992¹²³, demostraron una correlación entre la complejidad de las cuasiespecies en la región HVR 1 antes de comenzar el tratamiento antiviral y la respuesta a éste, la gran mayoría de los estudios se han centrado en el grado de variabilidad genética del VHC como factor predictivo de respuesta. Entre los trabajos cabe destacar el realizado por Yeh y cols. en el 2002¹¹⁵; estudian los factores predictivos de respuesta en 26 pacientes con HCC, genotipo 1b, tratados con IFN α . Los autores concluyen que a mayor carga viral y mayor número de cuasiespecies basal, la respuesta al tratamiento es menor. Otros autores coinciden en que las cuasiespecies es un factor predictivo de respuesta al tratamiento con IFN^{69,112,124-126}. Según el estudio de Salmerón y cols¹²⁷ las cuasiespecies son un factor predictivo importante de RVS. Se estudiaron 84 pacientes tratados con IFN y RBV. En la regresión logística se pudo comprobar que el genotipo, la carga viral y las cuasiespecies tenían valor independiente. Sin embargo, hay mucha controversia, ya que dependiendo del diseño y del método utilizado para el análisis de las cuasiespecies se pueden obtener resultados diferentes.

Se ha documentado que la composición de las cuasiespecies del VHC sufren significativos cambios durante el tratamiento con IFN, lo que sugiere que el IFN puede ejercer, directa o indirectamente, una presión selectiva en la evolución del virus¹¹⁰. Los pacientes NR y sobre todo los recidivantes a un primer tratamiento con IFN α , pueden lograr una RVS en un segundo tratamiento⁶⁹. En estos casos se han observado cambios significativos en las cuasiespecies después de finalizar el primer tratamiento. Esto parece indicar que se produce una selección de variantes genómicas que tienen capacidad de

seguir replicándose en las células, pero que son sensibles al IFN, por lo que un segundo tratamiento conseguiría una RVS. Todo esto explicaría la clínica de los pacientes recidivantes al tratamiento con IFN α . Durante el tratamiento, el conjunto virológico replicativo no está bien adaptado, por lo que comienza a disminuir la carga viral y a normalizarse la ALT. Sin embargo, las nuevas mutaciones que van apareciendo pueden ser ocasionalmente ventajosas para el virus, aumentando la capacidad de replicación de estos genomas, que infectarían nuevas células y provocaría una recaída del paciente. Hay pacientes recidivantes que al suspender la medicación tienen un pico marcado de ALT y un aumento de la carga viral. También se ha demostrado que estos cambios en el genoma del virus son mucho más rápidos al comienzo del tratamiento que al final del mismo, sugiriendo que la resistencia al IFN es muy precoz¹²⁸.

Un estudio muy interesante sobre la evolución de las cuasiespecies del VHC durante el tratamiento con IFN fue publicado por Farci y cols.¹¹⁰. Los autores estudian mediante clonación y posterior secuenciación de la región HVR 1 a 23 pacientes con HCC, cuyo patrón de respuesta al tratamiento era diferente: RVS, recidivantes al finalizar el tratamiento, recidivantes durante el tratamiento y NR. Utilizaron como grupo control pacientes no tratados. El estudio de las cuasiespecies se realizó en muestras basales de los 4 grupos, no observándose diferencias estadísticas entre los grupos seleccionados. A las 2 semanas de comenzar el tratamiento, se detectó solo en los respondedores una disminución significativa de la complejidad y la diversidad de las cuasiespecies en paralelo con una significativa reducción de la carga viral, sugiriendo que los cambios precoces de la viremia y de las cuasiespecies pueden predecir la RVS. Curiosamente un patrón similar se ha observado en pacientes que aclaraban espontáneamente el virus¹¹⁷. En los pacientes que

recidivaban una vez finalizado el tratamiento, se observó que las cepas salvajes del virus desaparecían al finalizar el tratamiento. Sin embargo, aparecían nuevas cepas virales, posiblemente resistentes al IFN. Los pacientes NR y recidivantes durante el tratamiento, mostraban una persistencia de las variantes virales dominantes originales durante todo el tratamiento, esto sugiere que pueden existir cepas virales resistentes al tratamiento con IFN. Estudios realizados con la técnica SSCP, también han demostrado resultados semejantes: los pacientes respondedores al IFN pegilado más RBV presentan una disminución en el número de cuasiespecies así como de la carga viral¹²⁹.

Polyak y cols.¹³⁰ en 1998, también demostraron que durante el tratamiento con IFN puede aparecer un incremento en el número de cuasiespecies en pacientes NR. Esto sugiere que durante el tratamiento hay una presión selectiva, apareciendo nuevas cepas resistentes al IFN, que se entiende como un proceso adaptativo del virus al entorno en el que se encuentra. Sin embargo, esto es difícil de evaluar, ya que el mecanismo de acción del IFN es muy complejo y aún no es del todo conocido.

Son varios los trabajos en los que no encuentran diferencias en el número de variantes virales antes, durante y al finalizar el tratamiento, pero todos coinciden en que los pacientes son NR y genotipo 1b^{113,114} o recidivantes al finalizar el tratamiento¹¹¹. Cabe destacar, el estudio realizado por Thelu y cols.¹¹³ en el que observan que pacientes con poca variabilidad viral, presentan una disminución de la carga viral a los tres meses de comenzar el tratamiento sin que se modifique el número de cuasiespecies, una explicación plausible es que la replicación viral se afecta con el IFN, hecho que ha sido demostrado con anterioridad.

Como se puede observar, la gran mayoría de los estudios realizados sobre este tema es en pacientes tratados con monoterapia (IFN), siendo mínimos los realizados con terapia combinada con IFN y RBV^{111,114,127} y con IFN pegilado más RBV¹²⁹, que es el tratamiento establecido en la actualidad. En todos los casos, sin embargo, se concluye que si bien la RBV potencia el efecto antiviral del IFN no afecta para nada la distribución de las variantes virales.

1.4.1.4.5. Importancia de las mutaciones del virus de la hepatitis C en los mecanismos de resistencia

Como ya se ha comentado, el 80 % de los pacientes tratados con IFN y más de la mitad de los pacientes tratados con IFN pegilado más RBV se consideran NR. Al parecer, uno de los mecanismos básicos para escapar a la acción antiviral del IFN es la ausencia de mutaciones en determinadas regiones del virus. El VHC tiene dos regiones que probablemente participan activamente en la resistencia al IFN: la región E2 y la NS5A. Este mecanismo de resistencia mediado por la NS5A y E2 está relacionado, al menos parcialmente, con la inhibición de la PKR que, como ya hemos comentado, interviene en la traducción de los ARN celulares. En general, se puede afirmar que si el virus está conservado en estas regiones (virus salvaje), sería resistente al IFN por su capacidad de inactivar la PKR, lo que en la clínica se correspondería con los pacientes NR. En cambio, en los casos de mutación de alguno o algunos de los aminoácidos de las regiones que se unen a la PKR, el virus perdería su mecanismo de resistencia al IFN y se produciría RVS.

Estudios *in vitro* sobre la importancia de la proteína NS5A del VHC en la resistencia al IFN. Enomoto y cols.²² demostraron que un número de 4 o más mutaciones en una región de la proteína NS5A condicionaba la respuesta al tratamiento con IFN en pacientes Japoneses infectados por el genotipo 1b del VHC. A esta región la llamó ISDR (región determinante de la sensibilidad al IFN, aminoácidos 2209-2248). Posteriormente, Gale y cols.^{131,132} realizaron una serie de estudios *in vitro* en los que demostraron que la proteína NS5A se une a la PKR, inhibiendo su actividad. La presencia de al menos 2 mutaciones en NS5A-ISDR impediría el enlace entre dicha región y la PKR. Por lo tanto, el estudio de las mutaciones en NS5A en aislados del VHC puede ser importante *in vivo* para determinar la eficacia del IFN.

Los estudios sobre la región NS5A se llevaron a cabo en líneas celulares diferentes a los hepatocitos, lo que podía cuestionar los resultados y su aplicación. Podevin y cols.¹³³ usaron una línea celular de hematoma humano (Huh7). Las células fueron transfectadas con plásmidos que expresaban NS5A y con un vector vacío utilizado como control negativo. Sobre estos cultivos realizaron una serie de ensayos. Para el ensayo de rescate de la replicación viral, los autores infectaron las células Huh7 con el virus de la estomatitis vesicular (VSV) y el virus de la encefalo-miocarditis (EMCV), que son sensibles al IFN. Posteriormente seleccionaron las células Huh7 infectadas por VSV y EMCV que expresaban un vector vacío o con la región NS5A mutada y les añadieron IFN α a una concentración de 100 U/ml. Demostraron que las secuencias de NS5A de dos pacientes NR y de un paciente con RVS al IFN, rescataban parcialmente la replicación viral de VSV y EMCV. El rescate más intenso lo obtuvieron en el NR que presentaba 8 mutaciones en la región NS5A-ISDR. Esto indica que esta región inactiva

al IFN y permite rescatar la replicación viral en presencia de este fármaco en dos tipos de virus que son sensibles al IFN. No obstante, también la secuencia NS5A del NR, que no presentaba mutaciones en la región ISDR y la del respondedor, que tenía solo 2 mutaciones rescataba aunque menos intensamente la replicación viral de VSV y EMCV. Esto claramente indica que NS5A está jugando algún papel en evadir al IFN, pero en este caso independientemente de la ISDR, ya que el número de mutaciones en esta región era independiente de la capacidad de responder al IFN. Estos mismos autores con microscopia confocal demostraron en las células Huh7 la localización de la proteína NS5A y la PKR en el área citoplasmática perinuclear. Sin embargo, no demostraron la colocalización de PKR con NS5A, por lo que es difícil obtener conclusiones.

Estudios con replicones subgenómicos del VHC también han dado lugar a resultados contradictorios. Se han descrito que replicones que carecen de la región ISDR de la NS5A continúan siendo sensibles a la acción del IFN¹³⁴. Así mismo, la obtención de líneas celulares resistentes a la acción del IFN implica la aparición de mutaciones adaptativas que se localizan en la región NS5A¹³⁵.

Importancia de la región NS5A-PKRBD del VHC en la resistencia al IFN. Es bien sabido que la región ISDR es necesaria pero no suficiente para la interacción entre NS5A y PKR requiriendo la presencia de 26 aminoácidos distales a la región ISDR, esta región es conocida como PKRBD (*PKR binding domain*, codones 2209-2274). Estudios recientes han hallado que mutaciones en la región PKRBD del VHC genotipo 1 se asocian con RVS al tratamiento con IFN α solo o combinado con RBV.¹³⁶⁻¹³⁸

Importancia de la región NS5A-V3 del VHC en la resistencia al IFN. Duverlie y cols.¹³⁹ detectaron en la proteína NS5A otra región muy variable llamada V3. Demostraron que los casos sensibles al IFN presentaban mutaciones en esta región, mientras que estaba conservada en los resistentes. Datos iguales a estos son presentados por Murphy y cols.¹⁴⁰. Recientemente El-Shamy y cols.¹⁴¹ han demostrado que la variabilidad genética en la región V3 y su flanco preV3 (aminoácidos 2334-2379) se correlaciona con la RVS, denominándola región determinante de la resistencia a IFN/RBV (IRRDR). Esto sugiere que V3 también juega un papel en la resistencia al IFN. Hasta la fecha se ha prestado muy poco interés en esta región y todavía no se han propuesto los mecanismos de actuación.

Estudios *in vitro* sobre la importancia de la proteína E2-PePHD del VHC en la resistencia al IFN. Taylor y cols.¹⁴², demostraron que la proteína E2 de la mayoría de los aislados de VHC contiene una secuencia de aminoácidos similar al sitio de autofosforilación de la PKR y al sitio de fosforilación del eIF2 α . Este dominio de homología se denominó PePHD (aminoácidos 665-676). La región PePHD puede interaccionar con la PKR y eIF2 α , originando *in vitro* una inhibición de la función de la PKR. Demostraron que en pacientes con genotipo 1a/1b (resistente al IFN) esta secuencia de 12 aminoácidos está muy conservada, mientras que en los pacientes con genotipos más sensibles al IFN (2a, 2b y 3a) se encuentran mutaciones en esta zona. Además, estos autores demostraron como E2-PePHD interacciona físicamente con la PKR y, por último, mediante inmunofluorescencia consiguieron demostrar en células HEK-293 la colocalización de E2-PePHD y PKR.

Por lo tanto, el VHC puede resistir el ataque del IFN a dos niveles, NS5A y E2. La acción combinada de estas dos regiones podría explicar por qué muchos pacientes con infección por VHC no responden al efecto antiviral del IFN. La consecuencia lógica de todos estos trabajos sería el desarrollo de estudios clínicos, que hasta el momento son escasos, que intenten analizar la participación de estas dos regiones en la resistencia al IFN.

Estudios clínicos sobre la importancia de las proteínas NS5A y E2 del VHC en la resistencia al IFN. También en los estudios clínicos se ha centrado la atención en la secuencia de la región NS5A y su potencial papel en la resistencia al IFN¹⁴³. Según Enomoto y cols.²², pacientes con genotipo 1b del VHC con respuesta sostenida al IFN presentaban mutaciones de 4 o más aminoácidos en la región ISDR. Otros estudios realizados en Japón corroboraron este hecho¹⁴⁴, en cambio, grupos de Europa y EEUU no confirmaron estos hallazgos^{139,145,146}. Actualmente son varios los estudios que demuestran la importancia de la secuencia de aminoácidos de la región NS5A, en la resistencia al tratamiento con IFN^{140,143,147,148}.

Son varios los autores que estudian el posible papel de la acción combinada de las regiones NS5A y E2 en la resistencia al tratamiento con IFN de los pacientes con HCC. Sarrazin y cols.¹⁴⁹ estudiaron la importancia de las regiones NS5A-ISDR y E2-PePHD en 33 pacientes infectados por genotipo 3a, de los que 16 presentaron RVS al tratamiento. Según sus resultados, no había diferencias estadísticamente significativas al estudiar el número de mutaciones de ambas regiones en los pacientes con RVS frente a los recidivantes o NR. Tampoco en un análisis filogenético consiguen demostrar diferencias entre aislados sensibles o resistentes.

Chayama y cols.¹⁵⁰ estudiaron 82 pacientes con genotipo 1b: 11 (13 %) con RVS y 71 (87 %) NR. En el análisis multivariante se observó que sólo la carga viral y las mutaciones en la región NS5A-ISDR eran predictivos de RVS al IFN. Se detectaron mutaciones en E2-PePHD sólo en 8 pacientes (10 %) y no se correlacionaban con la respuesta. Sin embargo, el análisis de la secuencia de aminoácidos de las cuasiespecies antes y después de una semana de IFN mostraba la eliminación de los clones con sustitución en este dominio.

Berg y cols.¹³⁶ estudiaron, en 81 pacientes infectados por el genotipo 1, si el patrón mutacional de la región E2-PePHD y NS5A-ISDR influye en la respuesta al IFN. La disminución inicial de la concentración viral fue determinada a la primera semana. Según la concentración viral diferencian tres grupos: grupo 1 si es menor del 50 %, grupo 2 entre el 50 % y el 90 % y grupo 3 más del 90 %. La región PePHD estaba altamente conservada en los tres grupos; el bajo número de pacientes que presentan mutaciones no se correlacionaba con la concentración o con la respuesta viral. En la región de los flancos, antes y después de PePHD, el número de mutaciones no se correlacionaba con la respuesta. El análisis de la secuencia de la proteína NS5A, que incluye a la región ISDR, demostró que había diferencias estadísticamente significativas en el número de mutaciones entre el grupo 1 y 3. También un número de mutaciones mayor de 4 en la región ISDR fue significativamente más frecuente en los que presentaban RVS que en los NR o recidivantes. Por tanto, la región ISDR fue, parece ser, funcionalmente más relevante en la reacción efectora inducida por el IFN.

Murphy y cols.¹⁴⁰ estudiaron la importancia de tres regiones del genoma del VHC (PePHD, ISDR y V3) en la resistencia al tratamiento con IFN y RBV

en pacientes con genotipo 1, llegando a la conclusión de que las mutaciones en las regiones PePHD e ISDR, no se pueden utilizar como factores predictivos de RVS, sin embargo la gran variabilidad genética encontrada en la región V3 de pacientes respondedores les sugiere que esta región debe ser más estudiada.

Según lo comentado en los estudios anteriores, la región E2 parece menos importante que la NS5A. Al menos en tres de ellos^{136,140,150} se detectó un mayor número de mutaciones en la región NS5A en los pacientes con RVS. Estos tres estudios estaban realizados en pacientes con genotipo 1, mientras que el trabajo que no mostró diferencias entre los grupos era en pacientes con genotipo 3a¹⁴⁹.

Un hecho a destacar es el pequeño número de estudios realizados en pacientes tratados con IFN pegilado más RBV, que es el tratamiento establecido en la actualidad.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

El hecho de que los pacientes respondan de manera diferente al IFN no ha sido resuelto y está abierto a debate. Es lógico pensar que los factores responsables son múltiples aunque con diferentes grados de importancia. Ciertamente, los factores virológicos juegan un importante papel y está bien establecido que la respuesta al tratamiento es diferente según el genotipo y la carga viral. De hecho, los pacientes con genotipo 2 y 3 presentan una respuesta a la combinación de IFN pegilado más RBV del 73 %, en contraste con el genotipo 1 que es alrededor del 50 %. Una mayor carga viral condiciona una peor respuesta en el paciente. No obstante, hay pacientes con factores predictivos desfavorables que presentan RVS, mientras que otros tienen todas las condiciones a su favor y no responden. Por último, en igualdad de condiciones (similar carga viral o genotipo), unos responden y otros no.

Todo lo anterior indica que hay otros factores al menos tan importantes como los ya referidos que pueden influir en la respuesta. Excluyendo los derivados del huésped y los genéticos, todo apunta hacia los factores virales como los principales implicados en la resistencia al tratamiento, entre los que hay que destacar las mutaciones virales. Hasta este momento los resultados son por un lado confusos y no se puede considerar como un tema agotado; por otra parte, los estudios se han centrado en pacientes tratados con IFN estándar sólo o asociado a RBV y se desconoce su importancia en los pacientes tratados con IFN pegilado más RBV, que es el tratamiento actual.

Con este estudio se pretende demostrar que la respuesta al tratamiento con IFN pegilado más RBV en pacientes con HCC está relacionado con la

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

heterogeneidad genética de alguna/s de las regiones objeto del mismo (E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR y/o NS5A-V3), ya que se sabe que estas regiones están implicadas, de alguna manera, con la sensibilidad al IFN.

2.2. OBJETIVOS

Objetivo principal:

Estudiar el papel que juega la heterogeneidad genética de las regiones E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR y NS5A-V3 y sus flancos en la resistencia del VHC al tratamiento con IFN pegilado más RBV en pacientes con genotipo 1.

Objetivos secundarios:

- 1.- Valorar como afectan los diferentes factores predictivos de respuesta en el número de mutaciones encontradas en las diferentes regiones objeto de estudio.
- 2.- Valorar como evolucionan el número de mutaciones de las distintas regiones durante el tratamiento y una vez finalizado este.
- 3.- Realizar un análisis filogenético para comprobar si se agrupan los pacientes con RVS y los NR o recidivantes

3. PACIENTES Y METODOLOGÍA

3.1. PACIENTES

3.1.1. SUJETOS DEL ESTUDIO

Se incluyeron de forma prospectiva 60 pacientes infectados por el VHC genotipo 1, tratados con IFN pegilado α -2a (180 μ g/semana) y RBV (1.000-1.200 mg/día) durante 48 semanas.

Los criterios de respuesta utilizados son los ya admitidos:

Respuesta	Definición
RVR	ARN del VHC indetectable (<29 UI/ml) a la semana 4
RVP	Descenso del ARN del VHC $\geq 2 \log_{10}$ UI/ml (100 veces) del inicial o indetectable a la semana 12
RVS	ARN del VHC indetectable a los 6 meses de suspender el tratamiento
NR	Descenso del ARN del VHC $< 2 \log_{10}$ UI/ml (100 veces) del inicial a la semana 12
Recidiva	ARN del VHC detectable tras suspender el tratamiento con un ARN del VHC indetectable durante el mismo (recurrencia)

Tabla 5. Definiciones de tipos de respuesta virológica utilizados en este estudio.

3.1.2. VARIABLES DEL ESTUDIO

Las variables dependientes han variado en función del estudio a realizar:

1.- En el estudio de los factores predictivos de respuesta las variables dependientes son: el tipo de respuesta al tratamiento antiviral: RVR, RVP y RVS. Las variables independientes han sido las características clínicas y biológicas de los pacientes: sexo, edad, datos epidemiológicos, datos bioquímicos (ALT, AST, GGT, FA, etc.) y los datos virológicos: genotipo, carga viral, lesión histológica y el número de mutaciones encontradas en cada región.

2.- En el estudio de los factores asociados a las mutaciones en las distintas regiones: la variable dependiente ha sido las mutaciones encontradas en cada región por separado y las variables independientes: edad, sexo, genotipo y carga viral.

3.1.3. RECOGIDA DE LOS DATOS

El diagnóstico de HCC se realizó en base a la elevación persistente de transaminasas durante al menos 6 meses junto con la detección de ARN-VHC en suero y biopsia compatible con HCC.

Para la participación se requirió consentimiento informado de cada uno de los pacientes. El protocolo de estudio se realizó conforme a las guías éticas de la declaración de Helsinki de 1975, previa aprobación del estudio por el comité ético.

En la inclusión en el estudio se analizaron las características clínicas y biológicas de estos pacientes: sexo, edad, datos epidemiológicos, datos bioquímicos (ALT, AST, GGT, FA, etc.), datos virológicos: genotipo y carga

viral en la basal y parámetros histológicos. Todos estos datos se incluyeron en una base de datos realizada para este estudio que se resume en la tabla 7.

El estudio histológico se llevó a cabo de acuerdo con los grados de actividad necroinflamatoria de Scheuer, con ligeras modificaciones¹⁵¹. Los pacientes no mostraron evidencia de infección por virus de la hepatitis B, ni hepatopatía alcohólica, autoinmune o inducida por fármacos.

Se realizaron extracciones de sangre: basal y en todos los meses durante el tratamiento, así como a los 6 meses postratamiento. En todas las muestras se procedió a la obtención de tres alícuotas de suero almacenándose a -80°C ; dos alícuotas fueron utilizadas posteriormente para el estudio virológico y la otra para el estudio bioquímico.

Estudio de la cinética viral: Se determinó la carga viral en las muestras basales, y en las semanas 4, 12, 48 y 72, con el objetivo de conocer los distintos tipos de respuesta y por tanto hacer los distintos grupos de estudio.

Estudio de la variabilidad viral:

- Basal: el estudio de mutaciones en la región NS5A se ha realizado en la muestra basal de los 60 pacientes mediante la técnica especificada en el apartado de metodología. La región PePHD se ha secuenciado en 23 de los pacientes no realizándose en el resto debido a la poca variabilidad encontrada en dicha región. De esta forma se pretende estudiar el papel que juega la heterogeneidad genética de las regiones objeto de estudio y sus flancos, y valorar como afectan los diferentes factores predictivos de respuesta en el número de mutaciones encontradas en dichas regiones.

- Durante el tratamiento: lógicamente este estudio se ha hecho en aquellas muestras que eran positivas para el VHC; por lo que se realizó en 15 pacientes NR y en 3 pacientes con RVS que permanecían con ARN-VHC positivo al primer mes de tratamiento. Este estudio se ha realizado sólo en la región NS5A, y el objetivo es observar como evolucionan el número de mutaciones de las distintas regiones durante el tratamiento y una vez finalizado este.

3.1.4. ANÁLISIS DE LOS DATOS

Análisis de secuenciación: NS5A y PePHD fueron alineados según la siguiente secuencia de referencia: VHC-J (GenBank accession number D90208) para el genotipo 1b¹⁵² y VHC-1 (GenBank accession number M62321) para el genotipo 1a¹⁵³. Además hemos alineado cada una de las secuencias con una secuencia consenso, realizada a partir del conjunto de secuencias de la población estudiada y obtenida como resultado de asignar el aminoácido más común de cada posición.

Para analizar el número de mutaciones de cada región mediante los factores asociados a ellas, se ha elegido como punto de corte, la mediana del número de mutaciones encontradas, de esta forma se distribuye la población en 2 grupos de igual tamaño (ISDR: con y sin mutaciones; PKRBD: $> \text{ ó } \leq 4$ mutaciones; V3: $> \text{ ó } \leq 5$ mutaciones). Esto nos permitió determinar mayor significación estadística.

Análisis filogenético: el árbol filogenético de la región NS5A (codones 2191-2405) de todos los pacientes se construyó con el método de ClustalW¹⁵⁴ (programa CLUSTALX 1.81) <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>.

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO

El genotipo viral fue determinado mediante técnicas de hibridación inversa (Inno-LIPA II HCV; Innogenetics, S.A., Ghent, Belgium).

3.2.2. DETECCIÓN DEL ARN-VHC

Para la detección cualitativa del ARN-VHC se utilizó la técnica COBAS AMPLICOR HCV V2.0 (Roche Diagnostics).

3.2.3. DETERMINACIÓN DE LA CARGA VIRAL

La concentración del VHC se realizó mediante CA MONITOR-HCV V2.0 (Roche Diagnostics).

3.2.4. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LAS REGIONES NS5A y E2-PePHD

El procedimiento empleado es el siguiente:

Extracción de ARN. El ARN viral fue extraído a partir de 200 µL de suero usando *High Pure Viral RNA Kit* (Roche) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

Transcripción inversa. A partir del RNA aislado, se obtuvo ADNc mediante transcripción inversa (RT). Previo a la RT, se mezcló 4 μ l de cebador antisentido (concentración final: 1 μ M) (Tabla 6) con 16 μ l de ARN, incubándolo durante 10 minutos a 65°C, con el objetivo de romper las uniones internas del ARN, rápidamente se enfrió a 4°C durante 5 minutos. La RT fue llevada a cabo en un volumen final de 40 μ L que contenía:

- 8 μ l de tampón de reacción 5x.
- 2 μ l de FTT 0.1M.
- 2 μ l de cada dNTP (concentración final 1 mM) (Promega).
- 0.5 mg de hexámeros (Promega).
- 100 unidades de MMLV Transcriptasa Reversa (USBTM, Promega).
- 1 μ l (20 unidades) de inhibidor de ribonucleasas (*RNasin Ribonuclease Inhibitor*, Promega).
- 5 μ l de H₂O DEPC.

Esta mezcla se calentó 2 minutos a 42°C, y finalmente se le añadió 2 μ l de AMV (Actif Motif Reflectase) y se volvió a incubar a 42°C durante 1 hora en un termociclador Perkin-Elmer 2400. Se desnaturalizó la enzima a 85°C durante 5 minutos, enfriándose posteriormente a 4°C. Finalmente, para concentrar la cantidad de ADNc obtenida y eliminar productos residuales se usaron filtros Microcon YM-100 (Millipore).

Amplificación del ADN. El ADNc fue utilizado para la amplificación por PCR de las regiones de interés.

Se utilizó la técnica de PCRs anidadas, que consiste en la realización de dos PCR consecutivas, cuyo objetivo es que la amplificación sea lo mayor posible, y poder detectar pequeñas cantidades de ADNc. Estas

amplificaciones se llevaron a cabo utilizando Brilliant SYBR R Green QPCR Masters Mix (Stratagene) en un termociclador Mx3000 (Stratagene). El SYBR R Green es una molécula que da fluorescencia cuando se une al surco menor del ADN de doble cadena. Cada reacción de PCR se realizaba en un volumen de 25 μ L que contenía:

- 12.5 μ l de Master Mix.
- 0.25 μ M de cebador antígenómico (Tabla 6).
- 0.25 μ M de cebador genómico (Tabla 6).
- 0.3 μ L de ROX (molécula fluorescente de referencia).
- 4 μ L de ADNc concentrado y purificado (para la 1ª ronda de PCR).
- 1 μ L de la 1ª ronda de PCR para la 2ª ronda de PCR.
- H₂O DEPC hasta alcanzar el volumen final de 25 μ l.

Para analizar la región NS5A se usó el siguiente protocolo:

Primera PCR:

- 1 ciclo a 95°C durante 10 min.
- 33 ciclos: 95°C durante 30 s, 60°C durante 30 s y 72°C durante 65 s.
- 1 ciclo de elongación durante 8 min a 72°C.

Segunda PCR: fue igual a la 1ª pero la fase de anillamiento fue a 58°C y la fase de elongación durante 50 s.

Para analizar la región PePHD se usó el siguiente protocolo:

- 1 ciclo a 95°C durante 10 min.
- 30 ciclos: 95°C durante 30 s, 58°C durante 30 s y 72°C durante 50 s.

Segunda PCR: fue igual a la 1ª pero la fase de anillamiento fue a 58°C durante 50 s.

El producto de PCR se sometió a un ciclo de desnaturalización para poder visualizar la curva de disociación, lo que nos permite evaluar el tamaño del fragmento de ADN producido en base a la temperatura de melting.

Purificación del producto de PCR. Previo a la secuenciación, los productos de ADN amplificado para las regiones PePHD la región NS5A fueron purificados con NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel), siguiendo el protocolo indicado en el manual del fabricante. Esto permite eliminar sales y componentes macromoleculares solubles.

Medida de la concentración del ADN amplificado. La cantidad de ADN amplificado de cada región se hizo mediante un Thermo Spectronic (Biomate).

Secuenciación. Los productos de ADN ya amplificados y purificados fueron posteriormente secuenciados. El kit utilizado para este paso fue el ABI PRISM BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing KIT (Applied Biosystems).

Para cada reacción de secuenciación se preparaba la siguiente mezcla en un volumen final de 8 μ L:

- 2 μ L de Big Dye Mix (dilución 1:20 del stock ABI).
- 400 ng de ADN molde.
- 5 μ M de cebador (sentido o antisentido) (Tabla 6).
- dH₂O (cantidad suficiente).

Las reacciones de secuenciación se preparaban en placas de 96 pocillos y se llevaban a cabo en un termociclador (Perkin Elmer 9600) conforme al siguiente protocolo:

- 95°C durante 2 min.
- 99 ciclos: 95°C durante 10 s.; 50°C durante 5 s.; - 60°C durante 4 min.
- 4°C ∞

Los productos de esta reacción se precipitaron con etanol y NaOAc siguiendo el protocolo propuesto por Applied Biosystems. Después fueron enviadas al Servicio de secuenciación del Instituto de parasitología y Biomedicina “López Neira”, donde las muestras eran procesadas con el secuenciador automático ABI Prism 377.

El análisis de los cromatogramas obtenidos se realizó a través del software Chromas Lite (<http://technelysium.com.au>).

Tabla 6. Cebadores usados en este estudio.

Región	Dirección	Cebador	Secuencia	Posición*
NS5A-1b				
RT y primera PCR	antisense	1ª1b-ISV3-AS	5' acgccttcgccttcacatcc 3'	7812-7793
Primera PCR	sense	1ª1b-ISV3-S	5' cccatcaacgcatacaccacg 3'	6510-6531
Segunda PCR y secuenciación	antisense	2ª1b-ISV3-AS	5'ggacattgagcagcagakacgac 3'	7595-7575
	sense	2ª1b-ISV3-S	5'gaccctcycayatyacagcag3'	6858-6879
NS5A-1a				
RT y primera PCR	antisense	1ª1a-ISV3-AS	5'gacattgagcagcacacgac 3'	7609-7590
Primera PCR	sense	1ª1a-ISV3-S	5' ccattaaygcctacaccacg 3'	6523-6542
Segunda PCR y secuenciación	antisense	2ª1a-ISV3-AS	5'tactgaccgtygaccatgac 3'	7569-7560
	sense	2ª1a-ISV3-S	5' atcctccatataacagcag 3'	6871-6891
PePHD-1b				
RT y primera PCR	antisense	1ª1b-PePHD-AS	5'cgcagaagaacacragraaggag3'	2627-2649
Primera PCR	sense	1ª1b-PePHD-S	5' ccatcacgrctytggcactacc 3'	2163-2184
Segunda PCR	antisense	2ª1b-PePHD-AS	5' acrgacgcygcattgag 3'	2605-2589
	sense	2ª1b-PePHD-S	5' aaggyaggatgtatgtggg 3'	2211-2230

*Las posiciones de los nucleótidos están de acuerdo a los prototipos VHC-J (genotipo 1b) y VHC-1 (genotipo 1a)

3.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables cuantitativas son expresadas como media \pm desviación estándar y las cualitativas como número de pacientes y el % en paréntesis. Las comparaciones entre grupos se realizaron con χ^2 ó test exacto de Fisher para las variables categóricas y el test t de Student para las variables cuantitativas. Para determinar si una variable está asociada independientemente a la variable dependiente, se utilizó una regresión logística binaria (análisis multivariante). Todas las covariables del análisis bivariante seleccionadas en base a su importancia clínica se incluyeron en el modelo multivariante.

El criterio de significación estadística fue $P \leq 0.05$. El estudio estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 15.0 para Windows.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES Y DIFERENTES RESPUESTAS AL TRATAMIENTO CON INTERFERÓN PEGILADO MÁS RIBAVIRINA

Las características generales de los pacientes así como las diferentes respuestas al tratamiento combinado se resumen en la tabla 7.

Se estudió en 45 pacientes la presencia de RVR, presentando dicha respuesta 23 (51 %) de los pacientes y no presentaron RVR 22 pacientes (49 %). En la semana 12, 52 (87 %) de los 60 pacientes incluidos en el estudio presentaron RVP. Los pacientes sin RVP fueron considerados como NR, (n = 8; 13 %). 36 (60 %) de los 60 pacientes incluidos en el estudio presentaron RVS. Los pacientes quienes mantenían negativo el ARN viral durante el tratamiento, pero en los que al suspender el mismo recidivaron (n = 16; 27 %) se consideraron NR (n = 24, 40 %).

La mitad de los pacientes eran menores de 40 años (n = 30), el 57% (n = 34) fueron hombres, la media de ALT fue de 117 UI/L, la de AST 68 UI/L y la de GGT de 74 UI/L; el 78 % de los pacientes (n = 47) estaban infectados por el genotipo 1b, el 80 % presentaban elevada carga viral (> 600.000 UI/ml), el grado de actividad necroinflamatoria media fue de 4 y el grado medio de fibrosis de 2.

En la tabla 7, se representa el número de mutaciones de las regiones PKRBD, ISDR, V3 y PePHD cuando las secuencias se alinearon con las cadenas de referencia (VHC-J para el genotipo 1b y VHC-1 para el genotipo 1a) (Figuras 11, 12 y 13).

RESULTADOS

Cuando se realizó el estudio de la RVR (semana 4) nos encontramos con que el 62 % de los pacientes jóvenes (≤ 40 años) presentaban dicha respuesta; en cuanto al sexo el 59 % de los hombres alcanzó RVR mientras que no lo hizo el 61 % de las mujeres, el grado de actividad necroinflamatoria media fue mayor para los pacientes sin RVR. En cuanto a las mutaciones encontradas en las diferentes regiones destacar que el 69 % de los pacientes con RVR tenían > 5 mutaciones en la región V3 mientras que el 59 % de los pacientes sin RVR presentaron ≤ 5 mutaciones en dicha región. Sin embargo no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de estos factores.

Respecto a la RVP, la media de ALT, AST y GGT fue mayor en los pacientes sin RVP sin encontrar correlación estadísticamente significativa. En cuanto a las mutaciones destacar que 19 pacientes (100 %) con > 4 mutaciones en la región PKRBD presentaron RVP ($P = 0.037$).

Los únicos factores asociados con la RVS fueron la edad ≤ 40 años ($P = 0.03$) y la presencia de > 4 mutaciones en la región PKRBD ($P = 0.001$). En la región ISDR, la diferencia fue casi estadísticamente significativa. Sin embargo, cuando se determinó la media de mutaciones en esta región, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre RVS y NR (RVS: 1.41 ± 1.46 mutaciones vs NR: 0.58 ± 0.65 mutaciones; $P = 0.005$).

En el análisis multivariante los factores independientes de RVS fueron la presencia de > 4 mutaciones en la región PKRBD (OR: 9.9, IC al 95 %: 1.9-50.3, $P = 0.006$) y tener ≤ 40 años (OR: 3.2, IC al 95 %: 1-10.3, $P = 0.056$) (Tabla 7).

Al comparar las secuencias con nuestra secuencia consenso, solo la región PKRBD se relacionó con la RVS (79.2% de los NR tenían ≤ 1 mutación y el 58.3 % de los pacientes con RVS presentaban >1 mutación; $P = 0.004$). (Figuras 11 y 13A)

La región V3 presentó una elevada variabilidad genética (Figuras 12 y 13B), pero no se relacionó con la RVS (Tabla 7).

La secuenciación de E2-PePHD, se determinó en 23 pacientes con genotipo 1b (19 con RVP, 4 sin-RVP, 11 con RVS y 12 NR). Esta región estaba muy conservada: solo 2 pacientes tenían 1 mutación y fueron NR, mientras que 21 no presentaron mutaciones, motivo por el cual no se continuó secuenciando. En el flanco 5' de E2-PePHD, 9 de 23 pacientes (5 con RVS y 4 NR) presentaron > 6 mutaciones, pero este hecho no fue estadísticamente significativo.

Cuando comparamos pacientes con RVS ($n = 36$) y recidivantes ($n = 16$), los factores predictivos de RVS fueron edades < 40 años ($P = 0.04$) y > 4 mutaciones en la región PKRBD ($P = 0.001$) como anteriormente; también las diferencias en la carga viral fueron casi significativas ($P = 0.07$).

Tabla 7. Características basales de los pacientes y diferentes respuestas al tratamiento con IFN pegilado más RBV.

	Todos los pacientes n = 60	n = 45		RVP n = 52	sin-RVP n = 8	RVS n = 36	NR n = 24
		RVR n = 23	sin-RVR n = 22				
Edad (años)							
≤40	30 (50)	13 (62)	8 (38)	27(90)	3 (10)	22(73)^{a,b}	8 (27)
>40	30 (50)	10 (42)	14 (58)	25 (83)	5 (17)	14 (47)	16 (53)
Sexo							
Masculino	34 (57)	16 (59)	11 (41)	31 (91)	3 (9)	22 (65)	12 (35)
Femenino	26 (43)	7 (39)	11 (61)	21 (81)	5 (19)	14 (54)	12 (46)
Epidemiología							
Parenteral	46 (84)	18 (58)	13 (42)	42 (91)	4 (9)	29 (63)	17 (37)
No parenteral	9 (16)	3 (33)	6 (67)	6 (67)	3 (33)	4 (44)	5 (56)
ALT (UI/L)	117±92	136±115	106±67	113±71	146±183	116±98	173±112
AST (UI/L)	68±67	86±87	60±28	69±41	107±137	72±42	53±17
GGT (UI/L)	74±63	63±82	69±40	59±52	123±116	55±41	52±35
Genotipo							
1a	13 (22)	8 (67)	4 (33)	10 (77)	3 (23)	9 (69)	4 (31)
1b	47 (78)	15 (45)	18 (55)	42 (89)	5 (11)	27 (57)	20 (43)
Carga viral (UI/ml)							
≤600.000	12 (20)	4 (40)	6 (60)	11 (92)	1 (8)	9 (75)	3 (25)
>600.000	48 (80)	19 (54)	16 (46)	41 (85)	7 (15)	27 (56)	21 (44)
Grado de actividad	4±2.2	3.89±2.68	4.63±1.98	4.05±2.3	3.67±1.8	4.3±2.2	4±2.4
Fibrosis	2.1±1.1	2.00±1.19	2.44±1.29	2.07±1.1	2.29±0.44	2±1.1	2.1±0.7
PKRBD							
≤4 mutaciones	41 (68)	15 (50)	15 (50)	33 (80)	8 (20)	19 (46)	22 (54)
>4 mutaciones	19 (32)	8 (53)	7 (47)	19(100)^c	0 (0)	17(89)^{d,e}	2 (11)
ISDR							
Sin mutaciones	22 (37)	8 (47)	9 (53)	17 (77)	5 (23)	10 (45)	12 (55)
≥1 mutaciones	38 (63)	15 (54)	13 (46)	35 (92)	3 (8)	26 (68)	12 (32)
V3							
≤5 mutaciones	39 (65)	12 (41)	17 (59)	33 (85)	6 (15)	21 (54)	18 (46)
>5 mutaciones	21 (35)	11 (69)	5 (31)	19 (90)	2 (10)	15 (71)	6 (29)
PePHD(n=23)							
Sin mutaciones	21 (91)	9 (45)	11 (55)	17 (81)	4 (19)	11 (52)	10 (48)
Con 1mutación	2 (9)	1 (50)	1 (50)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	2 (100)

RVR, Respuesta virológica rápida; RVP, Respuesta virológica precoz; RVS, Respuesta virológica sostenida; NR, No respondedores; ALT, alanino aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; GGT, gamma glutamyl transferasa; PKRBD, PKR binding domain; ISDR, IFN sensitivity-determining region; V3, variable region 3. Los datos están expresados en medias ± DS o número de pacientes (%).

Análisis bivalente entre: RVS y NR: ^aP = 0.03, ^dP = 0.001; RVP y sin RVP: ^cP = 0.037.

Análisis multivariante RVS vs NR: ^bOdds ratio = 3.2, IC al 95 %: 1-10.3, P = 0.056; ^eOdds ratio = 9.9, IC al 95 %: 1.9-50.3, P = 0.006.

4.2. ANÁLISIS DE LOS FACTORES ASOCIADOS CON MUTACIONES EN LA REGIÓN NS5A-PKRBD

Todos los pacientes presentaban mutaciones en esta región cuando se compararon con las secuencias de referencia. El 92 % de las mujeres ($P < 0.0001$), y el 79 % de los pacientes con mayor carga viral (> 600.000 UI/ml) ($P = 0.006$) se relacionaron con ≤ 4 mutaciones; así como el 75 % de los pacientes con menor carga viral (≤ 600.000 UI/ml) presentaron > 4 mutaciones en esta región ($P = 0.006$) (Tabla 8).

Al realizar el estudio comparativamente con la secuencia consenso de nuestra población (≤ 1 y > 1 mutaciones), las mujeres presentaban menos variabilidad en esta región (77 % de las mujeres con ≤ 1 mutación vs el 41 % de los hombres con ≤ 1 mutación; $P = 0.006$). Además, los pacientes con una baja carga viral tenían más mutaciones (75 % de los pacientes ≤ 600.000 IU/ml con > 1 mutaciones vs el 25 % de los pacientes con ≤ 600.000 IU/ml con ≤ 1 mutación; $P = 0.016$).

RESULTADOS

Caso	PKRBD VHC-J CONSENSO Genotipo 1b	2209																													
		P	S	L	K	A	T	C	T	T	H	H	D	S	P	D	A	D	L	I	E	A	N	L	L	W	R	Q	E	M	G
7	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	K	-	-	-	-
8	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	RVS	V	-	-	-	-	A	-	-	G	-	-	-	-	-	-	E	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-
53	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-	K	-	-
61	RVS	-	-	-	-	-	-	P	-	A	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
64	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	RVS	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	E	-	-	-	-	-	-	-	-	K	-	-	-	-	-
75	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	V	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
79	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
84	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
86	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
87	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
92	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V
94	RVS	-	-	M	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	RECIDIVANTE	-	-	-	-	-	-	-	-	A	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	RECIDIVANTE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	RECIDIVANTE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	RECIDIVANTE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	RECIDIVANTE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	RECIDIVANTE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	RECIDIVANTE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	RECIDIVANTE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	RECIDIVANTE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	RECIDIVANTE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	RECIDIVANTE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
81	RECIDIVANTE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88	RECIDIVANTE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
91	RECIDIVANTE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
93	RECIDIVANTE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	NR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	NR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	NR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	NR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	NR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	NR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 11. Secuenciaciones de PKRBD en pacientes infectados por el genotipo 1b. Cada secuencia se comparó con la secuencia de referencia VHC-J y la secuencia consenso. Las posiciones del primer y último aminoácido del dominio PKRBD de la poliproteína del VHC se indican sobre la secuencia VHC-J. Cada paciente es designado por número y respuesta al tratamiento.

Tabla 8. Factores asociados con mutaciones en NS5A-PKRBD

	≤4 mutaciones	>4 mutaciones	P
Edad (años)			
• ≤40 (n = 30)	19 (63)	11 (37)	ns
• >40 (n = 30)	22 (73)	8 (27)	
Sexo			
• Hombre (n = 34)	17 (50)	17(50)	0.0001
• Mujer (n = 26)	24 (92)	2 (8)	
Genotipo			
• 1a (n = 13)	9 (69)	4 (31)	ns
• 1b (n = 47)	32 (68)	15 (32)	
Carga Viral (UI/ml)			
• ≤600.000 (n = 12)	3 (25)	9 (75)	0.006
• >600.000 (n = 48)	38 (79)	10(21)	

NOTA. Los datos son número de pacientes (%).

4.3. ANÁLISIS DE LOS FACTORES ASOCIADOS CON MUTACIONES EN LA REGIÓN NS5A-ISDR Y SUS FLANCOS

En la región ISDR, 38 pacientes (63 %) presentaron variabilidad genética y 22 (37 %) tenían una secuencia ISDR salvaje (Tabla 9).

Cuando las secuencias se compararon con las secuencias de referencia el 77 % de los pacientes ≤ 40 años ($P = 0.03$), el 73% de los hombres ($P = 0.05$) y el 92 % con carga viral ≤ 600.000 IU/ml ($P = 0.021$) presentaron alta variabilidad genética (Tabla 9).

Con respecto a la secuencia consenso, el 65 % (22/34) de los hombres presentaron mutaciones, mientras que el 62 % (16/26) de las mujeres no lo hicieron ($P = 0.039$) y los pacientes con baja carga viral tenían más mutaciones en esta región (92 % con mutaciones vs el 8 % sin mutaciones; $P = 0.003$).

En el flanco 5' (codones 2191-2208), el 83 % (50/60) de los pacientes no presentaron mutaciones, y solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas con los genotipos (genotipo 1a: 31 % sin mutaciones y 69 % con mutaciones; genotipo 1b: 98 % sin mutaciones y 2 % con mutaciones; $P < 0.0001$).

Tabla 9. Factores asociados con mutaciones en NS5A-ISDR

	Sin mutaciones	Con mutaciones	P
Edad (años)			
• ≤40 (n = 30)	7 (23)	23 (77)	0.03
• >40 (n = 30)	15 (50)	15 (50)	
Sexo			
• Hombre (n = 34)	9 (27)	25 (73)	0.05
• Mujer (n = 26)	13 (50)	13 (50)	
Genotipo			
• 1a (n = 13)	2 (15)	11 (85)	0.06
• 1b (n = 47)	20 (43)	27 (57)	
Carga Viral (UI/ml)			
• ≤600.000 (n = 12)	1 (8)	11 (92)	0.021
• >600.000 (n = 48)	21 (44)	27 (56)	

NOTA. Los datos son número de pacientes (%).

4.4. ANÁLISIS DE LOS FACTORES ASOCIADOS CON LAS MUTACIONES EN LA REGIÓN NS5A-V3 Y SUS FLANCOS

En la región V3, cuando las secuencias se alinearon con las de referencia, el único factor asociado con las mutaciones fue el sexo, el 85 % de las mujeres presentaban ≤ 5 mutaciones en esta región ($P = 0.0001$) (Tabla 10).

Comparando con la secuencia consenso, solo el genotipo fue estadísticamente significativo (genotipo 1a: 92 % presentando > 3 mutaciones (mediana); genotipo 1b: 64 % presentaron < 3 mutaciones; $P < 0.0001$). (Fig. 12 y 13B)

Los flancos, preV3, codones 2275-2355, y postV3, codones 2380-2405, fueron notables por su carencia de homología entre los genotipos 1a y 1b. Como ocurrió con la región consenso V3, los pacientes con genotipo 1a tenían mayor número de mutaciones en ambas regiones, comparado con los pacientes con genotipo 1b (región preV3, $P = 0.013$; región postV3, $P = 0.025$). No encontramos correlación entre el número de mutaciones en estas regiones [preV3: 38 pacientes (24 con RVS y 14 NR) con > 5 mutaciones ($P = 0.5$); postV3: 25 pacientes (15 con RVS y 10 NR) con mutaciones ($P = 1$)] y la respuesta al tratamiento.

RESULTADOS

Caso	Región V3	2356	G	S	S	A	V	D	S	G	T	A	T	G	P	P	D	Q	A	S	D	D	G	D	K	2379	
	VHC-J		G	S	S	A	V	D	S	G	T	A	T	G	P	P	D	Q	A	S	D	D	G	D	K	G	
	CONSENSO		E	S	S	A	V	D	S	G	T	A	T	A	P	P	D	Q	P	S	D	D	G	D	A	G	
	Genotipo 1b																										
7	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	A	-	-	G	-	V	-	-	V	-	L	-	-	
8	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	E	G	-	-	A	-
12	RVS	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	T	H	-	-	-	P	-	V	-	-	-	T	-	
17	RVS	E	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	G	T	-	
25	RVS	E	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	P	-	S	-	-	-	A	-	
27	RVS	E	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	G	A	-	
31	RVS	E	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	A	-	S	-	-	-	P	P	-	T	-	-	T	-	
37	RVS	E	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	
40	RVS	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	G	-	S	-	-	-	-	-	-	A	-	
47	RVS	E	P	-	-	A	T	-	-	-	A	-	A	-	-	-	-	-	P	-	G	-	-	-	A	-	
50	RVS	E	-	-	G	-	-	-	-	-	-	S	A	-	-	-	-	-	P	I	I	-	-	-	T	-	
51	RVS	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	S	-	-	-	-	P	-	-	A	-	-	T	-	
53	RVS	-	-	-	-	A	N	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	G	A	E	
54	RVS	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	A	-	
60	RVS	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	G	T	-	
61	RVS	E	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	P	-	S	-	-	-	T	-	
64	RVS	E	T	-	-	-	-	-	-	-	-	S	A	S	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	T	-	
71	RVS	-	-	-	-	A	N	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	A	-	
75	RVS	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	A	-	
79	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	T	R	
83	RVS	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	L	-	-	N	-	-	A	-	
84	RVS	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	G	T	-	
85	RVS	E	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	A	-	
86	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	G	A	-	
87	RVS	D	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	G	T	-	
89	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	A	S	-	-	-	-	P	-	N	-	-	-	A	-	
90	RVS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	
92	RVS	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	
94	RVS	-	-	T	-	A	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	T	-	-	N	-	-	A	-	
6	RECIDIVANTE	K	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	A	-	
10	RECIDIVANTE	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	S	P	-	-	-	-	A	-	
11	RECIDIVANTE	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	P	-	S	-	-	-	A	-	
14	RECIDIVANTE	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	A	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	A	R	
32	RECIDIVANTE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	P	-	-	H	D	-	T	-	
43	RECIDIVANTE	E	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	G	A	-	
45	RECIDIVANTE	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	P	-	S	-	-	-	A	-	
49	RECIDIVANTE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	P	-	I	-	-	-	Q	E	
52	RECIDIVANTE	E	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	G	T	-	
56	RECIDIVANTE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	P	-	S	-	-	-	I	-	
68	RECIDIVANTE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	A	-	-	-	-	-	P	-	N	-	-	-	T	-	
81	RECIDIVANTE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	L	F	A	-	D	G	T	-	
88	RECIDIVANTE	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	E	T	-	
91	RECIDIVANTE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	L	-	-	-	P	-	-	-	-	G	A	-	
93	RECIDIVANTE	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	T	-	
3	NR	E	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	G	A	-	
9	NR	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	P	-	-	G	-	-	A	-	
18	NR	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	L	P	P	-	N	-	-	-	T	-	
20	NR	E	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	T	-	
55	NR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	G	A	-	
72	NR	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	L	P	-	-	-	-	T	-	

Figura 12. Secuenciación de V3 en pacientes infectados por el genotipo 1b. Cada secuencia se comparó con la secuencia de referencia VHC-J 1b y la secuencia consenso. Las posiciones del primer y último aminoácido del dominio V3 de la poliproteína del VHC se indican sobre la secuencia VHC-J. Cada paciente está designado por número y respuesta al tratamiento

Tabla 10. Factores asociados con las mutaciones en NS5A-V3.

	≤ 5 mutaciones	> 5 mutaciones	P
Edad (años)			
• ≤ 40 (n = 30)	19(63)	11 (37)	Ns
• >40 (n = 30)	20(67)	10(35)	
Sexo			
• Hombre (n = 34)	17(50)	17(50)	0.0001
• Mujer (n = 26)	22(85)	4(15)	
Genotipo			
• 1a (n = 13)	10 (77)	3(23)	Ns
• 1b (n = 47)	29 (62)	18(38)	
Carga Viral (UI/ml)			
• ≤ 600.000 (n = 12)	8(67)	4 (33)	Ns
• >600.000 (n = 48)	31 (65)	17(35)	

NOTA. Los datos son número de pacientes (%).

2274

G N I T R V E S E N K V V I L D S F D P L V A E E D E R E I S V P A E I
G N I T R V E S E N K V V V L D S F D P L V A E E D E R E V S V P A E I

- - - - - Q - - V - - - - -
- - - - - V - - - - - V - - - - -
- - - - - V - - - - - V - - - - -
- - - - - V - - - - - V - - - - -
- - - - - V - - - - - V - - - - -
- - - - - V - - - - - V - - - - -
- - - - - V - - - - - V - - - - -
- - - - - V - - - - - V - - - - -
- - - - - V - - - - - V - - - - -
- - - - - V - - - - - V - - - - -

Figura 13 (Continuación)

4.5. ESTUDIO EVOLUTIVO

Se analizó la variabilidad genética de las diferentes regiones de NS5A antes, durante y después del tratamiento para determinar la selección de subpoblaciones resistentes al tratamiento viral en 18 pacientes (3 RVS, 15 NR) (Tabla 11).

A causa del rápido descenso de la carga viral que presentan los pacientes respondedores, el estudio evolutivo solo se pudo realizar en 3 pacientes con RVS que aún presentaban positivo el ARN viral en el primer mes de tratamiento. En estos 3 pacientes no se detectaron cambios consistentes en las regiones PKRBD, V3 o sus flancos.

Se secuenciaron los sueros de 15 pacientes NR durante el primer mes de tratamiento y postratamiento hallando diferencias estadísticamente significativas entre el número de mutaciones en el primer mes de tratamiento y el número de mutaciones postratamiento en la región V3 y sus flancos ($P = 0.05$) (Tabla 11).

Tabla 11. Cambios de las secuencias durante el tratamiento y postratamiento

	RVS n = 3	NR n = 15
Región PKRBD		
• Basal	4.67 ± 0.57	3.8 ± 0.86
• Primer mes de tratamiento	4.67 ± 0.57	4 ± 1
• Postratamiento		4.38 ± 1.68
Región V3 y flancos		
• Basal	11.33 ± 2.3	11.67 ± 1.67[#]
• Primer mes de tratamiento	11.67 ± 2.0	10.83 ± 2.25[*]
• Postratamiento		13.29 ± 0.56

NOTA. Los datos implican media de número de mutaciones ± desviación estándar.

[#] Postratamiento vs basal (P = 0.06)

^{*} Postratamiento vs primer mes de tratamiento (P = 0.05)

4.6. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

La región NS5A se utilizó para construir el árbol filogenético (codones 2191 a 2405) usando las secuencias basales de todos los pacientes (n = 60).

Los pacientes se designaron por número, genotipo, respuesta al tratamiento y sexo (Figura 14). Las secuencias no se agruparon ni por respuesta al tratamiento ni por sexo. Sin embargo, los pacientes se agruparon por genotipo, como era de esperar.

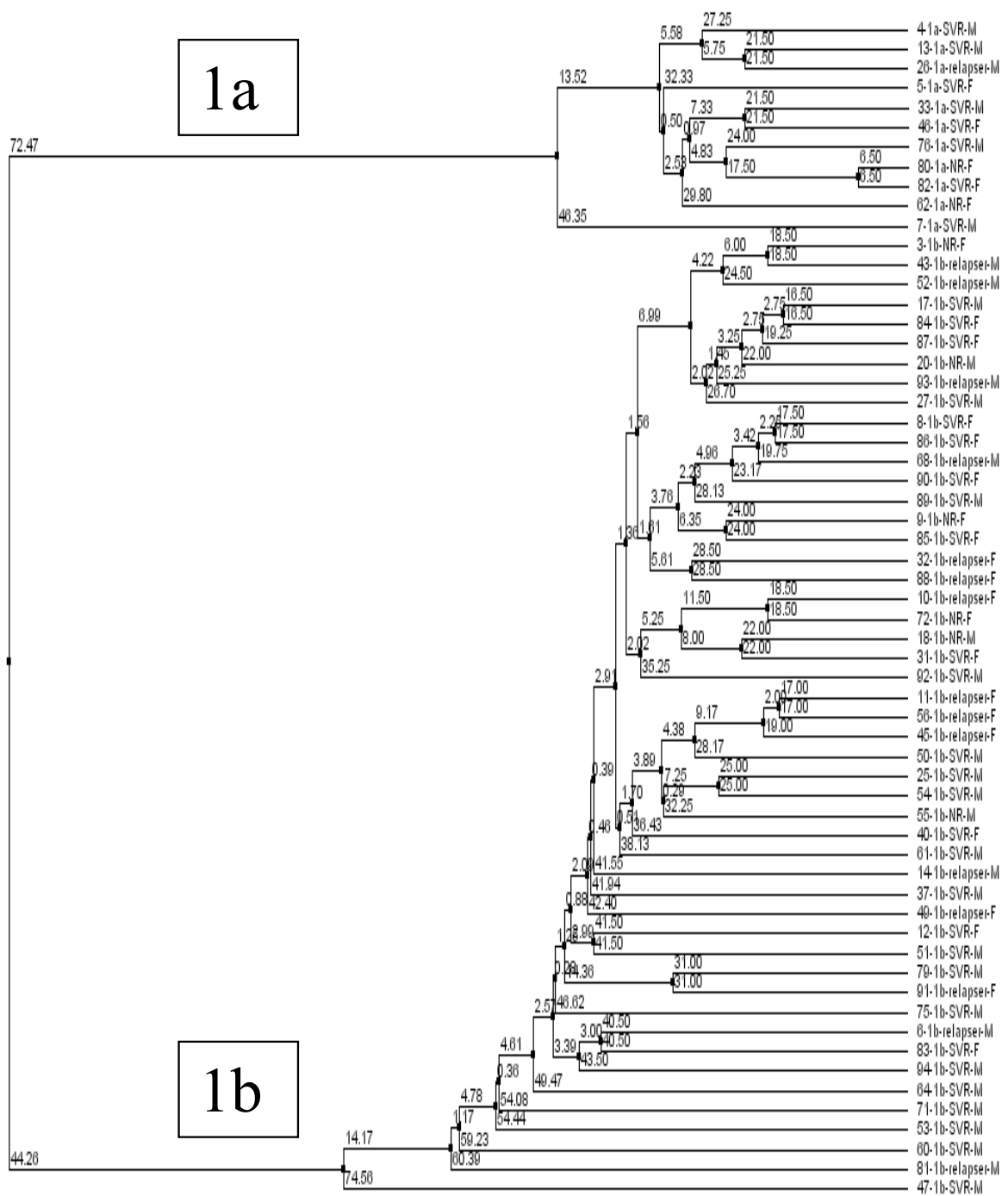


Figura 14. Árbol filogenético de la región NS5A de 60 pacientes. Genotipo (1a y 1b), respuesta al tratamiento (SVR: respuesta virológica sostenida; Relapser: recidivante; NR: no respondedor) y sexo (M: masculino; F: femenino).

5. DISCUSIÓN

Dos proteínas del VHC se ha demostrado que interactúan con las vías de transducción de señal del IFN α , lo que potencialmente ayuda al VHC a evadir los mecanismos antivirales. La inhibición de la actividad antiviral del IFN por NS5A se ha demostrado *in vitro* a través de la vía de interacción específica NS5A/PKR y NS5A-PKRBD^{131,132} y en células de mamíferos usando el virus de la encefalo-miocarditis y de la estomatitis vesicular¹⁵⁵. Se desconoce la relevancia de esta interacción *in vivo*, sin poder excluir otras interacciones de NS5A con pasos en la vía de transducción de señal del IFN α . Aunque, también se ha relatado una inconsistente asociación entre la interacción NS5A/PKR *in vitro* y la respuesta clínica¹⁵⁶. Además de la inhibición de la señalización de IFN α , NS5A es el inhibidor endógeno más potente de los IRF (factores reguladores del IFN), inducidos por la expresión del IFN por las células hepáticas, entre las proteínas no estructurales del VHC¹⁵⁷. Esto presupone que NS5A podría compensar el efecto antiviral producido por el IFN α . Más recientemente, también se ha demostrado la unión de la proteína E2 del VHC de aislados de VHC-1a/b con PKR y la inhibición *in vitro* de la función de PKR a través de PePHD.

En el presente estudio, se intenta determinar si el número de mutaciones en las regiones E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR y NS5A-V3 aisladas del suero pretratamiento de pacientes infectados crónicamente con el genotipo 1b del VHC tratados con IFN pegilado α -2a y RBV se correlacionan con la RVR, RVP y RVS. La mayoría de los estudios previos se realizaron con un número de pacientes menor que los utilizados para este estudio (n = 60) y usando otros tratamientos como IFN en monoterapia o la asociación de IFN estándar más RBV. Además, procuramos correlacionar los factores predictivos de RVS, tales como edad, sexo, genotipo y carga viral, con la variabilidad genética del virus en estas regiones.

Sabemos que existen otras regiones que han sido ampliamente investigadas, como la IRES (en la región 5' del ARN viral). Esta región se ha estudiado en relación con la respuesta al tratamiento con IFN. No obstante, en varios estudios, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los polimorfismos en esta región y la respuesta al tratamiento con IFN^{158,159}.

Debido a que hemos encontrado mutaciones en nuestra población en relación con las secuencias de referencia VHC-J y VHC-1 que ocurrían de forma repetida en todos nuestros pacientes, se decidió elaborar una secuencia consenso con las secuencias de los pacientes participantes en este estudio (n = 60). Algunas de estas mutaciones han sido encontradas en otras secuencias de referencia¹⁶⁰. Por lo tanto es razonable usar la secuencia consenso para evaluar las mutaciones en NS5A; pero cuando se alinearon las secuencias de nuestra población con las cadenas consenso, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con las cadenas de referencia.

También se ha demostrado que el número de mutaciones en la proteína ISDR regula la replicación de los replicones *in vitro*¹⁶¹. Es probable que mutaciones específicas en las regiones de NS5A que modulan la replicación del ARN-VHC sean importantes para la respuesta al tratamiento antiviral con IFN α .

Además de las propiedades antivirales, PKR puede ejercer función de supresión tumoral jugando un papel crucial en la regulación de las vías celulares que controlan la expresión génica dentro de la división celular. La evidencia experimental sugiere que la regulación de la actividad de PKR puede contribuir a la proliferación celular incontrolada y la transformación maligna. Se ha investigado la secuencia de NS5A-PKRBD en un gran grupo

de pacientes con CHC, demostrando que la prevalencia del virus salvaje o con presencia de mínimas mutaciones en la cadena NS5A es, en estos pacientes, más significativo que en aquellos con HCC sin CHC. Sugiriendo esto que la inhibición de la función de PKR mediada por NS5A podría participar en mecanismos oncogénicos conduciendo al desarrollo de CHC en pacientes crónicamente infectados por el VHC de larga evolución¹⁶².

En este estudio, el análisis multivariante reveló que > 4 mutaciones en la región PKRBD fue el único factor independiente asociado con la RVS al tratamiento combinado. Trabajos anteriores también mostraron una correlación positiva entre el número de mutaciones en esta región y la RVS¹³⁶⁻¹³⁸. Sin embargo, existen algunos estudios en los cuales tal relación no se encuentra^{163, 164}; estos o bien investigan en pacientes con genotipo 1a¹⁶³ o realizan el estudio estadístico analizando las mutaciones sólo en los 26 aminoácidos de la región PKRBD localizados en el extremo terminal de la región ISDR¹⁶⁴. Esta misma correlación y con mayor grado de significación estadística se ha encontrado en trabajos en los que únicamente se tenían en cuenta sustituciones de aminoácidos no sinónimas¹³⁷, esto se apreció, también, en pacientes infectados por el genotipo 3¹⁶⁵. Estos datos retoman la idea de que la región PKRBD y no solo la ISDR es un dominio funcional de NS5A y puede inducir resistencia o sensibilidad al tratamiento con IFN.

Se ha demostrado que pacientes con genotipo 1 y baja carga viral pretratamiento que presentan RVR (niveles de ARN-VHC indetectables en sangre o <29 UI/ml) en la semana 4 de tratamiento logran RVS (89 %) con solo 24 semanas de tratamiento con IFN pegilado y RBV y además los datos de la semana 12 son buenos para predecir la falta de respuesta al tratamiento¹⁶⁶. Somos conscientes de que es más sencillo determinar

rutinariamente el ARN-VHC y la carga viral en lugar de las secuencias del VHC, pero el objetivo de este trabajo fue estudiar la importancia de la variabilidad genética en relación con la respuesta viral. Este tipo de estudio (análisis de secuencias genómicas virales) puede tener algunas repercusiones futuras con la progresiva reducción de costes y la facilidad para el uso de las técnicas de secuenciación. Por tanto, en un futuro no muy lejano las secuenciaciones genéticas podrían aplicarse en la rutina clínica, facilitando un seguimiento más personalizado de los pacientes.

En el presente estudio, las mujeres presentaron menos variabilidad en la región PKRBD. De la misma manera, los pacientes con una elevada carga viral presentaron menos mutaciones en la región PKRBD que aquellos con una menor carga viral. El hecho de que el 100 % de los pacientes que tenían > 4 mutaciones en la región PKRBD alcanzaron RVP es importante.

La región ISDR es útil como marcador predictivo de respuesta al tratamiento con IFN para pacientes infectados con un subtipo específico Japonés (VHC-J)^{22,167,168}, pero no se encontraron correlaciones similares en estudios realizados en Europa y Estados Unidos^{140,169,170}. Sin embargo, un meta-análisis centrado en diferencias geográficas¹⁷¹, con 655 pacientes Japoneses y 525 Europeos, concluyó que había una significativa correlación positiva entre el número de mutaciones en la región ISDR y la tasa de RVS, independientemente de la región geográfica, aunque la probabilidad de RVS con cada mutación adicional en la región ISDR fue considerablemente más elevada en los pacientes Japoneses que en los Europeos. En nuestro estudio, la presencia o ausencia de mutaciones en ISDR no se correlacionó con la RVS (Tabla 7). Sin embargo, los pacientes con más mutaciones en esta región se correlacionaron con una mayor respuesta al tratamiento (RVS: 1.41

± 1.46 mutaciones vs NR: 0.58 ± 0.65 mutaciones; $P = 0.005$). Enomoto y cols.²² encontraron una significativa correlación positiva entre el número de mutaciones en la región ISDR y las tasas de RVS, cuando consideraban tres grupos de pacientes: tipo-salvaje (0 mutaciones), tipo-intermedio (1-3 mutaciones), tipo-mutante (> 4 mutaciones). En nuestro caso, solo el 7 % de los pacientes fueron tipo-mutante; mientras que el 57 % fueron tipo-intermedio y el 37 % tipo-salvaje. Esta misma proporción se ha encontrado en otros estudios Europeos. Lo que parece muy interesante de nuestros resultados es que factores predictivos de RVS, como la edad ≤ 40 años y la carga viral ≤ 600.000 UI/ml se correlacionaron significativamente con un elevado número de mutaciones en la región ISDR.

Estudios del dominio V3, han revelado que la sensibilidad a la terapia con IFN y RBV se correlaciona con las mutaciones en el mismo^{137,139,140,172}. En el estudio de El-Shamy y cols.¹⁴¹ el número medio de mutaciones en la región V3 y en el extremo superior que flanquea la región NS5A (aminoácidos 2234-2379) referida como región determinante de la resistencia a IFN/RBV (IRRDR) fue significativamente mayor para los aislados del VHC obtenidos de pacientes infectados por el genotipo 1b que alcanzaron RVS que para los pacientes que no alcanzaron RVS, encontrando sustituciones en los codones 2360 por Alanina y 2378 por Treonina, que se asociaron significativamente con la RVS, en particular Alanina 2360. Identificando como marcador independiente de RVS la variabilidad en la secuencia de IRRDR (≥ 6 mutaciones) y la mutación particular en el aminoácido Alanina 2360. En el presente estudio, no se encontró correlación entre el número de mutaciones en la región V3 y sus flancos y la respuesta al tratamiento. 8 de nuestros pacientes con RVS presentaron la mutación Alanina en el codón 2360, mientras que solo la presentaron 2 de los pacientes recidivantes y 1 NR; 12

pacientes con RVS presentaron la sustitución Treonina en el codón 2378. El número de mutaciones en esta región sólo se correlacionó con el sexo, con las mujeres que presentaron un menor número de mutaciones. Tampoco se encontró correlación entre las mutaciones en la región V3 y sus flancos y la posible cooperación con la región PKRBD para influenciar la respuesta al tratamiento. Esto puede ser posible, pero sería necesario un gran número de secuencias para poder demostrar este hecho.

En el estudio, las mujeres presentaron menos variabilidad en las regiones PKRBD y V3, sin tener una explicación clara para esto. Aunque en el estudio de Veillon y cols.¹⁷³ se encontró que hombres y mujeres presentaban diferentes números de mutaciones en las secuencias pretratamiento, sin embargo, hay muy pocos casos, y no han sido estudiados. Esta variabilidad podría deberse a una más agresiva respuesta inmune en hombres que en mujeres. Otra posibilidad es que los hombres generan más radicales libres de oxígeno en las células originando más mutaciones virales. En cualquier caso, se trata de un interesante hallazgo que requiere más estudios.

Este estudio muestra que la región PePHD se encontró elevadamente conservada, y solo 2 pacientes NR presentaron 1 mutación, siendo esto corroborado por otros estudios. Aunque la muy conservada secuencia PePHD podría contribuir a reducir la respuesta al IFN, las variaciones en esta región no parecen jugar papel en la modulación de la sensibilidad al IFN^{149,150,169,174-176}. Sin embargo, la región flanco de PePHD, codones 617-641, se correlaciona con la respuesta a monoterapia con IFN y la carga viral¹⁷⁶, sugiriendo que otras regiones distintas de PePHD en la parte C-terminal de E2 interaccionan con PKR, jugando un importante papel en la supresión de la misma. Hallazgo que no se encontró en este estudio.

También se han realizado intentos para correlacionar las sustituciones en PePHD con el CHC^{177,178}. Son necesarios nuevos estudios sobre la correlación de las mutaciones de PePHD y la relación con aspectos clínicos de la infección crónica por el VHC.

En el estudio evolutivo (Tabla 11), se observó que en los pacientes NR la región PKRBD no presentó cambios significativos por lo que las cuasiespecies dominantes antes del tratamiento persistieron durante el mismo. El IFN puede provocar una mayor presión inmunológica, comportándose como un importante agente selectivo para las cuasiespecies presentes, resultando en un continuo aclaramiento de las cuasiespecies variantes individuales y éstas podrían cambiar la composición de la población viral. No obstante, muchos de nuestros pacientes del estudio evolutivo (15 de 18) fueron NR, de los cuales se hallaron algunas poblaciones virales que finalmente resistieron la presión del IFN. En contra se apreció variabilidad genética en la región V3 y sus flancos presentando un aumento de mutaciones estadísticamente significativo entre el primer mes de tratamiento y los 6 meses posteriores al mismo. Esto sugiere que en pacientes infectados por el genotipo 1 del VHC la selección de cuasiespecies de NS5A puede ocurrir durante las primeras semanas del tratamiento con IFN, y las fuerzas selectivas parecen estar dirigidas a la región C terminal de la proteína. Es posible que las importantes modificaciones en el número de mutaciones o de los cambios en posiciones concretas en la región V3 puedan modificar la estructura del plegado secundario y terciario de la proteína NS5A, afectando así varias funciones biológicas como la inhibición de las cascadas de transducción de señal. Esto podría afectar la respuesta antiviral inducida por el IFN. No obstante, esta región sola no parece jugar un importante papel en el resultado del tratamiento.

Mutaciones específicas, no sólo el número total de mutaciones, pueden ser suficientes para impedir la interacción de PKRBD con PKR. Por este motivo, algunos autores¹⁶¹ han propuesto diferentes aminoácidos (2209, 2216 y 2227) cuyas mutaciones podrían estar asociadas con mayores tasas de RVS, revelándose en el análisis clínico el codón 2209 como uno de los sitios más importantes en la determinación de la respuesta al IFN, y el codón 2218 el sitio más frecuentemente mutado de entre todos los codones de ISDR. En este estudio, solo un paciente con RVS presentó sustituciones en los aminoácidos 2209 y 2227, sin apreciarse mutaciones en el codón 2216 de ninguno de los pacientes y siendo el aminoácido más comúnmente mutado el 2218 cuando se comparó con la secuencia consenso, presentando mutación en dicho aminoácido, 11 de los pacientes con RVS. Asimismo, la mutación de un aminoácido como prolina (codón 2209), que rompe la hélice alfa en la estructura proteica, significaría un cambio drástico en la estructura y función de la proteína. No obstante, en el estudio solo se encontró un cambio de este tipo (prolina), y este corresponde a un paciente respondedor. Del mismo modo, cambios en un grupo de aminoácidos (hidrofóbico, polar, ácido y básico) presupone una alteración de la función y la estructura proteica.

En resumen, los resultados acerca de la región ISDR están, por lo general, en la línea de lo relatado por otros estudios Europeos. Parece claro que se necesitaría analizar una gran cohorte de pacientes, dividida en grupos salvaje, intermedio y mutante de la región ISDR para obtener conclusiones similares a las de Enomoto y cols.²²

De este estudio de pacientes infectados por el genotipo 1 del VHC, podemos establecer que aquellos pacientes que presentan > 4 mutaciones en la región PKRBD de la proteína NS5A antes de iniciar el tratamiento se correlaciona

con la RVS al tratamiento con IFN pegilado y RBV, y por lo tanto la secuenciación de PKRBD podría ser usada como factor pronóstico para el tratamiento de los pacientes infectados por dicho genotipo.

6. CONCLUSIONES

- ✓ La variabilidad genética en la región PKRBD (> 4 mutaciones) es un factor predictivo de RVS al tratamiento con IFN pegilado más RBV en pacientes infectados por el genotipo 1 del VHC.
- ✓ En las regiones ISDR y PKRBD, el número de mutaciones encontradas se asocia con el sexo y la carga viral, de manera que los hombres y los pacientes con baja carga viral presentan un mayor número de mutaciones en ambas regiones; mientras que en la región V3, únicamente el sexo se asocia con el número de mutaciones, siendo las mujeres las que menor número presentan.
- ✓ En la región V3 de los pacientes NR, se observa un aumento del número de mutaciones al finalizar el tratamiento, de lo que se deduce que el número de mutaciones en esta región podría afectar a la respuesta al tratamiento con IFN pegilado más RBV. No obstante, esta región por sí sola no parece jugar un importante papel en el resultado del tratamiento.
- ✓ En el análisis filogenético, los pacientes no se agrupan ni por respuesta al tratamiento ni por sexo, pero sí por genotipos como cabría esperar.
- ✓ La estandarización en la práctica clínica del análisis de secuencias genómicas virales facilitaría un seguimiento más personalizado de los pacientes infectados por el VHC. Como guía pronóstica para el éxito del tratamiento combinado, los pacientes infectados por el genotipo 1 del VHC con > 4 mutaciones en la región PKRBD deberían ser

CONCLUSIONES

aconsejados para recibir tratamiento con IFN pegilado más RBV y además se les debe estimular durante el mismo para conseguir una buena adherencia, ya que presentan una respuesta favorable.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. **Choo QL, Kuo G, Weirg AJ.** Isolation of a cDNA clone derived from a blood- borne non A non B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
2. **Lauer GM, Walker BD.** Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2001; 345: 41-52.
3. **Berenguer M, Wright TL.** Hepatitis viral. En: Sleisenger & Fordtran *Enfermedades Gastrointestinales y Hepáticas.* Buenos Aires: Médica Panamericana, 2004; 7 ed. Tomo II: 1383.
4. **Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, et al.** The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med.* 1999; 341 (8): 556-562.
5. **Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Hudson FN, Mares A, Alexander WJ, et al.** The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med.* 1992; 327 (27): 1899-1905.
6. **Ohto H, Terazawa S, Sasaki N, Hino K, Ishiwata C, Kako M, et al.** Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. The Vertical Transmission of Hepatitis C Virus Collaborative Study Group. *N Engl J Med.* 1994; 330 (11): 744-750.

7. **Moisés Diago.** Transmisión y prevención de la hepatitis C. GH continuada. Enero-Febrero 2001. Vol 1, nº 2: 55-59.
8. **Montserrat García, Jose María Sanchez-Tapias.** Historia Natural de la hepatitis C. GH continuada. Enero-Febrero 2001. Vol 1, nº 2: 49-54.
9. **Diago M, Luján M, García M^a V.** Hepatitis por el VHC: Epidemiología y tratamiento. Actualizaciones temáticas Madaus en gastroenterología. Ed. Glosa. Barcelona 2001.
10. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of Hepatitis C 2002 – June 10-12. Hepatology 2002; 36(5 Suppl 1): S3-20.
11. **Hoofnagle JH.** Course and outcome of Hepatitis C. Hepatology 2002; 36(5) Suppl 1: S20-29.
12. **González-Peralta RP, Qian K, She JY, Davis GL, Onno T, Mizokami M, et al.** Clinical implications of viral quasispecies heterogeneity in chronic hepatitis C. J Med Virol. 1996; 49 (3):242-247.
13. **Eisen-Vandervelde AL, Yao ZQ, Hahn YS.** The molecular basis of HCV-mediated immune dysregulation. Clin Immunol. 2004;111 (1):16-21.

14. **Thomas DL, Seeff LB.** Natural History of hepatitis C. Clin Liver Dis 2005; 9: 383-98.
15. **Fattovich G, Stoffolini T, Zagni I, Donato F.** Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. Gastroenterology 2004; 127: Suppl 1: S35-S50.
16. **Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM.** Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2007: 1101-1152.
17. **Major ME, Feinstone SM.** The molecular biology of hepatitis C. Hepatology 1997; 25: 1527-30.
18. **Penin F, Dubuisson J, Rey F, Moradpour D, Pawlotsky JM.** Structural biology of Hepatitis C virus. Hepatology 2004; 39: 5-19.
19. **Martell M, Gómez J, Esteban J.I.** Aportaciones de la biología molecular en el estudio del virus de la hepatitis C. Gastroenterol Hepatol. 2001; 24 (Supl 1): 1-6.
20. **Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Shimotohno K.** Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by *in vitro* processing analysis. Proc Nat Acad Sci USA 1991; 88: 5547-51.
21. **Brass V, Moradpour D, Blum H.** Molecular virology of HCV: 2006 update. Int J Med Sci. 2006; 2: 29-34.

22. **Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, et al.** Mutations in the Nonstructural Protein 5a Gene and Response to Interferon in Patients with Chronic Hepatitis C Virus 1b Infection. *N Engl J Med.* 1996; 334 (2): 77-82.
23. **Pawlotsky JM.** Hepatitis C virus population dynamics during infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006; 299: 261-84.
24. **Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, et al.** Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol.* 1993; 74: 2391-2399.
25. **García-Retortillo M, Fornis X.** Variabilidad genómica e historia natural de la infección por el virus de la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol.* 2002; 25 (8): 514-520.
26. **Simmonds P.** Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus: 15 years on. *J Gen Virol.* 2004; 85: 3173-88.
27. **Liang TJ, Rehermann B, Seeff LB, Hoofnagle JH.** Pathogenesis, natural history, treatment and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med.* 2000; 132: 296-305.
28. **Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB, Rusti V, Di Bisceglie AD, Peters M, et al.** Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha-interferon: a preliminary report. *N Engl J Med.* 1986; 315: 1575-1578.

29. **Avedaño Solá C.** Interferones: tipos y acciones. Consenso para el tratamiento de la hepatitis B y C. *Gastroenterol Hepatol.* 2006; 29 (2): 125-128.
30. **Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J.** *Molecular cell biology.* Scientific American Books, 3rd ed, Oxford Press, New York 1995: 916.
31. **Kirchner H.** Interferons, a group of multiple lymphokines. *Springer Semin Immunopathol.* 1984; 7: 347.
32. **Lindsay KL.** Therapy of hepatitis C: overview. *Hepatology* 1997; 26 (Suppl. 1): 71S.
33. **Farrel GC, Bacon BR, Goldin RD, and the clinical Advisory Group for the Hepatitis C Comparative study.** Lymphoblastoid interferon alfa-n1 improves the long term response to a 6-month course of treatment in chronic hepatitis C compared with recombinant interferon alfa-2b: Results of an international randomized controlled trial. *Hepatology* 1998; 27: 1121
34. **Camma C, Giunta M, Pinzello G, Morabito A, Verderio P, Pagliaro L.** Chronic hepatitis C and interferon alpha: Convencional and cumulative meta-analyses of randomizez controlled trials. *Am J Gastroenterol.* 1999; 94 (3): 581-595.

35. **Davis GL, Balart LA, Schiff ER, Lindsay K, Bodenheimer HC Jr, Perrilo RP, et al.** Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa: A multicenter randomized, controlled trial. *N Engl J Med.* 1989; 321 (22): 1501-1506.
36. **Myers RP, Regimbeau C, Thevenot T, Leroy V, Mathurin P, Opolon P, et al.** Interferon for interferon naive patients with chronic hepatitis C. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002; (2) : CD000370.
37. **Alberti A, Benvegnú L.** Management of hepatitis C. *J Hepatol.* 2003; 38: S104-118.
38. **Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J, Heathcote EJ, Lai MY, Gane E, et al.** Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med.* 2000; 343: 1666–1672.
39. **Heathcote EJ, Shiffman ML, Cooksley WG, Dusheiko GM, Lee SS, Balart L, et al.** Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *N Engl J Med.* 2000; 343: 1673–1680.
40. **Lindsay KL, Trepo C, Heintges T, Shiffman M, Gordon SC, Hoefs JC, et al.** A randomised, double-blind trial comparing pegylated interferon alfa-2b to interferon alfa-2b as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001; 34: 395–403.
41. **Gale M Jr.** Effector genes of interferon action against hepatitis C virus. *Hepatology* 2003; 37: 975-978.

42. **Sen GC.** Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol* 2001; 55: 255-281.
43. **Pflugheber J, Fredericksen B, Sumpter R, Wang C, Ware F, Sodora D, Gale M Jr.** Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2002; 99: 4650-4655.
44. **Ji X, Cheung R, Cooper S, Li Q, Greenberg HB, He XS.** Interferon alfa regulated gene expression in patients initiating interferon treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 37: 610-621.
45. **Gao B, Hong F, Radaeva S.** Host factors and failure of interferon- α treatment in hepatitis C. *Hepatology* 2004; 39: 880-890.
46. **Hoofnagle JH, Seef LB.** Peginterferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *N Engl J Med.* 2006; 355: 2444-2451.
47. **Di Bisceglie AM, Conjeervaram HS, Fried HS, Sallie R, Park Y, Yurdaydin C, et al.** Ribavirin as therapy for chronic hepatitis C. *Ann Inter Med.* 1995; 123: 897-903.
48. **Asahina Y, Izumi N, Enomoto N, Uchihara M, Kurosaki M, Onuki Y, et al.** Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2005; 43: 623-9

49. **Young KC, Lindsay KL, Lee K-J, Liu W-Ch, He J-W, Milstein SL, et al.** Identification of a ribavirin-resistant NS5B mutation of hepatitis C virus during ribavirin monotherapy. *Hepatology* 2003; 38: 869-78.
50. **Dixit NM, Layden-Almer JE, Leyden TJ, Perelson AS.** Modeling how ribavirin improves interferon response rates in hepatitis C virus infection. *Nature* 2004; 432: 922-4.
51. **McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, et al.** Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med.* 1998; 339: 1485-92.
52. **Fried MW, Shiffman ML, Reddy R, Smith C, Marinos G, Goncales FL Jr, et al.** Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2002; 347: 975–982.
53. **Manns MP, McHutchinson JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al.** Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared to interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001; 358: 958–965.

54. **Hadziyannis SJ, Cheinquer H, Morgan T, Diago M, Jensen DM, Sette H, et al.** Peginterferon alfa-2a (40kD) (PEGASYS) in combination with ribavirin (RBV): efficacy and safety results from a phase III, randomised, double-blind multicentre study examining effect of duration of treatment and RBV dose. *J Hepatol.* 2002; 36 (Suppl 1):3.
55. **Sulkowski M, Lawitz E, Shiffman ML, Muir AJ, Galler G, McCone J, et al.** Final results of the IDEAL (Individualized dosing efficacy versus flat dosing to assess optimal pegylated interferon therapy) phase IIIb study. *J Hepatol.* 2008; 48 (Suppl. 2): S370.
56. **Martínez-Bauer E, Fornis X.** Tratamiento antiviral en la cirrosis hepática por el virus de la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol.* 2003; 26 (5): 303-6.
57. **Shiffman ML, Di Besceglie AM, Lindsay KL, Morishima C, Wright EC, Everson GT, et al.** Peginterferon alfa-2a and ribavirin in patients who have failed previous treatment. *Gastroenterology* 2004; 126: 1015-23.
58. **Bonkovsky HL, Naishadman D, Lambretch RW, Cheng RT, Hoefs JC, Nash SR, et al.** Roles of iron and HFE mutations on severity and response to therapy during retreatment of advanced chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2006; 131: 1440-51.

59. **Shiffman ML, Ghany MG, Morgan TR, Wright E, Everson G, Lindsay K, et al.** Impact of reducing peginterferon alfa-2a and ribavirin dose during retreatment in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2007; 132: 103-12.
60. **Poynard T, Colombo M, Bruix J, Schiff E, Terg R, Flamm S, et al.** Peginterferon alfa-2b and ribavirin: effective in patients with hepatitis C who failed interferon alfa/ribavirin therapy. *Gastroenterology* 2009; 136 (5): 1618-28.
61. **Jensen DM, Marcellin P, Freilich B, Andreone P, Di Bisceglie A, Brandao-Mello CE, et al.** Re-treatment of patients with chronic hepatitis C who do not respond to peginterferon-alpha2b: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2009; 150 (8): 1-34.
62. **Bacon B, Regev A, Galib RH, Morelli G, Rothstein KD, Shiffman ML, et al.** The DIRECT trial (Daily-dose consensus interferon and ribavirin: efficacy of combined therapy): treatment of non-responders to previous pegylated interferon plus ribavirin: sustained virologic response data. *Hepatology* 2007; 46 Suppl 1: 311A-312A.
63. **Trepo C, Lindsay K, Niederau C, Shiffman M, Gordon J, Hoefs J, Schiff E, et al.** Pegylated interferon alfa-2b (PEG-Intron) monotherapy is superior to interferon-alfa 2b (Intron-A) for the treatment of chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2000; 32 (Suppl. 2): 29.

64. **Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J, Heathcote EJ, Lai MY, Gane E, O'Grady J, et al.** Evaluation of the safety and efficacy of once-weekly PEG/interferon alfa-2a (Pegasys) for chronic hepatitis C. A multinational, randomized study. *J Hepatol.* 2000; 32 (Suppl. 2): 29.
65. **Lamp NP, Neumann AU, Gretch DR, Wiley TE, Perelson AS, Layden TJ.** Dose-dependent acute clearance of hepatitis C virus genotype 1 virus with interferon alfa. *Hepatology* 1997; 26: 226-231.
66. **Veldt BJ, Saracco G, Boyer N, Camma C, Bellobuono A, Hopf U, et al.** Long term clinical outcome of chronic hepatitis C patients with sustained virological response to interferon monotherapy. *Gut* 2004; 53: 1504-1508.
67. **Swain MG, Lai MY, Shiffman ML, Cooksley WGE, Abergel A, Lin A, et al.** Durable sustained virological response after treatment with peginterferon alpha- 2a (PEGASYS (R)) alone or in combination with ribavirin (COPEGUS (R)): 5-year-follow-up and the criteria of a cure. *J Hepatol.* 2007; 46 (Suppl. 1): 3A.
68. **Lindsay K, Manns MP, Gordon SC, Pockros P, Haussinger D, Hadziyannis SJ, et al.** Clearance of HCV at 5 year follow-up for peginterferon alfa-2b with or without ribavirin is predicted by sustained virological response at 24 weeks post-treatment. *Gastroenterology* 2008; 134 (Suppl. 1): 772A

69. **Pawlotsky JM.** Hepatitis C Virus Resistance to Antiviral Therapy. *Hepatology* 2000; 32 (5): 889-896.
70. **Neumann AU, Lamp NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, Perelson AS.** Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon- α therapy. *Science* 1998; 282: 103-107.
71. **Zeuzem S, Schmidt JM, Lee JH, Ruster B, Roth WK.** Effect of interferon alfa on the dynamics of hepatitis C virus turnover in vivo. *Hepatology* 1996; 23: 366-371.
72. **Pawlotsky JM, Neumann AU, Dahari H, Conrad A, Hezode C, Lonjon I, et al.** Hepatitis C virus (HV) dynamics during induction therapy with interferon (IFN) alpha and/or ribavirin. *Antiviral Ther.* 2000; 5 (Suppl. 1): 71.
73. **Zeuzem S, Herrmann E, Lee JH, Fricke J, Colucci G, Roth WK.** Hepatitis C virus kinetics in chronically infected patients treated with pegylated interferon-alfa. *Hepatology* 1999; 30: 309A.
74. **Buti M.** Implicaciones actuales y futuras de la cinética de aclaramiento viral en el tratamiento de la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol.* 2004; 27 (Supl 1): 24-9.
75. **Herrmann E, Lee JH, Marinos G, Mondini M, Zeuzem S.** Effect of ribavirin on hepatitis C viral kinetics in patients treated with pegylated interferon. *Hepatology* 2003; 37: 1351-8.

76. **Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, et al.** Randomised trial of interferon alpha-2b plus ribavirin for 48 or for 24 weeks versus interferon alpha-2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Lancet* 1998; 352: 1426-1432.
77. **Fried MW, Hadziyannis SJ, Shiffman M, Messinger D, Zeuzem S.** Rapid viral response is more important predictor of sustained virologic response (SVR) than genotype in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2008; 48 (Suppl. 2): 5A.
78. **Davis GL, Wong JB, McHutchinson JG, Manns MP, Harvey J, Albretch J.** Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 645-652.
79. **Mangia A, Minerva N, Bacca D, Cozzolongo R, Ricci GL, Carretta V, et al.** Individualized treatment duration for hepatitis C genotype 1 patients: randomized controlled trial. *Hepatology* 2008; 47: 43-50.
80. **Sanchez-Tapias JM, Diago M, Escartin P, Enriquez J, Romero-Gomez M, Barcena R, et al.** Peginterferon-alfa 2a plus ribavirin for 48 versus 72 weeks in patients with detectable hepatitis C virus RNA at week 4 of treatment. *Gastroenterology* 2006; 131: 451-460.
81. **Krebs DL, Hilton DJ.** SOCS: physiological suppressors of cytokine signalling. *J Cell Sci.* 2000; 113: 2813-2819.

82. **Song MM, Shuai K.** The suppressor of cytokine signalling (SOCS) 1 and SOC3 but not SOC2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *J Biol Chem.* 1998; 273: 35056-35062.
83. **Larrea E, García N, Qian C, Civeira MP, Prieto J.** Tumor necrosis factor alpha gene expresión and the response to interferon in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996; 23: 210-217.
84. **Kuzushita N, Hayashi N, Katayama K, Kanto T, Oshita M, Hagiwara H, et al.** High levels of serum interleukin-10 are associated with a poor response to interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol.* 1997; 32: 169-174.
85. **Morita K, Tanaka K, Saito S, Kitamura T, Kiba T, Fujii T, et al.** Expresion of interferon receptor genes in the liver as a predictor of interferon response in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 1999; 58: 359-365.
86. **Poynard T, McHutchinson J, Goodman Z, Ling MH, Albrecht J.** Is an “a la carte” combination interfron alfa-2b plus ribavirin regimen possible for the first line treatment in patients with chronic hepatitis C? The ALGOVIRC project group. *Hepatology* 2000; 31: 211-218.
87. **Poynard T, Bedossa P, Opolon P.** For the OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR and DOSVIRC Groups Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 1997; 349: 825-832.

88. **Deuffic S, Buffat L, Poynard T, Valleron AJ.** Modeling the hepatitis C virus epidemic in France. *Hepatology* 2000; 29: 1596-1601.
89. **Khan MH, Farrell GC, Byth K, Lin R, Weltman M, George J, et al.** Which patients with hepatitis C develop liver complication? *Hepatology* 2000; 31: 513-520.
90. **McHutchison JG, Poynard T, Gordon SC, Dienstag J, Morgan T, Yao R, et al.** The impact of race on response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1999; 30: 302A.
91. **Ortiz V, Berenguer M, Rayon JM, Carrasco D, Berenguer J.** Contribution of obesity to hepatitis C-related fibrosis progression. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97: 2408-2414.
92. **Berg T, Von Wagner M, Nasser S, Sarrazin C, Heintges T, Gerlach T, et al.** Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1: comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon-alfa-2a plus ribavirin. *Gastroenterology* 2006; 130: 1086-1097.
93. **Romero-Gómez M, Vilorio M Del Mar, Andrade RJ, Salmerón J, Diago M, Fernández-Rodríguez CM, et al.** Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 2005; 128: 636-641.
94. **Tai AW, Chung RT.** Treatment failure in hepatitis C: Mechanisms of non-response. *J Hepatol.* 2009; 50: 412-420.

95. **Hou C, Chuang WL, Yu ML, Dai CH, Chen SC, Lin ZY, et al.** Incidence and associated factors of neutralizing anti-interferon antibodies among chronic hepatitis C patients treated with interferon in Taiwan. *Scand J Gastroenterol.* 2000; 35: 1288-1293.
96. **Leroy V, Band M, de Traversay C, Maynard-Muet M, Lebon P, Zarski JP.** Role of anti-interferon antibodies in breakthrough occurrence during alpha 2a and 2b therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 1998; 28: 375-381.
97. **Schiff ER.** The alcoholic patient with hepatitis C virus infection. *Am J Med.* 1999; 107: 95S-99S.
98. **Degos F.** Hepatitis C and alcohol. *J Hepatol.* 1999; 31 (Suppl. 1): 113-118.
99. **Ohnishi K, Matsuo S, Matsutani K, Itahashi M, Kakihara K, Suzuki K, et al.** Interferon therapy for chronic hepatitis C in habitual drinkers: comparison with chronic hepatitis C in infrequent drinkers. *Am J Gastroenterol.* 1996; 91:1374-1379.
100. **Kau A, Vermehren J, Sarrazin C.** Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *J Hepatol.* 2008; 49: 634-651.
101. **Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchinson J, Albrecht J.** Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2001; 34: 730-73

102. **Ghany MG, Streader DB, Thomas DL, Seeff LB.** Diagnosis, Management and Treatment of hepatitis C: An Update. *Hepatology* 2009. 49 (4): 1335-1374.
103. **Soriano V, Garcia-Samaniego J, Rodriguez Casado R, Gonzalez J, Pedreira J.** Hepatitis C and HIV infection: biological, clinical, and therapeutic implications. *J Hepatol.* 1999; 31 (Suppl. 1): 119-123.
104. **Schalm SW, Brouwer JT, Bekkering FC, Van Rossum TG.** New treatment strategies in non-responder patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 1999; 31 (Suppl. 1): 184-188.
105. **Hadziyannis SJ, Sette Jr H, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, 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: 346-365.
106. **Jacobson IM, Brown RS Jr, Freilich B, Afdhal N, Kwo PY, Santoro J, et al.** Peginterferon alfa-2b and weight-based or flat-dose ribavirin in chronic hepatitis C patients: a randomized trial. *Hepatology* 2007; 46: 971-981
107. **Shiffman ML, Suter F, Bacon BR, Nelson D, Harley H, Sola R, et al.** Peginterferon alfa-2a and ribavirin for 16 or 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med.* 2007; 357: 124-134.

108. **Kobayashi M, Tanaka E, Sodeyama T, Urushihara A, Matsumoto A, Kiyosawa K.** The natural course of chronic hepatitis C: a comparison between patients with genotypes 1 and 2 hepatitis C viruses. *Hepatology* 1996; 23: 695-699.
109. **Weiner AJ, Brauer MJ, Roseblatt J, Richman J, Tung K, Crawford F, et al.** Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 1991; 180: 842-848.
110. **Farci P, Strazzer A, De Gioannis, Peddis G, Chaessa L, Coiana A, et al.** Evolution of HCV quasispecies of the different patterns of response to interferon therapy in chronic hepatitis C. *Proceedings of the 6th International Symposium on hepatitis C and related viruses.* 1999; 99.
111. **Sookoian S, Castaño G, Frider B, Cello J, Campos R, Flichman D.** Combined therapy with interferon and ribavirin in chronic hepatitis C does not affect serum quasispecies diversity. *Dig Dis Sci.* 2001; 46: 1067-1071.
112. **Le Guen B, Squadrito G, Nalpas B, Berthelot P, Pol S, Brechot C.** Hepatitis C virus Genome Complexity Correlates with response to interferon therapy: a study in french patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1997; 25: 1250-1254.

113. **Thelu MA, Baud M, Leroy V, Seigneurin JM, Zarski JP.** Dynamics of viral quasispecies during interferon therapy in non responder chronic hepatitis C patients. *J Clin Virol.* 2001; 22: 125-131.
114. **Grahovac B, Bingulac-Popovic J, Vucelic B, Hrstic I, Ostojic R, Drazic V, et al.** Dynamics of serum hepatitis C virus load and quasispecies complexity during antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Clin Virol.* 2001; 20: 85-89.
115. **Yeh BI, Han KH, Lee HW, Sohn JH, Ryu WS, Yoon DJ, et al.** Factors predictive of response to interferon-alpha therapy in hepatitis C virus type 1b infection. *J Med Virol.* 2002; 66: 481-487.
116. **Leone F, Zylberberg H, Squadrito G, Le Guen B, Berthelot P, Pol S, Brechot C.** Hepatitis C virus (HCV) hypervariable region 1 complexity does not correlated with severity of liver disease, HCV type, viral load or duration of infection. *J Hepatol.* 1998; 29: 689-694.
117. **Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, et al.** The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 2000; 288: 339-344.
118. **Koizumi K, Enomoto N, Kurosaki M, Murakami T, Izumi N, Marumo F, Sato C.** Diversity quasispecies in various disease stage of chronic hepatitis C virus infection and its significance in interferon treatment. *Hepatology* 1995; 22: 30-35.

119. **Hayashi J, Kishihara Y, Yamaji K, Furusyo N, Yamamoto T, Pae Y, et al.** Hepatitis C viral quasispecies and liver damage in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1997; 25: 697-701.
120. **Honda M, Kaneko S, Sakai A, Unoura M, Murakami S, Kobayashi K.** Degree of diversity of hepatitis C quasispecies and progression of liver disease. *Hepatology* 1994; 20: 1144-1151.
121. **Tsai SL, Chen YM, Chen MH, Huang CY, Sheen IS, Yeh CT, et al.** Hepatitis C virus variants circumventing cytotoxic T lymphocyte activity as a mechanism of chronicity. *Gastroenterology* 1998; 115: 954-965.
122. **Ray SC, Wang YM, Laeyendecker O, Tiehurst JR, Villanos A, Thomas DL.** Acute hepatitis C virus structural gene sequence as predictors of persistent viremia: hypervariable region 1 as a decoy. *J Virol.* 1999; 73: 2938-2946.
123. **Okada S, Akahane Y, Suzuki H, Okaamoto H, Mishiro S.** The degree of variability in the aminoterminal region of the e2/ns1 protein of hepatitis C virus correlates with responsiveness to interferon therapy in viremic patients. *Hepatology* 1992; 16: 619-624.
124. **Moribe T, Hayashi N, Kanazawa Y, Mita E, Fusamoto H, Negi M, et al.** Hepatitis C complexity detected by single-strand conformation polymorphism and response to interferon therapy. *Gastroenterology* 1995; 108: 789-795.

125. **Yuki N, Hayashi N, Moribe T, Matsushita Y, Tabata T, Inoue T, et al.** Relation of disease activity during chronic hepatitis C infection to complexity of hypervariable region 1 quasispecies. *Hepatology* 1997; 25: 439-444.
126. **Tang X, Quian K, Yuan X, Johnson YN.** Relationship between diversity of hepatitis C virus quasispecies and viremia, activity of liver disease and response to interferon therapy. *Chi J Exp Clin Virol.* 2002; 16: 128-131.
127. **Salmerón J, Muñoz De Rueda P, Ruiz-Extremera A, Casado J, Huertas C, Bernal M del Carmen, et al.** Quasispecies as predictive response factors for antiviral treatment in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci.* 2006; 51(5): 960-967.
128. **Gerotto M, Sullivan DG, Polyak SJ, Chemello L, Cavalletto L, Pontisso P, et al.** Effect of retreatment with interferon alone or interferon plus ribavirin on hepatitis C virus quasispecies diversification in nonresponder patients with chronic hepatitis C. *J Virol.* 1999; 73: 7241-7247.
129. **Salmerón J, Casado J, Muñoz De Rueda P, Lafuente V, Diago M, Romero-Gómez M, 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 (4): 264-269.

130. **Polyak SJ, McArdle S, Liu SL, Sullivan DG, Chung M, Hoffgartner WT, et al.** Evolution of hepatitis C virus quasispecies in hypervariable region 1 and the putative interferon sensitivity-determining region during interferon therapy and natural infection. *J Virol.* 1998; 72: 4288-4296.
131. **Gale MJ Jr, Blakely CM, Kwieciszewski B, Tan SL, Dossett M, Tang NM, et al.** Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol.* 1998; 18: 5208-5218.
132. **Gale MJ Jr, Korth MJ, Tang NM, Tan SL, Hopkins DA, Dever TE, 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: 217-227.
133. **Podevin P, Sabile A, Gajardo R, Delhem N, Abadie A, Lozach PY, 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: 1503-1511.
134. **Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM.** Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000; 290: 1972-1974.
135. **Noguchi T, Otsubaki T, Ando I, Ogura N, Ikeda S, Shimotohno K.** Isolation and gene analysis of interferon alpha-resistant cell clones of the hepatitis C virus subgenome. *Virology* 2008; 375 (2): 424-432.

136. **Berg T, Mas Marques A, Höhne M, Wiedenmann B, Hopf U, Schreier E.** Mutations in the E2-PePHD and NS5A region of hepatitis C virus type 1 and the dynamics of hepatitis C viremia decline during interferon alfa treatment. *Hepatology* 2000; 32:1386-95.
137. **Sarrazin C, Herrmann E, Bruch K, Zeuzem S.** Hepatitis C virus nonstructural 5A protein and interferon resistance: a new model for testing the reliability of mutational analyses. *J Virol.* 2002; 76:11079–11090.
138. **Macquillan GC, Niu X, Speers D, Englihs S, Garas G, Harnett GB, et al.** Does sequencing the PKRBD of hepatitis C virus NS5A predict therapeutic response to combination therapy in an Australian population? *J Gastroenterol Hepatol.* 2004;19: 551-557.
139. **Duverlie G, Khorsi H, Castelain S, Jaillon O, Izopet J, Lunel F, 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: 1373-1381.
140. **Murphy MD, Rosen HR, Marousek GI and Chou S.** Analysis of sequence configurations of the ISDR, PKR-Binding domain, and V3 region as predictors of response to induction interferon- and ribavirin therapy in chronic hepatitis C infection. *Dig Dis Sci.* 2002; 47(6): 1195-1205.

141. **El-Shamy A, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, Hotta H.** Sequence variation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A predicts outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. *Hepatology* 2008; 48 (1): 38-47.
142. **Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM.** Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999; 285: 107-110.
143. **Tan SL and Katze MG.** How hepatitis C virus counteracts the interferon response: The jury is still out on NS5A. *Virology* 2001, 284: 1-12.
144. **Chayama K, Tsubota A, Kobasyashi M, Okamoto K, Hashimoto M, Miyano Y, et al.** Pretreatment virus load and multiple amino acid substitutions in the interferon sensitivity-determining region predict in the interferon sensitivity-determining region predict the outcome of interferon treatment in patients with chronic genotype 1b hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1997; 25: 745-749.
145. **Khorsi H, Castelains S, Wyseur A, Izopet J, Canva V, Rombout A, et al.** Mutations of hepatitis C virus 1b NS5A 2209-2248 amino acid sequence do not predict the response to recombinant interferon-alfa therapy in French patients. *J Hepatol.* 1997; 27: 72-77.

146. **Squadrito G, Orlando ME, Cacciola I, Rumi MG, Artini M, Picciotto A, et al.** Long-term response to interferon alpha in unrelated to "interferon sensitivity determining region" variability in patients with chronic hepatitis C virus-1b infection. *J Hepatol.* 1999; 30: 1023-1027.
147. **Puig-Basagoiti F, Sáiz JC, Fornis X, Ampurdanès S, Giménez-Barcons M, Franco S, et al.** Influence of the genetic heterogeneity of the ISDR and PePHD regions of hepatitis C virus on the response to interferon therapy in chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 2001; 65: 35-44.
148. **Akuta N, Suzuki F, Tsubota A, Suzuki Y, Hosaka T, Someya T, et al.** Association of amino acid substitution pattern in nonstructural protein 5A of hepatitis C virus genotype 2a low viral load and response to interferon monotherapy. *J Med Virol.* 2003, 69: 376-383.
149. **Sarrazin C, Kornetzky I, Rüster B, Lee JH, Kronenberger B, Bruch K, et al.** Mutations within the E2 and NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 3a and correlation with treatment response. *Hepatology* 2000; 31: 1360-1370.
150. **Chayama K, Suzuki F, Tsubota A, Kobayashi M, Arase S, Saitoh S, et al.** Association of amino acid sequence in the PKR-eIF2 phosphorylation homology domain and response to interferon therapy. *Hepatology* 2000; 32: 1138-1144.

151. **Caballero T, Perez-Milena A, Masseroli M, O'Valle F, Salmeron FJ, Del Moral RMG, Sanchez-Salgado G.** 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: 740-747.
152. **Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T, Shimotohno K.** Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *PNAS* 1990; 87 (24): 9524-9528.
153. **Choo QL, Richman K, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, et al.** Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *PNAS* 1991; 88 (6): 2451-2455.
154. **Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, submitted, June 1994.
155. **Gale M Jr, Kwieciszewski B, Dossett M, Nakao H, Katze MG.** Antiapoptotic and oncogenic potentials of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR protein kinase. *J Virol.* 1999; 73(8):6506-6516.

156. **Paterson M, Laxton CD, Thomas HC, Ackrill AM, Foster GR.** Hepatitis C virus NS5A protein inhibits interferon antiviral activity, but the effects do not correlate with clinical response. *Gastroenterology* 1999; 117: 1187-1197.
157. **Zhang T, Lin RT, Li Y, Douglas SD, Maxcey C, Ho C, et al.** Hepatitis C virus inhibits intracellular interferon alpha expression in human hepatic cell lines. *Hepatology* 2005; 42: 819-827.
158. **Soler M, Pellerin M, Malnou CE, Dhumeaux D, Kean KM, Pawlotsky JM.** Quasispecies heterogeneity and constraints on the evolution of the 5'noncoding region of hepatitis C virus (HCV): relationship with HCV resistance to interferon-alpha therapy. *Virology* 2002; 298: 160-173.
159. **Thelu MA, Drouet E, Hilleret MN, Zarski JP.** Lack of clinical significance of variability in the internal ribosome entry site of hepatitis C virus. *J Med Virol.* 2004; 72: 396-405.
160. **Thomson M, Nascimbeni M, Gonzales S, Murthy KK, Rehmann B, Liang TJ.** Emergence of a distinct pattern of viral mutations in chimpanzees infected with a homogeneous inoculum of hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2001; 121 (5): 1226-1233.
161. **Kohashi T, Maekawa S, Sakamoto N, Kurosaki M, Watanabe H, Tanabe Y, et al.** Site-specific mutation of the interferon sensitivity-determining region (ISDR) modulates hepatitis C virus replication. *J Viral Hepat.* 2006; 13: 582-590.

162. **De Mitri MS, Morsica G, Cassini R, Bagaglio S, Zoli M, Alberti A, Bernardi M.** Prevalence of wild-type in NS5A-PKR protein kinase binding domain in HCV-related hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2002; 36: 116-122.
163. **Layden-Almer JE, Kuiken C, Ribeiro RM, Kunstman KJ, Perelson AS, Layden TJ, Wolinsky SM.** Hepatitis C virus genotype 1a NS5A pretreatment sequence variation and viral kinetics in African American and white patients. *J Infect Dis.* 2005; 192(6):1078-87.
164. **Kmieciak D, Kruszyna L, Migdalski P, Lacinski M, Juszczyk J, Trzeciak WH.** Mutations within protein kinase R-binding domain of NS5A protein of hepatitis C virus (HCV) and specificity of HCV antibodies in pretreatment sera of HCV-chronically infected patients and their effect on the result of treatment. *Jpn J Infect Dis.* 2006; 59(2):92-9.
165. **Goyal A, Hofmann WP, Hermann E, Traver S, Hissar SS, Arora N, et al.** The hepatitis C virus NS5A protein and response to interferon alpha: mutational analyses in patients with chronic HCV genotype 3a infection from India. *Med Microbiol Immunol.* 2007; 196(1):11-21.
166. **Zeuzem S, Buti M, Ferenci P, Sperl J, Horsmans Y, Cianciara J, et al.** Efficacy of 24 weeks treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C with genotype 1 and low pretreatment viremia. *J Hepatol.* 2006; 44: 97-103.

167. **Murayama M, Katano Y, Nakano I, Ishigami M, Hayashi K, Honda T.** 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 Jan;79 (1):35-40.

168. **Watanabe K, Yoshioka K, Yano M, Ishigami M, Ukai K, Ito H, 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: 504-512).

169. **Zeuzem S, Lee JH, Roth WK.** Mutations in the NS5A gene of European hepatitis C virus isolates and response to IFN alfa. *Hepatology* 1997;25:740-744.

170. **Gerotto M, Dal Pero F, Pontisso P, Noventa F, Gatta A, Alberti A.** Two PKR inhibitor HCV proteins correlate with early but not sustained response to interferon. *Gastroenterology* 2000; 119: 1649–55.

171. **Pascu M, Martus P, Höhne M, Wiedenmann B, Hopf U, Schreier E, Berg T.** Sustained virological response in hepatitis C virus type 1b infected patients is predicted by the number of mutations within the NS5A-ISDR: a meta-analysis focused on geographical differences. *Gut* 2004; 53: 1345-1351.

172. **Puig-Basagoiti F, Forns X, Furci I, Ampurdanes S, Gimenez-Barcons M, Franco S, 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: 1067–1075.
173. **Veillon P, Payan C, Le Guillou-Guillemette H, Gaudy C, Lunel F.** Quasispecies evolution in NS5A region of hepatitis C virus genotype 1b during interferon or combined interferon-ribavirin therapy. *World J Gastroenterol.* 2007; 13: 1195-1203.
174. **Sarrazin C, Bruckner M, Herrmann E, Ruster B, Bruch K, Roth WK, Zeuzem S.** Quasispecies heterogeneity of the carboxy-terminal part of the E2 gene including the PePHD and sensitivity of hepatitis C virus 1b isolates to antiviral therapy. *Virology* 2001 Oct 10; 289 (1): 150-63.
175. **Hung CH, Lee CM, Lu SN, Lee JF, Wang JH, Tung HD, et al.** Mutations in the NS5A and E2-PePHD region of hepatitis C virus type 1b and correlation with the response to combination therapy with interferon and ribavirin. *J Viral Hepat.* 2003; 10: 87-94
176. **Ukai K, Ishigami M, Yoshioka K, Kawabe N, Katano Y, Hayashi K, et al.** Mutations in carboxy-terminal part of E2 including PKR/eIF2 α phosphorylation homology domain and interferon sensitivity determining region of nonstructural 5A of hepatitis C virus 1b: their correlation with response to interferon monotherapy and viral load. *World J Gastroenterol.* 2006 Jun 21;12 (23): 3722-8.

177. **Gimenez-Barcons M, Franco S, Suarez Y, Forns X, Ampurdanes S, Puig-Basagoiti F, et al.** High amino acid variability within the NS5A of hepatitis C virus (HCV) is associated with hepatocellular carcinoma in patients with HCV-1b-related cirrhosis. *Hepatology* 2001 Jul; 34 (1): 158-67.
178. **Bagaglio S, De Mitri MS, Lodrini S, Paties C, Cassini R, Bianchi G, et al.** Mutations in the E2-PePHD region of hepatitis C virus type 1b in patients with hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat.* 2005 May;12(3):243-50.

ANEXO

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[∇]

P. Muñoz de Rueda, J. Casado, R. Patón, D. Quintero, A. Palacios, A. Gila, R. Quiles, J. León, A. Ruiz-Extremera, and J. Salmerón*

San Cecilio University Hospital, Gastroenterology Unit and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (Ciberehd), Granada, Spain

Received 15 October 2007/Accepted 21 April 2008

Mutations in several subgenomic regions of hepatitis C virus (HCV) have been implicated in influencing the response to interferon (IFN) therapy. Sequences within HCV NS5A (PKR binding domain [PKRBD], IFN sensitivity-determining region [ISDR], and variable region 3 [V3]) were analyzed for the pretreatment serum samples of 60 HCV genotype 1-infected patients treated with pegylated IFN plus ribavirin (1b, $n = 47$; 1a, $n = 13$) but with different treatment outcomes, those with sustained virologic responses (SVR; $n = 36$) or non-responders (NR; $n = 24$). Additionally, the sequence of the PKR/eIF-2 α phosphorylation homology domain (E2-PePHD) region was determined for 23 patients (11 SVR and 12 NR). The presence of >4 mutations in the PKRBD region was associated with SVR ($P = 0.001$) and early virologic responses (EVR; 12 weeks) ($P = 0.037$) but not rapid virologic responses (4 weeks). In the ISDR, the difference was almost statistically significant (68% of SVR patients with mutations versus 45% without mutations; $P = 0.07$). The V3 region had a very high genetic variability, but this was not related to SVR. Finally, the E2-PePHD ($n = 23$) region was well conserved. The presence of >4 mutations in the PKRBD region (odds ratio [OR] = 9.9; $P = 0.006$) and an age of ≤ 40 years (OR = 3.2; $P = 0.056$) were selected in a multivariate analysis as predictive factors of SVR. NS5A sequences from serum samples taken after 1 month of treatment and posttreatment were examined for 3 SVR and 15 NR patients to select treatment-resistant viral subpopulations, and it was found that in the V3 and flanking regions, the mutations increased significantly in posttreatment sera ($P = 0.05$). The genetic variability in the PKRBD (>4 mutations) is a predictive factor of SVR and EVR in HCV genotype 1 patients treated with pegylated IFN and ribavirin.

The hepatitis C virus (HCV) is one of the most frequent causes of chronic viral hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. Current therapy, a combination of pegylated-alpha interferon (peg-IFN- α) and ribavirin (RBV), achieves a response rate between 48% and 88% (29). The factors that have been shown to predict the response to therapy include HCV genotypes other than 1, low viral load, rapid virologic response (RVR; 4 weeks), and early virologic response (EVR; 12 weeks) (3). It is believed that both host and viral factors, including several viral genomic regions, are essential for an effective response to IFN therapy (9).

The clinical importance of amino acid mutations within the functional regions of the HCV proteins in correlation with chronic hepatitis C (CHC) has been questioned. NS5A has been studied as a possible mediator of IFN- α resistance (17). Information, derived mainly from the subgenomic replicon system, suggests that NS5A is involved in genomic RNA replication (21, 23). Prior to this, Enomoto et al. (8) suggested that the genetic heterogeneity of a specific domain of the NS5A region, termed the IFN sensitivity-determining region (ISDR), was related closely to the response in Japanese patients with

HCV genotype 1b, so that patients with at least four mutations within the ISDR achieved a sustained virologic response (SVR) to IFN- α monotherapy (8, 27, 40). However, the reported results in Europe and the United States concerning the correlation of the substitutions within the ISDR to the treatment outcome are conflicting (13, 26, 41). It is well known that the ISDR is necessary but not sufficient for the interaction between NS5A and the PKR enzyme (which is very important for the activation of IFN), with an additional 26 amino acids distal to the ISDR being required (12). This region is termed the PKR binding domain (PKRBD). This region-mediate disruption of PKR dimerization resulted in the repression of PKR function and the inhibition of PKR-mediated eIF-2 α phosphorylation. The introduction of multiple mutations within the PKR-binding region, including those within the ISDR, abrogated the ability of NS5A to bind to PKR. Recent studies have found that mutations within the PKRBD of HCV type 1 are associated with a long-term sustained response to IFN- α and IFN- α /RBV therapy (2, 24, 33).

Recently, clinical studies have proposed that the number of amino acid variations within variable region 3 (V3) may be associated with the treatment outcome (7, 26, 30, 33).

A PKR/eIF-2 α phosphorylation homology domain (PePHD) within the E2 protein has been found to interact with PKR and inhibit PKR in vitro, suggesting a possible mechanism of HCV to evade the antiviral effects of IFN (35). Mutations in this region are believed to influence the response to IFN therapy

* Corresponding author. Mailing address: Hospital Universitario San Cecilio, Ciberehd, Unidad Clínica de Aparato Digestivo, Avd. Dr. Oloriz 16, 18012 Granada, Spain. Phone: (34) 958240719. Fax: (34) 958284920. E-mail: fsalmero@ugr.es.

[∇] Published ahead of print on 30 April 2008.

TABLE 1. Oligonucleotide primers used in the present study

Region and application	Direction	Primer	Sequence	Position ^a
NS5A-1b				
RT and first PCR	Antisense	1 ^a 1b-ISV3-AS	5'-ACGCCTTCGCCTTCATCTCC-3'	7812-7793
First PCR	Sense	1 ^a 1b-ISV3-S	5'-CCCATCAACGCATACACCACG-3'	6510-6531
Second PCR and sequencing	Antisense	2 ^a 1b-ISV3-AS	5'-GGACATTGAGCAGCAKACGAC-3'	7595-7575
	Sense	2 ^a 1b-ISV3-S	5'-GACCCCTCYCAYATYACAGCAG-3'	6858-6879
NS5A-1a				
RT and first PCR	Antisense	1 ^a 1a-ISV3-AS	5'-GACATTGAGCAGCACACGAC-3'	7609-7590
First PCR	Sense	1 ^a 1a-ISV3-S	5'-CCATTAAYGCCTACACCACG-3'	6523-6542
Second PCR and sequencing	Antisense	2 ^a 1a-ISV3-AS	5'-TACTGACCGTYGACCATGAC-3'	7569-7560
	Sense	2 ^a 1a-ISV3-S	5'-ATCCCTCCCATATAACAGCAG-3'	6871-6891
PePHD-1b				
RT and first PCR	Antisense	1 ^a 1b-PePHD-AS	5'-CGCAGAAGAACACRAGRAAGGAG-3'	2627-2649
First PCR	Sense	1 ^a 1b-PePHD-S	5'-CCATACAGRCTYTGCCACTACC-3'	2163-2184
Second PCR	Antisense	2 ^a 1b-PePHD-AS	5'-ACRGACGCGYGCATTGAG-3'	2605-2589
	Sense	2 ^a 1b-PePHD-S	5'-AAGGTYAGGATGTATGTGGG-3'	2211-2230

^a Nucleotide positions are according to prototypes HCV-J (genotype 1b) and HCV-1 (genotype 1a).

(16, 31, 32); however, the results of different studies are conflicting because this region is highly conserved (2, 5, 13, 18, 38).

It has been speculated that mutations in the functional regions of the HCV proteins may be correlated with the response to IFN therapy, but few studies have been made of combine peg-IFN- α and RBV therapy, and what results are available are contradictory, possibly due to geographical factors. Furthermore, few studies exist that include all regions involving IFN activity, and little has been published on correlating the predictive factors of the response to the treatment with the genetic variability of these genome regions. We also examined the sequences not only in SVR and NR patients but also in patients showing RVR. In this paper, we report the results of an extensive analysis of the pretreatment amino acid substitutions in the E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR, and NS5A-V3 and flanking regions and their correlation with factors to predict responses to peg-IFN- α plus RBV therapy in patients with genotype 1. We also analyzed changes in the sequence motif during therapy for 18 patients.

MATERIALS AND METHODS

In this prospective study, 60 patients infected with HCV genotype 1 were treated with peg-IFN- α -2a (180 μ g/week) and RBV (1,000 to 1,200 mg/day) for 48 weeks. The diagnosis of CHC was based on raised aminotransferase levels for at least 6 months, biopsy-proven CHC, and the permanent detection of serum HCV-RNA. Individual data were collected on baseline clinical, biochemical, virological, and histological parameters. Finally, HCV-RNA analysis was performed at 4, 12, 24, 48, and 72 weeks. The histologic study was carried out in accordance with Scheuer's grading of necroinflammatory activity, with slight modifications (4). The patients showed no evidence of hepatitis B virus-infected, alcoholic, autoimmune, or drug-induced liver disease.

Patients who obtained normalization of alanine aminotransferase levels and HCV-RNA clearance for more than 6 months after therapy were considered as presenting SVR ($n = 36$; 60%). At week 12, 52 (87%) patients presented EVR (HCV-RNA negative or had a $\geq 2 \log_{10}$ decrease in viral load). Patients without EVR (non-EVR) were considered nonresponders (NR; $n = 8$). Also, patients who became HCV-RNA negative during a course of therapy but then relapsed and redeveloped HCV-RNA after stopping treatment ($n = 16$; 27%) were considered NR ($n = 24$). Finally, in 40 patients we studied who had RVR at 4 weeks, 21 (53%) patients were HCV-RNA negative. The sequences of the NS5A-PKRBD (codons 2209 to 2274, including the ISDR [codons 2209 to 2248]), NS5A-V3 (codons 2356 to 2379), and flanking regions for the dominant variant of HCV were determined for the pretreatment sera of 60 patients. These

sequences were also analyzed for the treatment and posttreatment serum samples of 18 patients in order to identify changes in the sequence motif during therapy. In addition, the sequences of the E2-PePHD region (codons 659 to 670) and 5' flanking region (codons 629 to 658) were determined for 23 patients with HCV genotype 1b.

Informed consent to participate was obtained from each patient. The study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Helsinki Declaration, and prior approval for the study was obtained from the ethics committee.

Virologic assays. The virus genotype was determined by reverse hybridization (Inno-LIPA II HCV; Innogenetics, S.A., Ghent, Belgium). HCV-RNA was determined for sera with the Amplicor HCV kit. HCV-RNA serum levels were measured by the Cobas Amplicor monitor HCV test version 2.0.

Amplification and sequencing of NS5A and E2-PePHD. HCV-RNA was extracted from 200 μ l of the pretreatment serum samples by means of the High Pure Viral RNA kit (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany). Isolated HCV-RNA was reverse transcribed by using avian myeloblastosis virus (Reflactase; Activ Motif) and 20 U of RNasin (Promega) at 42°C for 1 h in the presence of antisense primer (1 μ M) (Table 1). For the nested PCR, we used Brilliant Sybr green QPCR master mix (Stratagene) in an Mx3000 thermocycler (Stratagene). The first PCR mixture consisted of 12.5 μ l of the master mix, a sense and an antisense primer (0.25 μ M) (Table 1), 0.3 μ l of ROX (reference fluorescent dye), and 4 μ l of cDNA; 1 μ l of the first PCR mixture was used for the second PCR, and diethyl pyrocarbonate H₂O was added to obtain a final volume of 25 μ l. To analyze the NS5A region and the PePHD region, two PCRs were conducted, the first consisting of 1 cycle at 95°C for 10 min; 33 cycles at 95°C for 30 s (30 cycles for PePHD), 60°C for 30 s (58°C for PePHD), and 72°C for 65 s (50 s for PePHD); and 1 cycle at 72°C for 8 min. The second PCR was conducted in the same way as the first PCR, except for an annealing phase at 58°C for 50 s for elongation. The samples were subjected to a cycle of denaturation to visualize the dissociation curve. The size, purity, and approximate yield of the DNA obtained were verified by direct observation of 2% agarose gels. For sequencing, we used the Terminator Big Dye 3.1 (Aplay BioSystems) within a 3100 genetic analyzer (Aplay BioSystems). Between 10 ng and 40 ng of purified DNA (NucleoSpin extract; Macherey-Nagel) and 6.4 pM of sequence primer (Table 1) were added to obtain a 10- μ l final volume. Analysis of the chromatograms was by means of Chromas Lite software (<http://technelysium.com.au>).

Sequence analysis. NS5A and PePHD were aligned to the following reference sequences: HCV-J (GenBank accession number D90208) for genotype 1b (19) and HCV-1 (GenBank accession number M62321) for genotype 1a (6). The most common amino acid at each position of this study was taken as the consensus sequence. The factors associated with the mutations in each of the regions were studied, taking into account the median of the number of mutations in each region and distributing, in this way, the population of each region into two groups of similar size (ISDR, with and without mutations; PKRBD, $>$ or ≤ 4 mutations; V3, $>$ or ≤ 5 mutations). This allowed us to determine major statistical significances.

Phylogenetic analysis. The phylogenetic tree of the NS5A region (codons 2191 to 2405) of the 60 sequences of all patients was constructed by the Clustal W

TABLE 2. Baseline characteristics of patients and predictive factors of different types of responses to peg-IFN plus RBV therapy^a

Patients	Age (yr)		Sex		Epidemiology ^b				Genotype		Viral load		
	≤40	>40	Male	Female	Parenteral	Non-parenteral	ALT (IU/liter)	AST (IU/liter)	GGT (IU/liter)	1a	1b	≤600,000	>600,000
All (<i>n</i> = 60)	30 (50)	30 (50)	34 (57)	26 (43)	46 (84)	9 (16)	117 ± 92	68 ± 67	74 ± 63	13 (22)	47 (78)	12 (20)	48 (80)
RVR (<i>n</i> = 21)	13 (62)	10 (42)	16 (59)	7 (39)	18 (58)	3 (33)	136 ± 115	86 ± 87	63 ± 82	8 (67)	15 (45)	4 (40)	19 (54)
Non-RVR (<i>n</i> = 19)	8 (38)	14 (49)	11 (41)	11 (61)	13 (42)	6 (67)	106 ± 67	60 ± 28	69 ± 40	4 (33)	18 (55)	6 (60)	16 (46)
EVR (<i>n</i> = 52)	27 (90)	25 (83)	31 (91)	21 (81)	42 (91)	6 (67)	113 ± 71	69 ± 41	59 ± 52	10 (77)	42 (89)	11 (92)	41 (85)
Non-EVR (<i>n</i> = 8)	3 (10)	5 (17)	3 (9)	5 (19)	4 (9)	3 (33)	146 ± 183	107 ± 137	123 ± 116	3 (23)	5 (11)	1 (8)	7 (15)
SVR (<i>n</i> = 36)	22 (73) ^{d,e}	14 (47)	22 (65)	14 (54)	29 (63)	4 (44)	116 ± 98	72 ± 42	55 ± 41	9 (69)	27 (57)	9 (75)	27 (56)
NR (<i>n</i> = 24)	8 (27)	16 (53)	12 (35)	12 (46)	17 (37)	5 (56)	173 ± 112	53 ± 17	52 ± 35	4 (31)	20 (43)	3 (25)	21 (44)

^a Data are expressed as means ± standard deviations or as numbers of patients with percentages in parentheses. Comparisons between groups were made by the χ^2 or Fisher exact test for the categorical variables and the Student *t* test for the quantitative variables. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant. The variables included in the multivariate analysis were age, epidemiology, viral load, PKRBD mutations, and ISDR mutations.

^b ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; GGT, gamma glutamyltransferase.

^c Scheuer's grading of necroinflammatory activity, with slight modifications. Activity grade is periportal inflammation (score, 0 to 4) plus intralobular degeneration and focal necrosis (score, 0 to 4); the total score for activity could range from 0 to 8. Fibrosis stages are no fibrosis (0), periportal fibrous expansion without septum formation (1), periportal fibrous expansion with some septum formation (2), periportal fibrous expansion with septum formation (3), and cirrhosis (4).

^d Statistically significant difference between the values for SVR and NR patients (*P* = 0.03).

^e Logistic regression analysis of the values for SVR patients yielded an odds ratio of 3.2, a 95% confidence interval of 1 to 10.3, and a *P* value of 0.056.

^f Statistically significant difference between the values for EVR and non-EVR patients (*P* = 0.037).

^g Statistically significant difference between the values for SVR and NR patients (*P* = 0.001).

^h Logistic regression analysis of the values for SVR patients yielded an odds ratio of 9.9, a 95% confidence interval of 1.9 to 50.3, and a *P* value of 0.006.

method (36a). The sequences in FASTA format were pasted into the submission form (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), and the output obtained was represented by a phylogenetic tree.

Statistical analysis. The quantitative variables are expressed as means ± standard deviations. Comparisons between groups were made by the χ^2 or Fisher exact test for categorical variables and the Student *t* test for quantitative variables. Multivariate analysis was done by discriminant analysis by the stepwise forward selection method. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Baseline characteristics of patients and different responses to peg-IFN plus RBV therapy. The general characteristics of the patients prior to therapy with different responses to combined therapy (SVR [SVR, *n* = 36; NR, *n* = 24], EVR [EVR, *n* = 52; non-EVR, *n* = 8], and RVR [RVR, *n* = 21; non-RVR, *n* = 19]) are summarized in Table 2. The sequences were aligned with the reference strands (HCV-J for genotype 1b and HCV-1 for genotype 1a) (Fig. 1, 2, and 3). We did not find any predictive factors of RVR (4 weeks). With respect to EVR, 19 patients (100%) who presented >4 mutations in the PKRBD region had EVR (*P* = 0.037). The only factors associated with SVR were an age of ≤40 years and the presence of >4 mutations in the PKRBD region. In the ISDR, the difference was almost statistically significant. Nevertheless, when the average mutations in the ISDR were determined, there was a statistically significant difference between SVR and NR (1.41 ± 1.46 mutations versus 0.58 ± 0.65 mutations, respectively; *P* = 0.005). In the logistic regression analysis, >4 mutations in the PKRBD and ages of ≤40 years were independent factors of SVR (Table 2); this does not preclude the possibility that both variables correlate to biological factor affecting the viability or fitness of the virus in the organism and therefore to the viral load. If the sequences were aligned with the consensus sequence, only the PKRBD region would be related to SVR (79.2% of the NR had ≤1 mutation and 58.3% of the SVR patients had >1 mutation; *P* = 0.004) (Fig. 1 and 3A). The V3 region had a very high genetic variability (Fig. 2 and 3B) but was not related to SVR (Table 2). The sequence of the E2-

PePHD was determined for 23 patients with genotype 1b (19 EVR, 4 non-EVR, 11 SVR, and 12 NR). This region was well conserved. Two patients with one mutation had EVR, and later, they were viral RNA positive. Twenty-one patients had the wild type, which is why we did not continue sequencing this region. In the 5' flanking region of E2-PePHD, 9 of 23 patients (5 SVR and 4 NR) had >6 mutations, but this fact was not statistically significant.

When we compared patients with SVR (*n* = 36) and relapsers (*n* = 16), the predictive factors of SVR were ages of <40 years (*P* = 0.04) and >4 mutations in the PKRBD (*P* = 0.001) as before; also, the differences in viral load were almost statistically significant (*P* = 0.07).

Analysis of factors associated with mutations in the NS5A-PKRBD. All patients presented amino acid substitutions in the PKRBD region when the sequences were aligned with the reference strands (Fig. 1 and 3A). Ninety-two percent of the women (*P* < 0.0001) and 79% of the patients with viral loads of >600,000 IU/ml (*P* = 0.006) were related with ≤4 mutations (Table 3). On examining the consensus sequence and considering the number of mutations, the women had less variability (77% of women with ≤1 mutation versus 41% of men with ≤1 mutation; *P* = 0.006). Moreover, the patients with low viral loads had more mutations (75% of patients with viral loads of ≤600,000 IU/ml with >1 mutation versus 25% of patients with viral loads of ≤600,000 IU/ml with ≤1 mutation; *P* = 0.016).

Analysis of factors associated with mutations in NS5A-ISDR and the flanking region. In the ISDR, 38 patients (63%) had genetic variability and 22 (37%) had a prototype ISDR sequence. When the sequences were aligned with the reference strands, the patients aged ≤40 years, the men, and those with viral loads of ≤600,000 IU/ml presented high genetic variability (Table 3). With respect to the consensus sequence, 65% (22/34) of the men presented mutations, whereas 62% (16/26) of the women did not (*P* = 0.039), and the patients with low viral loads had more mutations in this region (92% with mutations versus 8% without mutations; *P* = 0.003).

TABLE 2—Continued

Activity grade ^c	Fibrosis stage ^c	PKRBD mutations		ISDR mutations		V3 mutations		PePHD mutations (n = 23)	
		≤4	>4	Without	≥1	≤5	>5	Without	1
4 ± 2.2	2.1 ± 1.1	41 (68)	19 (32)	22 (37)	38 (63)	39 (65)	21 (35)	21 (91)	2 (9)
3.89 ± 2.68	2.00 ± 1.19	15 (50)	8 (53)	8 (47)	15 (54)	12 (41)	11 (69)	9 (45)	1 (50)
4.63 ± 1.98	2.44 ± 1.29	15 (50)	7 (47)	9 (53)	13 (46)	17 (59)	5 (31)	11 (55)	1 (50)
4.05 ± 2.3	2.07 ± 1.1	33 (80)	19 (100) ^f	17 (77)	35 (92)	33 (85)	19 (90)	17 (81)	2 (100)
3.67 ± 1.8	2.29 ± 0.44	8 (20)	0 (0)	5 (23)	3 (8)	6 (15)	2 (10)	4 (19)	0 (0)
4.3 ± 2.2	2 ± 1.1	19 (46)	17 (89) ^{g,h}	10 (45)	26 (68)	21 (54)	15 (71)	11 (52)	0 (0)
4 ± 2.4	2.1 ± 0.7	22 (54)	2 (11)	12 (55)	12 (32)	18 (46)	6 (29)	10 (48)	2 (100)

In the 5' flanking region (codons 2191 to 2208), 83% (50/60) of the patients did not present mutations, and statistically significant differences were found only with genotypes (genotype 1a, 31% of patients without mutations and 69% with mutations; genotype 1b, 98% of patients without mutations and 2% with mutations; *P* < 0.0001).

Analysis of factors associated with mutations in NS5A-V3 and the flanking region. In the V3 region, when the sequences were aligned with the reference strands, the only factor associated with the number of mutations was gender (Table 3). When the sequences were aligned with the consensus sequence, only the genotype was statistically significant (for genotype 1a, 92% of patients presented >3 mutations (median); for genotype 1b, 64% of patients presented <3 mutations; *P* < 0.0001) (Fig. 2 and 3B).

The flanking regions, preV3 (codons 2275 to 2355) and postV3 (codons 2380 to 2405), were notable for their lack of homology between genotypes 1a and 1b. As happened with the V3 region consensus, the patients with genotype 1a had a greater number of mutations in both regions than the patients

with genotype 1b (preV3 region, *P* = 0.013; postV3 region, *P* = 0.025) (data not shown). We have not found a correlation between the number of mutations in these regions (preV3 and postV3) and the response to the treatment (data not shown).

Evolutionary study. We analyzed the genetic variability of the different regions of NS5A before, during, and after therapy to determine the selection of treatment-resistant viral subpopulations in 18 patients (3 SVR, 15 NR) (Table 4). Because of a rapid decrease in the viral loads in responders, sequence data were available for three patients undergoing therapy, who were sampled during the first month of treatment, but no consistent change was detected in the PKRBD, V3, or flanking regions. Serum samples from 15 NR patients from the first month of treatment and posttreatment were sequenced, and statistically significant differences were found between the number of mutations from the first month of treatment and the number of posttreatment mutations in the V3 and flanking regions (*P* = 0.05) (Table 4).

Phylogenetic analysis. The NS5A region has been used to make the phylogenetic tree (codons 2191 to 2405) using 60

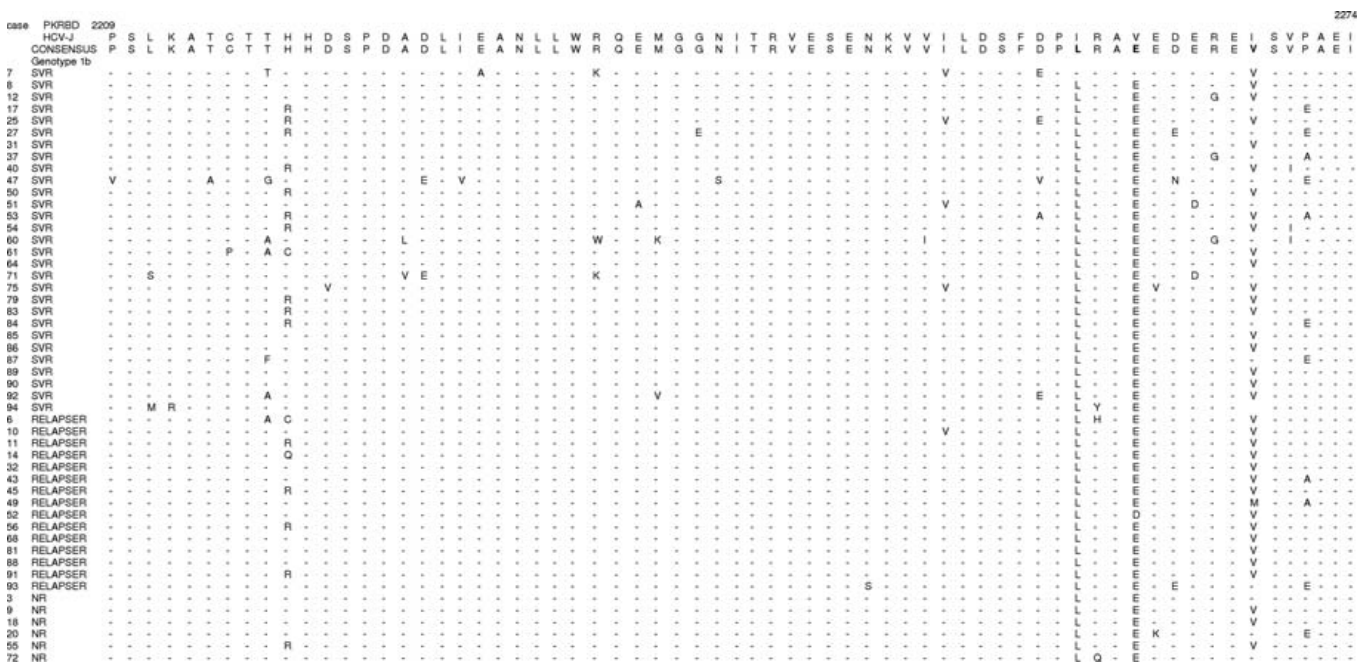


FIG. 1. Major PKRBD sequences in genotype 1b-infected patients. Each sequence was compared to the HCV-J 1b prototype sequence and consensus sequence. The positions of the first and last amino acids of the PKRBD in the HCV polyprotein are indicated over the HCV-J sequence. Each patient is designated by a number and response to treatment.

case	V3 region	2356																				2379				
		G	S	S	A	V	D	S	G	T	A	T	G	P	P	D	Q	A	S	D	D		G	D	K	G
	HCV-J	E	S	S	A	V	D	S	G	T	A	T	G	P	P	D	Q	A	S	D	D	G	D	K	G	
	CONSENSUS	E	S	S	A	V	D	S	G	T	A	T	G	P	P	D	Q	A	S	D	D	G	D	K	G	
	Genotype 1b																									
7	SVR	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	A	-	-	G	-	V	-	-	V	-	L	-	-	
8	SVR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	E	G	-	-	A	-	
12	SVR	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	T	H	-	-	P	-	V	-	-	-	T	-	
17	SVR	E	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	P	-	-	-	-	G	T	-	
25	SVR	E	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	P	-	S	-	-	-	A	-	
27	SVR	E	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	P	-	-	-	-	G	A	-	
31	SVR	E	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	A	-	S	-	-	P	P	-	T	-	-	T	-	
37	SVR	E	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	
40	SVR	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	G	-	S	-	-	-	-	-	A	-	
47	SVR	E	P	-	A	T	-	-	A	-	-	-	A	-	-	-	-	P	-	G	-	-	-	A	-	
50	SVR	E	-	-	G	-	-	-	-	-	-	S	A	-	-	-	-	P	I	I	-	-	-	T	-	
51	SVR	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	S	-	-	-	P	-	-	A	-	-	T	-	
53	SVR	-	-	-	-	A	N	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	N	-	-	G	A	E	
54	SVR	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	A	-	
60	SVR	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	P	-	-	-	-	G	T	-	
61	SVR	E	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	P	-	S	-	-	-	T	-	
64	SVR	E	T	-	-	-	-	-	-	-	-	S	A	S	-	-	-	P	-	-	-	-	-	T	-	
71	SVR	-	-	-	-	A	N	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	A	-	
75	SVR	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	A	-	
79	SVR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	T	R	
83	SVR	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	L	-	-	N	-	-	A	-	
84	SVR	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	P	-	-	-	-	G	T	-	
85	SVR	E	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	A	-	
86	SVR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	S	-	-	-	-	G	A	-	
87	SVR	D	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	P	-	-	-	-	G	T	-	
89	SVR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	A	S	-	-	-	P	-	N	-	-	-	A	-	
90	SVR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	
92	SVR	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	
94	SVR	-	-	T	-	A	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	T	-	-	N	-	-	A	-	
6	RELAPSER	K	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	A	-	
10	RELAPSER	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	S	P	-	-	-	-	A	-	
11	RELAPSER	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	P	-	S	-	-	-	A	-	
14	RELAPSER	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	A	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	A	R	
32	RELAPSER	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	P	-	-	H	D	-	T	-	
43	RELAPSER	E	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	T	-	-	-	-	G	A	-	
45	RELAPSER	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	P	-	S	-	-	-	A	-	
49	RELAPSER	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	P	-	I	-	-	-	Q	E	
52	RELAPSER	E	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	P	-	-	-	-	G	T	-	
56	RELAPSER	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	P	-	S	-	-	-	I	-	
68	RELAPSER	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	A	-	-	-	-	P	-	N	-	-	-	T	-	
81	RELAPSER	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	L	F	A	-	D	G	T	-	
88	RELAPSER	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	E	T	-
91	RELAPSER	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	L	-	-	P	-	-	-	-	G	A	-	
93	RELAPSER	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	T	-	
3	NR	E	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	P	-	-	-	-	G	A	-	
9	NR	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	P	-	G	-	-	-	A	-	
18	NR	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	L	P	P	-	N	-	-	-	T	-	
20	NR	E	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	A	-	
55	NR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	V	-	-	-	-	G	A	-	
72	NR	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	L	P	-	-	-	-	T	-	

FIG. 2. Major V3 sequences in genotype 1b-infected patients. Each sequence was compared to the HCV-J 1b prototype sequence and consensus sequence. The positions of the first and last amino acids of the V3 domain in the HCV polyprotein are indicated over the HCV-J sequence. Each patient is designated by a number and response to treatment.

sequences from all of the patients. Patients are listed by patient number, genotype, treatment response, and gender (Fig. 4). No clustering occurred by treatment response or gender. However, the patients were clustered by genotype, as was to be expected.

DISCUSSION

In the present study, we set out to determine whether the numbers of mutations in the E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR, and NS5A-V3 regions isolated from the pre-

treatment serum samples of chronically infected patients with genotype 1 treated with peg-IFN- α -2a and RBV were correlated with the RVR and final outcome. The majority of the previous studies were done with a notably lower number of patients than the number of patients used in this study ($n = 60$) and using other treatments like IFN monotherapy or standard IFN and ribavirin. In addition, we sought to correlate the predictive factors of virologic response, such as age, gender, genotype, viral load, and EVR, with the genetic variability of the virus in these regions.

We know that other regions exist that have been less widely

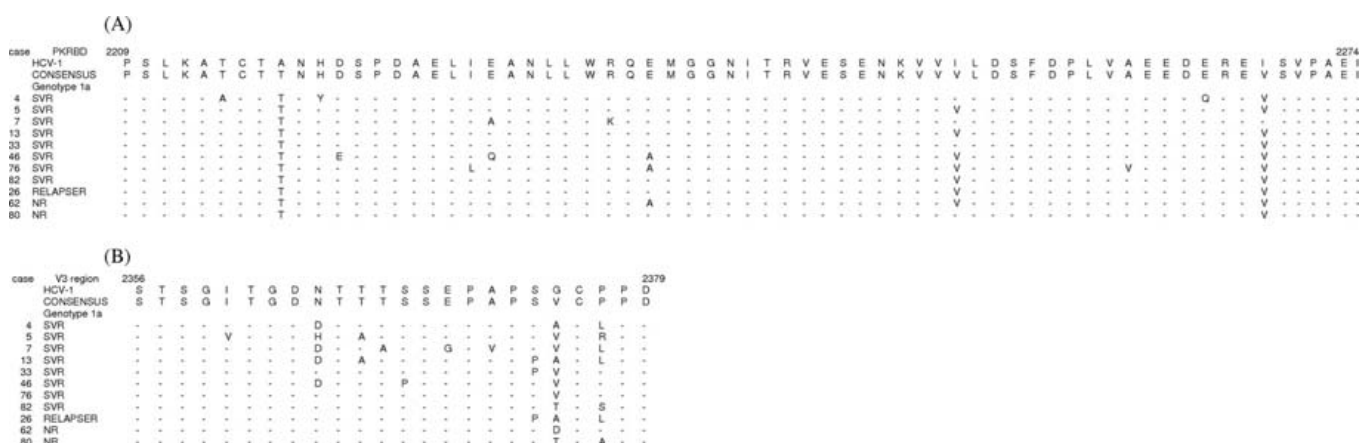


FIG. 3. Major PKRBD sequences (A) and V3 sequences (B) in genotype 1a-infected patients. Each sequence was compared to the HCV-1 1a prototype sequence and consensus sequence. The positions of the first and last amino acids of the PKRBD domain and V3 domain in the HCV polyprotein are indicated over the HCV-1 sequence. Each patient is designated by a number and response to treatment.

investigated, such as the polymorphisms in the RNA viral 5' region (IRES). This region has been studied in relation to the response to treatment with IFN. Nevertheless, in several studies, no significant difference between the polymorphisms in this region and the response to IFN was found (34, 36).

As we found mutations in relation to HCV-J and HCV-1 that occurred repeatedly in all our patients, we decided to perform a consensus sequence with all the patients participating in this study. These mutations have been demonstrated in other reference sequences (37). This suggests that it is reasonable to use the consensus sequences to assess the substitutions in NS5A, but when the sequences were aligned with the consensus strand, we obtained results similar to those with the reference strand.

It has been suggested that the NS5A protein plays a role in HCV-RNA replication. It has also been demonstrated that the number of mutations in the ISDR regulates the replication of

replicons in vitro (21). It is likely that specific amino acid variations within the NS5A regions that modulate HCV-RNA replication are important for the antiviral response to IFN- α .

The inhibition of the antiviral activity of IFN by NS5A has been shown in vitro in NS5A/PKR interaction via an NS5A-specific PKRBD (10, 12) and in mammalian cells using encephalomyocarditis virus and vesicular stomatitis virus (11). However, an inconsistent association between this in vitro interaction and the clinical response has also been reported (28). In this work, multivariate analysis revealed that the presence of >4 mutations in the PKRBD was only an independent factor associated with SVR and EVR to combination therapy. Previous papers have also reported a positive correlation between the number of mutations and SVR in this region (2, 24, 33). However, there are only a few studies in which such relationships have not been found (20, 22); these studies either investigated only genotype 1a patients (22) or performed the statis-

TABLE 3. Factors associated with mutations in NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR, and NS5A-V3^a

Region and mutations	Age (yr)		Sex		Genotype		Viral load (IU/ml)	
	≤40 (n = 30)	>40 (n = 30)	Male (n = 34)	Female (n = 26)	1a (n = 13)	1b (n = 47)	≤600,000 (n = 12)	>600,000 (n = 48)
PKRBD								
≤4	19 (63)	22 (73)	17 (50)	24 (92) ^d	9 (69)	32 (68)	3 (25)	38 (79)
≤4	11 (37)	8 (27)	17 (50)	2 (8)	4 (31)	15 (32)	9 (75) ^e	10 (21)
ISDR								
Without	7 (23)	15 (50)	9 (27)	13 (50)	2 (15)	20 (43)	1 (8)	21 (44)
With	23 (77) ^b	15 (50)	25 (73) ^c	13 (50)	11 (85) ^f	27 (57)	11 (92) ^h	27 (56)
V3								
≤5	19 (63)	20 (67)	17 (50)	22 (85) ^e	10 (77)	29 (62)	8 (67)	31 (65)
≤5	11 (37)	10 (35)	17 (50)	4 (15)	3 (23)	18 (38)	4 (33)	17 (35)

^a Data are expressed as numbers of patients with percentages in parentheses. Comparisons between groups were made by the χ^2 or Fisher exact test for the categorical variables. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

^b Statistically significant difference (*P* = 0.03).

^c Statistically significant difference (*P* = 0.05).

^d Statistically significant difference (*P* = 0.0001).

^e Statistically significant difference (*P* = 0.0001).

^f Statistically significant difference (*P* = 0.06).

^g Statistically significant difference (*P* = 0.006).

^h Statistically significant difference (*P* = 0.021).

TABLE 4. Treatment and posttreatment sequence changes^a

Region and treatment	SVR (<i>n</i> = 3)	NR (<i>n</i> = 15)
PKRBD region		
Baseline	4.67 ± 0.57	3.8 ± 0.86
First-mo treatment	4.67 ± 0.57	4 ± 1
Posttreatment		4.38 ± 1.68
V3 and flanking region		
Baseline	11.33 ± 2.3	11.67 ± 1.67 ^b
First-mo treatment	11.67 ± 2.0	10.83 ± 2.25 ^c
Posttreatment		13.29 ± 0.56

^a Data are expressed as means ± standard deviations. Comparisons between groups were made by the Student *t* test for the quantitative variables. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

^b Posttreatment versus basal value differences were statistically significant (*P* = 0.06).

^c Posttreatment versus first-month treatment value differences were statistically significant (*P* = 0.05).

tical analysis with the remaining portion of the PKRBD located downstream from the ISDR (26 amino acids) (20). A high level of significance for this correlation was observed when the analysis was restricted to nonconserved amino acid variations (33); this was found, too, with genotype 3 patients (15). Our data back the idea that the PKRBD and not the ISDR alone is a functional domain of NS5A and may produce resistance or sensitivity to IFN therapy.

It has been reported that a subset of genotype 1 patients who had RVR (undetectable serum HCV-RNA levels of <29 IU/ml) at 4 weeks of treatment achieved SVR (89%) with only 24 weeks of peg-IFN and ribavirin treatment and that data at 12 weeks are good for predicting NR (42). It is easier to routinely determine HCV-RNA and viral loads rather than sequence

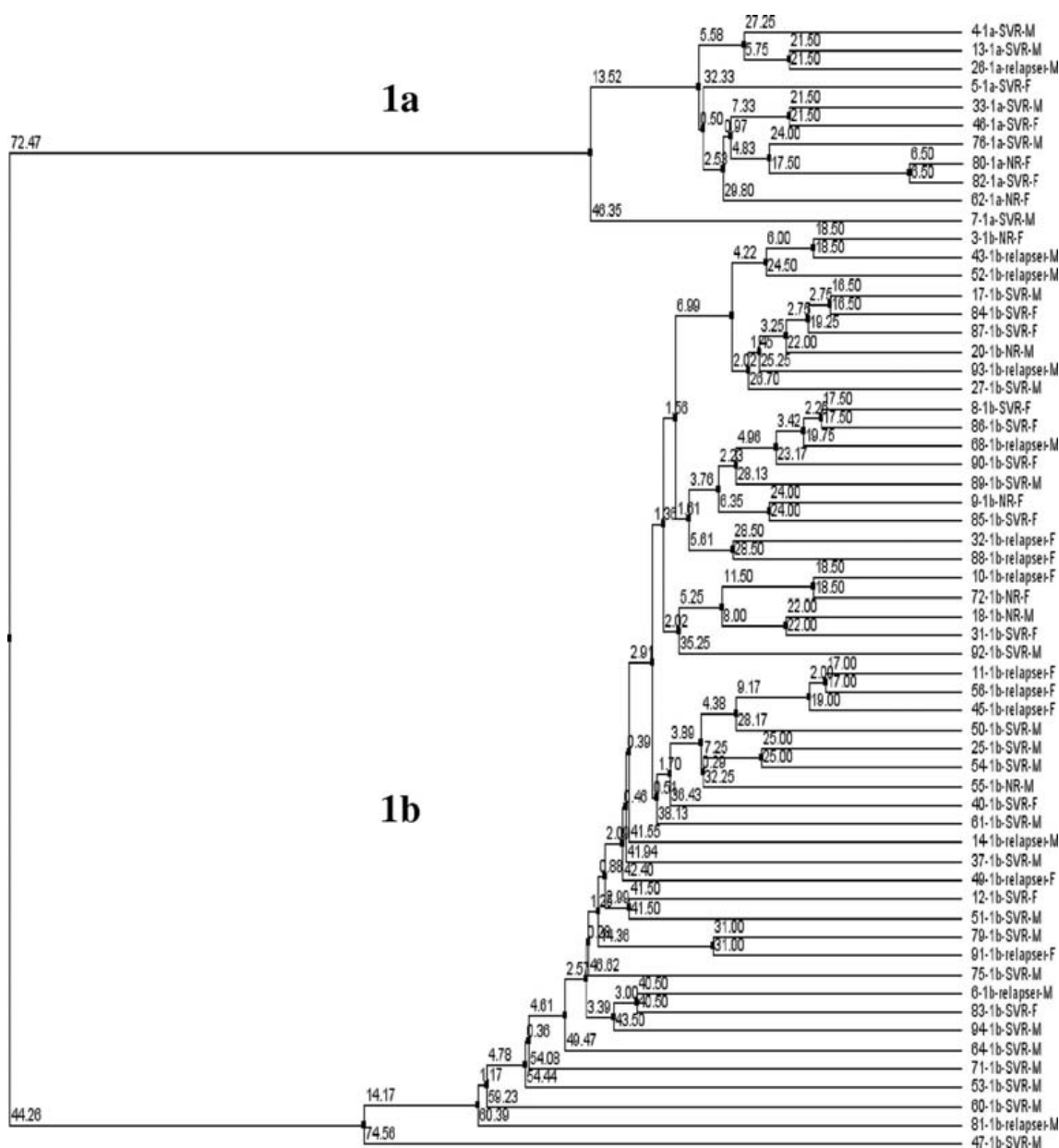


FIG. 4. Phylogenetic tree of the NS5A region in 60 patients. Genotype (1b and 1a), treatment response, and sex (M, male; F, female) are stated for all patients.

HCV, but the objective of this work was to study the importance of genetic variability in relation to viral response. This type of study (analysis of genomic viral sequences) can have many future repercussions with progressive cost reduction and easy use of sequencing technologies. Therefore, we think that in a not very distant future, the genetic sequence might apply in the clinical routine, facilitating a more personalized follow-up of patients. Nevertheless, we did not find any predictive factors for RVR.

In the present study, women presented less variability than men in the PKRBD. Likewise, patients with high viral loads presented fewer mutations in the PKRBD region than those with low viral loads. The fact that 100% of the patients who have >4 mutations in the PKRBD region presented EVR is important.

The ISDR is useful as a predictive marker of the response to IFN therapy for patients with a Japanese-specific subtype (HCV-J) (8, 25, 40), but similar correlations were not observed in studies conducted in Europe and the United States (13, 26, 41). Nevertheless, a meta-analysis of 655 Japanese and 525 European patients that focused on geographical differences (27) concluded that there was a significant positive correlation between the number of ISDR mutations and the SVR rate, irrespective of geographical region, although the likelihood of SVR with each additional mutation within the ISDR was considerably more pronounced for the Japanese patients than for the European patients. In our study, the existence or absence of mutations in the ISDR was not correlated with SVR (Table 2). Nevertheless, the patients with more mutations were correlated with a greater response to treatment (1.41 ± 1.46 mutations for SVR patients versus 0.58 ± 0.65 mutations for NR patients; $P = 0.005$). Enomoto et al. (8) found a significant positive correlation between the number of ISDR mutations and the SVR rate, when considering three groups of patients: wild type (0 mutations), intermediate type (1 to 3 mutations), and mutant type (>4 mutations). In our cases, only 7% of the patients were mutant type, whereas 57% were intermediate type and 37% wild type, as has been found in other European studies. Interestingly, we found that predictive factors of SVR, such as ages of ≤ 40 years and viral loads of $\leq 600,000$ IU/ml, were correlated significantly with a higher number of mutations in the ISDR.

Studies of the V3 domain have revealed that responsiveness to IFN/RBV therapy is correlated with mutations (7, 26, 30, 33). In the present study, no correlation was found between the number of mutations in the V3 and flanking regions and treatment response. The number of mutations in the V3 region was only correlated with gender, with women presenting fewer mutations. We have not found a correlation between the mutations in the flanks and V3 region and the possible cooperation with the PKRBD to influence the response to treatment. We believe that this can be possible, but we think that a major number of sequences are needed to be able to demonstrate these facts.

In the present study, women presented less variability in the PKRBD and V3 regions. We do not have a clear explanation for this result. Nevertheless, we found a paper (39) for which it was found that females and males have different numbers of mutations in their pretreatment sequences. However, there are very few cases, and they have not been studied. At first, we

thought that the variability could be due to a more aggressive immune response in men than women. Another possibility is that men generate more radical oxygen species in cells, causing more viral mutations. In any case, we believe that it is an interesting finding that needs more study.

The present study shows that PePHD was highly conserved, and thus, only 2 NR patients had one mutation, this being corroborated by other studies. There are no significant correlations between the substitutions in PePHD and the response to IFN therapy (2, 5, 13, 18, 32, 38). Nevertheless, the flanking region of PePHD (the N-terminal variable region in the C-terminal part of E2) correlates with both the response to IFN monotherapy and viral load (38). We did not find these correlations in the flanking region. Attempts have also been made to correlate substitutions in PePHD with hepatocellular carcinoma (1, 14). Further studies on the correlation of substitutions of PePHD with the clinical aspects of chronic HCV infection are needed.

In the evolutive study (Table 4), we observed for the NR patients that the PKRBD region did not present significant changes so that the dominant quasispecies of the pretreatment were persistent during treatment. We think that IFN will be an important selective agent for the present quasispecies and that these could change the composition of the viral population. Nevertheless, most of our patients from the evolutionary study (15 of 18) were NR, from which we found some viral populations that finally resisted the pressure of IFN. In the V3 and flanking regions, we found a statistically significant increase in mutations between the first month of treatment and 6 months posttreatment. It is possible that important modifications in the number of mutations or of changes in concrete positions in the V3 region could modify the structure of certain functional domains as the PKRBD and ISDR. Nevertheless, we consider that this region alone does not play an important role in the treatment outcome.

We think that specific mutations, not just the total number of mutations, can be sufficient to impede the PKRBD's interaction with PKR. Because of this, some authors (21) have proposed different amino acids (2209, 2216 and 2227) whose substitutions might be associated with a high rate of response. In our study, only one patient with an SVR presented substitutions in amino acids 2209 and 2216. Likewise, we believe that the substitution of such amino acids as proline, which breaks the alpha helix in the protein structure, means a drastic change in the structure and function of the protein. Nevertheless, in our study, we found only one change of this type (proline), and it corresponded to a patient with a response. In the same way, we think that a change in an amino acid's group (hydrophobic, polar, acidic, and basic) presupposes an alteration of function and structure. We have analyzed changes in the groups of amino acids (data not shown) which are very similar to those that we show in this paper. These results have not been given in this paper because we think that the identification of important positions and/or concrete substitutions of amino acids that alter function requires the analysis of more patients or sequences to obtain trustworthy conclusions.

In summary, our results concerning the ISDR are generally in line with those reported in European studies. It is clear that a large cohort, divided into wild-type, intermediate-type, and mutant-type ISDR groups, needs to be analyzed to draw con-

clusions similar to those of Enomoto et al. (8). From our study of HCV genotype 1-infected patients with a strong statistical analysis method and with a big sample of the population, we established that the presence of >4 mutations in the PKRBD region of NS5A protein from pretreatment serum samples is correlated with the virologic response to peg-IFN/RBV therapy, and therefore, PKRBD sequences might be used as a prognostic guide for treating HCV-1-infected patients.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigaciones Sanitarias) grant PI03/1018, and Ciberehd is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

REFERENCES

1. Bagaglio, S., M. S. De Mitri, S. Lodrini, C. Paties, R. Cassini, G. Bianchi, M. Bernardi, A. Lazzarin, and G. Morsica. 2005. Mutations in the E2-PePHD region of hepatitis C virus type 1b in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Viral Hepat.* **12**:243–250.
2. Berg, T., A. Mas Marques, M. Höhne, et al. 2000. Mutations in the E2-PePHD and NS5A region of hepatitis C virus type 1 and the dynamics of hepatitis C viremia decline during interferon alfa treatment. *Hepatology* **32**:1386–1395.
3. Berg, T., C. Sarrazin, E. Herrmann, et al. 2003. Prediction of treatment outcome in patients with chronic hepatitis C: significance of baseline parameters and viral dynamics during therapy. *Hepatology* **37**:600–609.
4. Caballero, T., A. Pérez-Milena, M. Masseroli, F. O'Valle, F. J. Salmeron, R. M. G. Del Moral, and G. Sanchez-Salgado. 2001. 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.* **34**:740–747.
5. Chayama, K., F. Suzuki, A. Tsubota, M. Kobayashi, Y. Arase, S. Saitoh, Y. Suzuki, N. Murashima, K. Ikeda, N. Takahashi, M. Kinoshita, and H. Kumada. 2000. Association of amino acid sequence in the PKR-eIF2 phosphorylation homology domain and response to interferon therapy. *Hepatology* **32**:1138–1144.
6. Choo, Q.-L., K. Richman, J. H. Han, K. Berger, C. Lee, C. Dong, C. Gallegos, D. Coit, A. Medina-Selby, P. J. Barr, A. Weiner, D. W. Bradley, G. Kuo, and M. Houghton. 1991. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:2451–2455.
7. Duverlie, G., H. Khorsi, S. Castelain, O. Jaillon, J. Izopet, F. Lunel, F. Eb, F. Penin, and C. Wychowski. 1998. Sequence analysis of the NS5A protein of European hepatitis C virus 1b isolates and relation to interferon sensitivity. *J. Gen. Virol.* **79**:1373–1381.
8. Enomoto, N., I. Sakuma, Y. Asahina, M. Kurosaki, T. Murakami, C. Yamamoto, Y. Ogura, N. Izumi, F. Marumo, and C. Sato. 1996. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N. Engl. J. Med.* **334**:77–81.
9. Feld, J. J., and J. H. Hoofnagel. 2005. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* **436**:967–972.
10. Gale, M., Jr., C. M. Blakely, B. Kwieciszewski, S. L. Tan, M. Dossett, N. M. Tang, M. J. Korth, S. J. Polyak, D. R. Gretch, and M. G. Katze. 1998. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol. Cell. Biol.* **18**:5208–5218.
11. Gale, M., Jr., B. Kwieciszewski, M. Dossett, H. Nakao, and M. G. Katze. 1999. Antiapoptotic and oncogenic potentials of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR protein kinase. *J. Virol.* **73**:6506–6516.
12. Gale, M. J., Jr., M. J. Korth, N. M. Tang, S. L. Tan, D. A. Hopkins, T. E. Dever, S. J. Polyak, D. R. Gretch, and M. G. Katze. 1997. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* **230**:217–227.
13. Gerotto, M., F. Dal Pero, P. Pontisso, et al. 2000. Two PKR inhibitor HCV proteins correlate with early but not sustained response to interferon. *Gastroenterology* **119**:1649–1655.
14. Gimenez-Barcons, M., S. Franco, Y. Suarez, X. Forns, S. Ampurdanes, F. Puig-Basagoiti, A. Sanchez-Fueyo, J. M. Barrera, J. M. Llovet, J. Bruix, J. M. Sanchez-Tapias, J. Rodes, and J. C. Saiz. 2001. High amino acid variability within the NS5A of hepatitis C virus (HCV) is associated with hepatocellular carcinoma in patients with HCV-1b-related cirrhosis. *Hepatology* **34**:158–167.
15. Goyal, A., W. P. Hoofmann, E. Herrmann, S. Traver, S. S. Hissar, N. Arora, H. E. Blum, S. Zeuzem, C. Sarrazin, and S. K. Sarin. 2007. The hepatitis C virus NS5A protein and response to interferon alpha: mutational analyses in patients with chronic HCV genotype 3a infection from India. *Med. Microbiol. Immunol.* **196**:11–21.
16. Gupta, R., M. Subramani, M. N. Khaja, C. Madhavi, S. Roy, C. M. Habibullah, and S. Das. 2006. Analysis of mutations within the 5' untranslated region, interferon sensitivity region, and PePHD region as a function of response to interferon therapy in hepatitis C virus-infected patients in India. *J. Clin. Microbiol.* **44**:709–715.
17. Hofmann, W. P., S. Zeuzem, and C. Sarrazin. 2005. Hepatitis C virus-related resistance mechanisms to IFN- α based antiviral therapy. *J. Clin. Virol.* **32**: 86–91.
18. Hung, C. H., C. M. Lee, S. N. Lu, J. F. Lee, J. H. Wang, H. D. Tung, T. M. Chen, T. H. Hu, W. J. Chen, and C. S. Changchien. 2003. Mutations in the NS5A and E2-PePHD region of hepatitis C virus type 1b and correlation with the response to combination therapy with interferon and ribavirin. *J. Viral Hepat.* **10**:87–94.
19. Kato, N., M. Hijikata, Y. Ootsuyama, M. Nakagawa, S. Ohkoshi, T. Sugimura, and K. Shimotohno. 1990. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:9524–9528.
20. Kmiecziak, D., L. Kruszyna, P. Migdalski, M. Lacinski, J. Juszczyk, and W. H. Trzeciak. 2006. Mutations within protein kinase R-binding domain of NS5A protein of hepatitis C virus (HCV) and specificity of HCV antibodies in pretreatment sera of HCV-chronically infected patients and their effect on the result of treatment. *Jpn. J. Infect. Dis.* **59**:92–99.
21. Kohashi, T., S. Maekawa, N. Sakamoto, M. Kurosaki, H. Watanabe, Y. Tanabe, C.-H. Chen, N. Kanazawa, M. Nakagawa, S. Kakinuma, T. Yamashiro, Y. Itsui, T. Koyama, N. Enomoto, and M. Watanabe. 2006. Site-specific mutation of the interferon sensitivity-determining region (ISDR) modulates hepatitis C virus replication. *J. Viral Hepat.* **13**:582–590.
22. Layden-Almer, J. E., C. Kuiken, R. M. Ribeiro, K. J. Kunstman, A. S. Perelson, T. J. Layden, and S. M. Wolinsky. 2005. Hepatitis C virus genotype 1a NS5A pretreatment sequence variation and viral kinetics in African American and white patients. *J. Infect. Dis.* **192**:1078–1087.
23. Lohmann, V., F. Korner, J. O. Koch, U. Herian, L. Theilmann, and R. Bartenschlager. 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**:110–113.
24. Macquillan, G. C., X. Niu, D. Speers, S. Englihs, G. Garas, G. B. Harnett, W. D. Reed, J. E. Allan, and G. P. Jeffrey. 2004. Does sequencing the PKRBD of hepatitis C virus NS5A predict therapeutic response to combination therapy in an Australian population? *J. Gastroenterol. Hepatol.* **19**: 551–557.
25. Murayama, M., Y. Katano, I. Nakano, M. Ishigami, K. Hayashi, and T. Honda. 2007. 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.* **79**:35–40.
26. Murphy, M. D., H. R. Rosen, G. I. Marousek, et al. 2002. 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.* **47**:1195–1205.
27. Pascu, M., P. Martus, M. Höhne, B. Wiedenmann, U. Hopf, E. Schreier, and T. Berg. 2004. 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* **53**:1345–1351.
28. Paterson, M., C. D. Laxton, H. C. Thomas, A. M. Ackrill, and G. R. Foster. 1999. Hepatitis C virus NS5A protein inhibits interferon antiviral activity, but the effects do not correlate with clinical response. *Gastroenterology* **117**: 1187–1197.
29. Poyard, T., M. F. Yuen, V. Ratziu, and C. L. Lai. 2003. Viral hepatitis C. *Lancet* **362**:2095–2100.
30. Puig-Basagoiti, F., X. Forns, I. Furci, S. Ampurdanes, M. Gimenez-Barcons, S. Franco, et al. 2005. 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.* **86**:1067–1075.
31. Saito, T., T. Ito, H. Ishiko, M. Yonaha, K. Morikawa, A. Miyokawa, and K. Mitamura. 2003. Sequence analysis of PePHD within HCV E2 region and correlation with resistance of interferon therapy in Japanese patients infected with HCV genotypes 2a and 2b. *Am. J. Gastroenterol.* **98**:1377–1383.
32. Sarrazin, C., M. Bruckner, E. Herrmann, B. Ruster, K. Bruch, W. K. Roth, and S. Zeuzem. 2001. Quasispecies heterogeneity of the carboxy-terminal part of the E2 gene including the PePHD and sensitivity of hepatitis C virus 1b isolates to antiviral therapy. *Virology* **289**:150–163.
33. Sarrazin, C., E. Herrmann, K. Bruch, and S. Zeuzem. 2002. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein and interferon resistance: a new model for testing the reliability of mutational analyses. *J. Virol.* **76**:11079–11090.
34. Soler, M., M. Pellerin, C. E. Malnou, D. Dhumeaux, K. M. Kean, and J.-M. Pawlowsky. 2002. Quasispecies heterogeneity and constraints on the evolution of the 5' noncoding region of hepatitis C virus (HCV): relationship with HCV resistance to interferon-alpha therapy. *Virology* **298**:160–173.
35. Taylor, D. R., S. T. Shi, P. R. Romano, G. N. Barber, and M. M. Lai. 1999. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* **285**:107–110.
36. Thelu, M.-A., E. Drouet, M.-N. Hilleret, and J.-P. Zarski. 2004. Lack of

- clinical significance of variability in the internal ribosome entry site of hepatitis C virus. *J. Med. Virol.* **72**:396–405.
- 36a. **Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignments through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673–4680.
37. **Thomson, M., M. Nascimbeni, S. Gonzales, K. K. Murthy, B. Rehmann, and T. J. Liang.** 2001. Emergence of a distinct pattern of viral mutations in chimpanzees infected with a homogeneous inoculum of hepatitis C virus. *Gastroenterology* **121**:1226–1233.
38. **Ukai, K., M. Ishigami, K. Yoshioka, N. Kawabe, Y. Katano, K. Hayashi, T. Honda, M. Yano, and H. Goto.** 2006. Mutations in carboxy-terminal part of E2 including PKR/eIF2 α phosphorylation homology domain and interferon sensitivity determining region of nonstructural 5A of hepatitis C virus 1b: their correlation with response to interferon monotherapy and viral load. *World J. Gastroenterol.* **12**:3722–3728.
39. **Veillon, P., C. Payan, H. Le Guillou-Guillemette, C. Gaudy, and F. Lunel.** 2007. Quasispecies evolution in NS5A region of hepatitis C virus genotype 1b during interferon or combined interferon-ribavirin therapy. *World J. Gastroenterol.* **13**:1195–1203.
40. **Watanabe, K., K. Yoshioka, M. Yano, M. Ishigami, K. Ukai, H. Ito, F. Miyata, T. Mizutani, and H. Goto.** 2005. 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.* **75**:504–512.
41. **Zeuzem, S., J. H. Lee, and W. K. Roth.** 1997. Mutations in the NS5A gene of European hepatitis C virus isolates and response to IFN alfa. *Hepatology* **25**:740–744.
42. **Zeuzem, S., M. Buti, P. Ferenci, et al.** 2006. Efficacy of 24 weeks treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C with genotype 1 and low pretreatment viremia. *J. Hepatol.* **44**:97–103.