

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Microbiología



**MUTACIONES EN LA REGIÓN DETERMINANTE DE SENSIBILIDAD A INTERFERÓN (ISDR) EN EL VIRUS DE LA HEPATITIS C. RELACIÓN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON INTERFERÓN PEGILADO MÁS RIBAVIRINA.**

D. Alejandro Peña Monje  
Granada, 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Alejandro Peña Monje  
D.L.: GR. 2614-2009  
ISBN: 978-84-692-3866-0

D<sup>a</sup> MARÍA DEL CARMEN MAROTO VELA, CATEDRÁTICO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal D Alejandro Peña Monje sobre el tema “Mutaciones en la Región Determinante de Sensibilidad a Interferón (ISDR) en el Virus de la Hepatitis C. Relación con la Respuesta al Tratamiento con Interferón Pegilado más 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, 11 de Junio de 2009

Fdo. D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> del Carmen Maroto Vela

D JOSE HERNANDEZ QUERO, PROFESOR TITULAR 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 Alejandro Peña Monje sobre el tema “Mutaciones en la Región Determinante de Sensibilidad a Interferón (ISDR) en el Virus de la Hepatitis C. Relación con la Respuesta al Tratamiento con Interferón Pegilado más 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, 11 de Junio de 2009

Fdo. D. Jose Hernández Quero

D. FEDERICO GARCÍA GARCÍA, PROFESOR ASOCIADO DE MICROBIOLOGÍA Y TÉCNICAS DE LABORATORIO DE LA ESCUELA UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal D Alejandro Peña Monje sobre el tema “Mutaciones en la Región Determinante de Sensibilidad a Interferón (ISDR) en el Virus de la Hepatitis C. Relación con la Respuesta al Tratamiento con Interferón Pegilado más 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, 11 de Junio de 2009

Fdo. D. Federico García García

<b>1 .- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 .- MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA VHC .....</b>	<b>5</b>
1.1.1.- ESTRUCTURA MACROMOLECULAR.....	6
1.1.2.- ESQUEMA GENÉTICO.....	6
<b>1.2 .- VARIABILIDAD GENÉTICA .....</b>	<b>13</b>
1.2.1.- DEFINICIÓN Y CONCEPTO .....	13
1.2.2.- VARIABILIDAD A LO LARGO DEL GENOMA DEL VHC .....	15
1.2.3.- GENOTIPOS, SUBTIPOS Y QUASIESPECIES DEL VHC ...	16
<b>1.3 .- EPIDEMIOLOGÍA .....</b>	<b>18</b>
<b>1.4 .- PATOGENIA Y CUADROS CLÍNICOS .....</b>	<b>20</b>
1.4.1 .- HEPATITIS AGUDA .....	21
1.4.2 .- HEPATITIS CRÓNICA .....	22
<b>1.5 .- DIAGNÓSTICO .....</b>	<b>24</b>
1.5.1 .- TESTS SEROLÓGICOS .....	25
1.5.1.1 .- Detección de anticuerpos específicos anti VHC por enzimo inmuno ensayos: test de screening inicial.....	25
1.5.1.2 .- Detección de antígenos del core del VHC.....	27
1.5.1.3 .- Detección específica de anticuerpos a través de técnicas de inmunoblots: test de confirmación diagnóstica.....	28
1.5.2 .- TESTS MOLECULARES .....	30
1.5.2.1 .- Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos basados en la Reacción de la Cadena Polimerasa (PCR).....	30
1.5.2.1.1 .- Detección cualitativa de ARN-VHC.....	30

1.5.2.1.2 .- Detección cuantitativos de ARN-VHC.....	31
1.5.2.2 .- Determinación del genotipo.....	32
1.5.2.2.1 .- Genotipado basado en PCR.....	33
1.5.2.2.2 .- Genotipado serológico .....	34

<b>1.6 .- IMPLICACIONES DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA .....</b>	<b>34</b>
1.6.1 .- EPIDEMIOLOGÍA O VARIABILIDAD GEOGRÁFICA .....	35
1.6.2 .- PATOGENICIDAD .....	37
1.6.3 .- RESISTENCIA AL TRATAMIENTO .....	38
<b>1.7 .- TRATAMIENTO.....</b>	<b>39</b>
<b>1.8 .- MECANISMOS DE RESISTENCIA A FÁRMACOS .....</b>	<b>50</b>
1.8.1 .- MECANISMOS DE RESISTENCIA AL IFN ALFA .....	50
1.8.1.1 .- Factores relacionados con el régimen de tratamiento seguido por el paciente.....	51
1.8.1.2 .- Factores relacionados con el paciente.....	52
1.8.1.3 .- Factores relacionados con el tipo y severidad de la enfermedad hepática .....	52
1.8.1.4 .- Factores relacionados con el virus.....	53
1.8.2 .- MECANISMOS DE RESISTENCIA A LA RIBAVIRINA .....	54
<b>2 .- OBJETIVOS .....</b>	<b>55</b>
<b>3 .- MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>56</b>
<b>3.1 .- POBLACIÓN DE ESTUDIO .....</b>	<b>56</b>
<b>3.2 .- MÉTODO .....</b>	<b>58</b>
3.2.1 .- EXTRACCIÓN DEL ARN DEL SUERO .....	58
3.2.1.1 .- Preparación de reactivos .....	59
3.2.1.2 .- Descripción de la técnica .....	59
3.2.2 .- AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS: REACCIÓN DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT-PCR) .....	61



3.2.2.1 .- Preparación de reactivos .....	61
3.2.2.2 .- Descripción de la técnica .....	63
3.2.3 .- ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA .....	66
3.2.3.1 .- Preparación de reactivos .....	66
3.2.3.2 .- Descripción de la técnica .....	67
3.2.4 .- SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN ISDR DEL ARN-VHC ..67	
3.2.4.1.- Descripción de la técnica .....	68
3.2.5 .- ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA .....	70
3.2.5.1 .- Descripción de la técnica .....	71
3.2.6 .- OTRAS DETERMINACIONES .....	73
3.2.7 .- METODOLOGÍA ESTADÍSTICA .....	74
<b>4 .- RESULTADOS .....</b>	<b>75</b>
<b>4.1 .- FACTORES RELACIONADOS CON LA RESPUESTA .....</b>	<b>76</b>
4.1.1.- TASA GLOBAL DE RESPUESTA .....	76
4.1.2.- RESULTADOS EN FUNCIÓN DE LA EXISTENCIA DE COINFECCIÓN VHC-VIH .....	77
4.1.2.1.- Respuesta virológica en pacientes monoinfectados en función del genotipo ... ..	78
4.1.2.2.- Respuesta virológica en pacientes coinfectados en función del genotipo .....	79
4.1.2.3.- Respuesta virológica función del subtipo .....	80
4.1.3.- RESPUESTA VIROLÓGICA EN FUNCIÓN DE LA VARIABILIDAD DE ISDR .....	80
4.1.3.1.- Variabilidad en IDSR en función al genotipo: Genotipo 1 .....	82
4.1.3.2.- Variabilidad en IDSR en función al genotipo: Genotipo 3 .....	82

4.1.3.3.- Variabilidad en ISDR en función a la coinfección por VIH .....	83
4.1.3.4.- Respuesta al tratamiento en función a la variabilidad en ISDR en pacientes coinfectados por VIH .....	84
4.1.3.5.- Respuesta al tratamiento en función a la variabilidad en ISDR y el genotipo en pacientes coinfectados por VIH .....	84
4.1.3.6.- Respuesta al tratamiento en función a la variabilidad en ISDR en pacientes mono infectados .....	88
4.1.3.7.- Re-análisis de las secuencias ISDR utilizando como referencia la cepa resistente mas prevalentes en nuestro medio.....	91
<b>4.2.- OTROS FACTORES CON POSIBLE RELACIÓN CON LA RESPUESTA: EXISTENCIA DE CIRROSIS .....</b>	<b>93</b>
<b>4.3.- FACTORES RELACIONADOS CON LA RESPUESTA: ANÁLISIS MULTIVARIADO .....</b>	<b>94</b>
<b>5.- DISCUSIÓN .....</b>	<b>95</b>
<b>6.- CONCLUSIONES .....</b>	<b>107</b>
<b>7.- BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>108</b>

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

AC: Anticuerpo

ADN: Ácido Desoxiribonucleico

Ag: Antígeno

Ag-AC: Unión Antígeno – Anticuerpo

ALT: Alaninoaminotransferas (enzima hepática)

ARN: Ácido Ribonucleico

ARN-VHC: Carga Viral (viremia) de VHC en sangre periférica

AST: Aspartato Aminotransferas (enzima hepática)

ATP: Adenosín Trifosfato

CD4+: Linfocitos CD4 en sangre periférica

CD8+: Linfocitos CD8 en sangre periférica

dATP: Deoxiadenintrifosfato

dCTP: Deoxicitosintrifosfato

ddNTP: Didesoxinucleótido

DEPC: Dietil pirocarbonato

dGTP: Deoxiguanidintrifosfato

DMSO: Dimetil-sulfóxido

dNTPs: Desoxinucleótidos

DTT: Dimetil Tritolueno

dTTP: Deoxitimidintrifosfato

EEUU: Estados Unidos

EIA: Enzimo Inmuno Análisis

ELISA: Enzimo Inmuno Análisis

FA: Fosfatasa Alcalina

GGT: Gamma Glutamil Transpeptidasa (enzima hepática)

GTP: Guanidín Trifosfato

HAI-2 : Hepatitis Autoinmune tipo II

HBs ag: Antígeno de superficie de la Hepatitis B

HCC: Hepatocarcinoma o Carcinoma Hepático

HVR: Región Hipervariable

IFN: Interferón

IFNa: Interferón alfa

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

IL: Inter Leukina

IMPDH: Inosina 5' Monofosfato Deshidrogenasa  
ISDR: Región Determinante de la Sensibilidad a Interferón (*Interferón Sensitivity Determining Region*)  
KCl: Cloruro potásico  
Kd: Kilo Dalton  
MgCl<sub>2</sub>: Cloruro magnésico  
NR: No respondedores al tratamiento  
ORF: Marco de lectura del material genético viral (*open reading frame*)  
PCR: Reacción de la Cadena Polimerasa  
PEG: poli-etilen-glicol  
PEG-IFN: Interferón Pegilado  
PKR: proteín-kinasa R  
RBV: Ribavirina  
RPR: Respuesta Viroológica Rápida  
RVF: Respuesta Viroológica Final de Tratamiento  
RVP: Respuesta Viral Precoz al tratamiento  
RVS: Respuesta Viroológica Sostenida tras la finalización del tratamiento  
TARGA: Tratamiento Antirretroviral de Alta Eficacia  
TBE: Tampón Borato EDTA  
UI/L: Unidades Internacionales por litro  
UTR: Región del material genético viral que no codifica la producción de ninguna proteína vírica (*untranslated region*)  
VHB: Virus de la Hepatitis B  
VHC: Virus de la Hepatitis C  
VHC-VIH: Coinfección por los virus VHC y VIH  
VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana  
WT: Cepa salvaje, sin cambios respecto a la cepa referencia (wild type)

## **CÓDIGOS DE NUCLEÓTIDOS:**

A: Adenina

C: Citosina

G: Guanina

T: Timina

I: Inosina

## **CÓDIGOS DE AMINOÁCIDOS:**

A: alanina

C: cisteína

D: ácido aspártico

E: ácido glutámico

F: fenilalanina

G: glicina

H: histidina

I: isoleucina

K: lisina

L: leucina

M: metionina

N: asparagina

P: prolina

Q: glutamina

R: arginina

S: serina

T: treonina

V: valina

W: triptófano

Y: tirosina

## 2 .- INTRODUCCIÓN

Hasta 1989, fecha en la que es identificado por primera vez el virus de la Hepatitis C [1], un importante volumen de enfermos afectados por inflamación hepática de origen infeccioso, quedaban sin un diagnóstico definitivo, englobándolos bajo el término, hepatitis “No A, no B”. En su mayoría eran usuarios de drogas por vía parenteral o pacientes que en algún momento fueron tratados con hemoderivados con mayor o menor frecuencia, como es el caso de los enfermos de hemofilia. Por esas fechas, no existía un tratamiento mínimamente efectivo, por lo que, su pronóstico a largo plazo en muchos casos era infausto. Estas poblaciones de riesgo, siguen representando en la actualidad, el grueso de enfermos con hepatitis crónica de origen vírico, constituyendo un importante problema de salud pública a nivel mundial, dado el porcentaje de pacientes que evolucionan a cirrosis y/o hepatocarcinoma [2-4].

Hoy en día, además hay que sumar otra variable que complica aún más la realidad de la hepatitis crónica por virus C: la enorme tasa de coinfección VIH, determinada por la presencia de infección por VHC en el 25-30% del total de la población mundial VIH positiva, cifra que es sobrepasada ampliamente el 50%, dentro de los usuarios de drogas parenterales. En España el porcentaje de coinfección asciende aún más hasta el 45-50% del total de pacientes VIH positivos (60000-80000 pacientes coinfectados VHC-VIH). Esto es debido en gran medida a la existencia de mecanismos de transmisión común a ambas enfermedades comunes, habiendo un altísimo porcentaje de adquisición simultánea de ambas infecciones [5-7] [8].

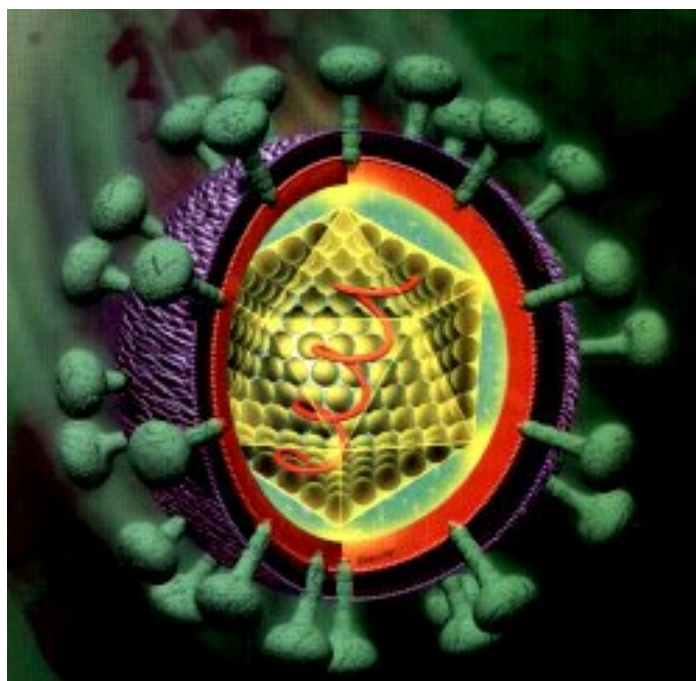
### 2.1 .- MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA VHC

Tanto el tamaño como la organización genómica del VHC guarda semejanza con la familia *Flaviviridae*, por lo que el “Internacional Commite for the Taxonomy of Viruses” los engloba dentro de dicha familia, aunque dentro de un nuevo género denominado *Hepacivirus*. (Bünchen Osmond, 2003; ICTV database, 00.026.0.01. Universal Virus Database, versión 3)

### 2.1.1 .- ESTRUCTURA MACROMOLECULAR

Se trata de un virus esférico de un diámetro de 40-60 nm aproximadamente, rodeado por una envuelta lipoprotéica y una nucleocápside icosaédrica de 25-30 nm de diámetro (core), que a su vez encierra una única molécula de ARN de cadena simple. El virión es estable in vitro en medio alcalino hasta un pH de 8 pero, sin embargo, es sensible tanto al calor como a disolventes orgánicos y detergentes [9].

*Figura 1.- Estructura macromolecular del virus de la hepatitis C.*

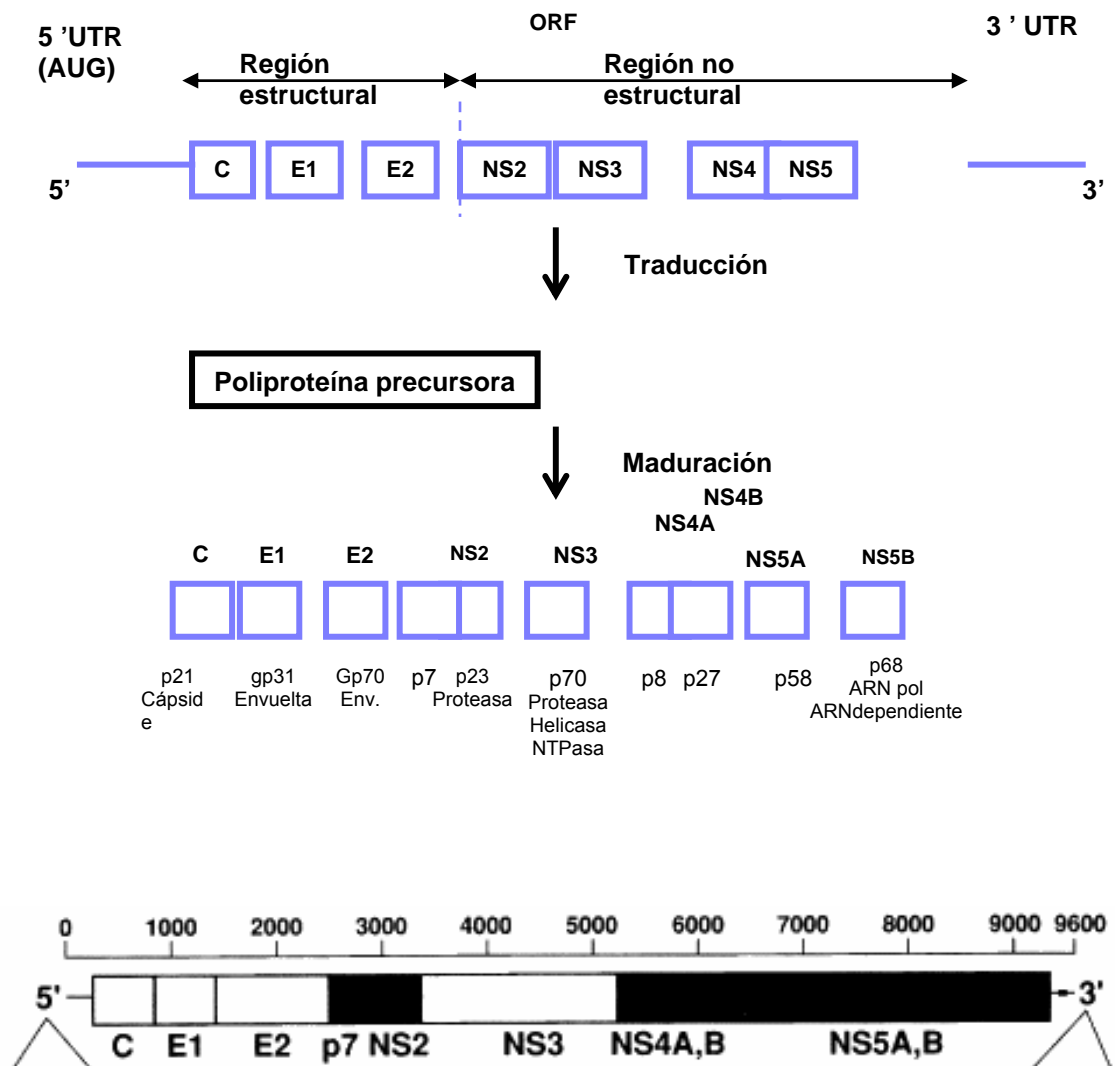


### 2.1.2 .- ESQUEMA GENÉTICO

El genoma (Figura 2) está constituido por una cadena única de ARN no segmentada de polaridad positiva, con una longitud de algo menos de 10.000 bases (9500-12500 nucleótidos). Posee un único marco abierto de lectura ORF (*open reading frame*) que codifica una poliproteína de 3.011 aminoácidos aproximadamente [10].

La polaridad positiva de su ARN implica que en el propio ARN quien funciona como mensajero y su traducción conduce a un precursor poliprotéico a partir del cual se producen las distintas proteínas virales, estructurales y no estructurales, por la acción de proteasas celulares. Los genes estructurales de *core* (C) y de la envuelta (E1 y E2), están localizados en el extremo aminoterminal, en la zona próxima al extremo 5' del genoma, mientras que los genes no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B), se localizan en el extremo carboxiterminal, adyacentes al extremo 3'. Los extremos 5' y 3' son regiones con secuencias no codificantes (UTR, *untranslated region*) que flanquean el ORF.

**Figura 2. Organización genómica del virus de la hepatitis C y de la poliproteína**



El virus de la hepatitis C usa los sistemas de síntesis proteica propios de la célula hospedadora tales como los ribosomas del retículo endoplásmico, así como sus



aminoácidos. El primer paso que lleva a cabo es elaborar una poliproteína de gran tamaño que será la precursora del resto de proteínas virales. Son las proteasas del propio hepatocito las que inician los sucesivos cortes de esta poliproteína viral, las metaloproteasas y las serin-proteasas, y el resultado de esta acción es la formación y activación de la ARN polimerasa viral, que comenzará a replicar el ARN-VHC para la síntesis de nuevas partículas virales. A partir de este momento, las diferentes proteínas virales llevarán las acciones pertinentes para perpetuar su autorreplicación.

A continuación pasamos a describir la localización y función de los distintos genes, tanto estructurales como no estructurales, y las distintas funciones de las proteínas que codifican:

### ***Región 5' no codificante del virus: 5'UTR***

La porción 5'-UTR, también conocida como 5'-NCR (*non-coding region*) abarca los primeros 341 nucleótidos de la poliproteína, siendo esencial para el inicio de la traducción ya que contiene el codón de inicio [11]. Esta región de secuencia muy bien conservada, con homología superior al 98% entre todas las cepas hasta ahora secuenciadas, contiene además importantes implicaciones para la replicación y el 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'-UTR de 27-51 bases. Por todo ello, es considerada una región fundamental para el desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular y para el diseño de fármacos antivirales [12].

### ***Región estructural codificante del virus: Gen C***

El producto del gen C, codifica las proteínas de la cápside del núcleo del virus, comprendida entre los nucleótidos de 342-915, con un peso de 16-22 kDa. La subunidad básica de la proteína de la nucleocápside viral (p22/p21) posee 190 aminoácidos, y presenta alto contenido en aminoácidos básicos (arginina y lisina) en su extremo amino, con un epítipo inmunodominante en el extremo N-terminal con actividad ARN de enlace. Esta región es la más conservada de todo el genoma, y constituye junto a la región 5'UTR, las regiones genéticamente más constantes del genoma viral, de ahí su importancia en el desarrollo de técnicas diagnósticas [11].

### **Región estructural codificante del virus: Gen E1 y Gen E2**

Los genes E1 y E2 codifican las dos glicoproteínas de la envuelta del virus, la gp33-35 y la gp70-72. Ambos están implicados en la unión del virus a receptores celulares para la posterior entrada de éste al interior del huésped. Ambas juegan un papel importante en la fisiopatología del virus. Cuando se expresan juntas forman un dímero que es detectado en la mayoría de los pacientes infectados por el VHC.

La glicoproteína de la envuelta E1, de 32-35 kDa (antígeno gp33/c33p31), es la proteína viral codificada por la secuencia comprendida entre los nucleótidos 915-1491 (gen E1). En el extremo carboxílico se han localizado dos secuencias homólogas a segmento transmembranales, que pudieran estar implicados en la entrada del virus al hepatocito [11]. Posee también dos regiones antigénicas altamente conservadas entre los diferentes aislados de VHC, localizados entre los residuos 484-499 y 554-569. Esta glicoproteína varía según el tipo de procesamiento de la misma, ya que o bien es procesada de forma íntegra, dando como resultado la proteína antes descrita, o bien puede sufrir un corte entre los aminoácidos 746-747 por una peptidasa, dando lugar a una glicoproteína E2 truncada, más una proteína denominada p7 de función aún desconocida.

Por otro lado, el gen E2 (antes denominada NS1), de 58-72 kDa y comprendida entre los aminoácidos 1491-2769, es responsable de una glicoproteína de 327 aa (antígeno gp70). Ésta tiene un papel importante en la maduración y acoplamiento del virus. En esta región cabe destacar la existencia de una región hipervariable o "HVR-1", que en determinados estudios se ha relacionado su alta densidad de mutaciones, con la respuesta posterior del paciente al tratamiento antiviral [11, 13].

Esta región HVR-1, es una zona hipervariable formada por 27 aminoácidos de la región E2, cuya diversidad en la secuencia de aminoácidos llega a alcanzar el 80%, alterando zonas muy irregulares con otras altamente conservada (homología media de 53-69%). Se localiza en la posición 665-676, coincidiendo con la zona donde se encuentran los epítomos neutralizantes de la fosforilación de la proteína-kinasa R (PKR), relacionados con la supuesta alteración del sistema inmune del huésped, que permitirá el escape del virus de la acción lítica del mismo, condicionando la capacidad de aparición de poblaciones virales persistentes que conllevan al establecimiento de infecciones crónicas y al fracaso de los distintos intentos terapéuticos [14-19].

La presencia en el extremo 3' de un punto de entrada al ribosoma, podría acelerar la traducción de la replicasa codificada por la zona NS5. La analogía de estas regiones no alcanzan el 60%, pudiéndose distinguir zonas altamente variables entre las regiones 1691-1708 y 1710-1728.

### ***Región No estructural codificante del virus: Gen NS2***

El gen NS2, codifica una Metaloproteinasa dependiente de zinc de 23 kDa (proteína p21-23), comprendida entre los nucleótidos 2769-3360, que se encarga de la fragmentación de las regiones NS2/NS3, acción necesaria para el procesamiento de toda la región no estructural del precursor poliprotéico (Autoproteasa) [20]. Además, participa en el ensamblaje del virión y forma parte del complejo de replicación junto con las regiones NS5a y NS5b. Entre los residuos 960-975 posee una región muy inmunogénica y altamente conservada en los diferentes aislamientos virales.

### ***Región No estructural codificante del virus: Gen NS3***

El gen NS3, comprendido entre los nucleótidos 3360-5313 (p68-70), al igual que el NS2 codifica una serie de enzimas necesarias para la viabilidad de la poliproteína viral. Entre ellas destacan: una enzima con actividad ARN helicasa; otra enzima NTPasa (nucleótido tri fosfatasa); y finalmente otra con actividad serín-proteasa (p70) que da lugar al proceso proteolítico del resto de la región no estructural.

La primera función, la actividad ARN-helicasa, se refiere a la capacidad de desdoblamiento de la cadena de ARN viral durante la replicación y la transcripción viral, obteniendo la energía necesaria de la hidrólisis de los nucleósidos trifosfatos. La actividad serín-proteasa actúa a dos niveles: uno a nivel del lugar de unión entre NS2/NS3 junto con la metaloproteinasa codificada por NS2, fragmentando la proteína a ese nivel; y otro a nivel de la unión NS3/NS4a, donde también crea una ruptura específica que determinará un complejo proteico distinto. Es esta región una de las dianas de nuevas terapias antivirales en investigación actualmente [21, 22].

También se cree que esta porción del genoma está implicada en el desarrollo del cáncer hepático [23, 24].

#### ***Región No estructural codificante del virus: Gen NS4***

El papel del gen NS4 no está tan claro, aunque la proteína codificada por NS4a (p4, de 8 kDa), comprendida entre los nucleótidos 5313-5475, se conoce que actúa como cofactor de la serín-proteasa de NS3. Y la función de la p27 derivada de NS4b (27 kDa), comprendida entre los nucleótidos 5475-6258, se ha relacionado con el complejo de replicación viral [24].

#### ***Región No estructural codificante del virus: Gen NS5***

El porcentaje de homología del genoma viral de esta región oscila entre el 56-72% [11]. Dentro del gen NS5 distinguimos dos subregiones, NS5a (56-58 kDa, comprendidos entre los nucleótidos 6258-7602), y NS5b (68-70 kDa, entre los nucleótidos 7602-9375), que codifican dos proteínas diferentes (p58 y p68 respectivamente). La región NS5 es la menos conservada entre todos los distintos aislados de VHC.

La primera, NS5a es una proteína de membrana que se localiza en la región citoplasmática perinuclear que entre sus funciones, destaca que se trata de un componente importante del complejo de replicación viral. Dentro de esta zona del ARN-VHC que codifica a la proteína NS5a, se encuentra la región ISDR (Región Determinante de la Sensibilidad a Interferón. *Interferón Sensitivity Determining Region*). Otras actividades de la NS5A son la de interactuar con elementos del sistema inmunológico como por ejemplo inhibiendo la secreción de las células NK, y su capacidad de modular la actividad del complemento. Por todo ello es por lo que se piensa que esta proteína puede ser clave para establecer una infección persistente, hasta el punto que diversos autores han afirmado que dicha región determina menor susceptibilidad a la ribonucleasa-L en los pacientes con genotipo 1, respecto a los infectados por genotipo 2 o 3, lo cual parece contribuir a la mayor resistencia a la terapia con interferón.

Esta fosfoproteína posee una forma hiperfosforilada de 58 kDa, que fija dos moléculas de fósforo entre los aminoácidos 2200–2250 y 2351–2419 respectivamente, a través de sendos residuos de serina localizados en la región central de la proteína. La primera de estas dos regiones es la antes mencionada región ISDR. Esta forma

cargada con moléculas extra de fósforo, podrían interferir en la función de la proteína kinasa R (PKR), ya que la PKR cataliza la fosforilación de distintos factores de transcripción como la subunidad alfa del factor 2 (e IF2 alfa), que codifica el inicio de la traducción del ARN mensajero del virus, el cual al ser fosforilado interrumpe la traducción de proteínas, tanto virales como del huésped, siendo este por tanto un factor determinante de la inhibición de la replicación viral. La expresión de otras proteínas no estructurales como son las NS3, NS4a y NS4b son también requeridas para procesar la forma hiperfosforilada de 58 kD. De hecho, mutaciones de la proteasa NS3 se ha comprobado que bloquea eficazmente la fosforilación de la NS5a. La ausencia de NS5a susceptible de ser fosforilada, como ocurre en las partículas virales con genotipo 2a, podría estar implicada en la diferencia de respuesta al tratamiento en estos genotipos. No obstante, las consecuencias funcionales de esta fosforilación aún no han sido determinadas.

Se ha visto que la PKR, es una proteína que además de ser supresora de tumores, al fosforilarse es capaz también de bloquear la expresión de determinados genes virales, y con ello, se consigue bloquear la síntesis de nuevos viriones como se mencionó anteriormente, de manera que tras la hiperfosforilación de NS5a y su influencia sobre PKR, secundariamente se bloquee su actividad kinasa, interfiriendo en su efecto antiviral. Éste sería, por tanto, uno de los mecanismos a través de los cuales el virus podría hacerse resistente al tratamiento con interferón.

Determinados trabajos japoneses han postulado cierta relación entre el número de mutaciones de esta región y la futura respuesta del paciente al tratamiento con interferón, hasta el punto de que si la secuencia no estaba mutada ("wild type"), la probabilidad de que sea un futuro no-respondedor al tratamiento podía alcanzar, de entrada hasta el 87%, pero esto será descrito posteriormente. No obstante hay muchas discrepancias entre distintas series, discrepancias que serán analizadas a fondo más adelante.

Por último, la última proteína no estructural codificada por el ARN-VHC, deriva de la región NS5b (7602-9375), que contiene el dominio encargado de la síntesis de la enzima ARN polimerasa ARN dependiente, que será quien determine de forma limitante la síntesis de nuevas moléculas de ARN para completar las nuevas poblaciones virales. La existencia de mutaciones en la secuencia de aminoácidos que determinan esta región también ha sido asociada con variaciones en la respuesta al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina [25].

### **Región 3' no codificante del virus: 3'UTR**

La zona codificante termina en un único codón de parada, al que sigue una región 3' no codificante (3'UTR), comprendida entre los nucleótidos 9375-9419. Ésta contiene una parte variable de 40 nucleótidos, seguida de una serie continua de residuos de uracilos (poly U), con una secuencia polipirimidínica con citosinas intercaladas. Se sigue con una región muy conservada (98-100% de homología) de 98 nucleótidos. Se desconoce la función de la región 3'UTR, aunque hay indicios de estar implicada en la replicación viral y siendo una de las dianas actuales para el desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular y de fármacos antivirales [12].

En la siguiente tabla (tabla 1), resumimos las principales funciones asociadas a las distintas proteínas codificadas por las regiones descritas anteriormente.

**Tabla 1.- proteínas codificadas por el ARN-VHC**

<b>Gen</b>	<b>Aminoácidos</b>	<b>Proteína</b>	<b>Función</b>	<b>Proteasa que procesa</b>
C	1-191	p21	Cápside	Proteasa celular
E1	192-393	gp33-35	Glicoproteína de la envuelta	Proteasa celular
E2	384-746	gp70-72	Glicoproteína de la envuelta	Proteasa celular
	747-809	p7	¿?	Proteasa celular
NS2	810-1026	p21-23	Autoproteasa en cisteína	Proteasa NS2-3
NS3	1027-1657	p68-70	Serin-proteasa/NTPasa/Helicasa	Proteasa NS3
NS4A	1658-1711	p4	Cofactor de proteasa NS3	Proteasa NS3
NS4B	1712-1972	p27	complejo de replicación	Proteasa NS3
NS5A	1973-2420	p58	Activación de la transcripción	Proteasa NS3
NS5B	2421-3011	P70	RNA polimerasa dependiente de RNA	Proteasa NS3

## **2.2 .- VARIABILIDAD GENÉTICA**

### **2.2.1 .- DEFINICIÓN Y CONCEPTO**

Los virus con genoma ARN, en general, representan el grupo de parásitos intracelulares más abundante de la biosfera, de manera que están enfrentándose

continuamente a una selección natural. Es por ello por lo que solo las partículas virales fenotípicamente más adaptables al medio resisten a su extinción en el tiempo o lo que es lo mismo, que solo las partículas virales con mayor eficiencia biológica (mejor “fitness viral”) serán las que prevalecerán en el tiempo. La evolución natural es un proceso dependiente del azar que incluye dos factores fundamentales: el primero, engloba los mecanismos intrínsecos del propio virus a escala molecular de los ARN virus; y el segundo, es el tamaño de las poblaciones virales que incluye los conceptos de subtipos y cuasiespecies, que serán explicados más adelante. En el caso del VHC, un virus ARN de cadena simple, su capacidad para persistir aún en presencia de una buena respuesta inmune del huésped, se debe fundamentalmente a su alta capacidad de replicación y a la alta tasa de mutaciones existente durante la misma, que le otorga un alto grado de heterogeneidad en su secuencia genómica. Es lo que se conoce como **variabilidad genética** [26].

En general, durante la replicación de los virus ARN, van apareciendo errores aleatorios que condicionan mutaciones, originados por fallos de la ARN Polimerasa ARN dependiente. Estos errores se irán acumulando, ya que dichas polimerasas carecen de la actividad correctora exonucleasa existentes en los microorganismos superiores (ADN polimerasas).

Esta modificación de la secuencia original de nucleótidos, da lugar a millones de poblaciones virales diferentes íntimamente relacionadas entre sí dentro de un mismo paciente, según el modelo de cuasiespecies. Esta heterogeneidad genética será una de las características intrínsecas del virus que le permitirá perpetua su presencia en el interior del hepatocito.

La tasa de error aproximada de esta ARN Polimerasa ARN dependiente es de  $10^{-4}$  mutaciones por ciclo replicativo, que sumada a una alta cinética de replicación viral definida por una producción diaria de  $10^{11} - 10^{12}$  partículas virales y a una vida media de 2,5 horas en sangre, supone una cinética de replicación incluso superior a la del virus de la inmunodeficiencia humana. Desgraciadamente, no existen modelos experimentales para el cultivo del virus, lo que dificulta la obtención de datos, aunque siguiendo el modelo propuesto para el VIH, la probabilidad de una mutación puntual será del orden de  $10^{-4}$ , siendo para una mutación doble del orden de  $10^{-11}$ . Esto se traduce en la producción de  $1,92 \cdot 10^3$  cambios en la posición de nucleótidos al año o lo que es lo mismo, en la producción aproximada de 3.300 virus nuevos al día, distintos al virus original. Además, estos errores persistirán en la secuencia debido a que como

se dijo anteriormente, la ARN Polimerasa ARN dependiente carece de función correctora [27].

De entre todas las poblaciones virales coexistentes, algunas presentarán alguna mutación que impida al virus replicarse, permitiendo al sistema inmune eliminarlo. Sin embargo, otras ocasiones, este cambio en la secuencia de aminoácidos da origen a una forma con mayor virulencia, capaz de replicarse de una manera más eficiente, siendo posible evadir la respuesta inmune defensiva del hospedador; e incluso, pueden aparecer formas virales resistentes a los regímenes terapéuticos. Sin embargo, la evolución genética del virus no parece ser el único mecanismo por el cual se elude al sistema inmune, ya que tras inocular clones monoclonales sintéticos en animales de investigación, todos los individuos infectados desarrollaron enfermedad crónica a pesar de haber inoculado una única secuencia viral [27]. A este respecto se han postulado mecanismos por los cuales la infección podría permanecer por existir una respuesta inmunológica insuficiente para erradicar la misma. De hecho, se sabe que en pacientes con patologías de base que afectan al sistema inmune desarrollan con mayor frecuencia y de forma más agresiva y precoz la cronificación de este tipo de patología.

### **2.2.2 .- VARIABILIDAD A LO LARGO DEL GENOMA DEL VHC**

La variabilidad genética no parece ser igual en todas las áreas del genoma. Si bien al principio las diferencias halladas se encontraban básicamente en las regiones NS3 y NS4, posteriormente, se demostró la existencia de nuevas diferencias, fundamentalmente en las proteínas de la envoltura E1, en el extremo aminoterminal de la región E2, y sobre todo en la región NS5a. Mientras que la región del core mantiene una secuencia de nucleótidos estable entre el 81-88% en todos los casos, la región codificadora de los genes de envoltura E1 y E2, solo alcanzan una similitud entre genotipos del 53-69% y 56-72%, respectivamente, dentro de la cual, en la porción aminoterminal de la proteína E2 se encuentra la zona hipervariable HVR1, que puede incluso variar en el 100% de su secuencia entre poblaciones virales distintas.

Existe una segunda región hipervariable denominada HVR2, localizada entre los aminoácidos 91 y 97, pero que solo existe en el genotipo 1b [28, 29]. De todos modos, se ha comprobado que no es la única región determinante de heterogeneidad genética, puesto que clones virales a los que se les extirpa la región HVR-1 han



mostrado el desarrollo de mutantes de escape inmunológico capaz de desarrollar una infección persistente [30].

Otra región con una alta heterogeneidad en su secuencia de aminoácidos, es la región codificadora de la proteína NS5a, más concretamente, la zona flanqueada por los aminoácidos 2209–2248. Esta ha sido asociada con la sensibilidad viral al tratamiento con IFN, definiéndose como ISDR (*Interferon Sensitivity Determining Region*). Partiendo de la secuencia de aminoácidos definida por Enomoto como HCV-J (tipo más frecuente encontrado en los pacientes japoneses, por encima del 40%), que denominaremos secuencia salvaje, se ha establecido la posible relación de números de sustituciones de aminoácidos en la región ISDR de cada población viral, con la mejor respuesta virológica al tratamiento con interferón, de manera que  $\geq 4$  cambios de aminoácidos en la sucesión de ISDR diferentes del tipo salvaje, se asociaban a mayores tasas de respuestas virológicas completas a la terapia con IFN.

Por todo ello, hoy en día se admite la existencia de múltiples poblaciones virales distintas de VHC, coexistiendo dentro del mismo huésped, de manera que los anticuerpos generados frente a las secuencias dominantes del virus no sean capaces de neutralizar las cepas minoritarias con secuencias distintas a las primeras [24, 31-33].

### **2.2.3 .- GENOTIPOS, SUBTIPOS Y QUASIESPECIES DEL VHC.**

Basándose en la secuencia de nucleótidos y en el análisis filogenético, se han establecido tres rangos de diversidad genética: genotipo, subtipo y cuasiespecie. Se han definido seis grupos mayores del virus VHC, denominados *genotipos*, designándose éstos por números consecutivos (genotipos 1 al 6). Estos genotipos, se han subdividido en sub-genotipos (o subtipos) y se designan con letras minúsculas a continuación del número que designa al genotipo.

Los genotipos tienen aproximadamente un 65% (60-70%) de homología entre sí. Por tanto distinguiremos hasta la fecha, 6 genotipos mayores diferentes, denominados del 1 al 6, a los cuales se les añade una letra (a, b, c, d ...) que equivaldría al subtipo, completando así la clasificación que se describe en la tabla 2 [34]. Subtipos idénticos supondrán una homología de un 77-79%.

**Tabla 2.- Genotipos del VHC**

Genotipo 1	Genotipo 2	Genotipo 3	Genotipo 4	Genotipo 5	Genotipo 6
1 <sup>a</sup>	2a	3a	4a	5a	6a
1b	2b	3b			6b
1c	2c	3k			6d
	2k				6g
					6h
					6k

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. 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 África. En nuestro medio cabe destacar el genotipo 1b como el más prevaleciente y con el que más frecuentemente se asocia la enfermedad hepática avanzada y hepatocarcinoma [35].

En las cuasiespecies o unidades individuales, es donde se alcanza una homología de un 91-99%, en el genoma viral. Estas van apareciendo en función de la acumulación de mutaciones durante la replicación viral, que permitirá la creación de nuevas moléculas virales capacitadas para escapar a una respuesta inmunitaria defensiva del hospedador, impedir el desarrollo de vacunas útiles para combatir la infección e incluso resistir las diferentes terapias antivirales disponibles. Dependiendo del locus analizado, podemos hallar diferencias entre cuasiespecies distintas pero no solo eso, pues si comparamos muestras de distintos tejidos del mismo paciente, también encontraremos diferencias dentro de la secuencia de la misma cuasiespecie. Estos porcentajes de similitud se resumen en la tabla 3, descrita a continuación.

**Tabla 3.- Variabilidad genética del VHC**

	HOMOLOGÍA (%)
GENOTIPO	66-69
SUBTIPO	77-80
CUASIESPECIE	91-99

Por tanto, para discriminar entre especies y subespecies, las regiones más apropiadas son por orden: E2, NS5, E1 y NS4. Mientras que las regiones no codificantes, núcleo (C) y NS3 no son útiles para la diferenciación dada la alta homogeneidad existente en su secuencia.

## **2.3 .- EPIDEMIOLOGÍA**

Aunque clásicamente se ha considerado a esta infección como la “hepatitis hematológica o post-transfusional” por su relación histórica con transfusiones de sangre contaminadas, la transmisión de la enfermedad se puede producir tanto por vía parenteral, vertical o como por vía sexual. No obstante esta última ha sido puesta en duda cada vez más, hasta el punto de que hoy en día no se recomienda el uso del preservativo entre parejas estables, ya que solo se ha observado transmisión efectiva a través de esta vía en individuos promiscuos con prácticas sexuales traumáticas, y en la coinfección por el virus VIH como queda reflejado en brotes epidémicos descritos de transmisión sexual VHC en Londres, Viena, Paris, Berlín, Ámsterdam, entre grupos homosexuales promiscuos con relaciones de alto riesgo (fisting, drogas locales, objetos) [36, 37].

Por tanto, la transmisión se producirá básicamente por:

- Exposición a sangre infectada: usuarios a drogas por vía parenteral, práctica de riesgo asociada al genotipo 3a a nivel mundial. En España, ésta práctica de riesgo continua siendo la principal vía de contagio de la enfermedad. Por tanto, es la principal vía de contagio en la actualidad, tanto de hepatitis por virus C como VIH; seguida a gran distancia por las transfusiones sanguíneas con hemoderivados contaminados, donde se estima según estudios epidemiológicos, existe entre un 0.5-4% de donantes de sangre en el mundo, con anticuerpos anti VHC [38]. Al contrario de los usuarios a drogas por vía parenteral, este factor de riesgo se asocia con el genotipo predominante que es el genotipo 1b.
- La transmisión de la enfermedad vía sexual se considera poco frecuente, excepto entre varones homosexuales, siendo superior en población VIH, que sin embargo tampoco supera el 3%. Parece que el riesgo de infección dentro de la pareja es mayor para la mujer que para el varón. La mayoría de los estudios muestran que las parejas de pacientes con hepatitis crónica por virus C, en relaciones monógamas de larga

duración no son necesarias modificaciones en las prácticas sexuales respecto al uso del preservativo, salvo durante la menstruación o si hubiera ulceraciones genitales. Se debe advertir, no obstante, que su uso disminuye el riesgo de contagio. Sigue estando recomendado realizar estudio de anti VHC a las parejas de los pacientes infectados. El panorama de la transmisión sexual cambia con respecto al contacto con múltiples parejas sexuales, existiendo una correlación positiva entre probabilidad de contagio y número de parejas; con mantener relaciones sexuales vía anal, u otras relaciones traumáticas; y mantener relaciones con pacientes infectados por el VIH. En todos estos casos, se recomienda el uso del preservativo [39].

- La transmisión vertical o materno-fetal, solo representa una incidencia de solo el 4-5%, pudiendo aumentar hasta un 10% si la madre se encuentra en fase replicativa activa , y hasta un 30% sí es coinfectada VIH, dependiendo siempre de la carga viral materna, que será el principal factor determinante de la capacidad infectiva de la madre al feto [3]. Las cargas virales indetectables tanto para VHC como para VIH en el momento del parto disminuyen mucho el riesgo de transmisión. La influencia del genotipo en la transmisión a este nivel parece ser muy discutible, al igual que la práctica de amniocentesis o rotura prematura prolongada de membranas. No hay estudios prospectivos que justifiquen la práctica de cesárea electiva para prevenir la transmisión al niño, por lo que no está recomendada en la actualidad [40, 41].
- Aunque el ARN-VHC puede ser detectado en el calostro materno, no hay constancia de transmisión a través de la lactancia, siempre y cuando no haya herida a nivel de la mama. Se recomienda explicar estos datos a la madre y que sea ella quien decida si dar lactancia o no [3].
- En los adictos a drogas vía oral, así como los consumidores de cocaína vía nasal, dado que con frecuencia comparten material, se ha observado un aumento de la incidencia de contagio de VHC, por lo que éstas debería ser consideradas como posibles vías de transmisión de hepatitis vírica [42, 43].

Por todo ello, es por lo que en la actualidad, según los últimos cálculos estimativos, existen aproximadamente 170 millones de portadores en todo el mundo, prácticamente el 3% de la población mundial, de los cuales 5 millones existen en Europa Occidental, (siendo mayor la incidencia en los países del Este), frente a los 2.7 millones existentes en EEUU, o los 2 millones que hay solo en Japón. Se establece según estos datos, que existe una prevalencia media mundial del 3%, oscilando entre

0.1-10%, según países, siendo en Europa del 1% (0.5% en países nórdicos, 2% en países mediterráneos, y 0.7-5% en países de Europa del Este) [44].

Debido a la similitud de las vías de contagio con el VIH, se estima una prevalencia de coinfectados VHC-VIH que oscila entre 15-40% en función del área geográfica, alcanzando un 90% en población usuaria de drogas por vía parenteral o hemofílicos. La realidad de la enfermedad en España, oscila entre el 1-2,5% de la población total, alcanzándose la cifra de 60000-80000 pacientes coinfectados.

## **2.4 .- PATOGENIA Y CUADROS CLÍNICOS**

Todavía no se conoce con certeza el mecanismo de producción de la lesión hepática en la infección por VHC, aunque parece que es motivado por un mecanismo combinado entre el efecto citopático del propio virus , y una alteración en el sistema inmune defensivo del propio enfermo. La respuesta inmune celular basada en la cooperación de los linfocitos CD4+ helper y CD8+ citotóxicos es la encargada de la eliminación de las partículas virales, mientras que la respuesta humoral presenta un papel en la prevención de infecciones secundarias.

El periodo de incubación de la infección oscila entre 5-12 semanas de media (2-26 semanas). Desde la puerta de entrada el virus llega al hígado a través del torrente circulatorio, ya que es un virus hepatótrofo. Allí se adherirá a las paredes del hepatocito donde se cree que la proteína E2, podría desempeñar algún papel (en la adherencia al hepatocito, aunque la absorción e internalización del mismo se desconocen). El virus de la hepatitis C, evita al sistema inmunitario, generalmente gracias al desarrollo de subpoblaciones virales en función de la hipervariabilidad de la región HVR-1 de E2, que impide el reconocimiento y posterior eliminación como partículas extrañas por parte del mismo. Posiblemente esta sea la causa de la aparición tardía de los anticuerpos defensivos de nuestro organismo, que no pueden llegar a ser detectables hasta incluso 20 semanas tras el primer contacto con el microorganismo. De esta manera, aunque los pacientes presenten una respuesta inmunitaria normal, al presentarse una gran variedad de poblaciones virales, no consigue bloquear la totalidad de la carga viral infectiva. En el caso de enfermos con Agammaglobulinemia o coinfectados por el VIH, el volumen viral bloqueado es mucho menor , y la evolución de la infección está más acelerada. Esto indicaría cierta relación entre los factores defensivos del huésped y la adaptación genética del VHC.

Con respecto a la clínica que puede llegar a manifestar la enfermedad, el espectro de sintomatología, tanto hepática como extra hepática en estos pacientes, abarca desde individuos asintomáticos con pruebas normales de función hepática hasta producir una enfermedad hepática variable severidad, tales como: hepatitis aguda, crónica, cirrosis, carcinoma hepatocelular y fallo hepático que requiere trasplante de hígado. No es obligatorio que exista paralelismo entre el grado de afectación histológico, la sintomatología del paciente, y nivel de alteración de las enzimas hepáticas. El patrón de referencia o "gold standard" para la medición del grado de afectación de la enfermedad a nivel hepático, sigue siendo la biopsia hepática, aunque cada vez está tomando mayor importancia los métodos no invasivos como el Fibroscan [45, 46], así como las mediciones indirectas con son el índice de Foros y de Apri.

El estatus de infección por el virus C de la hepatitis raramente es diagnosticado hasta la aparición de sus complicaciones crónicas, salvo en los coinfectados con VIH, ya que a todo paciente que en la actualidad se le diagnostica infección por el VIH, se le investiga también el virus por VHC, lográndose un diagnóstico precoz, previo a la aparición de las complicaciones crónicas propias de la infección crónica por VHC.

#### **2.4.1 .- Hepatitis aguda**

La hepatitis C suele ser asintomática en el 85% de los casos, y en el 20-25% de pacientes que presentan síntomas, sólo la mitad manifiestan ictericia como signo de enfermedad. El periodo de incubación es variable de 5-12 semanas de media. Transcurrido dicho periodo, comienzan a elevarse las transaminasas y aparecen síntomas indistinguibles de cualquier otra hepatitis viral, tales como ictericia, que puede llegar a durar entre 2 y 12 semanas, el cuadro se puede acompañar de otros signos-síntomas, como manifestaciones gastrointestinales inespecíficas (anorexia, náuseas, dolor abdominal y fatiga), de una gravedad variable.

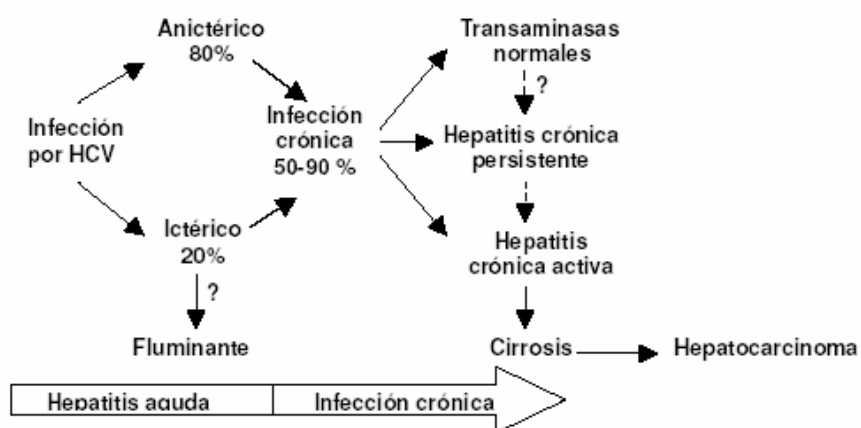
Prácticamente todos los pacientes tienen alteración de transaminasas aunque no existe un patrón constante de elevación y persistencia. Lo normal es que si la infección se resuelve, las transaminasas se normalicen a las pocas semanas. El ARN se detecta en las dos primeras semanas y la concentración de viriones circulantes se incrementa (hasta  $10^6$ - $10^8$  partículas/ml) hasta la aparición de anticuerpos específicos, existiendo por tanto un periodo ventana de 4 semanas, durante el cual se detectaría el virus pero

no los anticuerpos específicos, y en esta situación se hablaría de una infección aguda muy reciente. El periodo ventana suele ser mayor en los pacientes con deficiencias humorales, pudiendose incluso llegar a no producirse anticuerpos en ningún momento [11, 44, 47].

#### 2.4.2 .- Hepatitis crónica

Más del 80% de los casos de hepatitis aguda por VHC, evolucionan a enfermedad crónica, siguiendo un comportamiento no uniforme. La persistencia de ARN viral en suero durante al menos 6 meses, definirá el concepto de infección crónica. El curso natural de la infección a partir de este momento será: hepatitis crónica persistente, que progresará a hepatitis crónica activa, y desde ésta a cirrosis. La aparición de estos distintos estadios, dependen directamente de la capacidad replicativa del virus y de su capacidad de escape del control inmunológico del huésped. Después de un seguimiento de 5-10 años, se ha comprobado que el 20-30% de los pacientes con hepatitis crónica desarrollan cirrosis, con una incidencia media anual del 8%. De acuerdo con estudios de prevalencia, la infección por VHC, se asocia con unos intervalos desde la detección de la enfermedad hasta el desarrollo de secuelas directamente relacionadas, de 20-25 años, hasta la aparición de signos definitorios de cirrosis , y aproximadamente 30 años, para el desarrollo de carcinoma hepatocelular. Por todo ello, la hepatitis crónica por virus VHC en nuestro país, es el principal responsable de los trasplantes hepáticos realizados. La tasa de mortalidad de estos pacientes, asociada a su infección VHC es del 5-10% dentro de los 10-30 años de evolución de la enfermedad. Este esquema general queda reflejado en la figura 4.

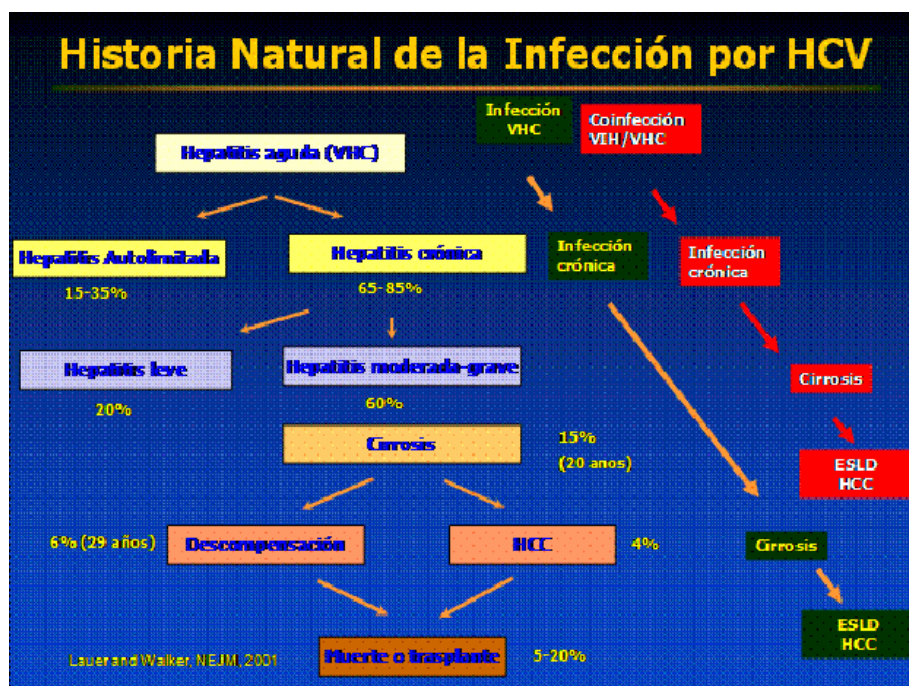
**Figura 4.- Historia natural de la infección por VHC**



Si a todo ello se le suma la variable de ser VIH+, se observa una mayor velocidad en el desarrollo de fibrosis hepática, aumentando por tanto la tasa de cirróticos, y su velocidad de aparición, que disminuye a tan solo 5-10 años. Esto se explica por la existencia de una mayor destrucción mitocondrial de hepatocitos, en parte por el efecto tóxico de los fármacos anti VIH y en parte, por las citocinas líticas liberadas por la infección de los linfocitos CD3. Además, a todo ello se le suma la pérdida del factor protector de los CD4 que están en depleción clara en los enfermos VIH+. Además, se ha comprobado una peor respuesta al tratamiento con interferón alfa en estos enfermos coinfectados [5, 7, 38, 44, 48-50].

Esta Influencia del VIH sobre la historia natural del VHC es aportada a partir de una gran cantidad de estudios en los que demuestran que el VIH acelera la progresión de la fibrosis hepática y la evolución a cirrosis, de manera que aumenta el porcentaje de pacientes que desarrollan hepatocarcinoma (HCC). Pero no solo aumenta la tasa de aparición, sino también la velocidad de desarrollo de la misma [51], como podemos observar en la figura 5, donde la aparición de cirrosis en los pacientes VIH+ se constata a los 5-10 años, y la incidencia de hepatocarcinoma baja hasta los 25-30 años, la mitad de la evolución habitual de esta patología en los pacientes infectados por el VHC. Todo ello repercute en una mayor mortalidad asociada al daño hepático causado por el VHC en la población VIH positiva [52, 53].

**Figura 5.- Aumento de la velocidad de progresión de la historia natural de la infección por VHC**





Existe disparidad de resultados sobre la posible influencia negativa de la infección por VHC sobre la reconstitución inmune de los pacientes que inician tratamiento antirretroviral. Parece que la reconstitución inmune está comprometida en los pacientes coinfectados, aunque pocas veces se han encontrado diferencias en la cifra de linfocitos CD4 al comparar pacientes portadores del VHC con pacientes VHC negativos. Si existe un efecto negativo en la reconstitución inmune, el tratamiento del VHC podría contribuir a conseguir mayores cifras de linfocitos CD4 en pacientes VIH positivo que inician TARGA [57, 58].

No obstante, distintos autores describen como la activación inmune persistente que ocasiona la infección crónica por VHC, parece facilitar la transcripción del VIH en los linfocitos T, provocando una destrucción más rápida de los mismos [53-55]. A esto se le suma el hecho demostrado de que el VHC es capaz de infectar los linfocitos T, lo cual acelera su muerte. otro estudio reciente ha demostrado un aumento de los marcadores de apoptosis en los linfocitos de sangre periférica de sujetos coinfectados VIH-VHC en comparación con los de sujetos mono infectados por VIH [56]. El VHC tiene además la influencia negativa de forma indirecta sobre la infección por VIH, ya que éste por sí solo aumenta la frecuencia de abandonos del TARGA e incrementando su toxicidad hepática. El 15% de los pacientes coinfectados que inician TARGA deben suspender el tratamiento por toxicidad hepática. Este riesgo es mayor en pacientes que presentan el genotipo 3 del VHC, que se asocia con más esteatosis hepática. Aunque la mayor parte de la toxicidad hepática es asintomática, se han descrito casos de fallo hepático agudo, pudiéndose asociar únicamente con una peor tolerancia del tratamiento antirretroviral por hepatotoxicidad [7, 59-62].

## **2.5 .- DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico de laboratorio de la infección por VHC es fundamentalmente serológico, ya que se basa en la detección de anticuerpos específicos, recomendando su uso especialmente en poblaciones de alto riesgo, que incluyen a usuarios de drogas vía parenteral, pacientes en hemodiálisis, receptores de transfusiones y órganos antes de 1992, niños nacidos de madres infectadas, personas que hayan recibido factores de coagulación antes de 1987, personal sanitario expuesto al virus y en pacientes con transaminasas persistentemente elevadas [48, 63].

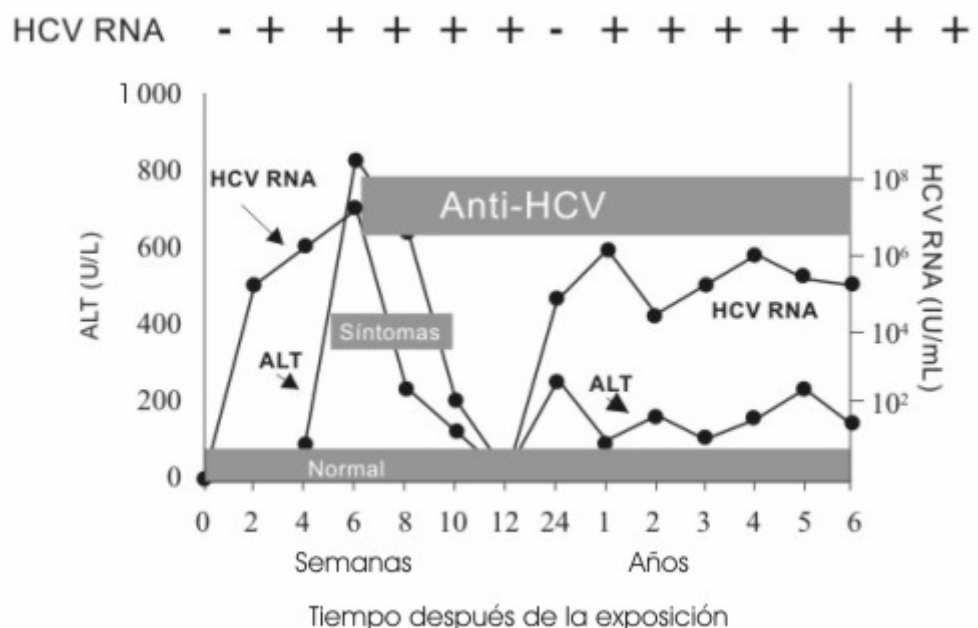
Su positividad nos indicaría la existencia de contacto con el virus. No obstante, existe también la posibilidad de detección del material genético del virus (ARN-VHC) mediante el diagnóstico molecular. También es posible la detección de proteínas estructurales virales (antígenos), siendo estas dos herramientas una importante ayuda para diferenciar una infección activa susceptible de ser tratada, de una infección antigua [2, 64].

## 2.5.1 .- Tests serológicos

2.5.1.1 .- Detección de anticuerpos específicos anti VHC por Enzimo Inmuno Análisis (EIA): test de Screening inicial.

La detección de IgG específica contra el VHC mediante técnica de ELISA (EIA) continúa siendo el método más práctico y fundamental para el diagnóstico de la infección por este virus. La producción de anticuerpos por parte de nuestro organismo se produce a partir de la 3-6 semana tras el contagio, pero generalmente no son detectables con los ensayos de 2ª-3ª generación hasta una media de 6-8 semanas después del mismo. Este periodo es el denominado “periodo ventana”, que en los ensayos de 1ª generación se prolongaba hasta pasados 6 meses. No obstante, el ARN del VHC ya es detectable tan solo 1-2 semanas después del contagio, como podemos ver en la figura 6.

**Figura 6.- Diagnóstico serológico de la infección VHC**

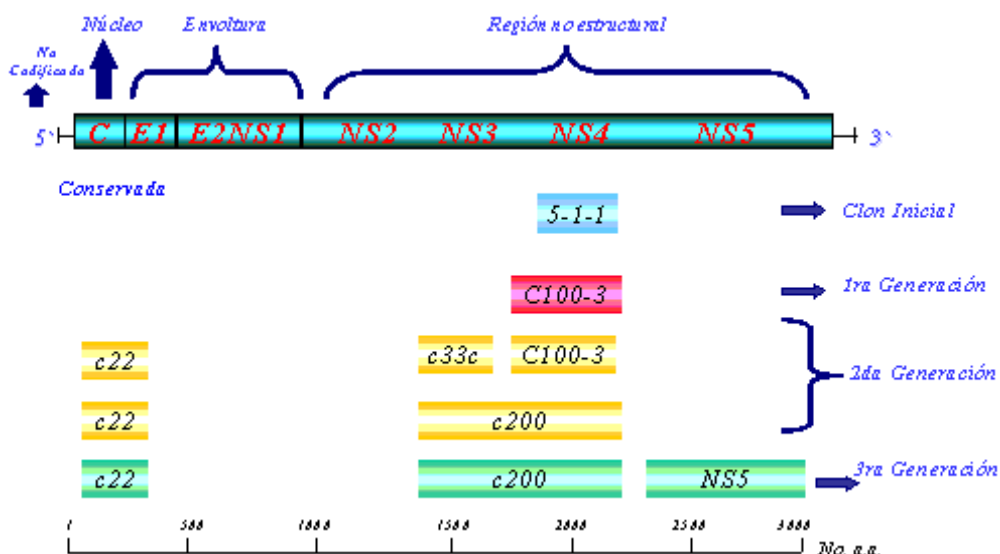


La detección de anticuerpos se realiza en plasma o suero, y para ello se usan péptidos sintéticos o antígenos recombinantes. La sensibilidad de estas técnicas oscila entre 99-100% en población inmunocompetente, disminuyendo en caso de pacientes en hemodiálisis, transplantados (ya sea con órganos sólidos o médula ósea), o pacientes VIH, donde la sensibilidad disminuye incluso hasta el 50%, dependiendo del grado de deficiencia inmunológica. En el caso de hepatitis aguda, la detección de anticuerpos es posible en el 50-70% de los casos al inicio de los síntomas. La especificidad de la técnica es de un 99.3-100%.

Es una prueba muy inespecífica donde solo se determina exposición al virus, no discriminando entre enfermedad actual, antigua y curada. Por ello, ante un resultado positivo siempre hará falta una confirmación posterior. Son posibles los falsos positivos, sobretodo en pacientes con desordenes inmunológicos, habiéndose demostrado la existencia de reactividad cruzada con otros antígenos virales. Por todo ello, son necesarios los ensayos de confirmación de la infección. En 1989 la compañía norteamericana *Chiron* © logró clonar el genoma del VHC, y obtuvieron por genética recombinante una proteína c100-3, equivalente a la codificada por la región 5-1-1 del NS4 del ARN-VHC. Esta proteína recombinante de 363 aminoácidos fue la base del primer sistema diagnóstico de infección del VHC. Fueron las técnicas de 1ª generación. Estos sistemas tenían baja sensibilidad y especificidad debido a la alta diversidad genética del NS4, y a la falta de detección de anticuerpos en la etapa temprana de la infección.

Las técnicas de ELISA de 2ª generación, incorporan además de la proteína C-100, la detección de anticuerpos anti proteínas virales contra el core (c22-3), y anti el producto de la región NS3 (c299-3/c33c), ya que alrededor del 93-95% de los sujetos infectados por VHC desarrollan estos anticuerpos, que además son los primeros anticuerpos en aparecer en los cuadros de primoinfección (4 semanas después del contagio) [44, 64]. Por tanto estos sistemas incrementan la sensibilidad de detección hasta un 99%.

**Figura 7.- Evolución de ensayos ELISA para el diagnóstico de la infección VHC**



Por último, las técnicas de tercera generación incluyen además la proteína NS5, siendo por tanto más sensibles por la optimización de los antígenos presentes en los ensayos de 2ª generación. Existen varios estudios, donde se ha intentado establecer cierto paralelismo entre el nivel cuantitativo de estas proteínas y los niveles de ARN VHC en sangre periférica, pero en la actualidad no tiene utilidad clara en clínica.

#### 2.5.1.2 .- Detección de antígenos del core del VHC

Con técnicas de inmunoensayo que utilizan anticuerpos monoclonales específicos se puede detectar el antígeno del core de la nucleocápside del VHC, mediante un inmuno-ensayo cuantitativo en microplaca (Ensayo Ortho® trak-C™). Esta técnica ha demostrado ser útil para el diagnóstico de screening en donantes de sangre, ya que este antígeno es un marcador precoz de replicación viral en procesos agudos, pudiendo detectarse en el 50-90% de los casos. No obstante, en procesos crónicos, no está clara aún su significación, aunque se está potenciando el uso de esta técnica para complementar los métodos moleculares para estimar la carga viral y monitorizar el tratamiento antiviral y la recurrencia de la infección en receptores de transplante.

En la actualidad también existe la posibilidad comercial de realizar en un mismo acto diagnóstico la determinación tanto del antígeno del core como de los anticuerpos del VHC. Se trata del kit VHC Ag-AC Ultra © (BIORAD).

Se trataría de una prueba de ELISA directo, en el cual se detectan al mismo tiempo anticuerpos y antígeno de la cápside del VHC, presentando un comportamiento de seroconversión igual al del ARN-VHC. Este sistema aporta como beneficio

fundamental respecto a las determinaciones serológica clásica que acorta el periodo ventana en una media de 24 días (0-43 días), manteniendo niveles habituales de sensibilidad y especificidad de las pruebas de ELISA clásicas. El soporte sólido de la prueba fija en su superficie un anticuerpo monoclonal dirigido contra la cápside del virus para la detección del antígeno C del VHC, y para la detección de anticuerpos utiliza dos proteínas recombinantes de NS3 (genotipo 1 y 3) , y una proteína recombinante NS4 [65, 66].

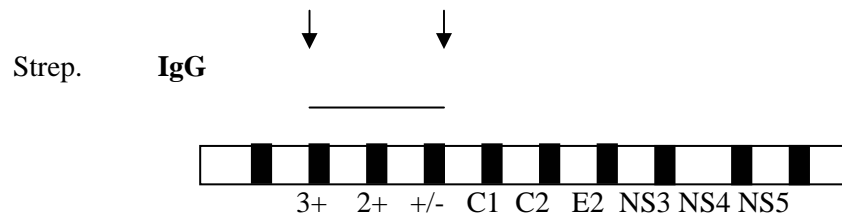
#### 2.5.1.3 .- Detección específica de anticuerpos a través de técnicas de inmunoblots: test de confirmación diagnóstica.

La asociación de un factor de riesgo percutáneo para infección por VHC sumado a niveles elevados de ALT (GPT) en un sujeto con un resultado por ELISA anti-VHC positivo, es indicativa de infección activa en más de un 98%, por lo que sería innecesario confirmación. No obstante para los donantes de sangre y población de bajo riesgo o con enzimas hepáticas normales, es siempre necesario confirmar un resultado de EIA positivo. Para la confirmación se utilizan técnicas de Inmunoblot, que utiliza antígenos recombinantes o péptidos sintéticos fijados sobre un soporte sólido de nitrocelulosa. Estos péptidos suelen ser los del *core* derivados de la región central, de la hipervariable E2, de la región de la helicasa NS3, así como los de las regiones NS4 y NS5 del VHC. Estas técnicas son muy específicas, y confirman el 97-99% del total de positivos. Esta determinación exige al menos la positividad para dos bandas para garantizar la confirmación del resultado, siendo las más frecuentes las bandas correspondientes a los antígenos NS3 y *core* (INNO-LIA™ HCVA b III update Innogenetic). El resultado del test se puede interpretar como:

- NEGATIVO: Ausencia de bandas de reacción.
- POSITIVO: Reactividad para al menos dos antígenos, preferiblemente procedente de genes distintos.
- INDETERMINADO: Será considerado como resultado indeterminado o no concluyente cualquier otro resultado, siendo necesario la realización de la determinación del ARN-VHC por técnicas moleculares.

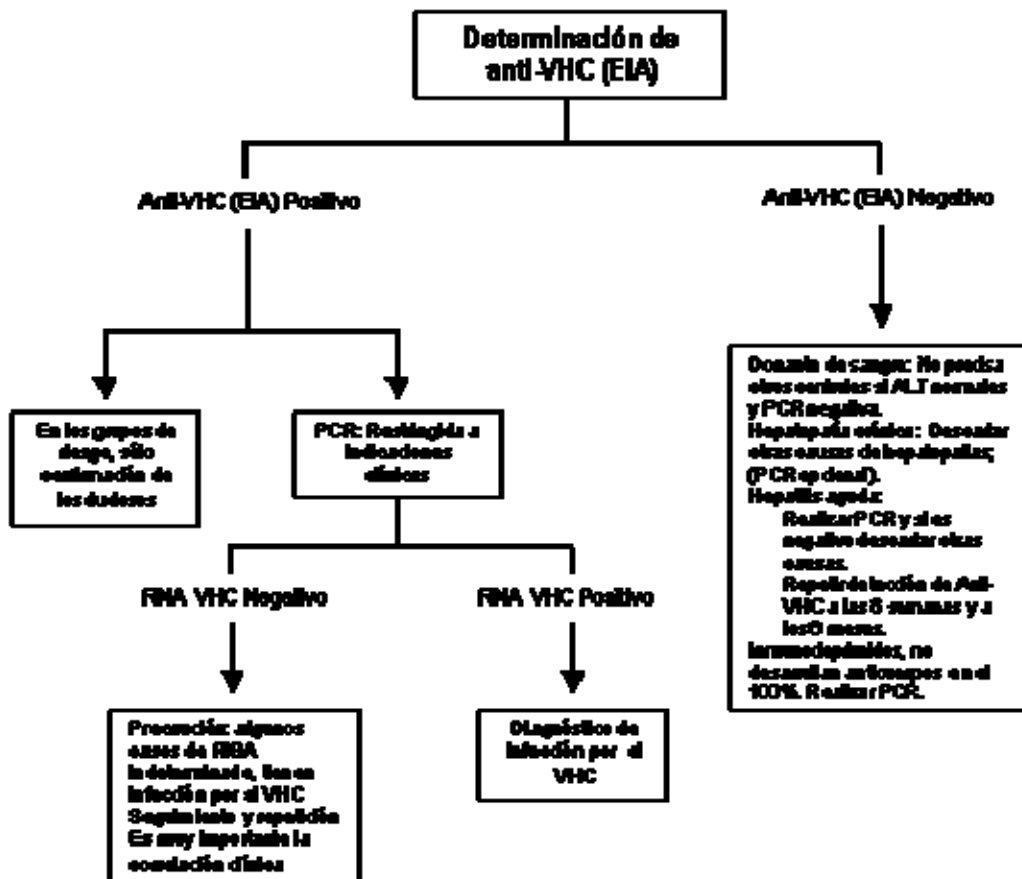
En la figura 8 vemos una representación de las tiras diagnóstica de confirmación de infección por VHC:

Figura 8.- Técnicas de confirmación diagnóstica de infección por VHC.



En la siguiente figura 9, describimos en esquema el algoritmo diagnóstico seguido en la actualidad, donde partimos inicialmente de la determinación de anticuerpos específicos de VHC a través de una técnica de cribado de alta sensibilidad como es el caso de las técnicas de ELISA (EIA), las cuales deben ser confirmadas por una técnica de determinación de anticuerpos específicos por técnicas de inmunoblots, aunque dicho paso cada vez más se tiende a sustituir por detección de ARN-VHC. Tras la determinación de éste se concluiría el algoritmo diagnóstico de infección por el virus de la hepatitis C.

Figura 9.- Algoritmo diagnóstico de infección por VHC



## 2.5.2 .- Tests moleculares

La replicación viral en el interior del hepatocito induce la destrucción del mismo, liberando al medio extracelular las nuevas partículas virales, de las cuales una parte pasa al torrente sanguíneo. Las técnicas de diagnóstico molecular detectarán directamente bien los viriones completos o bien su material genético.

Las principales indicaciones de estas técnicas se producen durante el periodo ventana de la infección aguda, y en el caso de enfermos inmunodeprimidos, donde el diagnóstico serológico puede fallar, siendo ésta la única posibilidad de detección del virus. A los niños nacidos de madres positivas para virus C se les recomienda hacer detección de ARN-VHC a los 2-6 meses de vida y/o test para anticuerpos anti VHC a los 18-24 meses, ya que anticuerpos maternos permanecen detectables hasta los 15 meses de vida del niño. Una de las principales indicaciones de la detección del ARN-VHC es la monitorización de la terapia antiviral frente la infección crónica por virus C.

### 2.5.2.1 .- Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos basados en la Reacción de la Cadena Polimerasa (PCR)

#### 2.5.2.1.1 .- *Detección cualitativa de ARN-VHC:*

Consiste en determinar en suero o plasma la existencia o no de viremia mediante retrotranscripción de la región 5'NC, seguida de una amplificación por reacción de cadena polimerasa. Existen varios métodos comerciales que en la actualidad son capaces de detectar niveles superiores a 25-50 UI/ml, aunque como antes se mencionó, dichos tests solo informan la detectabilidad o no ARN-VHC en sangre periférica, especificando siempre el límite inferior de detección del ensayo frente un estándar internacional de detección.

El test cualitativo para la detección de ARN VHC estandarizado y disponible en kit comercial utilizado en nuestro laboratorio es el *COBAS AMPLICOR ® HCV Monitor (Roche)*, basado en la técnica RT-PCR, con una sensibilidad de detección de 15 UI/ml.

Estas técnicas tienen como aplicaciones, las siguientes situaciones:

- Determinar la presencia de viremia en pacientes con anticuerpos anti VHC positivos a través de técnicas de ELISA.
- Determinar la presencia de viremia en hepatitis agudas durante el periodo ventana.
- Determinar la presencia de viremia en pacientes inmunodeprimidos con anticuerpos anti VHC negativos, realmente portadores del virus de la hepatitis C.
- Investigar la existencia de transmisión vertical en hijos de madres infectadas.
- Descartar la sangre y/o hemoderivados infectados por VHC.
- Confirmar la replicación viral antes del inicio del tratamiento antiviral, así como evaluar la respuesta virológica al mismo.

#### **2.5.2.1.2 .- *Detección cuantitativa de ARN-VHC:***

Estas técnicas tienen como finalidad determinar en suero o plasma la existencia de viremia por VHC en el paciente infectado, cuantificando la misma. Existen múltiples métodos comerciales en la actualidad, los cuales expresan sus resultados en la misma unidad, cuyo significado de no detectabilidad de ARN-VHC no implica ausencia de viremia, ya que pueden existir pacientes con niveles no cuantificables pero detectable con ensayos cualitativos de mayor sensibilidad. Esto es especialmente importante en pacientes en tratamiento frente al virus de la hepatitis C.

Estas técnicas se suelen basar en métodos de PCR (por ejemplo el AMPLICOR<sup>®</sup> HCV Monitor utilizado en nuestro laboratorio, con un límite de detección 15 UI/ml.) o bien en otros tipos como por ejemplo un método basado en la captura del ARN-VHC por hibridación de la región 5'UTR del ARN viral con sondas específicas, llamado QUANTIPLEX (Branched DNA). Esta combinación sonda-ARN, se une a moléculas luminiscentes que permiten amplificar la señal en lugar de amplificar el genoma. La intensidad de la señal recibida será proporcional a la cantidad de ARN de la muestra.

No obstante, las técnicas de PCR han evolucionado hacia las técnicas en tiempo real (Taqman<sup>®</sup>, Roche Molecular Systems), donde se agrupan las fases de amplificación y detección del amplicado, que aporta mayor velocidad en la detección y



disminución del riesgo de contaminación al eliminar fases de manipulación de las mismas, pero que seguiría las mismas directrices de las PCR clásicas.

En general, estas técnicas tienen las siguientes aplicaciones:

- Determinación basal pre-tratamiento en los pacientes infectados por VHC, para poder evaluar la caída de la carga viral tras el inicio del tratamiento y comprobar la efectividad del mismo y continuarlo o bien suspenderlo de forma precoz en caso de la no respuesta al tratamiento.

#### 2.5.2.2 .- Determinación del genotipo

Son usadas para determinar que tipo de virus es el que tiene el paciente, aspecto fundamental a la hora de determinar tipo y tiempo de tratamiento antiviral, y es el primer paso obligado en cualquier estudio de epidemiología molecular. Para determinar el genotipo de VHC se pueden distinguir varios procedimientos, de los cuales, la técnica de referencia es la secuenciación de ácidos nucleicos a través de técnicas de amplificación por PCR, secuenciación y posterior análisis de la secuencia obtenida, con la ayuda de un programa informático [67, 68].

Las regiones a estudiar deberían ser NS5b, 5'UTR y Core, ya que aquí es donde se pueden localizar con mayor exactitud las diferencias que caracterizan a los distintos genotipos y subtipos. Sin embargo, existen determinadas zonas del genoma como por ejemplo la NS5b, que es muy variable, y por ello los protocolos de secuenciación son muy complejos, incluyendo la necesidad de amplificar por separado cada uno de los genotipos, estando por el momento solo al alcance de laboratorios de investigación especializada en VHC.

Es por esto por lo que las técnicas moleculares para la detección de genotipos, amplifican una parte del genoma mucho más conservada: La región 5'UTR o no codificante. Además, la utilización de esta región como base para la determinación del genotipo presenta una ventaja adicional, ya que el amplificado que hemos obtenido para la determinación de ARN-VHC nos sirve directamente para su secuenciación, ya que la mayoría de estos ensayos amplifican la región 5'UTR.

### **2.5.2.2.1 .- Genotipado basado en PCR**

Basados en la PCR, que son las técnicas de elección, hay básicamente dos: INNO-LIPA HCV II, y Truprep HCV 5'NC Genotyping Kit. Ambas muestran una muy buena correlación con la determinación del genotipo del VHC, pero hay que recordar que ninguna muestra una eficacia superior al 80%, en la estimación del mismo.

#### **➤ .- INNO-LIPA HCV II**

Ensayo basado en la hibridación reversa, donde una vez obtenido el amplificado de la región 5'UTR se desnaturaliza, y se enfrenta a una tira de nitrocelulosa que contiene sondas específicas que permiten la hibridación del producto amplificado. Dichas sondas son específicas de genotipo/subtipo.

El producto de la hibridación se somete posteriormente a un revelado de tipo inmunológico que se interpretará comparándola con un patrón que proporciona la casa comercial.

#### **➤ .- Truprep HCV 5'NC Genotyping Kit**

Se basa en la secuenciación bidireccional del amplificado de la región 5'UTR, tras una purificación previa del producto y una secuenciación mediante el empleo de primers marcados con CY5.0 (3') y CY5.5 (5') y dideoxiterminadores (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP). Para cada muestra por tanto se requerirán 4 reacciones de secuenciación (una para cada base A, C, G y T). Al final un software de interpretación nos permite alinear las secuencias con las de referencia y establece un informe que indica el genotipo, subtipo y aislado con el que muestra una mayor homología.

En esta técnica se secuencia un fragmento de 183 bases, de las que 66 son responsables de las diferencias entre genotipos/subtipos/aislados. En el resto de las posiciones no existen diferencias entre los genotipos ya que, como sabemos, la región que se secuencia es altamente conservada. Esta última es de mayor complejidad técnica que las citadas con anterioridad.

#### **2.5.2.2.2 .- Genotipado serológico**

La determinación del serotipo infectante (tipado serológico), se realiza a través de técnicas de ELISA o de INMUNOBLOT. Métodos específicos y reproducibles donde se detectan anticuerpos específicos frente a diferentes péptidos de la región NS4 del VHC. Consisten en presentar el suero problema a cinco canales o tiras de nitrocelulosa donde hay fijados péptidos serotipo específicos de la región no estructural NS4, y de las regiones del núcleo de los tipos 1, 2 y 3.

Estas técnicas presentan dos ventajas sobre el anterior: Rapidez y simplicidad en la preparación. No obstante tiene como principales inconvenientes, que presenta una menor sensibilidad, y una pobre especificidad para la discriminación de la mayoría de los subtipos, quedando más del 20 % de las muestra como no tipables. Otro problema es la reactividad cruzada entre genotipos que proporcionan un gran número de resultados discordantes siendo imposible distinguir distintos subtipos [67, 68].

Por esta serie de inconvenientes, dichos sistemas no se han podido implantar como técnica de rutina para el genotipado de VHC en el laboratorio.

## **2.6 .- IMPLICACIONES DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA**

Esta gran cantidad de mutaciones producidas en el genoma viral del VHC constituyen una gran reserva de variantes fenotípicas que en condiciones favorables pueden derivar en una mayor patogenicidad y virulencia de la enfermedad, hepática o extrahepática producida por dicho virus. Pero no solo esta variabilidad viral puede influir en las propiedades infectivas del mismo, si no que también puede influir sobre el sistema inmune del huésped, para evitar de este modo la lisis viral al no poder adherirse al hepatocito o escapando del ataque de las células T citotóxicas; o sobre la selección de cepas resistentes al tratamiento antiviral que contribuyen claramente a la persistencia significativa del virus de la hepatitis C. Por tanto, la variabilidad genética del VHC presenta importantes implicaciones tanto a nivel patogénico como a otros niveles como la epidemiología y el diagnóstico, que pasaremos a describir a continuación.

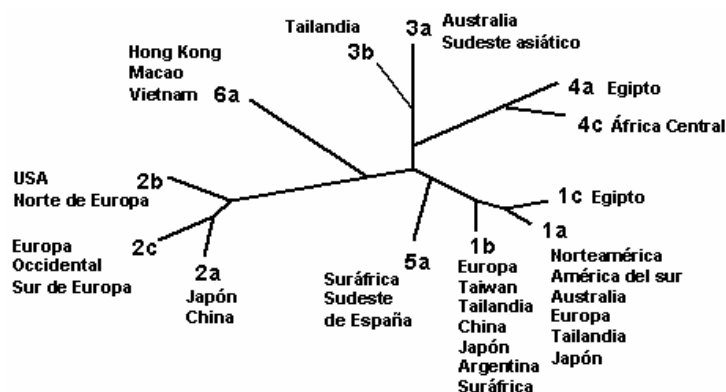
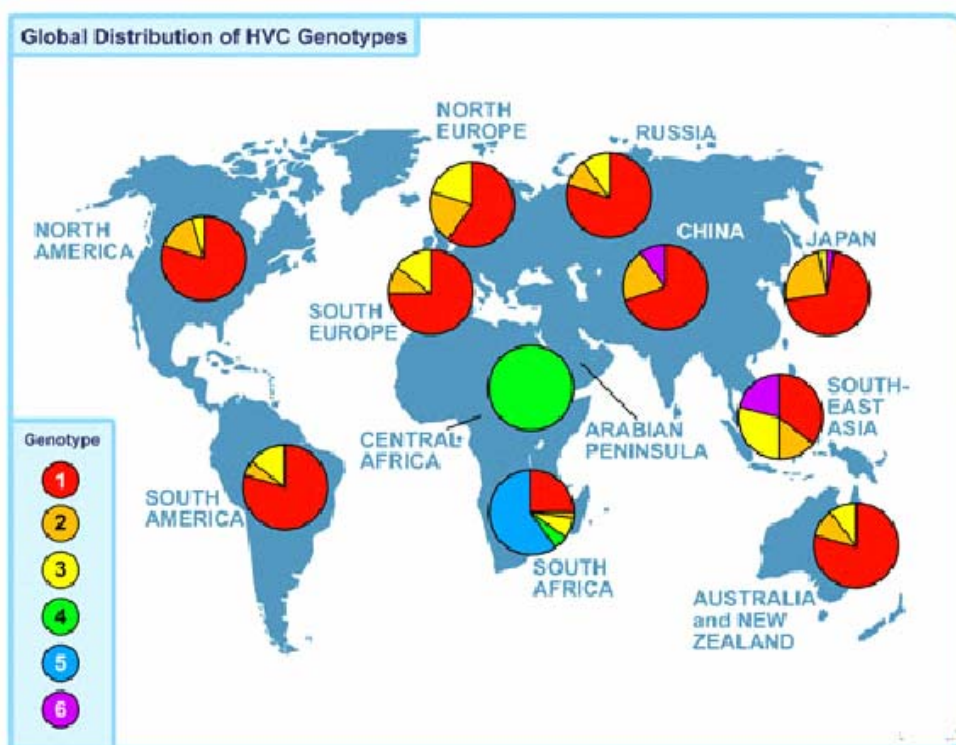
### 2.6.1 .- Epidemiología o Variabilidad geográfica

Analizando las secuencias de cepas virales prototipos de distintos países se ha podido comprobar que existen virus genéticamente distinguibles, y que esta heterogeneidad se refleja en una distribución típica por genotipos que tras su seguimiento en el tiempo muestra cierto paralelismo a nivel mundial con los movimientos poblacionales, tanto por emigración como por turismo. Además, existen otros factores que contribuyen como son la drogadicción, compartir o usar por accidente material contaminado entre enfermos; y las transfusiones sanguíneas, aunque éstas, gracias a los controles en los bancos de sangre, han pasado a un segundo plano.

Tras construir distintos árboles filogenéticos en función de distintas regiones del ARN-VHC, varios autores han comparado las distancias genéticas entre distintos aislados virales, integrando sus resultados para el estudio de la divergencia a lo largo del tiempo y distribución geográfica de los mismos, observando como la distribución mundial muestran una coexistencia generalizada respecto a los genotipos 1, 2 y 3. Estos representan una mayor prevalencia en Europa occidental, Gran Bretaña, Norteamérica, Sudamérica, Japón (específicamente el genotipo 1b, también definido como K1 según la nomenclatura de Enomoto, que describe la variante HCV-J como la más prevalente en dicho país), China y Australia. Mientras que era raro localizarlo en Asia Oriental, donde era más frecuente localizar pacientes infectados por el genotipo 4, al igual que en África del Norte, África Central (Zaire) y Oriente Medio, que coincide con la enorme población inmigrante en estos países procedentes de países como Egipto, Arabia Saudita, Líbano o Iraq. El genotipo 5 es prácticamente exclusivo de los casos de hepatitis C en África del Sur, y respecto al genotipo 6, resulta ser el más prevalente en el Sudeste asiático, junto al 1b.

En la siguiente figura 10, analizamos la distribución geográfica de los distintos genotipos virales, en función de los datos recopilados de los distintos estudios mundiales acerca del VHC, que muestra determinadas rutas de transmisión de la infección, fundamentalmente a expensas de la población inmigrante y el turismo.

Figura 10.- Distribución Mundial Genotípica de la infección por VHC



También hay que hacer hincapié en la importancia de la variabilidad de los genotipos según las prácticas de riesgo, siendo clara la asociación entre los genotipos 3a en drogadictos por vía parenteral, a nivel mundial, estando específicamente asociada en España entre ésta misma práctica con el genotipo 1a. Por otro lado, el contagio de la infección a través de transfusiones de sangre contaminada se ha asociada universalmente con el genotipo 1b.

Otra utilidad del estudio del genotipo sería utilizarlos como “Marcadores epidemiológicos”, para el seguimiento y control de movimientos de productos sanguíneos y posibles rutas de contagio. Pero en ambos casos este tipo de estudios son poco específicos y habría que utilizar estudios filogenéticos más exhaustivos que

analizasen otras regiones más específicas, tales como la HVR1, E2 o la NS5a, y poder hacer el seguimiento de las rutas de transmisión de una cepa concreta.

## 2.6.2 .- Patogenicidad

Como ya se ha mencionado, una de las características más importantes del VHC es su tendencia a producir una infección crónica. Los mecanismos por los cuales el VHC persiste en el organismo son desconocidos, siendo lógico pensar que la variabilidad genética del virus puede contribuir en parte a explicar la persistencia de la infección [30, 69].

Hay estudios que intentan relacionar los cambios que se van produciendo en el virus con un patrón de selección y escape a la respuesta inmune. Esto ocurre fundamentalmente a expensas de la región hipervariable HVR-1, donde hay estudios que muestran que la aparición de anticuerpos contra la secuencia predominante de la región hipervariable 1, es seguida por la aparición de una nueva variante HVR-1 con una secuencia diferente no reconocida por anticuerpos previos [13]. Algunos autores mostraron que anticuerpos generados contra la secuencia dominante de la región HVR-1 de un aislado podían neutralizar a la cepa mayoritaria *in vitro*, siendo capaz de abolir la infectividad de dicha subpoblación viral predominante, pero no de las cepas minoritarias con secuencias distintas presentes en el mismo paciente [70].

No obstante, el escape a la respuesta inmune no se produce únicamente como respuesta a la presión inmune ejercida por anticuerpos específicos. Hay datos que apoyan la aparición de mutantes de escape frente a la respuesta inmune celular ejercida por linfocitos T citotóxicos frente a epítomos de regiones conservadas como la proteína NS3 [27].

Sin embargo, la evolución genética del virus no parece ser el único mecanismo por el que el virus persiste. Otro mecanismo por el cual el VHC podría persistir en el organismo sería que la respuesta inmune generada frente al virus fuese insuficiente para erradicar la infección. De hecho, estudios de inmunidad celular en humanos y chimpancés sugieren que esta respuesta es más débil en individuos en los que la infección evoluciona a la cronicidad si se compara con aquellos que son capaces de eliminar el virus.

Respecto a las manifestaciones extrahepáticas derivadas del VHC, diversos estudios a lo largo de la historia han relacionado enfermedades autoinmunes con la hepatopatía crónica por VHC. Tales como la hepatitis autoinmune tipo II (HAI-2), la crioglobulinemia, la glomerulonefritis membranoproliferativa, o el Síndrome de Sjögren. Dicha relación se ha basado fundamentalmente por la similitud existente entre los autoanticuerpos causantes de dichas patologías (AC microsomales en riñón o hígado, AC-KLM, o AC anti GOR), y determinadas regiones genómicas del ARN-VHC, tales como las regiones codificadoras del core (C), envuelta (E2) o NS5. Al determinar el genotipo por técnicas de PCR en poblaciones de alta prevalencia de pacientes enfermos con HAI-2 con ARN-VHC, se ha observado una mayor incidencia de virus genotipo 1b de hasta el 80% en dichos enfermos; por otro lado el genotipo 2a se ha visto asociado a la presencia de AC-KLM +. Por tanto, parece que también existe relación entre la variabilidad genética del VHC y las manifestaciones extrahepáticas mediadas por autoanticuerpos asociados a la infección [71, 72].

### **2.6.3 .- Resistencia al tratamiento**

- Papel de NS5a: PKR y región ISDR.

Respecto a la región ISDR de NS5a, se ha postulado una posible relación con la respuesta del paciente al tratamiento con interferón. La PKR es una proteína que además de ser supresora de tumores, es capaz también de bloquear la expresión de los genes víricos. La interacción de PKR con la región NS5a puede inhibir la hiperfosforilización de dicha enzima, y secundariamente su actividad kinasa. Existe pues una interacción entre la proteína NS5a, en los genotipos 1a y 1b, y el sitio catalítico de PKR, siendo este el primer mecanismo descrito por el que el virus podría hacerse resistente al interferón. Según series de trabajos japoneses liderados por Enomoto y colaboradores, han postulado que el número de mutaciones de esta región pudiera estar en relación con la futura respuesta del paciente al tratamiento con interferón, hasta el punto de que si la secuencia no estaba mutada (“wild type”), la probabilidad de que hubiera respuesta al tratamiento podía alcanzar el 23%. Cuando existen de 1-3 mutaciones en esta región, calificaremos la cepa como “intermedia”, aumentando la probabilidad de respuesta al tratamiento hasta el 35 %. Por último, una cepa se clasifica como “mutante” cuando existen  $\geq 4$  mutaciones en esta misma región, con las cuales, la probabilidad de alcanzar una respuesta satisfactoria al tratamiento, sube hasta el 67% en las mejores series (se ha comprobado que estas

cepas, suelen englobar entre 4 y 9 mutaciones). Resumimos la terminología utilizada sobre el número de mutaciones acumuladas en la región ISDR en la tabla 4.

**Tabla 4.- Clasificación del aislado viral en función al número de mutaciones que presente en la región ISDR del ARN-VHC.**

	Nº DE MUTACIONES EN LA REGIÓN ISDR
WILD TYPE	Ninguna mutación
INTERMEDIO	1-3 mutaciones
MUTANTE	≥4 mutaciones

- Papel de NS3

Recientemente, un grupo de investigadores estudiando la región NS3 (con acción ATPasa/helicasa), ha encontrado en individuos infectados tres tipos de clones procedentes del genotipo 2a (buenos respondedores) y de los 1a y 1b (no respondedores). Pues bien, aunque la diferencia de secuencias entre todos los genotipos era muy pequeña (alrededor del 15%), existía una variación clara en el residuo 450 que condicionaba la respuesta al tratamiento. En el caso de los respondedores, el aminoácido era una isoleucina, y en el de los no respondedores, una treonina. También se cree que esta porción del genoma está implicada en el desarrollo del cáncer hepático [23].

## **2.7 .- TRATAMIENTO**

Históricamente, el tratamiento de la hepatitis crónica ha tenido siempre muy malos resultados, augurando mal pronóstico a todo paciente infectado, dada la poca o nula mejoría con el uso de las diferentes pautas utilizadas. De ahí, el enorme interés por la investigación de nuevos fármacos y pautas, que poco a poco puedan ofrecer una mejor esperanza y calidad de vida a la población afectada con hepatopatía crónica por VHC. Una vez confirmado el diagnóstico de infección crónica por VHC, se realiza un estudio del genotipo del virus, y una cuantificación del ARN viral o carga viral existente previa al inicio del tratamiento, también denominada carga viral basal previa. Estos son los principales factores predictivos de la respuesta al tratamiento.



Definimos previamente una serie de conceptos necesarios para la mejor comprensión de la respuesta del estado del paciente y la evolución de la enfermedad en función del tratamiento administrado:

- **Respuesta Viroológica Final de Tratamiento (RVF):** Carga viral indetectable (< de 50 unidades internacionales/ ml), inmediatamente tras finalizar la pauta de tratamiento establecida.
- **Recaída Viral, tras respuesta inicial al tratamiento:** Detección de ARN-VHC en sangre antes de que pasen 6 meses tras la finalización del tratamiento, habiendo tenido carga viral indetectable inmediatamente a la correcta cumplimentación del mismo.

Existen diferentes teorías acerca del origen de las recaídas, siendo la más aceptada aquella que establece una población viral residual, bien dentro del hepatocito o bien en el interior de los propios linfocitos, que no están en fase activa pero que en un momento dado. A partir de este momento vuelve a haber ARN-VHC detectable en sangre periférica por las diferentes técnicas diagnósticas [38].

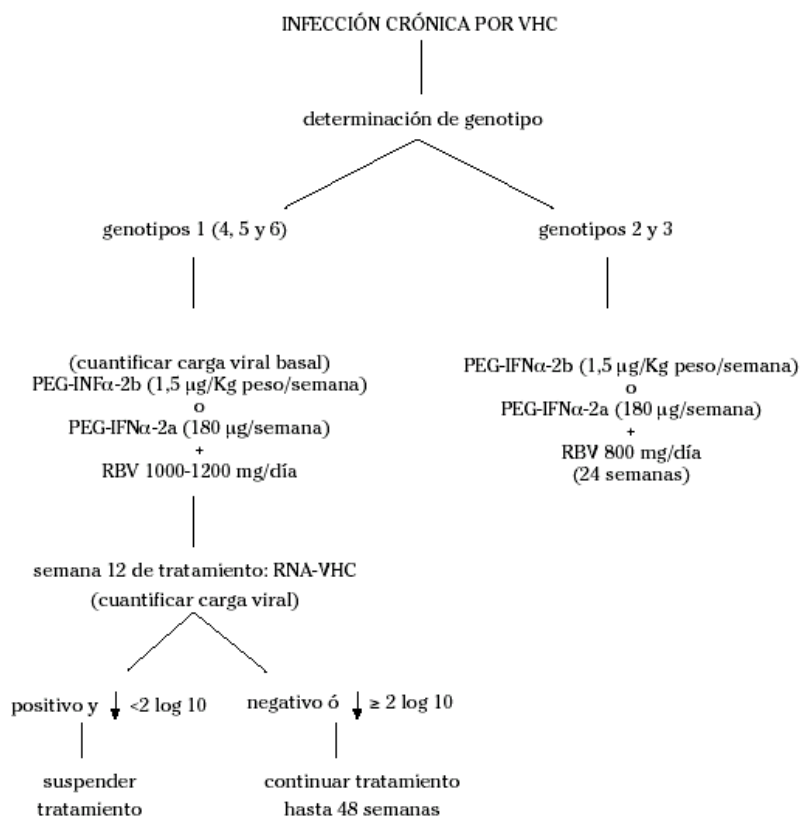
- **No respondedores al tratamiento (NR):** Son aquellos pacientes cuya carga viral a lo largo de todo el tratamiento es detectable, no habiendo relación entre cantidades detectadas y pronóstico del mismo.
- **Respuesta Viroológica Sostenida tras la finalización del tratamiento (RVS):** Mantener el ARN-VHC por debajo del límite de detección de la técnica disponible en el laboratorio (inferior a 15 Ui/ml, en nuestro caso), o sea mantener la carga viral del VHC indetectable, 6 meses después de haber finalizado el tratamiento.
- **Respuesta Viral Precoz al tratamiento (RVP):** Se define como la negativización de la carga viral detectable en plasma antes de la 12 semana de tratamiento. Determinará un factor predictivo importante a la hora de alcanzar una respuesta viral mantenida y evolución posterior del paciente y su patología crónica [73-75].
- **Respuesta Viroológica Rápida (RPR):** Negativización de la carga viral de VHC en la semana 4 de haber iniciado el tratamiento.

El **tratamiento actual** de la hepatitis crónica por VHC, irá condicionado principalmente por el genotipo causante del cuadro, distinguiéndose:

- GENOTIPO 1: 1000-1200 mg/día de Ribavirina (RBV), durante 48 semanas más interferón alfa pegilado (PEG-IFN). La elección de una dosis u otra dependerá del peso del paciente. Por encima de 70 kg al inicio del tratamiento determinará el uso de 1200 mg/día de ribavirina. En caso contrario la dosis de RBV será de 1000 mg/día.
- GENOTIPOS 2 y 3: 800 mg/día de RBV + PEG-IFN, durante 24 semanas.
- GENOTIPOS 4, 5 y 6, dada la falta de datos concluyentes en la actualidad, se le aplicará la misma pauta que en el caso del genotipo 1.

En la figura 11, queda reflejado el algoritmo terapéutico aceptado en la actualidad para todo paciente infectado por el virus de la hepatitis C que inicie tratamiento específico frente a dicha infección [39, 76].

**Figura 11.- Algoritmo terapéutico de la infección por VHC**



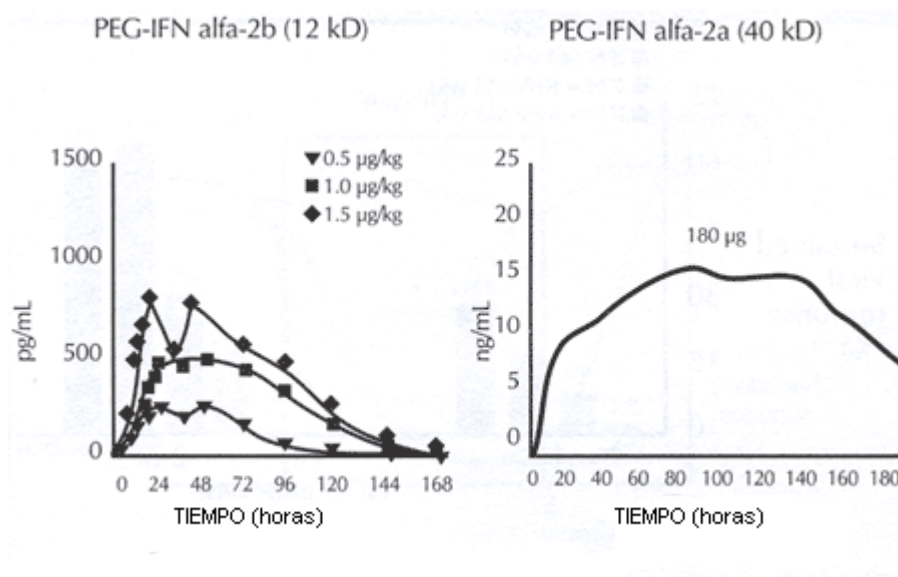
Inicialmente, el tratamiento se basaba en el uso del interferón alfa (IFNa) en monoterapia, que fue sustituido por la pauta combinada con Ribavirina (RBV) en el año 1990 (momento en el que es aprobado por la FDA para su uso en humanos: 3 mega unidades, 3 veces en semana durante 48 semanas), alcanzando respuesta al tratamiento (RVS) en el 12-16% y 35-45% respectivamente [77-79].

Posteriormente, se introduciría el “Interferón pegilado”, que no es más que el interferón alfa convencional (INF-alfa) unido a una molécula de poli-etilen-glicol (PEG), molécula que no tiene ninguna actividad enzimática y que solo tiene como función la de aumentar el peso molecular del interferón, con que consigue retrasar la metabolización del mismo en nuestro organismo aumentando su tiempo de vida media, que pasa a ser de 40 horas respecto a las 4 horas del INF convencional. Esta circunstancia se debe a que la aclaramiento renal sólo supone un 30% del aclaramiento total del interferón. De este modo se consigue mantener niveles elevados de interferón durante más tiempo, sin las caídas bruscas de los niveles farmacológicos del INF convencional [77, 80-82]. De esta manera, se mejora la actividad anti-vírica, ejerciendo una presión continua sobre el virus y pasar así de 3 dosis en semana a una única dosis subcutánea a la semana, lo cual es un punto importante para un mejor cumplimiento de la pauta a largo plazo, ya que mejora notablemente su administración.

Podemos distinguir dos moléculas diferentes de interferón pegilado (PEG-IFN):

- PEG-IFN Alfa 2a (Pegintrón, “Schering”); de bajo peso molecular (12 kd) de estructura lineal unida mediante un enlace covalente a la histidina-34, aunque existen otros puntos secundarios de pegilación como la cisteína N-terminal y la lisina-31,-121,-134). Dentro de varias dosificaciones probadas, exigiría una dosis de 0.5-1.5 µgr/kg de peso del paciente, por dosis semanal.
- PEG-IFN Alfa 2b (Pegassys, “Roche”); de alto peso molecular de 60000 daltons, de los cuales la porción proteínica constituye aproximadamente 20 kd. Presenta una estructura ramificada, que permite una dosificación de 180 µgr a la semana, que no necesita ser ajustada al peso del paciente, sino a su tolerancia y respuesta progresiva.

**Figura 12.- Farmacodinámica de las dos moléculas de PEG-IFN comercializados en la actualidad**



La RBV es un análogo sintético de la Guanosina, que administrado sin el interferón no tiene ningún efecto en la infección crónica por VHC, pero que en combinación con éste, “in vitro”, muestra actividad inhibidora de las enzimas ARN polimerasa de algunos virus como el VHC y el causante de la diarrea bovina. Se ha comprobado que tras tres días de administración, la ribavirina es capaz de reducir al menos 0.5 log<sub>10</sub> copias/ml, a través de una inhibición competitiva por el GTP intracelular con la enzima “Inosina Monofosfato Deshidrogenasa”, que debido a esta depleción energética intracelular, no puede seguir con la síntesis de ARN viral.

Una de las características de los virus ARN, como el VIH y el VHC, es la alta capacidad de mutación de estos virus, lo que supone que en la replicación de estos virus se cometan errores cada vez más frecuentes. Si se aumenta aún más esta tasa de errores, los virus pueden llegar a alcanzar incapacidad para perpetuar su información genética con lo que se pierde la capacidad de infección de nuevas células. Ese proceso se denomina "entrada del virus en catástrofe de error", es decir, extinción del propio virus por incapacidad de copiar y transferir su material genético. El número de errores que pueden llegar a cometer estos virus pueden aumentarse con agentes mutagénicos, algunos de los cuales se emplean en las terapias contra el cáncer, de manera que se fuerce la entrada del virus en catástrofe de error. La ribavirina posee como mecanismo antiviral generando una cascada de mutaciones en el virus, que

alteran y deforman el ARN-VHC, de manera que se imposibilita la replicación del virus, haciendo que el virus entre en catástrofe del error.

La ribavirina parece también tener cierto carácter potenciador de la respuesta inmune defensiva del hospedador junto al interferón, pero que no es bien conocido, aunque se cree estar relacionada con el desequilibrio entre las interleucinas Th1/Th2, a favor del primero y con la supresión de la síntesis de interleukina 10 por parte del VHC [83].

En caso de no poder administrar RBV y tener que utilizar el PEG-IFN en monodosis, se ha establecido que la dosis de este sea de 1.0  $\mu\text{gr}/\text{kg}$  de peso del paciente en monodosis semanal, durante 48 semanas.

No obstante, por el momento no existen datos concluyentes sobre:

- Cual de estas dos moléculas de interferón pegilado es mejor en general para el tratamiento pautado en la hepatopatía crónica por VHC.
- Ajuste real de la dosis de PEG-IFN, habiendo ya indicios de que las dosis prescritas en la actualidad son superiores a las realmente necesarias y efectivas (mismos resultados con 1.0 que con 1.5  $\mu\text{gr}/\text{kg}$  de peso).

Se ha sugerido que existen determinados factores previos al inicio del tratamiento que predisponen la respuesta posterior mantenida al mismo, como son:

- Genotipo viral (que sigue siendo el principal factor pronóstico a la respuesta posterior al tratamiento, donde el genotipo 1 se relaciona a priori con mal pronóstico, frente a los genotipos 2 y 3, con buena respuesta al tratamiento a medio y largo plazo) [84-90].
- Carga viral baja, previamente al inicio del tratamiento [91-93].
- GPT alta, previamente al inicio del tratamiento.
- Ausencia de fibrosis avanzada o cirrosis hepática [59].
- Respuesta viral precoz al tratamiento [94].

- Correcto seguimiento del cumplimiento de la pauta del tratamiento (se considera como óptima el cumplimiento de al menos el 80% de la duración total del tratamiento con al menos el 80% de la dosis prescrita [95].

Después existen otros factores secundarios, que si bien se cree tienen relación, no está tan clara la magnitud de su importancia:

- Bajo peso del paciente.
- Edad superior a 40 años del mismo.
- Mujeres son mejores respondedoras [9, 42].
- Raza negra o india, mejor que blanca [96].
- Consumo activo de alcohol.
- Esteatosis hepática previa al inicio del tratamiento se ha asociado con peor respuesta al tratamiento [97-100].
- Resistencia a la insulina, que al igual que en el caso anterior también se ha asociado con peor respuesta al tratamiento anti VHC [101].
- Coexistencia de hepatitis B oculta (ADN-VHB positivo y HBs ag negativo, junto a ARN-VHC positivo).
- Coexistencia con el VIH.

Por otro lado, existen múltiples líneas de investigación abiertas, acerca de otras posibilidades de tratamiento, aunque estas se encuentran en fase de experimentación, y por tanto, aún están lejos de poder usarse con garantías en la población humana [102]. Entre otras cabe destacar:

➤ NUEVOS INTERFERONES en desarrollo:

- Interferón omega (fase clínica II): Pro fármaco desarrollado para dispensación oral.
- Interferón Medusa (fase clínica II)
- Alfacon-1 pegilado (fase clínica I)
- Interferón alfa oral (fase clínica I)
- Multiféron ®: Molécula idéntica al IFN  $\alpha$ , obtenido a partir de glóbulos blancos humanos (Interferón alfa humano leucocitario), indicado en el tratamiento de la hepatitis crónica por virus B y C, tanto solo como en

combinación con ribavirina. También tiene indicación en el tratamiento de Leucemia de células vellosas y en la leucemia mielógena crónica que ha desarrollado resistencia a los interferones alfa recombinantes clásicos, probablemente debido a la aparición de anticuerpos neutralizantes.

- Albuferón (fase clínica II): Molécula obtenida tras combinar el IFN $\alpha$  2 beta con partículas de albúmina humana, de manera que el mayor tamaño de la molécula resultante, al igual que ocurre con la pegilación del IFN, supone un tiempo de vida media en plasma de 157 horas. En recientes estudios han presentado porcentajes de respuesta virológica sostenida próxima al 60% en distintos grupos con administración bisemanal, siempre comparándose con pacientes en tratamiento con interferón pegilado alfa convencional más ribavirina.
  - ANA 245, ANA 971 (fase clínica I/II): Análogo de nucleósido de bajo peso molecular que induce la síntesis y liberación de múltiples citocinas, incluido el IFN  $\alpha$ , lo cual se ha correlacionado con una clara disminución de la carga viral tras su administración (Profármaco de Isatoribina) [83]
  - Resiquimod (fase clínica II): También induce la síntesis y liberación de múltiples citocinas: IL 12, 1, 6, IFN  $\alpha$ , factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y neopterinina.
- ANÁLOGOS DE RIBAVIRINA: Debido al riesgo de desarrollo de anemia hemolítica que desarrolla la RBV, ha sido necesario la búsqueda de moléculas alternativas a la misma. De ahí la aparición de:
- Levovirina (fase clínica I): Isómero levógiro de la RBV, asociado a una menor tasa de aparición de anemia hemolítica, debido a que no es necesaria su fosforilación para ser activa. Su rango de administración oscilaría entre 200-1200 mg.
  - Viramidina (fase clínica III): Pro fármaco de la RBV, que es transformado en este rápidamente en el hígado por la acción de la adenosina deaminasa. Incluso dosis por encima de 1200 mg son bien toleradas in vivo. Recientes estudios ofrecen datos de similar actividad

antiviral de este fármaco respecto a RBV, con menor incidencia de anemia hemolítica por parte de la Viramidina.

- HEPTAZYME(fase clínica I): Ribozimas sintética diseñada para la destrucción específica de la región IRES del ARN-VHC, que pese a encontrarse en fase 1, ya vislumbra una excelente actividad antiviral con un perfil de seguridad toxicológico muy bueno en animales [103].
  
- INHIBIDORES ENZIMÁTICOS: Fármacos encargados de inhibir aquellas enzimas codificadas por los genes no estructurales del ARN-VHC, de manera que se interrumpe la síntesis de nuevos viriones.
  - BILN 2061 (fase clínica II): Inhibidor específico de la serín-proteasa (p70) codificada por la región NS3, que ya ha sido probado en ensayos clínicos demostrando buena eficacia y tolerancia administrado dos veces al día durante periodos de dos días. Se están realizando nuevos estudios para comprobar como se comporta dicho fármaco durante una administración mas prolongada [104].
  
  - VX 950 (fase clínica I): Inhibidor específico de las proteasas codificadas por la región NS3-4a, que en estadíos iniciales demostró una mediana de disminución de la carga viral de 4 logaritmos, la mayor potencia de inhibición de la replicación del virus C observada hasta el momento con una dosis de 750 mg/día, lo que sugiere que este medicamento podría utilizarse en monoterapia.
  
  - Valopicitabina o NM 283 (fase clínica II): Análogo de nucleósido inhibidor de Proteasa específico de la NS5b ARN Polimerasa ARN Dependiente. Fármaco que se administra oralmente y en toma única, ha demostrado tanto en los ensayos en fase I como en fase II, con buen perfil de seguridad, y un potente efecto anti VHC tanto en monoterapia como en combinación con PEG IFN, alcanzándose una reducción de la carga viral de 1.21 logaritmos a los 16 días del inicio del tratamiento.
  
  - JTK 003 y JTK 109 (fase clínica I/II): Se trata de dos inhibidores selectivos de la NS5b ARN Polimerasa ARN Dependiente. Pero al



contrario de lo que ocurre con el fármaco anterior, éste es un fármaco No análogo de nucleósido.

- Merimepodib (VX 497) (fase clínica II): Inhibidor de proteasa específico de la IMPDH (Inosina 5' Monofosfato Deshidrogenasa), que provoca una disminución de la concentración intracelular de guanina trifosfato (GTP), molécula fundamental para la síntesis de ADN y ARN, con lo cual impide la replicación viral [105].
- Acido micofenólico o Micofenolato mofetil (fase clínica I): Otro Inhibidor específico de la IMPDH, aún en estadios iniciales de investigación.
- Otros inhibidores enzimáticos en fases precoces:
  - Inhibidores de la helicasa (fase clínica I)
  - SCH-6 y SCH-503034 (fase clínica I)
  - ITMN B.
  - HCV-896 y HCV-796

#### ➤ AGENTES INMUNOMODULADORES

- Histamina dihidrocloride HDC (fase clínica II): Fármaco con capacidad moduladora de linfocitos T, células "natural killers" y fagocitos, que en estudios realizados junto a IFN  $\alpha$ -2b ha alcanzado una respuesta virológica mantenida entre 33-38% , y que se encuentra inmerso en nuevos ensayos formando parte de un régimen triple junto a PEG IFN y RBV [106].
- Timosin alfa 1 (fase clínica III): Péptido sintético no glicosilado de 28 aminoácidos de longitud estimulador de la síntesis de IFN gamma, interleukina 2 y 3, que ya se está utilizando en ensayos clínicos en combinación con PEG IFN en pacientes no respondedores al régimen habitual de PEG IFN + RBV [107] .
- Amantadina (fase clínica IV): Fármaco anti influenzae A, que se ha probado en triple régimen junto a PEG IFN + RBV, aportando en determinadas series una alta respuesta virológica mantenida incluso en pacientes que recaen al PEG IFN + RBV, pero por el contrario otros

estudios ofrecen datos contradictorios sobre su eficacia frente al VHC [108].

#### ➤ AGENTES ANTIFIBRÓTICOS

La finalidad de estos fármacos es la de disminuir lo máximo posible el daño primario de desestructuración y fibrosis que sufre el hígado tras el ataque del virus de la hepatitis, así como el que puede ejecutar el propio organismo frente a hepatocitos anómalos. Sin embargo, los resultados obtenidos con todos ellos no son muy esperanzadores, pues, si bien hay un efecto antifibrótico inicial, se comprueba en menos de un año un importante repunte de la carga viral (ARN-VHC) [109, 110].

- Oligonucleótidos antisense (ISIS 14803): Este fármaco, actualmente en fase de desarrollo II, es un oligonucleótido complementario a la región IRES del ARN-VHC de 20 aminoácidos de longitud. Inhibe directamente la síntesis de proteínas virales al interrumpir la fase traducción del ARN-VHC. Dicha molécula, ya en fase clínica II, ha demostrado efecto dosis dependiente in vivo, mostrando una reducción significativa de la carga viral en pacientes tratados, por lo que ya se ha incluido en combinación con PEG IFN + RBV en ensayos clínicos [95].
- Antifibrótico oral IP-501

#### ➤ ANTICUERPOS MONOCLONALES (fase clínica I): Aún en fases muy precoces de investigación. Entre otros podemos distinguir entre:

- XTL 002 y XLT-6865: anticuerpo monoclonal específico frente a la proteína viral E2.
- HCV AB 68
- ANA 245 y ANA 971
- Tarvacin
- ID 6556
- ISIS 14803
- Enbrel

#### ➤ VACUNAS TERAPÉUTICAS

Por último, la gran variabilidad de determinadas regiones del VHC, hace muy difícil el desarrollo de una vacuna útil. No obstante, existen diferentes líneas de investigación abiertas para la creación de una vacuna preventiva contra el VHC utilizando proteínas de distintas zonas del *core*, siendo vehiculizadas por otros virus.

Varios intentos ha habido ya a la hora de desarrollar una vacuna efectiva frente al virus de la hepatitis C, unos basados en las glicoproteínas de la envuelta (E1, E2), proteínas del core o en proteínas no estructurales tales como NS3, NS4 y NS5, pero ninguna ha dado buenos resultados. Hasta el momento, solo se ha conseguido frenar la fibrosis hepática en el caso de la vacuna desarrollada a partir de E1, o bien estimular la síntesis de IFN gamma y secundariamente células T citotóxicas (CD4 y CD8) por el propio organismo, que serían capaces de alcanzar cierta respuesta en no respondedores al régimen clásico [111].

- Péptido IC 41 (fase clínica II)
- Proteína de envuelta (E) (fase clínica II)

## **2.8 .- MECANISMOS DE RESISTENCIA A FÁRMACOS**

### **2.8.1 .- MECANISMOS DE RESISTENCIA AL IFN ALFA**

Existen distintos tipos de interferón, según su origen. Distinguimos entre el interferón alfa (INF-alfa) producido por los linfocitos B y los monocitos, que han sido los más utilizados; interferón beta e interferón gamma.

Respecto al interferón alfa, que es el que se utiliza como pilar fundamental del tratamiento de la hepatitis crónica por VHC, posee un mecanismo de acción doble:

- Por una parte, tiene una acción antiviral directa: éste fármaco ejerce una acción moduladora de la respuesta inmune del propio individuo aumentando la expresión de los antígenos de superficie del hepatocito, que se traducirá en un reconocimiento más efectivo por parte de los linfocitos T, que junto a una mayor activación de las células NK (Natural Killer) mediarán una destrucción más eficaz de las células infectadas. Además actúan Inhibiendo la replicación

viral a través de la expresión de una serie de proteínas que él mismo se encarga de inducir, como son:

- La 2'-3' Oligo Adenilato Sintetasa (OAS), una enzima dependiente de ARN de doble cadena que cataliza la polimerización del ATP de la célula infectada por el VHC (ATP representa la fuente de energía fundamental celular) y activará una endonucleasa, la Ribonucleasa L, la cual promueve la degradación del ARN viral y la inhibición de la síntesis de las nuevas proteínas virales de cadena simple.
  - La PKR (Proteín Kinasa dependiente de ARN de cadena doble) que cataliza la fosforilación de distintos factores de transcripción como la subunidad alfa del factor 2 (e IF2 alfa), que codifica el inicio de la traducción del ARN mensajero del virus, el cual al ser fosforilado interrumpe la traducción de proteínas, tanto virales como del huésped, siendo este por tanto un factor determinante de la inhibición de la replicación viral. Además, desencadena la apoptosis celular a través del BCR-2 y mecanismos mixtos dependientes de las caspasas, que como última instancia provoca la destrucción de las células infectadas, en este caso los hepatocitos colonizados por el VHC.
  - Las proteínas Mx A y Mx B, de la familia de las Guanosin Trifosfato (GTP), contribuyen a la defensa antiviral del sistema inmune inhibiendo la transcripción del ARN viral a través de la inhibición de la síntesis del ARN mensajero viral. Aunque parece que este mecanismo no tiene un papel muy importante en la infección por VHC.
- Por otra parte, bloquea el mecanismo de penetración al interior celular, a través de una unión selectiva con el receptor celular de superficie del hepatocito con respecto al VHC (se piensa está relacionado con las proteínas de la envuelta gp70 y gp33).

El fallo en el aclaramiento del ARN-VHC por parte del interferón, se deberá a un conjunto de variables que podemos clasificar en:

#### 2.8.1.1 Factores relacionados con el régimen de tratamiento seguido por el paciente.

Las primeras terapias antivirales utilizadas, basadas en la administración de IFN alfa en monoterapia tres veces en semana, producían un rápido descenso del nivel de ARN-VHC en sangre, pero aproximadamente hacia el segundo día tras su administración (que coincidía con el día previo a la segunda dosis de IFN), se observaba un rebote intenso en la producción de nuevas moléculas virales, que según estudios posteriores de secuenciación genética se ha comprobado se podían agrupar en cuasiespecies distintas, con la posible resistencia al tratamiento posterior.

El interferón pegilado, induce una típica declinación en dos fases de la replicación viral: una primera a las 24 horas de su administración, donde hay un descenso brusco de la cantidad de moléculas virales en plasma que muestra el efecto lítico directo del fármaco sobre las mismas, y una segunda fase de acción, donde se observa un descenso más lento del número de ARN-VHC, que representa la destrucción de células infectadas a través de la respuesta inmune del huésped.

Es por ello, por lo que se intenta mantener una concentración en plasma de los distintos fármacos que constituyen la terapia combinada actual, lo más constante posible, de manera que, la replicación viral sea la mínima posible y con ello, que no aparezcan nuevas cuasiespecies virales resistentes al tratamiento.

#### 2.8.1.2 . Factores relacionados con el paciente.

Parece haber relación entre algunas características del sujeto y su posterior respuesta al tratamiento como son por ejemplo la edad, el sexo, la etnia, el índice de masa corporal, así como de determinantes genéticos, hormonales o inmunológicos aún no determinados con claridad. Se ha podido observar como varones, hispanos o africanos frente a caucasianos o asiáticos, de edad avanzada, responden peor al tratamiento. No obstante no hay ninguna característica intrínseca en el sujeto que determine claramente como va a responder a la terapia combinada.

#### 2.8.1.3 . Factores relacionados con el tipo y severidad de la enfermedad hepática.

Se han relacionado con esta posibilidad determinadas características de la enfermedad hepática, como el grado de fibrosis hepática y el estado de compensación

o no de la cirrosis, las cuales se han relacionado con peor respuesta al tratamiento. La existencia de manifestaciones extrahepáticas, tales como la crioglobulinemia o la glomerulonefritis membranoproliferativa, también se han asociado a menor tasa de respuesta virológica al tratamiento. Y por último, el estado de coinfección con VIH o con hepatitis B oculta, ya sea por el efecto citopático del virus, por el efecto tóxico del tratamiento que supone esta otra enfermedad acompañante, o simplemente por el estado de inmunosupresión causado por estos virus, también parece influir en la existencia de un menor efecto beneficioso a la terapia anti-VHC que en pacientes infectados exclusivamente por VHC (mono infectados).

#### 2.8.1.4 . Factores relacionados con el virus.

Los virus no son células, son endoparásitos estrictos, y además, desde el punto de vista genético no tienen metabolismo propio, por lo que dependen fisiológicamente de la célula huésped, funcionando como una pieza añadida al material genético de la célula huésped. Además, el virus no se limita a replicar su genoma y producir viriones, sino que desencadena ciertas interacciones virus-célula para que el ciclo de multiplicación vírica y la habilidad para causar la enfermedad tengan éxito. Esta alteración de las funciones normales de la célula infectada es lo que se denomina citopatogenia, y este fenómeno sucede como inhibición múltiple en varios niveles de la expresión génica mediada por el bloqueo de una o varias fases de la expresión: transcripción, procesamiento, transporte o traducción.

No obstante, tras el estudio de la secuencia genómica, se ha observado la acción de la proteína viral NS5A, que es capaz de inhibir la actividad de la PKR inducida por el interferón. De esta manera, se inhiben las señales de apoptosis y la restricción de la traducción viral mediada por el factor de iniciación de la traducción eIF2. Al bloquear sendos efectos limitantes de la replicación viral, se anula el efecto antiviral que ejerce el interferón sobre el virus C, de manera que, muchos casos de hepatitis C desarrollan resistencias al fármaco.

También se ha observado cierta relación entre la cantidad de mutaciones halladas en determinadas regiones del genoma del VHC, que no el tipo de mutación, y la respuesta al interferón. Es por tanto fundamental seguir investigando esta línea de comportamiento, en interés de establecer una relación fiable que nos permita intuir una respuesta satisfactoria o no al tratamiento, antes de iniciar el mismo, o al menos de la

manera más precoz posible con la idea de ahorrarle al paciente múltiples efectos secundarios derivados del uso de interferón, y economizar recursos hospitalarios.

### **2.8.2 .- MECANISMOS DE RESISTENCIA A LA RIBAVIRINA**

Los mecanismos de resistencia a la ribavirina no son bien conocidos, pero dado que su acción básica es la de potenciar los distintos efectos del interferón, y que juntos los beneficios a largo plazo son claramente mayores, se piensa que los mecanismos de resistencia no deben de ser muy diferentes de los antes descritos para el interferón.

### **3 .- OBJETIVOS**

El trabajo experimental de la presente Tesis, ha sido planteado en función de los antecedentes expuestos en el capítulo de Introducción de la misma, proponiéndose los siguientes objetivos:

- Conocer el valor predictivo de la presencia de mutaciones en la región ISDR del gen NS5a del ARN-VHC, respecto la respuesta virológica al PEG-IFN como pilar del tratamiento antiviral frente a la hepatitis provocada por VHC.
- Detectar otros posibles factores relacionados con la RVS de los pacientes con hepatopatía crónica por VHC en tratamiento con PEG-IFN más RBV.

El análisis de las mutaciones existentes en dicha región del ARN-VHC en nuestra población así como su efecto sobre la respuesta virológica al tratamiento con interferón nos permitirá determinar la existencia de factores pronósticos de respuesta. A su vez, también contribuiremos al conocimiento de los porcentajes de respuesta de la población con hepatopatía crónica por VHC ya tratada en nuestro medio con PEG-IFN más RBV.



## **4 .- MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1 .- POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Para el estudio descriptivo retrospectivo de la relación entre estado de mutaciones de la región ISDR del ARN-VHC, y la posterior respuesta antiviral frente al VHC, se estudiaron un total de 91 pacientes. Todos ellos diagnosticados de hepatitis crónica por VHC, de los cuales 40 (44%) estaban también coinfectados por el VIH; mientras que los 51 pacientes restantes (56%), solo estaban infectados por el virus de la hepatitis VHC (pacientes mono infectados).

La terapia combinada anti-VHC, consiste en la combinación de Interferón Pegilado (Pegassys, Roche), a una dosis única subcutánea de 180 microgramos a la semana ( $\mu\text{gr/semana}$ ); más Ribavirina (Rebetol, Pfizer), 1000 miligramos por día, durante bien 48 semanas en el caso de los pacientes mono infectados por el genotipo 1, y todos los pacientes coinfectados por los virus VHC e VIH, independientemente del genotipo. O bien 800 mg/d durante 24 semanas en el caso de los pacientes mono infectados con genotipo 3.

La variabilidad genética de la región ISDR será determinada en el suero procedente de muestras de pacientes ingresados en los Servicios de Enfermedades Infecciosas de los Hospitales Clínicos Universitarios San Cecilio de Granada, Ntra. Sra. Virgen de Valme y Ntra. Sra. Virgen del Rocío. Todas ellas fueron recepcionadas por el Servicio de Microbiología Clínica del Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada, donde se llevaron a cabo todas las técnicas de extracción, amplificación y secuenciación del ARN-VHC, así como su posterior análisis.

### **POBLACIÓN COINFECTADA**

Se dispusieron de 40 sueros pertenecientes a tantos pacientes, distribuidos por sexo de la siguiente manera: 30 (75 %) varones y 10 (25 %) mujeres, con una media de edad de  $39.78 \pm 5.9$  años (rango de edad de 29-66 años).

Con respecto a las características virológicas de VHC, la carga viral basal media fue de  $1.56 \cdot 10^6 \pm 2.46 \cdot 10^6$  copias/ml, los cuales presentaban la siguiente distribución genotípica: 12 muestras presentaron un genotipo 1a (30 %), 6 con genotipo 1b (15 %) y 22 presentaron un genotipo 3a (55 %).

En cuanto a la infección por VIH, la media de linfocitos CD4/ $\mu$ l basal de los pacientes incluidos fue de  $581.9 \pm 283.1$  (136 - 1473); así como una media de la carga viral basal expresada en copias/ml, de  $8252.9.4 \pm 32073.3$  (<50- 162181 copias/ml).

Finalmente, la funcionalidad hepática expresada por la actividad de las distintas enzimas hepáticas, mostraron unos valores medios de  $100.8 \pm 71.8$  y  $127.05 \pm 75.4$  mg/dl, de AST y ALT respectivamente).

## **POBLACION MONOINFECTADA VHC**

Respecto a los pacientes VIH negativos, se dispusieron de 51 sueros pertenecientes a los mismos pacientes, que presentaban una distribución por sexo de 33 (64.7 %) varones y 18 (35.8 %) mujeres, con una media de edad de  $42.18 \pm 8.6$  años, con un rango que oscilaba entre los 23 años el paciente más joven y los 57 años el mayor. Con respecto a las características virológicas de VHC, la carga viral basal media fue de  $1.8 \cdot 10^6 \pm 2.7 \cdot 10^6$  copias/ml, los cuales fueron agrupados genotípicamente en 9 muestras con genotipo 1a (17.6 %), 28 con genotipo 1b (54.9 %) y 14 presentaron un genotipo 3a (27.5 %).

Finalmente, la funcionalidad hepática expresada por la actividad de las distintas enzimas hepáticas, mostraron unos valores medios de  $82.1 \pm 64.5$  y  $118 \pm 63.7$  mg/dl, de AST y ALT respectivamente. Estos pacientes al no presentar coinfección por el virus VIH, no presentan determinación ni seguimiento de poblaciones linfocitarias (CD4), ni tampoco carga viral para el virus de la inmunodeficiencia humana.

A continuación, la tabla 5 resume las características basales de la población que hemos estudiado:

**Tabla 5.- Características basales de la población de estudio.**

<b>Características basales</b>	<b>Población COINFECTADA (N: 40)</b>	<b>Población MONOINFECTADA (N: 51)</b>
Sexo	V: 30 (75 %); M: 10 (25 %)	V: 33 (64.7 %); M: 18 (35.3 %)
Edad	39.78 ± 5.9 (29 – 66 años)	42.18 ± 8.6 (23 - 57 años)
CD4 células/μl	581.9 ± 283 (136 - 1473)	
Carga viral VIH media (copias/ml)	8252.9 ± 32073.3 (rango entre <50 - 1.6 10 <sup>6</sup> )	
Carga viral VHC (copias/ml)	1.56 10 <sup>6</sup> ± 2.46 10 <sup>6</sup> (rango entre 650 – 14.6 10 <sup>6</sup> )	1.8 10 <sup>6</sup> ± 2.7 10 <sup>6</sup> (rango entre 0.14 10 <sup>6</sup> – 17.9 10 <sup>6</sup> )
Genotipo VHC	1a: 12 (30 %) 1b: 6 (15 %) 3a: 22 (55 %)	1a: 9 (17.6 %) 1b: 28 (54.9 %) 3a: 14 (27.5 %)
Enzimas hepáticas:		
AST (mg/dl)	100.8 ± 71.8	82.1 ± 64.5
ALT (mg/dl)	127.05 ± 75.4	118.0 ± 63.7
GGT (mg/dl)	164.1 ± 245.5	81.4 ± 84.9
FA (mg/dl)	188.5 ± 133.8	97.7 ± 63.3

## **4.2 .- MÉTODO**

### **4.2.1 .- EXTRACCIÓN DEL ARN DEL SUERO**

El ARN del VHC fue obtenido a partir de plasma o suero sanguíneo de los pacientes, mediante el método “QUIAMP viral ARN Kit “(Quiagen).

#### 4.2.1.1 .- Preparación de reactivos

A) Buffer de lisis (buffer AVL): A un vial de transporte (carrier ARN), se le añade 1 ml de tiocianato de guanidina, que deberá agitarse bien en vórtex para su correcta disolución. Posteriormente, se prepararán alícuotas de 6 ml en diferentes tubos que serán marcados con la fecha de elaboración, que se conservará a 4°C. Su utilización deberá realizarse en los siguientes 6 meses. Hay que tener la precaución de calentarlo a 70° tras su descongelación para disolver posibles cristales de precipitado que de no eliminarse impedirán la correcta elaboración de la técnica. Las sucesivas congelaciones-descongelaciones del producto harán que pierda sus propiedades, por lo que no se recomienda prolongar su uso de la misma mezcla más allá de 5 veces.

B) Buffer de lavado 1 (buffer AW1): El kit comercial contiene 19 ml del buffer concentrado (etanol 70% en TrisClH), por lo que habrá que añadirle 25 ml de etanol 100% para su uso. De esta manera se obtiene un volumen final de 44 ml, que se conservará a temperatura ambiente (15-25°). Anotar también la fecha de elaboración para evitar las alteraciones que pueda sufrir la mezcla con el tiempo.

C) Buffer de lavado 2 (buffer AW2): Al igual que en el paso anterior, al frasco del kit con 13 ml del buffer concentrado (etanol 70% en Tris/HCl), se le añade 30 ml de etanol 100%, obteniendo un volumen final de 43 ml de solución de lavado 2. Anotar fecha de elaboración y conservar a temperatura ambiente.

D) Buffer de elución (buffer AVE): Viene ya listo para su uso. El kit aporta 22 ml de buffer (Tris/HCl 5 mM, pH 8.5), que será el compuesto de liberar el material genético fijado a las columnas de silica-gel. Conservar a temperatura ambiente.

E) Columnas de extracción QUIAGEN mini spin column, listas para su uso. Conservar a temperatura ambiente.

#### 4.2.1.2 .- Descripción de la técnica

En primer lugar, cada muestra se somete a un proceso de lisis celular química con tiocianato de guanidina, una sustancia caotrópica que separa las enzimas, proteínas y lípidos suspendidas en suero. Éste lleva incluido un carrier inespecífico que fijará todo el ácido nucleico suspendido en la muestra, separándolo del resto de componentes celulares del suero.

1. En un tubo eppendorff colocar 1000  $\mu$ l de muestra, que se centrifugará a 23600 rpm durante 1 hora a 4°C y dejar solo 140  $\mu$ l, con cuidado de no arrastrar el precipitado. Agitar con el vórtex.

2. Añadir 560 $\mu$ l de Buffer de lisis AVL. Agitar en vórtex e incubar a temperatura ambiente durante 10 min. Spin 3500 rpm durante 1 minuto.

Al final de la lisis, tendremos el ARN de virus C junto a todo el material genético que hubiese en la preparación, fijados en las columnas de extracción. Se pondrá en contacto con etanol, provocando la precipitación del mismo, que quedará adherido al soporte sólido utilizado, que consiste en columnas de silica-gel, que contienen una membrana filtrante.

3. Añadir 560 $\mu$ l de etanol al 100% por tubo y agitar en vórtex, 15-30 segundos.

4. Transferir 630  $\mu$ l a una columna. Centrifugar a 8.000 rpm/1min. Recuperar la columna y pasar a un nuevo tubo de desecho. Volver a repetir el paso 4, para completar el volumen total acumulado hasta el momento.

Se realizarán sucesivos lavados con un buffer hidroalcohólico al 70%, para ir eliminando el resto de componentes celulares no adheridos.

5. Añadir 500  $\mu$ l de Buffer de lavado AW1 a la columna. Centrifugar a 8.000 rpm/1min. Nuevamente se recupera la columna y se pasa a un nuevo tubo de desecho.

6. Añadir 500  $\mu$ l de Buffer de lavado AW2 a la columna. Centrifugar 8.000 rpm/1 min y 13.500 rpm/ min, 3 minutos. Recuperar la columna y pasarla a un tubo eppendorff estéril.

7. Añadir 60  $\mu$ l de Buffer de elución AVE a temperatura ambiente. Incubar las columnas, 1 min, a temperatura ambiente. Centrifugar a 8.000 rpm /1 min. Desechar la columna y guardar el eppendorff en nevera.

Si la muestra no se va a procesar inmediatamente, congelar a- 70°C.

#### 4.2.2 .- AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS: REACCIÓN DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT-PCR)

Se trata de un método enzimático, que permite obtener múltiples copias de una región genómica *in vitro*. Para realizar la amplificación repetimos de forma cíclica tres fases térmicas, denominadas: **desnaturalización** (separación de las dos hebras de ADN, a través de la rotura de los puentes de hidrógeno existente entre las mismas, por la acción del calor); **hibridación** (unión de los *primers* o iniciadores a las bases complementarias específicas de la región deseada que queremos estudiar, cada uno en un extremo del fragmento a amplificar); y **polimerización o elongación de la cadena en síntesis** (Comienza la síntesis de la hebra complementaria a la hebra de ADN diana a través de una enzima polimerasa). Dicho proceso se repetirá “n” veces.

En el caso del Virus de la Hepatitis C, al ser un ARN virus, es necesario un paso previo en el cual el ARN viral sea transcrito a su ADN complementario, ya que para las técnicas de PCR, el molde debe de ser siempre ADN. Este paso, recibe el nombre de retrotranscripción (RT), debido a que la enzima que convertirá el ARN en su ADN complementario tiene por nombre: retrotranscriptasa o transcriptasa inversa. Posteriormente se realiza la PCR, denominándose la técnica RT-PCR.

Para la amplificación de la región ISDR de VHC se realizará una Nested-PCR o PCR anidada, para aumentar la especificidad del proceso. Se realizará una primera fase donde se amplificará fragmento de ADN (1<sup>er</sup> round) dentro del cual debe de encontrarse la región última a analizar, para posteriormente realizar una segunda amplificación (2<sup>o</sup> round), que limitará específicamente la secuencia de aminoácidos en estudio.

Se trata por tanto de una doble amplificación que necesitará dos parejas de *cebadores o iniciadores de la reacción*: dos *externos* y dos *internos*, en donde la segunda pareja reconoce y amplifica una región interna del primer amplificado.

##### 4.2.2.1 .- Preparación de reactivos

Vamos a utilizar el kit comercial “ONE STEP RT-PCR System” (Roche Diagnostics), que usa como enzima de polimerización una Taq polimerasa que

contiene un fragmento de la ADN polimerasa perteneciente al *Carboxydotherrnus hidrógenoformans*. Esto otorga a esta *Taq* ADN polimerasa las necesidades de termoestabilidad necesarias para poder actuar a las altas temperaturas que hay que fijar durante la reacción de amplificación, que mantendrá a las dos hebras molde de ADN separadas (temperatura de desnaturalización de los puentes de hidrógeno que las mantiene unidas). El rango de calor de actuación de dichas enzimas estará entre 60-70° C.

Los *Cebadores, Primers o iniciadores de la reacción de polimerización*, son oligonucleótidos, cuya secuencia de bases sea equivalente a la zona a amplificar. La *Taq* polimerasa para su actuación requiere de este pequeño iniciador o *primer* que forma un dúplex con el ADN diana. De esta forma le indica el lugar exacto donde debe iniciarse la reacción. En la PCR se suelen utilizar dos por cada reacción, dos primers externos para el primer round y otros dos internos para el segundo round:

Las secuencias de los primers utilizados en el primer round, para la RT-PCR, son las siguientes:

- Genotipo 1 (serán comunes tanto para 1a como para 1b):

TGCTGAGGAGTACGTGGA. Sense.  
AGCTCIGCAAGGCAGIAGA antisense.

I: inosina

- Genotipo 3a:

GGAGGGTTGTAGTCCGGTCTAGCC sense.  
TGAGACTCCACCGCTACGCCCTC antisense.

Las secuencias de los primers empleados para el 2º round son los siguientes:

- genotipo 1a:

CCTCCCATATAACAGCAGAG sense.  
CGAAGGAGTCCAGAATCACC antisense.

- genotipo 1b:

TCCTTGGCCAGCTCTTCAGC sense.  
TCCCTCTCATCCTCCTCCGC antisense.

- genotipo 3a:  
CTAGTCTAGATAGGAAGGGC sense.  
CTTGCTCGAGGGTCCCCTCCAT antisense.

- Solución donde se encuentren los cuatro nucleótidos (dNTPs), de los que consta el ADN (dATP, deoxiadenintrifosfato; dGTP, deoxiguanidintrifosfato; dCTP, deoxicitosintrifosfato; dTTP, deoxitimidintrifosfato). Estos serán utilizados a concentraciones iguales y a pH 7.
- Tampón de amplificación. Sus componentes fundamentales son Tris-HCl (ph 8,3-8,8), KCl y MgCl<sub>2</sub>. Este último es muy importante, ya que una ligera variación en su concentración puede afectar al rendimiento de la reacción.

#### 4.2.2.2 .- Descripción de la técnica

Los problemas principales de la RT-PCR, son las contaminaciones por productos de PCR y la degradación del ARN. Para evitar en todo lo posible estos problemas, tomaremos una serie de precauciones:

- Usar material esterilizado en autoclave para evitar la degradación del ARN por la acción de ARN asasa. Por esta misma razón durante la extracción y la transcripción, utilizaremos agua tratada con Dietil pirocarbonato (DEPC) al 0.1%, que destruye las ARNasas. Para el 2º round de la PCR, solo autoclavar el agua, ya que el DEPC puede inactivar a la Taq polimerasa.
- Usar puntas con filtro.
- Separar las áreas de extracción y de PCR. Evitar abrir los tubos con producto de PCR en la zona de trabajo que será donde se carguen los sucesivos geles.

Se deben preparar las dos mezclas o master mixes por separado para evitar reacciones “primer-dimer” en presencia de la enzima, que podrían ocurrir antes de agregar la muestra. La composición de estas dos mezclas aparece en la tabla 6. En un tubo de 0.2 ul colocar 20 ul de la Mezcla 1 (sin la muestra) y 20 ul de la Mezcla 2. Luego agregar 10 ul de la muestra, para alcanzar un volumen final de 50 ul.



**Tabla 6.- Composición de ambas mezclas para la amplificación 1.**

<b>Componentes MEZCLA 1</b>	<b>Volumen (ul)</b>
Agua libre ARNasa	3.7
DNTPS (25 mM)	0.8
DMSO al 100%	2.5
DTT (100 mM)	2.5
Primer outer sense (10 µM)	5
Primer outer antisense (10 µM)	5
ARNsa inhibitor (40U/µl)	0.5
VOLUMEN FINAL	20
<b>Componentes MEZCLA 2</b>	<b>Volumen (ul)</b>
Agua libre ARNasa	8
Buffer 5X	10
Enzima (C therm. Polymerasa mixture)	2
VOLUMEN FINAL	20

Finalmente colocaremos el tubo de 0.2 ml en el termociclador. El programa variará en función del genotipo que estemos amplificando. Este es el esquema del programa de amplificación utilizado:

- 60°C 30'
  - 94°C 2'
  
  - 94°C 30''
  - X°C Y''
  - 72°C 30''
- } X10
- 
- 94°C 30''
  - X°C Y''
  - 72°C 45''- 4'
- } X25    Se aumentan 5'' por ciclo en la extensión
- 
- 72°C 7'

Los tiempos y temperaturas de unión o “annealing” se expresan a continuación en la tabla 7:

**Tabla 7.-Esquema de tiempos de temperaturas de annealing para la amplificación 1.**

<b>ANNEALING</b>	<b>GENOTIPO 1</b>	<b>GENOTIPO 3</b>
Temperatura (X)	55°	53°
Tiempo (Y)	45”	30”

Terminado el primer round o primera PCR, se procederá a la realización de la segunda PCR o “nested”.

Segundo round:

Utilizamos tubos con una mezcla ya preparada (BIOTOOLS), alicuotados de 0,2 ml listos para su uso, que incluyen un buffer compuesto por: 75  $\mu$ M de Tris HCl a pH 9,0, 50 mM de KCl, 20 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM de Cl<sub>2</sub>Mg y 0.2  $\mu$ M de dNTPs. De esta manera, sólo tenemos que añadir los primers, el agua destilada y la muestra a analizar. El almacenamiento de estos viales debe ser a 4°C (no congelar a -20°C ya que esto inactiva la enzima en forma de gel).

Finalmente, partiendo del amplificado del primer round y para una muestra con un volumen final de 50  $\mu$ l, realizaremos la mezcla necesaria para la 2ª amplificación, cuya composición se describe en la tabla 8:

**Tabla 8.-Esquema mezcla para la amplificación 2.**

<b>Componente</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>l)</b>
Agua destilada	37 $\mu$ l
Primer inner sense (10 $\mu$ M)	5 $\mu$ l
Primer inner antisense (10 $\mu$ M)	5 $\mu$ l
Amplificado del primer round	3 $\mu$ l

El programa de amplificación empleado para la nested PCR se muestra a continuación:

- 60°C 30'
  - 94°C 2'
  - 94°C 30''
  - X°C Y''
  - 72°C 30''
- } X30 ciclos
- 72°C 7'

Los tiempos y temperaturas de annealing se expresan a continuación en la tabla 9:

**Tabla 9.- Esquema de tiempos de temperaturas de annealing para la amplificación 2.**

ANNEALING	GENOTIPO 1a	GENOTIPO 1b	GENOTIPO 3
Temperatura (X)	55°	55°	53°
Tiempo (Y)	30''	45''	30''

El revelado del producto amplificado se realiza mediante electroforesis en agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio, llegándose a observar un fragmento de 324 bp.

### 4.2.3 .- ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

#### 4.2.3.1 .- Preparación de reactivos

- Gel de Agarosa

Pesamos 1 gr de agarosa al 2% y lo disolvemos en 50 ml de TBE 1X (tampón de electroforesis a pH 8). Se calienta la suspensión lentamente en el microondas hasta el punto de ebullición, para asegurar que la agarosa se funde perfectamente. Dejamos enfriar durante 1 minuto y añadimos 0.5 µl de una solución stock de bromuro de etidio de 10mg/ml. Vertemos todo el contenido en una cubeta de electroforesis. Colocamos el peine que dará forma a los pocillos y dejamos enfriar durante media hora, hasta que solidifique el gel.

- Buffer de carga: 10 µl de marcador de peso molecular (azul de bromofenol 0.25%), glicerol 50% y EDTA 1mM a pH 8.

#### 4.2.3.2 .- Descripción de la técnica

Una vez realizado el segundo round de la RT-PCR, tenemos que detectar el producto amplificado. Para su visualización, realizamos corremos 10 µl del amplificado mezclado con 2 µl del tampón de carga en el gel de agarosa, al cual se le ha añadido el bromuro de etidio, que es quien teñirá al gel.

El ADN amplificado posee carga negativa, de manera que al depositarlo cerca del cátodo y al someterlo al paso de corriente eléctrica, éste migrará hacia el ánodo de carga positiva (electroforesis). De esta manera, podemos ver la carrera electroforética de los amplificados con la ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta, y comprobar que la PCR ha funcionado.

#### 4.2.4 .- SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN ISDR DEL ARN-VHC

Para obtener la secuencia de aminoácidos de la región ISDR del ARN-VHC, hemos utilizado el amplificado resultante del segundo round de PCR, que se ha sometido a las siguientes etapas:

**a) Reacción de secuenciación bidireccional;**

**b) Electroforesis** de los productos de secuenciación;

**c) Alineamiento de las secuencias** con una de referencia e interpretación de los resultados.

La reacción de secuenciación se basa en la secuenciación bidireccional, que se conoce como reacción CLIP<sup>TM</sup>. Esta no es más que una modificación del método de Sanger que emplea terminadores de la secuencia de ADN en forma de dideoxinucleótidos marcados con fluoróforos. En este caso son los primers los que están marcados en 5'. Un primer incorpora Cy5.5 como fluoróforo y el otro incorpora Cy5.0. Estos dos fluoróforos tienen la característica de emitir luz a distintas longitudes de onda, de modo que podremos diferenciar con un láser la emisión de los productos de secuenciación iniciados con cada uno de estos dos primers , y de esta manera, conoceremos en un mismo tubo la secuencia en dirección 5'-3' y en dirección 3'-5' (*forward* y *reverse*).

Para la reacción de secuenciación de la región ISDR, necesitamos 4 tubos por cada muestra (A, C, G, T), uno por cada nucleótido. En cada uno de estos tubos añadimos los primers de secuenciación marcados con los fluoróforos Cy5.5 y Cy5.0. Añadimos la enzima de secuenciación (Amplitaq FS), un buffer adecuado para esta enzima y una mezcla de desoxinucleótidos (dNTPs) con un didesoxinucleótido (ddNTP), concretamente el ddATP en el tubo A, el ddCTP en el tubo C, el ddGTP en el tubo G, y el ddTTP en el tubo T. El ddNTP carece del grupo –OH en el carbono 3 del azúcar, que es el responsable de la unión de los nucleósidos entre sí a través del grupo fosfato para formar el nucleótido e incorporarse a la cadena del ácido nucleico. Por lo tanto, si una enzima al elongar una cadena de ADN coloca en lugar de una adenina en forma de dATP una adenina en forma de ddATP, la cadena que se está formando se trunca y no puede elongarse más. Por esto se dice que los ddNTPs son terminadores.

Esto mismo sucede en los tubos C, G y T, de modo que al final de los 30 ciclos de la reacción de secuenciación, dispondremos de todos los fragmentos con incrementos en su tamaño, de base en base y marcados con Cy5.5 si se sintetizaron en dirección 5' y con Cy5.0 si se sintetizaron en dirección 3'. A continuación, necesitamos realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida, para poder detectar los productos de secuenciación.

#### 4.2.4.1.- Descripción de la técnica

- Alicuotar en cada tubo de 0.2 ul, 3 ul de cada terminador junto a cada primer, en su tubo correspondiente. Trabajar en hielo para no inactivar la enzima.
- Diluir la enzima Termosequenase 1/10 con buffer de dilución.
- Los primers, que son los mismos que para el segundo round pero marcados con Cy5.0 y Cy5.5, deben estar a una concentración de 3 uM, mientras que deben estar fraccionados a 10 uM.
- Añadir a cada tubo con terminadores (A,C,G,T) con 5 ul de la anterior mezcla, trabajando siempre en hielo.

La composición de la mezcla a elaborar por muestra, se describe a continuación en la tabla 10:

**Tabla 10.- Composición de la mezcla para la realización de la secuenciación.**

<b>Componente</b>	<b>Volumen (ul)</b>
Sequencing buffer	2.5
Cy5.5 primer (3μM)	1.25
Cy5 primer (3μM)	1.25
Agua	11
Enzima diluida 1/10, Ampli Taq DNA polimerasa 5 U/μl	4
Producto de PCR	2

El esquema del programa de secuenciación será descrito a continuación:

- 94°C 2'
  - 94°C 20''
  - X°C Y''
  - 70°C 45''
- } X 30 ciclos
- 
- 94°C 25''
  - 70°C 2'
- } X 15 ciclos
- 
- 72°C 2'

Los tiempos y temperaturas de annealing se expresan en la tabla 11:

**Tabla 11.- Esquema de tiempos de temperaturas de annealing para la secuenciación.**

<b>ANNEALING</b>	<b>GENOTIPO 1a</b>	<b>GENOTIPO 1b</b>	<b>GENOTIPO 3</b>
Temperatura (X)	55°	55°	53°
Tiempo (Y)	30''	45''	30''

Una vez finalizado, añadir 6  $\mu$ l de solución de parada por tubo. En este momento se pueden conservar las muestras a 4°C.

#### **4.2.5 .- ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA**

Cuando se realiza la electroforesis estos componentes se separarán en función a su peso molecular. El secuenciador semiautomático dispone de un sistema láser que hace lecturas cada 30 segundos de manera que va registrando las señales que emiten los fluoróforos.

Hay que recordar que el producto de secuenciación en la dirección 5' incorpora Cy5.5, que emite a 550 nm y que el producto de secuenciación en dirección 3' está marcado con Cy5.0, que emite a 670 nm.

El secuenciador dispone de un sistema de registro de ambas longitudes de onda de modo que a la vez lee la secuencia de la dirección 5' y 3'. Por esto a esta tecnología se la conoce como secuenciación bidireccional.

Tras finalizar el tiempo de electroforesis, el aparato recoge todas las señales emitidas en cada carril y las transforma en un cromatograma. De este modo, para secuencia, disponemos de 8 cromatogramas, 4 en dirección 5' y correspondientes a la A, C, G y T, y otros 4 en dirección 3', también correspondientes a las bases A, C, G y T.

Por tanto, al finalizar la reacción de secuenciación, dentro de cada tubo, podremos distinguir:

- Primers marcados y no incorporados, los de menor tamaño.
- Distintos fragmentos de material genético de distinto peso molecular con primers marcados incorporados.

- Productos de secuenciación completos, con primers incorporados; los de mayor tamaño.
- cDNA en exceso sin secuenciar.

#### 4.2.5.1.- Descripción de la técnica

1. Cargar con el polímero Surefill™ los cristales para el gel, al que previamente se le colocó un peine con 16 pocillos.
2. Polimerizar el gel con luz ultravioleta. Limpiar los restos de polímero y retirar el peine.
3. Montar el gel en el secuenciador (Long-Read Tower™) con cuidado de hacer coincidir los carriles con el lector de láser, llenar las cámaras superior e inferior con 1 ml de TBE 1x. Lavar los pocillos con TBE 1x.
4. Hacer el *pre-run* para que el buffer TBE comience a pasar por los carriles.
5. Desnaturalizar las muestras secuenciadas a 85-95°C durante un minuto. Pasar inmediatamente a hielo, se recomienda dejar las muestras en hielo aproximadamente 1 hora antes de cargarlas en el gel.
6. Cargar 1,5 µl de muestra en cada pocillo convenientemente identificado en el software del secuenciador.
7. Correr las muestras durante 25 minutos a 53°C y con 1300 voltios de corriente.

El paso final para la secuenciación consiste en el alineamiento de las distintas secuencias de aminoácidos. El *software* integra los 2 cromatogramas obtenidos para cada muestra y para cada dirección (5' y 3'). Después combina las dos secuencias y las enfrenta a una cepa de referencia de los genotipos 1a, 1b y 3a, que previamente hemos seleccionado. A continuación, revisaremos la secuencia completa, viendo todas



las bases en las que no exista concordancia entre las direcciones 5' y 3' o con la secuencia de referencia. En estos dos pasos debemos ser extremadamente cautelosos ya que somos nosotros los que vamos a decidir si estamos o no de acuerdo con la interpretación que el *software* realiza. Analizada la secuencia, se exporta y se alinea con las demás secuencias del estudio mediante el uso del programa Clustal W versión 1.8 (European Bioinformatics Institute).

Las secuencias de referencia fueron las siguientes:

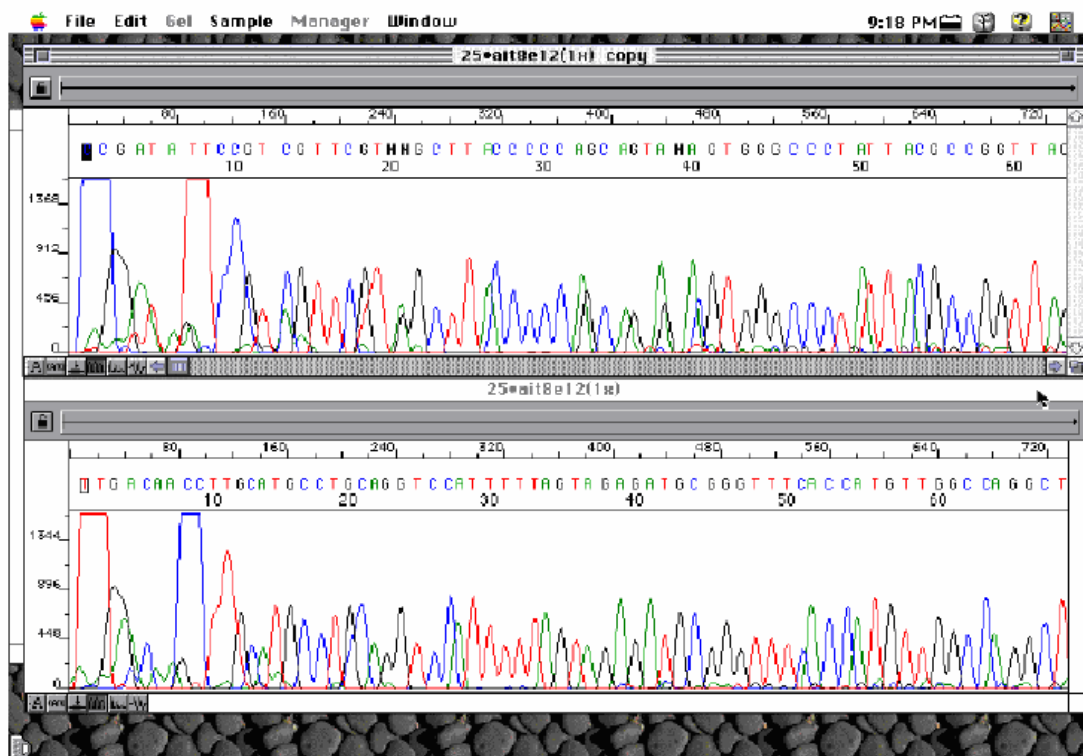
Genotipo 3a: Genbank N° de acceso D28917

Genotipo 1a: Genbank N° de acceso M62321

Genotipo 1b: Genbank N° de acceso D90208

El resultado de la lectura bidireccional de las secuencias de aminoácidos, queda reflejada en la figura 13:

**Figura 13.-Resultado de la lectura de secuencia de aminoácidos.**



#### 4.2.6 .- OTRAS DETERMINACIONES

- El genotipado del VHC se realizará a través de técnicas de secuenciación, donde partiendo del ARN extraído del suero en el paso 4.2.1, se determina la secuencia de aminoácidos de la región 5'UTR del mismo mediante el kit comercial de genotipado "Trugene® HCV 5'NC" (Bayer HealthCare).
- La carga viral VIH se determinó con el kit Amplicor HIV-1 monitor, Roche; la carga viral VHC con el kit Amplicor HCV monitor.
- El recuento de linfocitos CD4 fue realizado mediante citometría de flujo, con la ayuda del Servicio de Inmunología del Hospital Clínico San Cecilio de Granada, en un instrumento Ortho-Cytoron (Ortho).
- Las determinaciones enzimáticas, a través de las cuales valoramos la función hepática de cada paciente (enzimas ALT, AST, GGT y FA), fueron cuantificadas mediante el método colorimétrico del sistema automatizado Synchron LX® (Beckman Coulter, Inc, USA), en el Servicio de Bioquímica del Hospital Clínico San Cecilio de Granada.
- El análisis de las secuencias para la construcción de los árboles filogenéticos se realizó con el programa CLUSTAL W, y por medio del programa MEGA versión 4, utilizando el método de Neighbor Joining que usa el test de "bootstrap" de 1000 iteraciones.

#### **4.2.7 .- METODOLOGÍA ESTADÍSTICA**

Los datos se analizaron mediante el programa estadístico SPSS 15.0, con el cual se realizó el análisis estadístico, primeramente descriptivo para conocer la frecuencia de las distintas variables implicadas en el estudio, para posteriormente realizar un estudio comparativo entre todas las variables.

La comparación de proporciones se realizó mediante el test de Chí-cuadrado y el test exacto de Fisher. La comparación de variables cuantitativas se determinó a través de la prueba de “T” de Student en caso de que las variables siguieran una distribución normal, o el test no paramétrico de “U” de Mann-Whitney, en el caso de que no presentaran una distribución normal.

Para la comparación de medias de más de dos muestras independientes se utilizó el ANOVA, seguido de la comparación de parejas de Bonferroni en caso de que se apreciara diferencias entre grupos.

Se utilizó la regresión lineal múltiple paso a paso cuando se quiso analizar la relación entre una variable dependiente cualitativa y varias independientes tanto cuantitativas como cualitativas de forma conjunta.

## 5 .- RESULTADOS

A continuación, describiré los resultados hallados tras el análisis estadístico de los datos obtenidos, comenzando con la descripción de la respuesta al tratamiento antiviral tanto a nivel general, como en las distintas poblaciones de estudio, mono infectada y coinfectada; así como agrupadas por genotipo y subtipo.

Hay que tener en cuenta como posible sesgo, que la respuesta analizada es la correspondiente a todos los aislados a los cuales se ha podido amplificar su región ISDR, dejando fuera del análisis todos los pacientes tratados con interferón pegilado más ribavirina a los que por razones técnicas, no se haya podido analizar la secuencia de aminoácidos de ISDR. Una vez aclarado este punto, pasaremos a hacer una descripción porcentual de los diferentes subconjuntos de pacientes a analizar.

En la tabla 12, se describen las dos poblaciones fundamentales de estudio, la población de pacientes coinfectados por VIH y VHC, así como la población mono infectada VHC. Del total de 91 pacientes, el 31% eran mujeres (28) y 63 hombres (69%). La edad media fue de 41,12 años (23-66 años). Cuarenta pacientes (44%) presentaban coinfección VIH, de los cuales sólo 6 (15%) se encontraban recibiendo TARGA al mismo tiempo que el PEG-IFN.

La distribución por genotipos fue la siguiente: La mayoría de los pacientes presentaban un genotipo 1 (55 pacientes, 60%), de los cuáles 21 (23% del global) tenían un genotipo 1a y 34 (37% del global) genotipo 1b. El resto de la muestra (36 pacientes, 40%) tenían un genotipo 3. Diferenciando la población coinfectada de la mono infectada, encontramos que existe diferencias estadísticamente significativa, ya que mientras en la primera el 30% de la población presentaba un genotipo 1b, en la población mono infectada es el genotipo 1a el predominante, con un 55% ( $p=0,0024$ ). Respecto al genotipo 3, también existen diferencias estadísticas, donde la población con genotipo 3 coinfectada duplica a la mono infectada ( $p=0,007$ ).

Cuando comparamos otras variables observamos lo siguiente: respecto a la carga viral VHC basal, expresada en logaritmo en base 10, ésta fue comparable en ambos grupos, ya que en la población mono infectada fue de 5,68 UI/ml (2,81-6,64), frente a 5,87 UI/ml (2,81-7,25) para la población coinfectada. Al compararlas vemos que no hay diferencias estadísticamente significativas.

Tampoco existieron diferencias respecto a la edad media de los pacientes, siendo 42,18 años (23-57) para los pacientes mono infectados y 39,78 (29-66) para los coinfectados. El grado de afectación de las enzimas hepáticas, donde la ALT basal en mono infectados fue de 118,10 UI/L (39-314), frente a unos valores de 127,05 UI/L (20-348) en coinfectados; y la AST basal en mono infectados fue de 82.1 UI/L (17,6-146,6), frente a unos valores medios en coinfectados de 100,8 UI/L (29-172,6). Tampoco había diferencias en la posible situación terminal del daño hepático que supone el estadio de cirrosis hepáticas. Todas estas comparativas quedan recogidas en la siguiente tabla 12.

**Tabla 12.- Comparativa de Características epidemiológicas**

	VIH	No VIH	P
Edad (rango)	39,78 (29-66)	42,18 (237)	Ns
Sexo varón N(%)	30 (75%)	33 (64.7%)	Ns
Genotipo 1			
1a N(%)	12(30%)	9 (17%)	p=0,0024
1b N(%)	6 (15%)	28 (55%)	
Genotipo 3 N(%)	22 (55%)	14 (25%)	p= 0,007
Cirrosis N(%)	6 (15%)	3 (6%)	Ns
ALT basal (rango)	127 (20-348)	118 (39-314)	Ns
AST basal (rango)	100.8 (29-172.6)	82.1 (17.6-146.6)	

## 4.1.- FACTORES RELACIONADOS CON LA RESPUESTA

### 4.1.1.- Tasa global de respuesta

En primer lugar, se analiza la muestra de forma general, tanto al final del tratamiento (RFT), como la respuesta sostenida seis meses después de haber finalizado el tratamiento (RVS), analizaremos conjuntamente población infectada por el VIH y población mono infectada, de manera que vemos como la respuesta al final de tratamiento fue del 79,1%, no diferenciando por genotipo, mientras que de forma sostenida la respuesta fue del 61,5%. Estos datos globales de respuesta quedan resumidos en la tabla 13.

**Tabla 13.- Comparativa de datos globales de respuesta al tratamiento antiviral con PEG-IFN.**

N = 91	Respuesta Viroológica al Final del tratamiento (RVF)	Respuesta Viral Sostenida, 6 meses después de finalizar el tratamiento (RVS)
No responde	19 pacientes (20.9%)	35 pacientes (38.5%)
Responde	72 pacientes (79.1%)	56 pacientes (61.5%)

Quando analizamos la respuesta antiviral en función del genotipo sin diferenciar entre pacientes VIH y no VIH, se obtiene que existe una diferencia significativa en la tasa de respuesta a favor del genotipo 3, como se indicaba previamente frente a los pacientes con genotipo 1 ( $p=0,033$ ), ya que mientras 27 de los 36 pacientes con genotipo 3 respondieron, lo cual supone un 75% de respuesta, solo 29 de los 55 pacientes con genotipo 1 respondieron (52.7%). Estos datos se detallan en la tabla 14, donde queda reflejada la mejor respuesta virológica sostenida en la población con genotipo 3, frente a los pacientes con genotipo 1, sin distinguir entre si los pacientes son VIH o no.

**Tabla 14.- Comparativa de resultados de Respuesta viral sostenida, 6 meses después de finalizar el tratamiento en función del genotipo.**

N = 91	Pacientes con genotipo 1	Pacientes con genotipo 3
No responde	26 pacientes (47.3 %)	9 pacientes (25 %)
Responde	29 pacientes (52.7 %)	27 pacientes (75 %)
	55 pacientes	36 pacientes
		P=0.033

#### **4.1.2.- Resultados en función de la existencia de coinfección VIH-VHC.**

Al analizar los resultados en función de la coinfección por VIH, se observa que no existen diferencias significativas entre los dos grupos en cuanto a la respuesta sin agrupar por genotipos. Existe un 62.75% de respuesta de forma global en pacientes

no VIH (32/51 pacientes), frente a un 60% de respuesta entre los pacientes VIH+ (24/40 pacientes), lo cual no aporta diferencias significativas entre los dos grupos (p=0.789). Estos resultados se muestran en la tabla 15.

**Tabla 15.- Comparativa de resultados de Respuesta Viral Sostenida, 6 meses después de finalizar el tratamiento en función del tipo de población (VIH + o negativa).**

N = 91	Respuesta Viral Sostenida en población VIH -	Respuesta Viral Sostenida en población VIH +
No responde	19 pacientes (37.25%)	16 pacientes (40%)
Responde	32 pacientes (62.75%)	24 pacientes (60%)
	51 pacientes VIH negativo	40 pacientes VIH positivo P=0.789

En la tabla 16 se muestran los resultados al estratificar por genotipos, reduciendo la muestra a 21 pacientes VIH negativo que responden al tratamiento (56.8%), y que son portadores de aislados subtipo 1; y a tan solo 8 pacientes respondedores VIH positivo, con genotipo 1 (44.4%). Sigue sin existir significación estadística, aunque se mantiene la mejor respuesta en la población no VIH.

**Tabla 16.- Comparativa de resultados de Respuesta Viral Sostenida de los pacientes con genotipo 1, 6 meses después de finalizar el tratamiento en función del tipo de población (VIH + o negativa).**

N = 91	Respuesta Viral Sostenida en población VIH - (Genotipo 1)	Respuesta Viral Sostenida en población VIH + (Genotipo 1)
No responde	16 pacientes (43,2%)	10 pacientes (55.6%)
Responde	21 pacientes (56.8%)	8 pacientes (44.4%)
	51 pacientes	40 pacientes P=0.4

4.1.2.1.- Respuesta virológica en pacientes mono infectados en función del genotipo.

Cuando analizamos la tasa de respuesta virológica dentro de la población mono infectada, se confirma una mayor tasa de respuesta en los pacientes con

genotipo 3 (78.6%), frente a los pacientes con genotipo 1 (56.8%), pero sin alcanzar significación estadística ( $p=0,150$ ). Estos datos se recogen en la siguiente tabla 17.

**Tabla 17.- Comparativa de resultados de Respuesta viral sostenida, 6 meses después de finalizar el tratamiento, dentro de la población mono infectada en función de su genotipo (1:3).**

N = 51	Respuesta Viral Sostenida en pacientes con genotipo 1.	Respuesta Viral Sostenida en pacientes con genotipo 3.
No responde	16 pacientes (43.2%)	3 pacientes (21.4 %)
Responde	21 pacientes (56,8 %)	11 pacientes (78.6 %)
	37 pacientes genotipo 1	14 pacientes genotipo 3 n.s.

4.1.2.2.- Respuesta virológica en pacientes coinfectados en función del genotipo.

Al analizar la respuesta virológica de la población coinfectada por los virus VHC y VIH, vemos como de nuevo como la Respuesta Viral Sostenida al tratamiento con PEG-IFN es mayor entre los genotipos 3 respecto a los pacientes con genotipo 1. Pero este hecho sigue sin ser estadísticamente significativo, aunque con una clara tendencia a la significación ( $p=0,069$ ). Estos datos se resumen en la tabla18.

**Tabla 18.- Comparativa de resultados de Respuesta viral sostenida, 6 meses después de finalizar el tratamiento, dentro de la población coinfectada en función de su genotipo (1:3).**

N = 40	Respuesta viral sostenida en pacientes con genotipo 1.	Respuesta viral sostenida en pacientes con genotipo 3.
No responde	10 pacientes (55.6%)	6 pacientes (27.3 %)
Responde	8 pacientes (44.4%)	16 pacientes (72.7 %)
	18 pacientes genotipo 1	22 pacientes genotipo 3 $p=0.068.$



#### 4.1.2.3.- Respuesta virológica función del subtipo.

En este apartado vamos a analizar la RVS en función de los subtipos 1 (1a vs 1b), para ver si existen diferencias entre subtipos en el global de la muestra, y también en función de la existencia o no de coinfección por el VIH.

En el global de la muestra, no existen diferencias estadísticamente significativas en función del subtipo, ya que la RVS fue del 52.4% para el subtipo 1a (11/21 pacientes). Mientras que en el caso de los subtipos 1b, la tasa de respuesta fue del 52.9% ( $p=0.889$ ). Cuando estudiamos solo a los pacientes mono infectados, observamos que hubo una mayor tasa de respuesta en los pacientes con subtipo 1a, y esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p=0.025$ ), respecto a la respuesta de los pacientes con subtipo 1b. Alcanzaron una RVS del 89% (8/9 pacientes), frente a un 46% de respuesta obtenida por los pacientes con subtipo 1b (13/28 pacientes). En el caso de los pacientes coinfectados VIH-VHC, ocurre lo contrario, ya que existen diferencias respecto a la respuesta, pero en este caso favoreció al genotipo 1b, siendo mayor en este grupo. Obtenemos una RVS del 25% (3/12) para el subtipo 1a frente al 83% (5/6) para el subtipo 1b ( $p=0,019$ ).

#### **4.1.3.- Respuesta virológica en función de la variabilidad de ISDR.**

Como objetivo principal de nuestro estudio, analizamos la posible influencia sobre la respuesta al tratamiento basado en la combinación de interferón pegilado más ribavirina de nuestros pacientes con hepatitis crónica por VHC, en función del número de mutaciones en la región ISDR.

En la tabla 19, describimos la distribución de pacientes en función del número de mutaciones en la región ISDR, sin diferenciar pacientes coinfectados o no por el VIH. Los pacientes se clasificarán en función del número de cambios de aminoácidos en la secuencia de la región ISDR respecto a la secuencia de referencia definida por Enomoto (HCV-J). Los pacientes que no presentaron ningún cambio supusieron el 29.7% del total de la población estudiada; pacientes que mostraban entre 1 y 3 cambios frente a la secuencia tipo representaban el 58,2% del total; y con más de tres cambios respecto a la secuencia de HCV-J, y por tanto se consideraron como cepas resistentes, los cuales supusieron solo el 12,1% del total de pacientes estudiados.

**Tabla 19.- Distribución de pacientes estudiados respecto el resultado de la secuenciación de la región ISDR y su comparativa respecto a la secuencia de la cepa resistente HCV-J definida por Enomoto.**

AISLADO SIN MUTACIONES (WILD TYPE)	AISLADO INTERMEDIO (1-3 mutaciones)	AISLADO MUTANTE (>3 mutaciones)
27 pacientes (29.7%)	53 pacientes (58.2%)	11 pacientes (12.1%)

El porcentaje de respuesta al final del tratamiento fue del 74% en el caso de los aislados sin mutaciones en la región ISDR, del 79.3 % en los pacientes con aislados intermedios, y finalmente los pacientes con >3 mutaciones presentaron una tasa de respuesta del 90.9%. Estos porcentajes no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.273$ ). Ni tan siquiera cuando se agrupan los pacientes con al menos una mutación enfrentando su tasa de respuesta con la que presentan los pacientes wild type (WT), donde la respuesta del grupo que presenta al menos una mutación alcanza el 72.2% ( $p=0.44$ ). La Respuesta Viral Sostenida mantiene un paralelismo con los porcentajes alcanzados al final del tratamiento, donde la población que no presenta ninguna mutación en su secuencia ISDR presenta una RVS de 59.3%, frente a la respuesta del grupo con una mutación en la región de estudio que se sitúa en 60.4%, y 72.7% de respuesta en el grupo con >3 mutaciones en ISDR. Al igual que ocurre para la respuesta final del tratamiento (RFT), no se alcanzan diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.525$ ). Estos datos se presentan en la tabla 20.

**Tabla 20.- Respuesta Viral al Final del tratamiento y Respuesta Viral Sostenida en función de las mutaciones existentes en la Región ISDR (Global)**

	AISLADO SIN MUTACIONES 27 pacientes	AISLADO INTERMEDIO 53 pacientes	AISLADO MUTANTE 11 pacientes
RESPUESTA AL FINAL DEL TRATAMIENTO	RESPONDE: 20 (74,07%) NO RESPONDE: 7 (25,93%)	RESPONDE: 42 (79,24%) NO RESPONDE: 11 (20,76%)	RESPONDE: 10 (90,91%) NO RESPONDE: 1 (9,09%) $P = 0.273$
RESPUESTA VIRAL SOSTENIDA DEL TRATAMIENTO	RESPONDE: 16 (59,26%) NO RESPONDE: 11 (40,74%)	RESPONDE: 32 (60,38%) NO RESPONDE: 21 (39,62%)	RESPONDE: 8 (72,73%) NO RESPONDE: 3 (27,27%) $P = 0.525$

#### 4.1.3.1 .- Variabilidad en ISDR en función al genotipo: Pacientes con genotipo 1

Si seleccionamos por genotipo, encontramos que dentro de la población con genotipo 1, los resultados son muy similares a los obtenidos en el total de pacientes: 64.3% de RFT en pacientes sin mutaciones antes del inicio del tratamiento antiviral, frente al 73% en aislados intermedios, y un 75% de respuesta en los pacientes con ISDR mutantes ( $p=0.544$ ). Algo similar se observa cuando se estudia la Respuesta Viral Sostenida (RVS), que fue del 50% en la población WT, 51.3% en pacientes con aislados intermedios, y del 75% entre los aislados mutantes. Agrupando los pacientes con alguna mutación, es decir mutantes e intermedios, y compararlos frente a los aislados sin mutaciones (76.9% en los primeros vs 23.1% de respuesta en población WT), tampoco se obtiene diferencia estadísticamente significativa al analizar la RFT ( $p=0.378$ ), ni la RVS (0.528). Estos datos se presentan en la tabla 21.

**Tabla 21 - Respuesta Viral Final del tratamiento y Respuesta Viral Sostenida de los pacientes con genotipo 1, en función de las mutaciones existentes en la Región ISDR**

	AISLADO SIN MUTACIONES 14 pacientes	AISLADO INTERMEDIO 37 pacientes	AISLADO MUTANTE 4 pacientes
RESPUESTA AL FINAL DEL TRATAMIENTO	RESPONDE: 9 (64.28 %)  NO RESPONDE: 5 (35.72 %)	RESPONDE: 27 (72.97 %)  NO RESPONDE: 10 (27.03 %)	RESPONDE: 3 (75.0 %)  NO RESPONDE: 1 (25.0 %)  P = 0.544
RESPUESTA VIRAL SOSTENIDA	RESPONDE: 7 (50.0 %)  NO RESPONDE: 7 (50.0 %)	RESPONDE: 19 (51.35 %)  NO RESPONDE: 18 (48.65 %)	RESPONDE: 3 (75.0 %)  NO RESPONDE: 1 (25.0 %)  P = 0.555

#### 4.1.3.2 .- Variabilidad en ISDR en función al genotipo: Pacientes con genotipo 3

La respuesta final de tratamiento en la población con genotipo 3 en aislados sin mutaciones, al igual que en aislados intermedios y mutantes, fue ligeramente superior a la alcanzada por los pacientes con genotipo 1 (84.6%, 93.8% y 100%, vs 74.07%, 76.24%, 90.91%, respectivamente). De igual manera se comportó la RVS en los genotipos 3 vs los genotipos 1 (69.2%, 81.3% y 71.4%, vs 59,26%, 60,38%, 72,73%, respectivamente). Al igual que ocurriera con los pacientes con genotipo 1, estas

diferencias no alcanzaron diferencias estadísticamente significativas, ni tampoco al agrupar intermedios y mutantes con respecto a ISDR, frente a los pacientes con cepa salvaje: 84.5% vs 95.2%, respuesta final de tratamiento (p=0.249); 69.2% vs 71.8%, RVS (p=0.547). Estos datos se resumen en la tabla 22.

**Tabla 22 - Respuesta Viral Final del tratamiento y Respuesta Viral Sostenida de los pacientes con genotipo 3, en función de las mutaciones existentes en la Región ISDR**

	<b>AISLADO SIN MUTACIONES</b> 13 pacientes	<b>AISLADO INTERMEDIO</b> 16 pacientes	<b>AISLADO MUTANTE</b> 7 pacientes
<b>RESPUESTA AL FINAL DEL TRATAMIENTO</b>	RESPONDE: 11 (84.6 %)	RESPONDE: 15 (93.8 %)	RESPONDE: 7 (100 %)  P = 0.455
<b>RESPUESTA VIRAL SOSTENIDA</b>	RESPONDE: 9 (69.2 %)	RESPONDE: 13 (81.3 %)	RESPONDE: 5 (71.4 %)  P = 0.736

#### 4.1.3.3.- Variabilidad en ISDR en función a la coinfección por el VIH

Cuando estudiamos los pacientes en función a la coinfección por el VIH, encontramos la siguiente distribución en función del número de mutaciones acumuladas de forma basal en la región ISDR: 32.5% de los pacientes coinfectados analizados presentaron una secuencia sin mutaciones (WT), frente al 52.5% de pacientes con al menos una mutación (21 pacientes entre 1 y 3 mutaciones, considerados por tanto como intermedios), y 6 pacientes como cepas mutantes (15%). Estos datos se muestran en la tabla 23.

**Tabla 23.- Distribución de pacientes en función del nº de mutaciones acumuladas en ISDR, y agrupadas en población coinfectada VHC-VIH, o mono infectada VHC.**

<b>AISLADO SIN MUTACIONES (WILD TYPE)</b>	<b>AISLADO INTERMEDIO</b> (1-3 mutaciones)	<b>AISLADO MUTANTE</b> (>3 mutaciones)
COINFECTADOS: 13 pacientes (32.5%)	COINFECTADOS: 21 pacientes (52.5%)	COINFECTADOS: 6 pacientes (15.0%)
MONOINFECTADOS: 14 pacientes (27.5%)	MONOINFECTADOS: 32 pacientes (62.7%)	MONOINFECTADOS: 5 pacientes (9.8%)

4.1.3.4 .- Respuesta al tratamiento con función de la variabilidad en ISDR en pacientes coinfectados por VIH

Al analizar la respuesta virológica según esta distribución (40 pacientes), sin distinguir genotipos, obtenemos una RFT entre aislados sin mutaciones del 84.6%, frente a la respuesta de los pacientes con aislados intermedios del 71.5%, y del 83.3% entre los aislados mutantes. Dichos porcentajes se presentan en la tabla 24, donde se puede observar que no se alcanzan diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.747$ ). Al analizar la RVS a los 6 meses de seguimiento, la respuesta baja a un 69.23% en la población WT, frente al 30.77% en pacientes con alguna mutación en ISDR. Se mantienen las diferencias estadísticamente No significativas ( $p=0.389$ ). Los resultados se resumen en la tabla 24.

**Tabla 24.- Respuesta Viral Final del tratamiento y RVS de población coinfectada, sin diferenciar por genotipos, en función de las mutaciones existentes en la Región ISDR**

	AISLADO SIN MUTACIONES 13 pacientes	AISLADO INTERMEDIO 21 pacientes	AISLADO MUTANTE 6 pacientes
RESPUESTA AL FINAL DEL TRATAMIENTO	RESPONDE: 11 (84.62 %)  NO RESPONDE: 2 (15.38 %)	RESPONDE: 15 (71.43 %)  NO RESPONDE: 6 (28.57 %)	RESPONDE: 5 (83.33 %)  NO RESPONDE: 1 (16.17 %)  P = 0.747
RESPUESTA VIROLÓGICA SOSTENIDA	RESPONDE: 9 (69.2 %)  NO RESPONDE: 4 (30.8 %)	RESPONDE: 12 (57.1 %)  NO RESPONDE: 9 (42.9 %)	RESPONDE: 3 (50.0 %)  NO RESPONDE: 3 (50.0 %)  P = 0.389

4.1.3.5 .- Respuesta al tratamiento con función de la variabilidad en ISDR y el genotipo en pacientes coinfectados por VIH

Cuando se analizan los cambios en ISDR en población coinfectada en función del genotipo, comprobamos que todos los pacientes con genotipo 1 de los pacientes coinfectados VHC-VIH presentan alguna mutación en la región ISDR. La figura 14 muestra el alineamiento de todas las secuencias de la región ISDR de los pacientes

coinfectados con genotipo 1, frente a la secuencia de referencia, donde se puede observar que el cambio de aminoácido en la posición 2218 alcanza una prevalencia del 77.8%. Es la única mutación de las descritas por Enomoto y Watanabe respecto a ISDR de HCV-J presente en nuestros pacientes coinfectados con genotipo 1b. No hubo ningún cambio de aminoácido ni en posición 2209, 2216, 2224, ni 2227, que son las otras posiciones definidas con mayor relevancia respecto a ISDR.

La tabla 25 muestra la respuesta alcanzada en este grupo de pacientes. Al final del tratamiento se alcanza el 62% de respuesta en los pacientes con ISDR clasificada como intermedia (responden 6 de 16 pacientes intermedios), frente al 50% de respuesta que presentan los pacientes con cepas mutantes a nivel en ISDR (responde 1 de los 2 pacientes mutantes). Al evaluar la RVS en el grupo de pacientes con cepas intermedias, 7 pacientes la mantienen (43.75%), frente al 50% de RVS de los pacientes con más de 3 mutaciones en la región de estudio.

**Tabla 25.- Respuesta Viral Final del tratamiento y RVS de población coinfectada genotipo 1, diferenciando aislados intermedios de mutantes.**

	AISLADO sin mutaciones 0 pacientes	AISLADO INTERMEDIO 16 pacientes	AISLADO MUTANTE 2 pacientes
RESPUESTA AL FINAL DEL TRATAMIENTO	---	RESPONDE: 10 (62.5 %)  NO RESPONDE: 6 (37.5 %)	RESPONDE: 1 (50 %)  NO RESPONDE: 1 (50%)  p = 0.732
RESPUESTA VIRAL SOSTENIDA AL TRATAMIENTO	---	RESPONDE: 7 (43.75 %)  NO RESPONDE: 9 (56.25 %)	RESPONDE: 1 (50 %)  NO RESPONDE: 1 (50%)  p = 0.706

Al analizar la población con genotipo 3 (22 pacientes), comprobamos que todos los pacientes con alguna mutación en la región ISDR (9 pacientes; 5 pacientes con aislados intermedios, y 4 pacientes mutantes), respondieron al tratamiento (100% de RFT). Mientras que en los pacientes sin mutaciones (11 pacientes), observamos que dos pacientes no respondieron (84.6%). Respecto a la RVS, el grupo de pacientes sin mutaciones disminuye su respuesta al 69.2%, mientras que dos pacientes con alguna mutación presenta recaída al volver a detectarse ARN-VHC en sangre periférica.

Ambos pacientes que no alcanzaron RVS presentaban una cepa mutante en ISDR (100% de RVS en pacientes con aislados intermedios, frente al 50% de RVS en aislados mutantes). Ni en RFT, ni en RVS se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.467$  y  $p=0.223$ , respectivamente). Estos resultados se muestran en la tabla 26.

**Tabla 26.- Respuesta Viral Final del tratamiento y RVS de población coinfectada genotipo 3, en función de la variabilidad de ISDR.**

	AISLADO sin mutaciones 13 pacientes	AISLADO INTERMEDIO 5 pacientes	AISLADO MUTANTE 4 pacientes
RESPUESTA AL FINAL DEL TRATAMIENTO	RESPONDE: 11 (84.6 %)	RESPONDE: 5 (100 %)	RESPONDE: 4 (100 %) $p = 0.467$
RESPUESTA VIRAL SOSTENIDA AL TRATAMIENTO	RESPONDE: 9 (69.2 %)	RESPONDE: 5 (100 %)	RESPONDE: 2 (100 %) $p = 0.223$





4.1.3.6 .- Respuesta al tratamiento con función de la variabilidad en ISDR y el genotipo en pacientes mono infectados (VIH negativo)

Analizando la respuesta al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina en función de las mutaciones de la región ISDR dentro de la población no infectada por el virus VIH, estudiamos una población de 51 pacientes mono infectados. La distribución respecto al número de cambios de aminoácidos en ISDR, como se mostró con anterioridad fue del 27.5% para pacientes que no presentan ninguna mutación en la región ISDR (WT), el 62.7% presentan entre 1 y 3 mutaciones, y el 10%, presentaron más de 3 mutaciones en ISDR.

Analizamos la respuesta en función del número de mutaciones pero solo en los pacientes con genotipo 1 (n=37), ya que en la población de pacientes con genotipo 3 no hallamos ningún paciente con aislado sin mutaciones. La tasa de respuesta se mantiene en el subgrupo con aislados WT y con aislados con más de tres mutaciones, variando ligeramente en el grupo con cepas intermedias (81% al final del tratamiento, y 57.1% respectivamente) sin alcanzar significación estadística como vemos en la tabla 27 (p=0.379 al analizar RFT, y p=0.40 si analizamos la RVS). Puede existir una tendencia a la asociación con RVS y presentar más de 3 mutaciones, aunque en nuestra serie el número de pacientes mono infectados con más de tres mutaciones fue muy escaso (sólo 2 pacientes).

**Tabla 27 - Respuesta Viral Final del tratamiento antiviral de población mono infectada, genotipo 1, en función de las mutaciones existentes en la Región ISDR (Global)**

	AISLADO SIN MUTACIONES 14 pacientes	AISLADO INTERMEDIO 21 pacientes	AISLADO MUTANTE 2 pacientes
RESPUESTA AL FINAL DEL TRATAMIENTO	RESPONDE: 9 (64.3 %)  NO RESPONDE: 5 (35.7 %)	RESPONDE: 17 (81 %)  NO RESPONDE: 4 (19%)	RESPONDE: 2 (100 %)  NO RESPONDE: 0 (0 %)  p = 0.379
RESPUESTA VIROLÓGICA SOSTENIDA	RESPONDE: 7 (50 %)  NO RESPONDE: 7 (50 %)	RESPONDE: 12 (57.1 %)  NO RESPONDE: 9 (42.9 %)	RESPONDE: 2 (100 %)  NO RESPONDE: 0 (0 %)  p = 0.300

Agrupando todos los aislados con alguna mutación, y enfrentándolo al grupo de pacientes con aislados wild type (WT), sigue sin existir respecto a la respuesta al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina. En la tabla 28 recogemos estos datos de respuesta, donde el grupo sin mutaciones mantiene porcentajes de respuesta tanto al final del tratamiento (64.3%), como de forma sostenida (50% de RVS), mientras que el grupo con al menos un mutación presenta una tasa de RFT del 82.6% y una RVS del 60.9% ( $p=0.193$  para la RFT;  $p=0.379$  para la RVS).

**Tabla 28.- Respuesta Viral Final del tratamiento y RVS de población mono infectada con genotipo 1, diferenciando únicamente entre no presentar ninguna mutación en la Región ISDR, o bien acumular alguna mutación.**

	AISLADO SIN MUTACIONES 14 pacientes	AISLADO con alguna mutación 37 pacientes
RESPUESTA AL FINAL DEL TRATAMIENTO	RESPONDE: 5 ( 64.3 %)  NO RESPONDE: 9 ( 35.7 %)	RESPONDE: 19 ( 82.6 %)  NO RESPONDE: 4 (17.4%)  $p = 0.193$
RESPUESTA VIROLÓGICA SOSTENIDA	RESPONDE: 7 ( 50 %)  NO RESPONDE: 7 ( 50 %)	RESPONDE: 14 (60.9%)  NO RESPONDE: 9 (39.1%)  $p=0.4$

La figura 15 muestra el alineamiento de todas las secuencias de la región ISDR de los pacientes mono infectados VHC-VIH con genotipo 1, comparándolos con sus cepas de referencia, donde se agrupan 9 secuencias pertenecientes a sendos pacientes con genotipo 1a, y 28 secuencias correspondientes a los pacientes con genotipo 1b. Al igual que ocurría en los pacientes coinfectados, tras el alineamiento de todas las secuencias ISDR de los pacientes mono infectados, observamos que la única mutación de las descritas por Enomoto y Watanabe respecto a ISDR de HCV-J presente en nuestros pacientes coinfectados con genotipo 1b se acumula en la posición 2218, alcanzo esta vez una menor prevalencia (46.4%). Al igual que ocurriera en coinfectados, ninguna otra cambio de los descritos como más influyentes sobre la sensibilidad a interferón aparecieron entre nuestros pacientes mono infectados con genotipo 1b.

1b 2209	16	18	24	27	2248																																		
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	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
P	S	L	K	A	T	C	T	T	H	H	D	S	P	D	A	D	L	I	E	A	Y	L	M	W	R	Q	E	M	G	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
P	S	L	K	A	T	C	T	A	c	H	D	S	P	D	A	D	L	I	E	A	N	L	L	W	R	Q	E	S	G	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
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	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
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	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
P	S	L	R	A	T	C	T	T	n	S	D	S	P	D	A	D	L	I	E	A	N	L	L	W	R	Q	E	M	G	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
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	G	d	I	T	R	V	E	S	E	N
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	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
P	S	L	K	A	T	C	T	T	r	H	D	S	P	D	A	D	L	I	E	A	N	L	L	W	R	Q	E	M	G	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
P	S	L	K	A	T	C	T	T	r	H	D	S	P	D	A	D	L	I	E	A	N	L	L	W	R	Q	E	M	G	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
P	S	L	K	A	T	C	T	T	r	H	D	S	P	D	A	D	L	I	E	A	N	L	L	W	R	Q	E	M	G	G	h	I	T	R	V	E	S	E	N
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	G	N	I	T	R	V	E	S	G	N
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	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
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	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
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	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
P	S	L	K	A	T	C	T	A	c	H	D	S	P	D	A	D	L	I	E	A	N	L	L	W	R	Q	E	i	G	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
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	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
P	S	L	K	A	T	C	T	T	r	H	D	S	P	D	A	D	L	I	E	A	N	L	L	W	R	Q	E	M	G	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
P	S	L	K	A	T	C	T	T	n	H	D	S	P	D	A	E	L	I	E	A	N	L	L	W	R	Q	a	M	G	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
P	S	L	K	A	T	C	T	T	r	H	D	S	P	D	A	D	L	I	E	A	N	L	L	W	R	Q	E	M	G	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
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	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
P	S	L	K	A	T	C	T	T	r	H	D	S	P	D	A	D	L	I	E	A	N	L	L	W	R	Q	E	M	G	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
P	S	L	K	A	T	C	T	T	n	H	D	S	P	D	A	E	L	I	E	A	N	L	L	W	q	Q	a	M	G	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
P	S	L	K	A	T	C	T	T	r	H	D	S	P	D	A	D	L	I	E	A	N	L	L	W	R	Q	E	M	G	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
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	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
P	S	L	K	A	T	C	T	T	r	H	n	Y	P	D	A	D	L	I	E	A	N	L	L	W	q	Q	E	M	G	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
1A 2209	16	18	24	27	2248																																		
P	S	L	K	A	T	C	T	A	N	H	D	S	P	D	A	E	L	I	E	A	N	L	L	W	R	Q	E	M	G	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
P	S	L	K	A	A	C	T	T	N	Y	D	S	P	D	A	E	L	I	E	A	N	L	L	W	R	Q	E	M	G	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
P	S	L	K	A	T	C	T	T	N	H	D	S	P	D	A	E	L	I	E	A	N	L	L	W	R	Q	E	M	G	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
P	S	L	K	A	T	C	T	T	N	H	D	S	P	D	A	E	L	I	E	A	N	L	L	W	R	Q	E	M	G	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
P	S	L	K	A	T	C	T	T	N	H	D	S	P	D	A	E	L	I	E	A	N	L	L	W	R	Q	E	M	G	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
P	S	L	K	A	T	C	T	T	N	H	D	S	P	D	A	E	L	I	E	A	N	L	L	W	R	Q	E	M	G	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
P	S	L	K	A	T	C	T	A	n	H	D	S	P	D	A	E	L	I	E	A	N	L	L	W	R	Q	E	M	G	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
P	S	L	K	A	T	C	T	A	n	H	D	R	P	D	V	E	L	I	E	A	N	L	L	W	q	Q	E	M	G	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N
P	S	L	K	A	T	C	T	A	r	H	D	S	P	D	A	E	L	I	E	A	N	L	L	W	R	Q	E	M	G	G	N	I	T	R	V	E	S	E	N

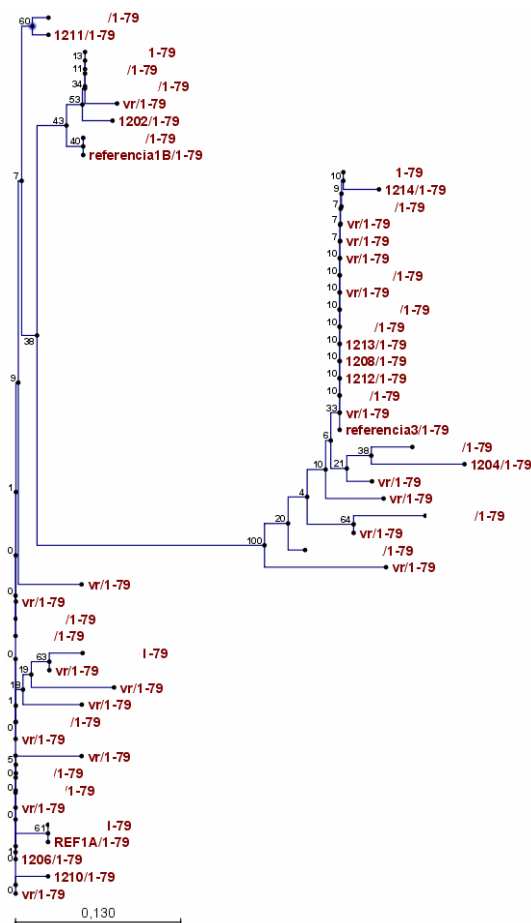
Figura 15.- Alineamiento de las secuencias de ISDR con respecto a la secuencia de referencia, de los pacientes mono infectados VHC. Cambios resaltados en rojo.

4.1.3.7 .- Re-análisis de las secuencias ISDR utilizando como referencia la cepa resistente más prevalentes en nuestro medio.

En este apartado mostraremos los resultados obtenidos al reclasificar las cepas de estudio en las tres categorías analizadas hasta el momento (wild type, intermedia y mutante), pero esta vez utilizando como cepa de referencia el aislado más común en nuestro medio para cada genotipo, dentro de los pacientes no respondedores de cada grupo.

La Figura 16 muestra la distancia filogenética entre los distintos aislados de cada genotipo con su cepa de referencia. Esta figura, como se indica en material y métodos, se ha construido utilizando Neighbour-Joining y la secuencia de ISDR. Cómo se puede observar, la mayor distancia con respecto a las cepas de referencia se obtiene para el genotipo 1b, para el que se utilizó la secuencia de HCV-J.

**Figura 16.- Árbol filogenético según genotipo resultante del alineamiento de su secuencia de aminoácidos en ISDR.**



Utilizando este tipo de análisis, 39 aislados sería wild type (WT), frente a los 27 que obteníamos inicialmente. Al no tener en cuenta el cambio más prevalente en nuestro medio, el volumen de pacientes con aislados sin mutaciones aumenta un 13% con la consecuente disminución de los aislados intermedios que bajan de 53 a 42 pacientes (46.2% ahora, frente al 58.2% inicial). Respecto a los pacientes con más de tres mutaciones en ISDR, baja en dos pacientes (10 pacientes que suponen un 10.9% ahora, frente a los 12 pacientes que había inicialmente). Esta comparación entre como se distribuyen los aislados de estudio en función del número de mutaciones en ISDR, se describen en la tabla 29.

**Tabla 29.- Distribución de pacientes estudiados respecto el resultado de la secuenciación de la región ISDR y su comparativa respecto a la secuencia de la cepa resistente HCV-J definida por Enomoto y también si la comparásemos a nuestra cepa más prevalente.**

	AISLADO SIN MUTACIONES (WILD TYPE)	AISLADO INTERMEDIO (1-3 mutaciones)	AISLADO MUTANTE (>3 mutaciones)
Tomando como referencia a HCV-J de Enomoto	27 pacientes (29.7%)	53 pacientes (58.2%)	11 pacientes (12.1%)
Tomando como referencia nuestra cepa más prevalente	39 pacientes (42.9%)	42 pacientes (46.2%)	10 pacientes (11%)

Al estudiar los cambios en función de la coinfección, observamos que en la población VIH, si se observan diferencia, ya que los aislados sin mutaciones pasan de 13 a 21 (52.5%) en detrimento de los aislados intermedios que pasan de 21 a tan solo 14 (35%). Los aislados mutantes pasan de 6 pacientes a 5, en el caso de los pacientes coinfectados, mientras que se mantienen en 5 pacientes en el caso de la población monoinfectada independientemente del patrón de referencia utilizado. En la población no VIH, apenas varían los porcentajes de prevalencia en los distintos subgrupos como podemos observar en la siguiente tabla 30.

Tabla 30.- Distribución de pacientes en función del nº de mutaciones acumuladas en ISDR, y agrupadas en población coinfectada VHC-VIH, o sola mono infectada VHC, realizando una comparativa entre la secuencia de la cepa resistente HCV-J definida por Enomoto y también si la comparásemos a nuestra cepa más prevalente.

	AISLADO sin mutaciones (WILD TYPE)	AISLADO INTERMEDIO (1-3 mutaciones)	AISLADO MUTANTE (>3 mutaciones)
<b>Tomando como referencia a HCV-J de Enomoto</b>	COINFECTADOS: 13 pacientes (32.5%) MONOINFECTADOS: 14 pacientes (27.5%)	COINFECTADOS: 21 pacientes (52.5%) MONOINFECTADOS: 32 pacientes (62.7%)	COINFECTADOS: 6 pacientes (15.0%) MONOINFECTADOS: 5 pacientes (9.8%)
<b>Tomando como referencia nuestra cepa más prevalente</b>	COINFECTADOS: 21 pacientes (52.5%) MONOINFECTADOS: 18 pacientes (35.3%)	COINFECTADOS: 14 pacientes (35%) MONOINFECTADOS: 28 pacientes (54.9%)	COINFECTADOS: 5 pacientes (12.5%) MONOINFECTADOS: 5 pacientes (9.8%)

Pese a la variación de porcentajes antes descrita, al analizar estadísticamente la relación entre la respuesta al tratamiento de los distintos pacientes estudiados y la existencia de mutaciones en la región ISDR de sus aislados virales, no encontramos significación estadística. El análisis que se ha realizado ha seguido el mismo esquema que el presentado anteriormente. Para no resultar repetitivos, no se muestran los resultados.

#### **4.2.- OTROS FACTORES CON POSIBLE RELACIÓN CON LA RESPUESTA: EXISTENCIA DE CIRROSIS**

Analizando la existencia de otros factores que pudieran influir en el porcentaje de pacientes que respondieron al tratamiento, quisimos descartar una posible variable de confusión como es la existencia de cirrosis en los pacientes estudiados, y como podemos observar en la siguiente tabla 31, tampoco existen diferencias en función de la existencia o no de cirrosis, si bien el escaso número de pacientes con cirrosis hace que tenga poco valor estadístico. No existieron ni en la muestra global, donde solo se hallaron 9 pacientes en estadio cirrótico de su patología hepática, ni dividiendo a los pacientes en función del genotipo y de la coinfección, ya que en ese caso se reducía aún más el tamaño muestral, 6 pacientes coinfectados, frente a 3 mono infectados.

Tabla 31.- Influencia del estadio cirrótico de los pacientes, en su respuesta al tratamiento con PEG-IFN más RBV.

	PACIENTES NO CIRROSIS (82)	PACIENTES CIRRÓTICOS (9)
<b>No respondedores</b>	38.3%	44.5%
<b>Respuesta Viral Sostenida</b>	61.72%	55.5%

p=0.480

#### 4.2 .- FACTORES RELACIONADOS CON LA RESPUESTA: ANÁLISIS MULTIVARIADO

Tras el análisis estadístico univariado, realizamos un análisis multivariado de la muestra, tras el cual hallamos que el único factor que se relaciona de forma significativa en la RVS fue el genotipo ( $p=0,035$ ), con el logaritmo de la carga viral muy próximo a la significación ( $p=0,089$ ). Las demás variables estudiadas (VIH, sexo, estado ISDR y presencia de cirrosis) no mostraron significación. Posteriormente, estratificando en función de la coinfección desaparece la asociación del genotipo y pierde valor el log CV-VHC en mono infectados, persistiendo en coinfectados.

Además se analizó la influencia de la respuesta en función del subtipo. En el caso del subtipo 1a la única variable que se relacionó de forma independiente con la aparición de RVS fue la ausencia de coinfección VIH. En el caso del subtipo 1b, no existieron asociaciones significativas.

Tabla 32.- Análisis Multivariado,

VARIABLE	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA (GENOTIPO 1b)	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA (GENOTIPO 1a)
<b>Logaritmo de la carga viral basal de VHC</b>	P=0,363	P=0.479
<b>Sexo</b>	P=0,701	P=0.612
<b>Clasificación: WT, intermedio, mutante</b>	P=0,343	P=0.999
<b>Cirrosis</b>	P=0,999	P=0.254
<b>Coinfección con VIH</b>	P=0,299	<b>P=0.014</b>
<b>Enzimas hepáticas basales</b>	P=0,761	P=0.999

## 6 .- DISCUSIÓN

El virus de hepatitis C (HCV) sigue siendo una de las principales causas de enfermedad hepática crónica, afectando aproximadamente en el mundo a 170 millones de personas. Hasta hace unos años, los pacientes se trataban tradicionalmente con Interferón alfa, con un pobre porcentaje de respuesta a largo plazo. A raíz de la aparición de la molécula de IFN pegilado (PEG-IFN), y de dos ensayos clínicos que demostraron su superioridad, esta formulación se ha establecido como tratamiento estándar de la hepatitis crónica por virus C. A principios de esta década, Fried [111] y Manns [112] compararon en pacientes mono infectados, la respuesta al interferón clásico más ribavirina, con una nueva molécula de interferón pegilado, estableciéndose como pauta estándar de tratamiento antiviral. La combinación de interferón pegilado más ribavirina, La combinación de PEG-IFN más Ribavirina (RBV) aporta una tasa de respuesta virológica media a largo plazo del 40-50% en genotipos 1-4 frente a un porcentaje de respuesta también a largo plazo del 80-90% en genotipos 2-3.

Nuestros resultados, para la población mono infectada, concuerdan con las principales series, tanto europeas como americanas, coincidiendo en diferenciar genotipos de alta y baja respuesta al tratamiento antiviral. En nuestra serie, la tasa de respuesta en población mono infectada fue del 56.75% de respuesta viral sostenida para genotipos 1 y un 78.6% en genotipos 3 (respuesta media del 67.75%). Fried al estimar la eficacia de PEG IFN alfa 2a en combinación con Ribavirina, obtiene como resultados una Respuesta Viral Sostenida (RVS) del **56%** de media en el grupo que utilizó la combinación peginterferón más ribavirina (**46%** para genotipo 1). Manns [112] describe una RVS media del **54%** (**82%** para genotipo no 1, **42%** para genotipo 1).

En la actualidad, el virus de hepatitis C, se prevé que siga creciendo principalmente en la población VIH, debido al que la terapia antirretroviral (HAART) ha mejorado radicalmente el pronóstico de enfermedad de estos pacientes, el alto coste de las drogas antirretrovirales, la falta de adhesión al tratamiento y la resistencia del virus VIH, constituyen aún importantes barreras para un control adecuado de la epidemia. Cuando analizamos nuestro medio y nuestros pacientes, observamos como más de los dos tercios de los pacientes se encuentran co-infectados por ambos virus, VIH y VHC.



La combinación de interferón pegilado más ribavirina es también más eficaz que la terapia clásica de interferón normal más ribavirina en los pacientes coinfectados. Tres ensayos clínicos, Chung y colaboradores en el ACTG5071 [113], Torriani y colaboradores en el APRICOT [114] y Carrat en el RIBAVIC [115], establecieron que también en población coinfectada por el virus VIH, la combinación de interferón pegilado más ribavirina es más eficaz que la terapia clásica de interferón normal más ribavirina, alcanzando porcentajes de respuesta estratificada por genotipos de 36-52% para los genotipos 1 y 4, valores muy próximos al 60% alcanzado por nuestra serie de pacientes VIH+ y genotipo 1. Los dos primeros ensayos utilizan Peg-IFN alfa-2a, mientras que en el RIBAVIC se empleó Peg-IFN alfa-2b, todos ellos en combinación con ribavirina 800 mg/día, durante 48 semanas. En nuestro estudio, se utilizó la primera pauta de tratamiento siguiendo el protocolo establecido por el *National Institutes of Health (Consensus Development Conference Statement, Junio 2002)*, que establece que el tratamiento se realice con interferón pegilado más ribavirina durante 24 semanas para los genotipos 2-3 en pacientes VIH negativos, y durante 48 semanas para los genotipos 1-4 en pacientes mono infectados, y en todos los pacientes coinfectados VHC-VIH independientemente de su genotipo. Dadas las dos presentaciones comerciales existentes en este momento, Peg-IFN alfa-2a (Pegasys®) y Peg-IFN alfa-2b (Pegintrom®), en nuestro estudio se ha utilizado el primero, ya que es la única presentación disponible en los distintos hospitales participantes.

Nuestra serie alcanza una respuesta global ajustada por genotipo y por la existencia o no de coinfección VIH del 60% de forma sostenida en coinfectados VIH-VHC. Algo superior que los valores alcanzados en estos tres grandes estudios, que se encuentran entre el 27% de los estudios de Chung y Carrat, y el 40% de respuesta viral sostenida global de Torriani, aunque siempre dentro de los mismos porcentajes de respuesta. Algo parecido ocurre entre los pacientes con genotipo 3: nuestros pacientes presentan una respuesta viral sostenida del 73%, mientras que en estos tres grandes estudios la respuesta en genotipos no-1 osciló entre el 62-73% de forma sostenida. Sin embargo, el porcentaje de abandono en nuestra serie fue menor 7.7% (solo 6 pacientes dejaron el tratamiento) frente al 12% acumulado en el estudio ACTG, 25% presentado el APRICOT y hasta el 38% que alcanzó el RIBAVIC, eventualidad que debe haber influido en que nuestra serie presente ligeramente mejores porcentajes de respuesta. También el porcentaje de pacientes con cirrosis de nuestra serie fue tan solo de un 10%, frente al 11% del ACTG, 16% del APRICOT y el 39% que presentó el estudio RIBAVIC, que podría justificar esa ligera diferencia en los resultados tras finalizar el seguimiento de los pacientes. Solo el estudio ACTG

presentaba un volumen importante de pacientes de raza negra en su población de estudio (30%), mientras que los otros dos no superan el 10%. Nuestra serie no incluyó ningún paciente de raza negra.

La media de la carga viral basal de virus C de todos estos estudios son muy homogéneas (entre 5.6 y 6.2 x 10<sup>6</sup> UI/ml), rango dentro del cual se encuentra también la media de carga basal en nuestro estudio, que se encontraba en 5.9 x 10<sup>6</sup> UI/ml. El porcentaje de pacientes con carga viral VIH indetectable fue superior en nuestra serie, con un 77.5% de pacientes con ARN-VIH inferior a 50 copias/ml frente al 60% de los otros estudios de referencia, lo cual también sería un factor importante que pudiera justificar una mejor respuesta de nuestros pacientes; se ha descrito que las concentraciones de ARN-VHC son más altas en los pacientes coinfectados, tanto en hígado como en plasma, y así de forma secundaria, al existir mayor replicación viral del VHC exista peor respuesta al tratamiento con interferón. Finalmente, el recuento de células T CD4 basal también fue ligeramente superior en nuestros pacientes con 581 células/μl frente a los 477-520 células/μl que presentaban los pacientes incluidos en los estudios de referencia. Otra variable más que beneficia la respuesta de nuestros pacientes, ya que también está descrito que hay peor control de la replicación del VHC por existir un mayor déficit de células CD8+ específicas anti-VHC.

Además de los estudios internacionales previamente citados [113, 115], también se han presentado algunas series nacionales que describen una menor eficacia del tratamiento frente a la hepatitis por virus C en pacientes coinfectados por VIH. En este sentido, Ballesteros y colaboradores comunican resultados de respuesta virológica sostenida del 27% en genotipo 1-4, y del 44% en genotipo 2-3 [116]. Sorprende que utilizando un esquema de tratamiento de la hepatitis idéntico al nuestro, basado en interferón pegilado (peg-Intron®) más ribavirina 800 mg/día (dosis inferior a la utilizada por nuestros pacientes), la respuesta al tratamiento de 28 pacientes, de los cuales el 46.4% tenían genotipo 1, población ligeramente inferior a la nuestra (18 pacientes coinfectados VHC-VIH con genotipo 1), pero que alcanza una RVS muy inferior a la observada en nuestra población (44.4% de RVS en nuestros pacientes coinfectados con genotipo 1), teniendo en cuenta que ambas poblaciones de estudio presentaban gran similitud respecto a CD4 basales (554.4 células/μl vs 581.9 en nuestra serie), y ARN-VHC basal (5.4 log UI/ml vs 5.6 log UI/ml de nuestros pacientes). Siguen siendo porcentajes de respuesta en pacientes coinfectados inferiores a los porcentajes de RVS del 56.8% para pacientes mono infectados.

En resumen, en la serie que hemos estudiado, nuestros resultados coinciden con los presentados en la literatura para los pacientes mono infectados. Con respecto a los coinfectados, hemos de destacar la menor respuesta, global y por genotipos, cuando se comparan con los mono infectados, así como una tendencia a una mayor tasa de respuesta que en otros estudios nacionales e internacionales.

Las diferencias en la tasa de respuesta al tratamiento anti VHC se ha asociado principalmente con factores virológicos, principalmente el genotipo y la carga viral. Otros factores, como la edad y raza del paciente, o el número de mutaciones acumuladas en distintas regiones del ARN del virus C, tales como E2, NS3/4 o la que motiva este trabajo, la región ISDR (Región de Sensibilidad al Interferón) localizada dentro de la secuencia codificante de la proteína NS5a, se han intentado relacionar con la tasa de respuesta.

En nuestra serie, volvemos a coincidir con la afirmación de que es el genotipo del virus C el principal factor predictivo de respuesta, como refleja el análisis multivariable, que encuentra el genotipo de VHC como único factor relacionado de forma significativa con la RVS ( $p=0,035$ ), aunque el logaritmo de la carga viral basal del propio VHC está muy próximo a la significación ( $p=0,089$ ). Las demás variables estudiadas (VIH, sexo, estado ISDR y presencia de cirrosis) no mostraron significación. Posteriormente, se analizó la influencia de la respuesta en función del subtipo. En el caso del subtipo 1a la única variable que se relacionó de forma independiente con la aparición de RVS fue la ausencia de coinfección VIH, aunque el bajo número de muestras puede ser un factor que esté perturbando estos resultados. En el caso del subtipo 1b no existieron asociaciones significativas en ningún momento, como tampoco han existido diferencias significativas en el global de la población en la tasa de respuesta en función de la coinfección o no con el VIH. Aunque la tasa de respuesta en los genotipos 1 es inferior en los pacientes coinfectados, la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0,39$ ).

Es importante resaltar que en la población de estudio, todos los pacientes son de etnia hispánica - raza caucásica, por tanto no se pudo valorar la influencia de esta variable en la respuesta al tratamiento con interferón más ribavirina.

Enomoto et al [118] definieron en 1995 la secuencia HCV-J, la cual ellos definieron como la cepa Standard resistente a interferón convencional, para los genotipos 1b, dentro de la cual existía entre los aminoácidos 2209 y 2248 una región relacionada con esta respuesta a dicho fármaco a la que denominaron ISDR (Interferon Sensitivity Determining Region / Región Determinante de Sensibilidad a Interferón). Ellos postulaban que cuantos más cambios se acumulaban respecto a su secuencia de referencia, cabría esperar una mayor respuesta al tratamiento con interferón, in vitro. Enomoto y Watanabe en 2005, dada la controversia existente entre los datos de estudios orientales y occidentales, realizan un análisis exhaustivo de 334 pacientes japoneses con genotipo 1b, no solo detectando el número de mutaciones acumulados en la región ISDR, sino también estudiando en qué posición se encuentran las mismas, de manera que dan un paso hacia delante y distinguen entre mutaciones relacionadas con alta eficacia al tratamiento (mutaciones localizadas en las posiciones 2209, 2216 y 2227 de ISDR); y mutaciones de baja eficacia (2218 y 2224 de ISDR). De todas ellas, la más prevalente en Japón es la 2218, y la que más afecta a la respuesta con interferón es la mutación en posición 2209. Pese a ello, no otorgan mayor peso específico a una mutación sobre otra, y en sus conclusiones solo hacen referencia a que el número de mutaciones en ISDR es un factor limitante para la respuesta a interferón. Nosotros en función de este dato, analizamos nuestros aislados para comprobar la prevalencia de los cambios reseñados por Enomoto, y observamos que únicamente encontramos cambios en la posición 2218 (la más prevalente en Japón) en 13 de los pacientes mono infectados con genotipo 1b. En el resto de posiciones señaladas, nuestros pacientes no presentan ningún cambio de aminoácidos respecto a la cepa de referencia, y en la posición 2218 de ISDR de los pacientes con genotipo 1b coinfectados, tampoco se acumula ninguna mutación que analizar. Por tanto debemos pensar, que dichos cambios en ISDR deben ser propios de los subtipos J como postulan Pascu y Murayama, y no en los subtipos propios del resto del mundo o subtipos W, a los cuales pertenecen nuestros pacientes en su totalidad.

Posteriormente, han ido apareciendo distintos trabajos que han aportado distintos datos, unos a favor y otros en contra, respecto al verdadero factor predictivo de las “mutaciones” acumuladas en dicha región, que a grandes rasgos afirman que prácticamente todos los estudios relacionados en Japón y países colindantes (China, Taiwán y Corea ), mostraron concordancia con la afirmación de Enomoto, mientras

que los datos aportados por trabajos europeos y americanos, muestran gran discordancia en sus resultados, existiendo varios trabajos que indican que existe independencia entre la respuesta a interferón y los cambios de aminoácidos acumulados en la región ISDR. Estas diferencias de resultados entre los trabajos de distinta área geográfica se constatan tras revisar las series japonesas y las europeas, donde comparando porcentajes de respuesta vemos como en el subgrupo de pacientes sin mutaciones en ISDR existe una respuesta viral sostenida próxima al 45% en series japonesas, mientras que en trabajos europeos, la tasa de respuesta de estos pacientes no llega al 25%. Lo mismo ocurre si comparamos los grupos de pacientes con aislados intermedios y en aislados con más de tres mutaciones en ISDR, donde en Japón llegan al 18% de respuesta frente al escaso 12% de respuesta de los pacientes con aislados mutantes en series europeas.

Nuestra serie partía de 34 pacientes con genotipo 1b con una RVS global del 52.7%, tratados todos ellos con interferón pegilado más ribavirina; y al igual que viene ocurriendo en todos los trabajos analizados, el porcentaje de pacientes con aislados intermedios fue mucho superior a los aislados mutantes, 62% frente a un 18% en el caso del trabajo Taiwanés, y en ambos casos se concluyen en que tener más de cuatro mutaciones acumuladas en ISDR es determinante para presentar mejores porcentajes de respuesta respecto a los pacientes que no tienen mutaciones en dicha región del ARN-VHC, mientras que nuestros pacientes (58.2% con cepa intermedia, frente a un 12.1% de cepas mutantes) con número de pacientes equiparable no corrobora dicha afirmación. El trabajo coreano también señala al ARN-VHC basal, así como la edad del paciente al inicio de tratamiento como variables predictivas de respuesta. Llama la atención además de lo referido anteriormente, que el único trabajo oriental que afirma que la cantidad de ribavirina utilizada es predictiva de mejor respuesta virológica a interferón (mejor respuesta al usar >14 mg/kg/día), es el trabajo taiwanés, que a su vez, utiliza 1000-1200 mg/día de ribavirina en lugar de los 600-800 mg/día utilizados generalmente.

Entre tanta discrepancia de resultados respecto a la importancia de esta variable, Pascu y colaboradores, en 2004 [74], realiza un meta análisis que incluía 1230 pacientes infectados por VHC genotipo 1b procedentes tanto de estudios japoneses como europeos, y a través de un análisis por regresión logística de las respuestas de estos pacientes en función del número de mutaciones acumuladas en la

región ISDR, concluyendo que solo existía relación entre dichas variables en los aislados procedentes de estudios japoneses, estableciendo una diferenciación geográfica entre cepas VHC-J o japonesas y VHC-W o procedentes del resto del mundo (worldwide). Estos datos son confirmados en 2007 por Murayama y colaboradores [111], donde a través de un estudio prospectivo que incluía 79 pacientes (35 VHC-J, 44 VHC-W, tratados con interferón alfa tres veces en semana + ribavirina), concluye tras el análisis multivariable de su serie que el número de mutaciones en ISDR es útil como predictor de respuesta virológica al tratamiento con interferón frente al VHC sólo en los subtipos VHC-J, no influyendo en el caso de los pacientes con aislados VHC-W. La distancia filogenético que hemos encontrado entre nuestros aislados 1b respecto la cepa HCV-J utilizada como referencia, además de la localización geográfica son dos argumentos más, además de la ausencia de los cambios específicos descritos por Watanabe con anterioridad, para clasificar a nuestros aislados 1b como HCV-W.

Todos nuestros aislados pertenecían al subtipo-W, por lo que en nuestra serie no se pudieron comparar las tasas de respuesta en función de esta variable. Sin embargo, al comparar distintos trabajos realizados en Europa, donde ninguno especifica esta condición en su población de estudio, por lo que se asume que todos serían subtipos W, seguimos observando algunas diferencias. Entre las más relevantes, encontramos un grupo español que muestra unos resultados que coinciden con las series japoneses al afirmar que el número de mutaciones en la región ISDR puede predecir la respuesta a interferón, estudios realizados en Barcelona por Sainz y Puig-Basagoiti [119]. Estos autores, al igual que el grupo de Murphy [32], presentan series que oscilan entre 45 y 85 pacientes, donde tras presentar una tasa de respuesta a interferón clásico que no alcanza el 20% e incluir exclusivamente población VIH negativo, concluyen que el número de mutaciones en ISDR es una variable independiente asociada a la respuesta con interferón. Respecto a estos resultados, hay que señalar que todos partían de una notable diferencia respecto a la carga viral de VHC basal, que es mucho más alta en estos estudios en comparación con nuestros datos ( $4,50-5,30 \cdot 10^5$  copias/ml frente a nuestra carga basal que es de  $1,56 \cdot 10^5$ ), que como ya hemos comentado, son variables importante que definen una peor respuesta en general al tratamiento con interferón. Curiosamente, Puig-Basagoiti cuatro años después de emitir estos resultados, realiza otro trabajo [68], con mucho menor número de pacientes (15 pacientes mono infectados con genotipo 1b, frente a los 74 pacientes incluidos en su primer trabajo de 2001), esta vez tratados con interferón clásico (3

inyecciones subcutáneas a la semana) pero en esta serie acompañados con ribavirina (frente a la monoterapia del primer estudio), en el cual alcanza tasas de respuesta viral sostenida del 60%, (RVS del 14.8% en 2001)[119]. En este caso, el autor concluye que tras volver a analizar el número de mutaciones en ISDR, antes y durante el tratamiento de los pacientes que, si bien el número de mutaciones existentes antes del inicio del tratamiento fue superior en el grupo de pacientes respondedores respecto a los no respondedores, no existen diferencias estadísticamente significativas que relacionen la respuesta a interferón con la variabilidad existente en la región ISDR. Por tanto parece que el porcentaje global de respuesta al régimen de tratamiento utilizado influye de manera importante sobre el resultado final que intenta relacionar dichas variables motivo de nuestro estudio.

Hofmann [29], Zeuzen y Sarrazin [19], hacen una revisión en 2004 de todos los trabajos publicados hasta la fecha, donde comparan los resultados obtenidos de respuesta viral utilizando distintos regímenes de tratamiento según se usara interferón clásico o interferón pegilado más ribavirina, donde lógicamente vuelve a comprobar los mejores porcentajes de respuesta con interferón pegilado, pero además analiza la posible influencia de diferentes proteínas del propio virus como variables que pudieran influir en el efecto antiviral del interferón. Si bien comparan la influencia del número de mutaciones de la región ISDR sobre la respuesta al tratamiento con interferón pegilado más ribavirina, y aunque otorgan cierto papel al acumulo de mutaciones en dicha región, no pueden concluir que exista paralelismo entre estas variables. Como nosotros, estos autores aluden a la escasez de mutaciones detectadas para explicar porque no se alcanzan diferencias significativas, y proponen otras localizaciones del genoma del VHC para explicar las diferencias de respuesta virológica existente en los pacientes infectados por virus C genotipo 1. En dichos trabajos, no solo analizan el número de mutaciones acumuladas exclusivamente en la región ISDR, sino que amplían el análisis al extremo carboxy-terminal de NS5a de una población de algo menos de 40 pacientes mono infectados con genotipo 1. Al comprobar el número de mutaciones existentes, observaron que no había ningún paciente que presente más de tres mutaciones, concentrándose el grueso de pacientes en el rango entre 1-3 mutaciones (aislados intermedios), los cuales no presentaban más de un 25% de respuesta. No obstante, al ampliar la zona de análisis, el número de mutaciones encontradas ascendía considerablemente, viéndose como los pacientes con RVS presentaban una media de mutaciones de 8, aunque los no respondedores y pacientes con respuesta virológica al final del tratamiento pero con recaída posterior acumulaban

una media de 6 mutaciones en el total del dominio analizado. Nosotros duplicamos prácticamente el número de pacientes analizados (n=55), sumando pacientes VIH positivo y mono infectados, con el doble en porcentaje de respuesta (52.7% de RVS en genotipo 1), y si bien solo hemos analizado la región ISDR, contamos con mayor número de pacientes con cepas intermedias (37 pacientes) y mutantes (4 pacientes), pero que sería equiparable a la población de Sarrazin (26 pacientes con cepas intermedias, frente a ningún paciente con cepas mutantes para ISDR). En ambos casos, en ninguno se encuentra relación entre el número de mutaciones en dicha región, si bien Sarrazin concluye tras ampliar la zona de análisis a todo el dominio de NS5a, que si bien la respuesta virológica sostenida es mayor entre los pacientes que acumulan más mutaciones, esta variable por si sola no es suficiente para explicar dicho comportamiento virológico respecto a la actividad del interferón.

Respecto al grueso de trabajos europeos antes mencionados debido a sus resultados radicalmente opuestos a los antes descritos estudios orientales, al igual que nosotros concluyen que no existe asociación entre el número de mutaciones en ISDR y la respuesta al tratamiento. Todos ellos realizados con interferón clásico en lugar de interferón pegilado y partiendo de una alta carga viral basal de sus pacientes. Entre todos ellos, destacamos inicialmente los realizados por Khorsi [120], Duvelie [121] y Brillet [122] en Francia (43 pacientes, con un 39% de RVS), donde si bien el primero destaca por el volumen de pacientes analizados (43 con genotipo 1b, en el mismo nivel que nuestra serie con 34), los cuales debido a que utiliza interferón clásico en lugar del interferón pegilado utilizado en nuestro trabajo, solo alcanza un porcentaje de respuesta del 39% frente a nuestro 52% de respuesta, también es importante por referirse a una población como es la francesa que al igual que otras como son la población japonesa, la italiana y la española, presentan como genotipo predominante al 1b; y al igual que las series japonesas y españolas, el grueso de cepas estudiadas respecto al número de mutaciones acumuladas en ISDR fueron cepas intermedias con escasa prevalencia de cepas mutantes, y todas ellas coincidían en el cambio más prevalente en la posición 2218. Pero mientras que trabajos japoneses muestran un 80% de pacientes con alguna mutación, tanto en las series francesas como en la nuestra no alcanzamos el 60%, con una prevalencia de cepas mutantes inferiores al 10%, por lo que todos coincidimos en la ausencia de relación entre ISDR y la eficacia a interferón. Es más, en este trabajo francés, ellos reanalizan la secuencia de ISDR de los 22 pacientes que no respondieron tras finalizar el tratamiento con interferón, y vieron que solo 5 de estos pacientes no respondedores presentaban algún cambio



respecto a la secuencia patrón HCV-J (posiciones 2218 y 2225, ambas de baja eficacia según Watanabe y colaboradores). Los 17 pacientes restantes no respondedores no presentaron ningún cambio respecto a su secuencia previa al tratamiento anti-VHC. A estos últimos datos, Brillet y colaboradores, aporta un dato más, ya que este trabajo francés determina la secuencia de ISDR de 16 pacientes con genotipo 1b antes del tratamiento con interferón y la reanalizan 24 horas después de administrar la primera dosis de dicho fármaco, viendo como la secuencia de ISDR no presentaban ningún cambio entre ambas secuencias analizadas, y solo mostraba diferencias respecto a HCV-J en la posición 2218, sin ninguna diferencia entre la secuencia de los pacientes respondedores (68%) y no respondedores, teniendo en cuenta que dicho trabajo define como respondedor a aquel paciente que con una sola dosis de interferón consigue bajar la carga viral de VHC en al menos 0.5 log del ARN-VHC basal (descenso medio de la carga viral tras una única dosis de interferón clásico sin ribavirina de 0.55-2.7 log IU/ml).

Squadrito [123] en Italia analiza la secuencia de ISDR de 24 pacientes, que ellos definen como largos respondedores (mantener ARN-VHC indetectable por encima de 38 meses tras haber recibido tratamiento con interferón clásico sin ribavirina), y la comparan con la secuencia de 41 pacientes no respondedores de forma retrospectiva, observando que entre estos pacientes respondedores, el 91% de los pacientes presentaban cepas intermedias con entre 1-3 mutaciones (14/23 pacientes solo presentaban el cambio de aminoácido en posición 2218), y solo 1 paciente mantenía idéntica secuencia que HVC-J. Pero pese a ello, las diferencias con la secuencia de los pacientes no respondedores les conducían a concluir que la eficacia al tratamiento con interferón no estaba relacionada con el número de mutaciones en ISDR, y vuelven a instar en la implicación de otras regiones del ARN-VHC en los mecanismos de resistencia a interferón. En esta misma línea investigó Rispeter y colaboradores [124] en Alemania, los cuales analizaron la región ISDR de 13 pacientes con genotipo 1b infectados por el mismo aislado de VHC (HCV-AD78), y se secuenciaron muestras obtenidas sucesivamente durante 12-14 años de evolución de la enfermedad. Sin presión farmacológica, los pacientes desarrollaron una media de  $2.2 \times 10^{-3}$  cambios de aminoácidos en la secuencia de ISDR, al año. Tras tratar a estos pacientes con interferón clásico, se distinguieron entre respondedores al final del tratamiento (30%), y no respondedores (70%), llamando la atención que todos los pacientes analizados tenían una secuencia correspondiente a cepas intermedias respecto a HCV-J, donde el cambio más prevalente fue en la posición 2218, no encontrándose distinción

reseñable entre los pacientes con respuesta completa, no respondedores o pacientes con respuesta inicial con recaída posterior. Finalmente cabe destacar el trabajo realizado por Veillon [125], que si bien solo analiza a 10 pacientes, infectados todos por aislados genotipo 1b, de los cuales solo 7 respondieron al tratamiento con interferón clásico más ribavirina. Pero lo interesante de este trabajo es que de los 10 pacientes se fueron obteniendo muestras antes y durante el tratamiento, de las cuales se estudiaron 256 clones de la región NS5a completa, que incluía entre otras a la región ISDR, y las comparaba no solo con la secuencia tipo de HCV-J, sino también con la secuencia que ellos llaman “secuencia maestro” que es la secuencia predominante antes de la clonación, viendo que mientras que respecto a HCV-J, las secuencias estudiadas acumulaban una media de  $32.1 \pm 5.2$  cambios, al compararlas con su propia cepa de referencia solo acumulaba  $11.7 \pm 7.9$  cambios. Con lo cual no solo volvía a incidir en la falta de relación entre el número de mutaciones en ISDR respecto a la respuesta a interferón, sino que también nos animó a comparar nuestros datos no solo frente a la cepa patrón definida por Enomoto, sino también con la secuencia de las cepas más prevalentes en nuestro medio, por lo que volvimos a hacer todos los cálculos estadísticos que intentaban encontrar relación entre la respuesta antiviral a interferón y el número total de mutaciones acumuladas en ISDR, pero en lugar de partiendo de 27 pacientes con cepa salvaje, 53 intermedios y 11 mutantes, partíamos de 39 pacientes con cepa salvaje, 42 pacientes con cepas intermedias y 12 pacientes mutantes. No obstante los resultados volvieron a arrojar las mismas conclusiones.

Los estudios que si utilizan interferón pegilado acompañado además con altas dosis de ribavirina (1000-1200 mg/día), como el realizado en Italia por Capiello [126] sobre 45 pacientes infectados por genotipo 1, dada la similitud de la población de estudio y los protocolos seguidos, son más adecuados para valorar nuestros resultados. Los autores de este trabajo concluyen que no existe asociación entre las mutaciones de la región ISDR y la respuesta al tratamiento antiviral; sin embargo, en este trabajo no se incluyen pacientes infectados por VIH, por lo que sólo podemos comparar nuestros resultados en población mono infectada. Capiello y colaboradores [126], presentan una distribución en la región ISDR (26,7% de pacientes wild type, 64,4% intermedios y 8,9% mutantes) similar a la nuestra (27,5% wild type, 62,7% intermedios y 9,8% mutantes). No obstante, mientras que sus pacientes genotipo 1 mostraban una RVS del 37%, nuestra serie alcanzaba el 56% de respuesta en población VIH negativa, genotipo1. A pesar de tener mejor respuesta entre un volumen

de pacientes similares con distribución equivalente respecto al número de mutaciones en ISDR, ambos concluimos en la falta de asociación entre la variabilidad de la región ISDR y su posterior respuesta al interferón.

En población coinfectada VHC-VIH existen pocos trabajos, entre los más relevantes se encuentra el trabajo publicado por Ballesteros y colaboradores en 2004 [116], pero que solo consigue amplificar la región ISDR en 12 pacientes, de los cuales solo uno fue wild type respecto a HCV-J, 2 pacientes fueron cepas mutantes, entre las cuales estaba el único respondedor de la serie, y al igual que ocurre en todas las series descritas, incluida la nuestra, el grueso de pacientes fueron intermedios. Se observa que las mutaciones acumuladas en la región ISDR solo aparecen en los pacientes respondedores con genotipo 1, pero debido al escaso tamaño muestral, no se encuentra relación estadísticamente significativa entre cambios en ISDR y respuesta al interferón pegilado, por lo que la relación entre las dos variables de estudio vuelve a ser no concluyentes.

## 7 .- CONCLUSIONES

- El porcentaje de Respuesta Viral Sostenida al tratamiento estándar (interferón pegilado más ribavirina) es inferior en la población coinfectada por el Virus de la Hepatitis C y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana, respecto a la población mono infectada solo por el VHC.
- El único factor que se relaciona de forma significativa en la Respuesta Viral Sostenida es el genotipo de VHC. Las demás variables estudiadas (logaritmo de la carga viral basal, Virus de la Inmunodeficiencia Humana, sexo y cirrosis) no mostraron relación significativa con la Respuesta Viroológica Sostenida.
- La elevada tasa de respuesta en los pacientes con genotipo 3, tanto en coinfectados como en mono infectados, no ha permitido establecer relaciones con el número de mutaciones en ISDR. Por este motivo, el estudio de la región ISDR en genotipos 3 no tiene repercusión clínica.
- No hemos encontrado asociación significativa entre la variabilidad genética presente en la región ISDR del ARN-VHC y los pacientes con genotipo 1, subtipos 1a y 1b, independientemente de que la población de estudio esté infectada únicamente por el VHC, o estuviese coinfectada además por el VIH.
- En todos los aislados virales que hemos analizado, tras el estudio de alineamiento y posterior análisis de mutaciones específicas, sugieren la presencia de subtipos no japoneses (HCV-W). No existe asociación significativa entre la respuesta virológica a interferón y el número de mutaciones acumuladas en ISDR de los aislados virales subtipo no japoneses (subtipos W).
- Planteamos la necesidad de caracterizar con exactitud el aislado, como subtipo W o subtipo japonés (subtipo J), antes de iniciar estudios posteriores sobre la utilidad clínica de la región ISDR y su relación con la respuesta a interferón.

## 8 .- BIBLIOGRAFÍA

1. Farci, P., Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome [Science 1989;244:359-362]. *J Hepatol*, 2002. **36**(5): p. 582-5.
2. Sharara, A.I., C.M. Hunt, and J.D. Hamilton, Hepatitis C. *Ann Intern Med*, 1996. **125**(8): p. 658-68.
3. Thomas, S.L., et al., A review of hepatitis C virus (HCV) vertical transmission: risks of transmission to infants born to mothers with and without HCV viraemia or human immunodeficiency virus infection. *Int J Epidemiol*, 1998. **27**(1): p. 108-17.
4. Zein, N.N., et al., Hepatitis C virus genotypes in the United States: epidemiology and pathogenicity and response to interferon therapy. Collaborative Study Group. *Ann Intern Med*, 1996. **125**(8): p. 634-9.
5. Torriani, F.J., et al., Hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV) dynamics during HCV treatment in HCV/HIV coinfection. *J Infect Dis*, 2003. **188**(10): p. 1498-507.
6. Sherman, K.E., HCV and HIV: a tale of two viruses. *Rev Gastroenterol Disord*, 2004. **4**(Suppl 1): p. S48-54.
7. Graham, C.S., et al., Influence of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*, 2001. **33**(4): p. 562-9.
8. Nunez, M., et al., Baseline Hepatitis C Virus RNA and Response at Week 4 Are the Best Predictors of Relapse After Treatment With Pegylated Interferon Plus Ribavirin in HIV/Hepatitis C Virus-Coinfected Patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007 Apr 26;.
9. Alexopoulou, A. and S.P. Dourakis, Genetic heterogeneity of hepatitis viruses and its clinical significance. *Curr Drug Targets Inflamm Allerg*, y 2005. **4**(1): p. 47-55.
10. Penin, F., et al., Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*, y 2004. **39**(1): p. 5-19.
11. Cuthbert, J.A., Hepatitis C: progress and problems. *Clin Microbiol Rev*, 1994. **7**(4): p. 505-32.
12. Smith, D.B. and P. Pontisso, Heterogeneity of hepatitis C virus. *Baillieres Clin Gastroenterol*, 1996. **10**(2): p. 243-55.
13. Weiner, A.J., et al., Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(8): p. 3468-72.
14. Berg, T., et al., Mutations in the E2-PePHD and NS5A region of hepatitis C virus type 1 and the dynamics of hepatitis C viremia decline during interferon alpha treatment. *Hepatology*, y 2000. **32**(6): p. 1386-95.

15. Durante Mangoni, E., et al., Hepatitis C virus E2 and NS5A region variability during sequential treatment with two interferon-alpha preparations. *J Med Virol*, 2003. **70**(1): p. 62-73.
16. Hung, C.H., 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**(2): p. 87-94.
17. Lo, S. and H.H. Lin, Variations within hepatitis C virus E2 protein and response to interferon treatment. *Virus Res*, 2001. **75**(2): p. 107-12.
18. Saito, T., et al., 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*, 2003. **98**(6): p. 1377-83.
19. Sarrazin, C., et al., 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.
20. Kurihara, C., et al., Molecular characterization of hepatitis C virus genotype 2a from the entire sequences of four isolates.
21. Malcolm, B.A., et al., SCH 503034, a mechanism-based inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polyprotein maturation and enhances the antiviral activity of alpha interferon in replicon cells. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2006. **50**(3): p. 1013-20.
22. Sarrazin, C., et al., SCH 503034, a novel hepatitis C virus protease inhibitor, plus pegylated interferon alpha-2b for genotype 1 nonresponders. *Gastroenterology.*, 2007. **132**(4): p. 1270-8.
23. Gimenez-Barcons, M., 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*, y 2001. **34**(1): p. 158-67.
24. Rispeter, K., et al., Hepatitis C virus variability: sequence analysis of an isolate after 10 years of chronic infection.
25. Hamano, K., et al., Mutations in the NS5B region of the hepatitis C virus genome correlate with clinical outcomes of interferon-alpha plus ribavirin combination therapy. *J Gastroenterol Hepatol*, 2005. **20**(9): p. 1401-9.
26. Kato, N., Y. Shiratori, and M. Omata, Hepatitis C virus genotypes: molecular basis and clinical significance. *Prog Liver Dis*, 1996. **14**: p. 223-44.
27. Weiner, A., et al., Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(7): p. 2755-9.
28. Herrmann, E. and C. Sarrazin, [Hepatitis C-virus --virus kinetics and resistance mechanisms]. *Z Gastroenterol*, 2004. **42**(5): p. 387-96.
29. Hofmann, W.P., S. Zeuzem, and C. Sarrazin, Hepatitis C virus-related resistance mechanisms to interferon alpha-based antiviral therapy. *J Clin Virol*, 2005. **32**(2): p. 86-91.
30. Forns, X. and J. Costa, HCV virological assessment. *J Hepatol*, 2005. **22**: p. 22.
31. Fan, W., et al., Nonstructural 5A gene variability of hepatitis C virus (HCV) during a 10-year follow up. *J Gastroenterol*, 2005. **40**(1): p. 43-51.
32. Murph, y M.D., et al., Analysis of sequence configurations of the ISDR, PKR-binding domain, and V3 region as predictors of response to induction interferon-alpha and ribavirin therapy in chronic hepatitis C infection. *Dig Dis Sci*, 2002. **47**(6): p. 1195-205.
33. Neau, D., et al., Hepatitis C virus genetic variability in 52 human immunodeficiency virus-coinfected patients. *J Med Virol*, 2003. **71**(1): p. 41-8.

34. *Simmonds, P., et al., Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. Hepatolog, y 2005. 42(4): p. 962-73.*
35. *Salmeron, J., et al., Epidemiology and prevalence of seropositivity for hepatitis C virus in pregnant women in Granada. Rev Esp Enferm Dig., 1998. 90(12): p. 841-50.*
36. *Gotz, H.M., et al., A cluster of acute hepatitis C virus infection among men who have sex with men--results from contact tracing and public health implications. AIDS., 2005. 19(9): p. 969-74.*
37. *Gambotti, L., et al., Acute hepatitis C infection in HIV positive men who have sex with men in Paris, France, 2001-2004. Euro Surveill., 2005. 10(5): p. 115-7.*
38. *Hwang, S.J., Hepatitis C virus infection: an overview. J Microbiol Immunol Infect, 2001. 34(4): p. 227-34.*
39. *Tossing, G., Management of chronic hepatitis C in HIV-co-infected patients--results from the First InteARNtional Workshop on HIV and Hepatitis Co-infection, 2nd-4th December 2004, Amsterdam, Netherlands. Eur J Med Res, 2005. 10(1): p. 43-5.*
40. *Munoz-Almagro, C., et al., [Prevalence of hepatitis C virus in pregnant women and vertical transmission]. Med Clin, 2002. 118(12): p. 452-4.*
41. *Orenstein, R. and N. Tsogas, Hepatitis C virus and human immunodeficiency virus co-infection in women. J Am Osteopath Assoc, 2001. 101(12 Suppl Pt 2): p. S1-6.*
42. *Chou, R., E.C. Clark, and M. Helfand, Screening for hepatitis C virus infection: a review of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. Ann Intern Med, 2004. 140(6): p. 465-79.*
43. *Garcia, F., et al., Subtype distribution among intravenous drug users with chronic type C hepatitis in southern Spain. Microbios, 1998. 95(380): p. 15-24.*
44. *Higuchi, M., E. Tanaka, and K. Kiyosawa, Epidemiology and clinical aspects on hepatitis C. Jpn J Infect Dis, 2002. 55(3): p. 69-77.*
45. *Halfon, P., et al., [Noninvasive methods for predicting liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: alteARNtives to liver biopsy]. Presse Med., 2007. 36(3 Pt 2): p. 457-66.*
46. *Castera, L., et al., FibroScan and FibroTest to assess liver fibrosis in HCV with normal aminotransferases. Hepatology., 2006. 43(2): p. 373-4; author reply 375-6.*
47. *BeARNrd, E.J., PegIFN/ribavirin during acute HCV coinfection. IAPAC Mon, 2004. 10(7): p. 260-1.*
48. *Camino, N., J. Sheldon, and V. Soriano, Update on hepatitis C treatment in HIV-coinfected patients. Minerva Gastroenterol Dietol, 2004. 50(1): p. 67-77.*
49. *Chayama, K., Management of chronic hepatitis C and prevention of hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol, 2002. 37(Suppl 13): p. 69-73.*
50. *Cooper, C.L., Natural history of HIV and HCV coinfection. J Int Assoc Physicians AIDS Care, 2003. 2(4): p. 147-51.*
51. *Martin-Carbonero, L., et al., Incidence and predictors of severe liver fibrosis in human immunodeficiency virus-infected patients with chronic hepatitis C: a European collaborative study. Clin Infect Dis, 2004. 38(1): p. 128-33.*
52. *Ruiz-Sancho, A. and V. Soriano, [HIV and HCV coinfection]. Enferm Infecc Microbiol Clin., 2006. 24(5): p. 335-45; quiz 346.*
53. *Sulkowski, M.S. and D.L. Thomas, Hepatitis C in the HIV-Infected Person. Ann Intern Med, 2003. 138(3): p. 197-207.*

54. Allor, Y., et al., *Impact of human immunodeficiency virus infection on the histological features of chronic hepatitis C: a case-control study. The MULTIVIRC group. Hum Pathol*, 2000. **31**(1): p. 69-74.
55. Rockstroh, J.K., et al., *Influence of hepatitis C virus infection on HIV-1 disease progression and response to highly active antiretroviral therapy. J Infect Dis*, 2005. **192**(6): p. 992-1002.
56. Sato, C., [Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction]. *Nippon Rinsho*, 2001. **59**(7): p. 1271-6.
57. Nunez, M. and V. Soriano, *How effective is HAART in HCV and HIV coinfection? AIDS*, 2004. **18**(15): p. 2081-4.
58. Sterling, R.K., et al., *Impact of highly active antiretroviral therapy on the spectrum of liver disease in HCV-HIV coinfection. Clin Gastroenterol Hepatol*, 2004. **2**(5): p. 432-9.
59. Benhamou, Y., et al., *Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multivirc Group. Hepatolog, y 1999. 30(4): p. 1054-8.*
60. Benhamou, Y., et al., *Factors affecting liver fibrosis in human immunodeficiency virus-and hepatitis C virus-coinfecting patients: impact of protease inhibitor therapy. Hepatolog, y 2001. 34(2): p. 283-7.*
61. Cooper, C.L. and D.W. Cameron, *Review of the effect of highly active antiretroviral therapy on hepatitis C virus (HCV) RNA levels in human immunodeficiency virus and HCV coinfection. Clin Infect Dis*, 2002. **35**(7): p. 873-9.
62. Garcia-Samaniego, J., et al., *Hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients with chronic hepatitis C. Am J Gastroenterol*, 2001. **96**(1): p. 179-83.
63. Stanczak, J.J., [Genetic diagnosis of hepatitis C virus infection]. *Pol Merkuriusz Lek*, 1999. **6**(32): p. 92-5.
64. Urdea, M.S., et al., *Hepatitis C--diagnosis and monitoring. Clin Chem*, 1997. **43**(8 Pt 2): p. 1507-11.
65. Takahashi, M., et al., *Benefit of hepatitis C virus core antigen assay in prediction of therapeutic response to interferon and ribavirin combination therapy. J Clin Microbiol*, 2005. **43**(1): p. 186-91.
66. Laperche, S., et al., *Simultaneous detection of hepatitis C virus (HCV) core antigen and anti-HCV antibodies improves the early detection of HCV infection. J Clin Microbiol*, 2005. **43**(8): p. 3877-83.
67. Tisminetzky, S., et al., *Comparison of genotyping and serotyping methods for the identification of hepatitis C virus types. J Virol Methods*, 1995. **55**(3): p. 303-7.
68. Dixit, V., et al., *Evaluation of a novel serotyping system for hepatitis C virus: strong correlation with standard genotyping methodologies. J Clin Microbiol*, 1995. **33**(11): p. 2978-83.
69. Puig-Basagoiti, F., 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**(Pt 4): p. 1067-75.
70. Farci, P., et al., *Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(26): p. 15394-9.
71. Thiel, J., et al., *Kinetics of hepatitis C (HCV) viraemia and quasispecies during treatment of HCV associated cryoglobulinaemia with pulse cyclophosphamide. Ann Rheum Dis*, 2002. **61**(9): p. 838-41.



72. Liakina, V., et al., Prevalence of cryoglobulinemia in patients with chronic HCV infection. *Med Sci Monit*, 2002. **8**(1): p. CR31-6.
73. Abbate, I., et al., Heterogeneity of HVR-1 quasispecies is predictive of early but not sustained virological response in genotype 1b-infected patients undergoing combined treatment with PEG- or STD-IFN plus RBV. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2003. **17**(2): p. 162-5.
74. Poynard, T., et al., Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C. *Hepatolog*, y 2003. **38**(1): p. 75-85.
75. Pascu, M., et al., Sustained virological response in hepatitis C virus type 1b infected patients is predicted by the number of mutations within the NS5A-ISDR: a meta-analysis focused on geographical differences. *Gut*, 2004. **53**(9): p. 1345-51.
76. Rocca, L.G., et al., Management of patients with hepatitis C in a community population: diagnosis, discussions, and decisions to treat. *Ann Fam Med*, 2004. **2**(2): p. 116-24.
77. Heathcote, J. and S. Zeuzem, Pegylated interferon monotherapy for chronic hepatitis C. *Semin Liver Dis*, 2004. **2**: p. 39-45.
78. Querenghi, F., et al., Evolution of hepatitis C virus genome in chronically infected patients receiving ribavirin monotherapy. *J Viral Hepat*, 2001. **8**(2): p. 120-31.
79. Ueda, E., et al., Changes of HCV quasispecies during combination therapy with interferon and ribavirin. *Hepatol Res*, 2004. **29**(2): p. 89-96.
80. Lindsa, y K.L., et al., A randomized, double-blind trial comparing pegylated interferon alfa-2b to interferon alfa-2b as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatolog*, y 2001. **34**(2): p. 395-403.
81. Hadziyannis, S.J. and G.V. Papatheodoridis, Peginterferon-alpha2a (40 kDa) for chronic hepatitis C. *Expert Opin Pharmacother*, 2003. **4**(4): p. 541-51.
82. Sarrazin, C., et al., Assessment, by transcription-mediated amplification, of virologic response in patients with chronic hepatitis C virus treated with peginterferon alpha-2a. *J Clin Microbiol*, 2001. **39**(8): p. 2850-5.
83. Pawlotsk, y J.M., Hepatitis C virus resistance to antiviral therapy. *Hepatolog*, y 2000. **32**(5): p. 889-96.
84. Perez-Olmeda, M., et al., Pegylated IFN-alpha2b plus ribavirin as therapy for chronic hepatitis C in HIV-infected patients. *AIDS*, 2003. **17**(7): p. 1023-8.
85. McHutchison, J.G., et al., Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatitis Interventional Therapy Group. N Engl J Med*, 1998. **339**(21): p. 1485-92.
86. Marrone, A. and R. Sallie, Genetic heterogeneity of hepatitis C virus. The clinical significance of genotypes and quasispecies behavior. *Clin Lab Med*, 1996. **16**(2): p. 429-49.
87. Yeh, B.I., et al., Factors predictive of response to interferon-alpha therapy in hepatitis C virus type 1b infection. *J Med Virol*, 2002. **66**(4): p. 481-7.
88. Yoshioka, K., et al., Interferon sensitivity-determining region of nonstructural region 5A of hepatitis C virus genotype 1b correlates with serum alanine aminotransferase levels in chronic infection. *J Viral Hepat*, 2005. **12**(2): p. 139-45.
89. Farci, P. and R.H. Purcell, Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin Liver Dis*, 2000. **20**(1): p. 103-26.

90. Mondelli, M.U. and E. Silini, Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *J Hepatol*, 1999. **1**: p. 65-70.
91. Fried, M.W., et al., Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*, 2002. **347**(13): p. 975-82.
92. Sherman, K.E., S.D. Rouster, and P.S. Horn, Comparison of methodologies for quantification of hepatitis C virus (HCV) ARN in patients coinfecting with HCV and human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*, 2002. **35**(4): p. 482-7.
93. Chun, S. and K.E. Sherman, Treatment of hepatitis C virus/HIV coinfection. *Clin Liver Dis*, 2005. **9**(3): p. 525-33, ix.
94. Davis, G.L., et al., Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, y 2003. **38**(3): p. 645-52.
95. McHutchison, J.G., et al., Adherence to combination therapy enhances sustained response in genotype-1-infected patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterolog*, y 2002. **123**(4): p. 1061-9.
96. McHutchison, J.G., et al., The impact of interferon plus ribavirin on response to therapy in black patients with chronic hepatitis C. The InteARNtional Hepatitis Interventional Therapy Group. *Gastroenterolog*, y 2000. **119**(5): p. 1317-23.
97. Dev, A., K. Patel, and J.G. McHutchison, Hepatitis C and steatosis. *Clin Liver Dis*, 2004. **8**(4): p. 881-92, ix.
98. McHutchison, J.G., et al., The face of future hepatitis C antiviral drug development: Recent biological and virologic advances and their translation to drug development and clinical practice. *J Hepatol*, 2005. **7**: p. 7.
99. Patton, H.M., et al., The impact of steatosis on disease progression and early and sustained treatment response in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol*, 2004. **40**(3): p. 484-90.
100. Myers, R.P., et al., The rate of fibrosis progression is an independent predictor of the response to antiviral therapy in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*, 2003. **10**(1): p. 16-22.
101. Patel, K., A. Zekr, y and J.G. McHutchison, Steatosis and chronic hepatitis C virus infection: mechanisms and significance. *Clin Liver Dis*, 2005. **9**(3): p. 399-410, vi.
102. Bhopale, G.M. and R.K. Nanda, Emerging drugs for chronic hepatitis C. *Hepatol Res*, 2005. **12**: p. 12.
103. Macejak, D.G., et al., Enhanced antiviral effect in cell culture of type 1 interferon and ribozymes targeting HCV ARN. *J Viral Hepat*, 2001. **8**(6): p. 400-5.
104. Hinrichsen, H., et al., Short-term antiviral efficacy of BILN 2061, a hepatitis C virus serine protease inhibitor, in hepatitis C genotype 1 patients. *Gastroenterolog*, y 2004. **127**(5): p. 1347-55.
105. McHutchison, J.G., et al., Predicting response to initial therapy with interferon plus ribavirin in chronic hepatitis C using serum HCV ARN results during therapy. *J Viral Hepat*, 2001. **8**(6): p. 414-20.
106. Lurie, Y., et al., A multicentre, randomized study to evaluate the safety and efficacy of histamine dihydrochloride and interferon-alpha-2b for the treatment of chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*, 2002. **9**(5): p. 346-53.
107. Andreone, P., et al., Thymosin-alpha 1 plus interferon-alpha for naive patients with chronic hepatitis C: results of a randomized controlled pilot trial. *J Viral Hepat*, 2004. **11**(1): p. 69-73.

108. *Brillanti, S., Role of amantadine and other adjuvant therapies in the treatment of hepatitis C. Semin Liver Dis, 2004. 24 Suppl 2: p. 89-95.*
109. *Pockros, P.J., et al., A multicenter study of recombinant human interleukin 12 for the treatment of chronic hepatitis C virus infection in patients nonresponsive to previous therapy. Hepatolog, y 2003. 37(6): p. 1368-74.*
110. *Glesb, y M.J., et al., Pilot study of low-dose interleukin-2, pegylated interferon-alpha 2b, and ribavirin for the treatment of hepatitis C virus infection in patients with HIV infection. J Infect Dis, 2005. 191(5): p. 686-93.*
111. *Bhopale, G.M. and R.K. Nanda, Prospects for hepatitis C vaccine. Acta Virol, 2004. 48(4): p. 215-21.*
112. *Fried, M.W., Clinical application of hepatitis C virus genotyping and quantitation. Clin Liver Dis, 1997. 1(3): p. 631-46.*
113. *Manns, M.P., et al., Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. Lancet, 2001. 358(9286): p. 958-65.*
114. *Chung, R.T., et al., Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin versus interferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C in HIV-coinfected persons. N Engl J Med, 2004. 351(5): p. 451-9.*
115. *Torriani, F.J., et al., Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients. N Engl J Med, 2004. 351(5): p. 438-50.*
116. *Carrat, F., et al., Pegylated interferon alfa-2b vs standard interferon alfa-2b, plus ribavirin, for chronic hepatitis C in HIV-infected patients: a randomized controlled trial. JAMA., 2004. 292(23): p. 2839-48.*
117. *Ballesteros, A.L., et al., Early HCV dynamics on Peg-interferon and ribavirin in HIV/HCV co-infection: indications for the investigation of new treatment approaches. Aids, 2004. 18(1): p. 59-66.*
118. *Hofgartner, W.T., et al., Mutations in the NS5A gene of hepatitis C virus in North American patients infected with HCV genotype 1a or 1b. J Med Virol, 1997. 53(2): p. 118-26.*
119. *Jardim, A.C., et al., Quasispecies of hepatitis C virus genotype 1 and treatment outcome with Peginterferon and Ribavirin. Infect Genet Evol. 2008 Nov 21.*
120. *Layden-Almer, J.E., et al., Hepatitis C virus genotype 1a NS5A pretreatment sequence variation and viral kinetics in African American and white patients. J Infect Dis., 2005. 192(6): p. 1078-87.*
121. *Dal Pero, F., et al., Impact of NS5A sequences of Hepatitis C virus genotype 1a on early viral kinetics during treatment with peginterferon- alpha 2a plus ribavirin. J Infect Dis., 2007. 196(7): p. 998-1005.*
122. *Enomoto, N., et al., Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. J Clin Invest., 1995. 96(1): p. 224-30.*
123. *Puig-Basagoiti, F., 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(1): p. 35-44.*
124. *Khorsi, H., 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(1): p. 72-7.*
125. *Duverlie, G., et al., Sequence analysis of the NS5A protein of European hepatitis C virus 1b isolates and relation to interferon sensitivity.*

126. *Brillet, R., et al., The nonstructural 5A protein of hepatitis C virus genotype 1b does not contain an interferon sensitivity-determining region. J Infect Dis., 2007. 195(3): p. 432-41.*
127. *Squadrito, G., et al., Is investigation of hepatitis C virus NS5A gene heterogeneity a tool for predicting long-lasting response to interferon therapy in patients with HCV-1b chronic hepatitis? J Viral Hepat, 2002. 9(5): p. 360-9.*
128. *Rispeter, K., et al., The "interferon sensitivity determining region" of hepatitis C virus is a stable sequence element. J Hepatol, 1998. 29(3): p. 352-61.*
129. *McKechnie, V.M., P.R. Mills, and E.A. McCrudden, The NS5a gene of hepatitis C virus in patients treated with interferon-alpha. J Med Virol, 2000. 60(4): p. 367-78.*
130. *Cappiello, G., et al., ISDR pattern and evolution in patients with chronic hepatitis C treated with standard or PEG-IFN plus ribavirin. Antivir Ther, 2003. 8(2): p. 105-10.*