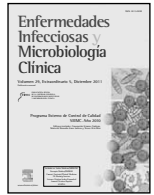




# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



## Posibilidades actuales para predecir la respuesta a la terapia en pacientes con hepatitis C crónica por el genotipo 1 del virus de la hepatitis C

Verónica Saludes Montoro<sup>a,b</sup>, Vicente Ausina Ruiz<sup>a,c</sup> y Elisa Martró Català<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Microbiología, Fundación Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud Germans Trias y Pujol, Hospital Universitario Germans Trias y Pujol, Badalona, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España

<sup>b</sup>CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Barcelona, España

<sup>c</sup>CIBER Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Bunyola, España

### RESUMEN

#### Palabras clave:

Virus de la hepatitis C  
Genotipo 1  
Interferón alfa pegilado  
Predicción de la respuesta a la terapia  
Modelos multivariantes

Únicamente el 50% de los pacientes con infección crónica por el genotipo 1 del virus de la hepatitis C responde con éxito a la terapia estándar con interferón alfa pegilado y ribavirina, y los recientemente aprobados inhibidores de la proteasa deberán administrarse conjuntamente con estos dos fármacos. En consecuencia, predecir la respuesta a la terapia estándar, idealmente antes de iniciarla, sigue siendo un reto importante. Aunque se han descrito varios factores basales predictivos del fallo terapéutico, tanto del hospedador como del virus, ninguno de ellos es capaz de proporcionar predicciones fiables a nivel individual. Por otro lado, el desarrollo de modelos multivariantes que agrupan varios factores predictivos, hasta el momento no ha permitido obtener predicciones con el grado de fiabilidad necesario para poder ser implementados en la práctica clínica. Por lo tanto es necesario seguir investigando para mejorar estos modelos predictivos y describir nuevos factores que nos ayuden a predecir la respuesta de manera más fiable y reproducible. El desarrollo de algoritmos de selección de candidatos a recibir las nuevas terapias en función de sus probabilidades de responder o no a la terapia estándar permitirá reducir los costes asociados al tratamiento y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Con esta revisión hemos querido dar una visión de las posibilidades actuales para predecir la respuesta a la terapia estándar en los pacientes con hepatitis C crónica por el genotipo 1 del virus de la hepatitis C.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Current options for predicting therapeutic response in chronically infected patients with hepatitis C virus genotype 1

#### ABSTRACT

#### Keywords:

Hepatitis C virus  
Genotype 1  
Pegylated interferon alfa  
Treatment response prediction  
Multivariate models

Only about 50% of patients chronically infected with hepatitis C virus genotype 1 achieve a successful response to standard treatment with pegylated interferon-alfa and ribavirin. Moreover, the recently approved protease inhibitors will have to be administered together with these drugs. Consequently, predicting response to standard treatment, ideally before starting it, remains an important challenge. Although several baseline predictors of treatment failure have been described, including clinical and virological factors, none of them is able to provide reliable predictions at the individual level. In addition, the development of multivariate models combining several predictive factors has not yet yielded predictions with the requisite reliability for use in clinical practice. Therefore, further research is needed to improve predictive models and to describe new factors that would enable us to predict treatment outcome with greater reliability and reproducibility. The development of candidate selection algorithms that help clinicians to identify which patients could benefit from the new therapies on the basis of their chances of responding to standard therapy is of major interest for both patient well-being and healthcare expense. This review attempts to provide a view of the current options for predicting the response to pegylated interferon-alfa plus ribavirin therapy in patients chronically infected with hepatitis C virus genotype 1.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

\*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: emartro.igtp.germanstrias@gencat.cat (E. Martró Català).

## La hepatitis C crónica, un grave problema de salud pública

Desde su identificación en el año 1989, el virus de la hepatitis C (VHC) sigue siendo un grave problema de salud pública. Se estima que actualmente existen unos 130 millones de personas infectadas en el mundo. Dado que la hepatitis C crónica es progresiva por naturaleza, la infección por el VHC es el factor desencadenante de aproximadamente el 30% de casos de cirrosis y carcinoma hepatocelular mundialmente, además de ser la causa principal de trasplante hepático. Cabe destacar que, hoy por hoy, el tratamiento sólo es efectivo en la mitad de los casos y que no hay una vacuna profiláctica efectiva para luchar contra la infección por el VHC<sup>1,2</sup>.

El VHC es un virus con envuelta y genoma ARN que codifica para 4 proteínas estructurales (Core, glucoproteínas E1 y E2, y proteína p7) y 6 proteínas no estructurales (NS2-NS5)<sup>3</sup>. Al igual que otros virus con genoma ARN, el VHC posee una elevada tasa de replicación y de mutación y, por lo tanto, un alto grado de variabilidad genética. Esta variabilidad permite clasificar al VHC en al menos 6 genotipos y más de 100 subtipos<sup>4</sup>. Al mismo tiempo, en un paciente infectado el VHC circula como un conjunto de variantes estrechamente relacionadas entre sí, fenómeno que ha sido denominado "distribución en cuasiespecies". La presencia de cuasiespecies representa una ventaja adaptativa para el virus, ya que le permite evolucionar rápidamente adaptándose al entorno y, por lo tanto, tiene numerosas implicaciones biológicas. Entre ellas, el establecimiento de una infección persistente en la mayoría de los casos por selección de mutantes de escape a los anticuerpos neutralizantes y linfocitos T, cambios en la patogenicidad del virus y progresión de la enfermedad hepática, además de la selección de mutantes resistentes a los nuevos fármacos dirigidos frente a dianas específicas del VHC. Asimismo, el grado de variabilidad genética en determinadas regiones del genoma del virus se ha relacionado con la probabilidad de responder a la terapia con interferón alfa (IFN- $\alpha$ )<sup>5</sup>.

El tratamiento actual de la hepatitis C crónica se basa en la administración combinada de IFN- $\alpha$  pegilado (pegIFN- $\alpha$ ) y ribavirina, dos fármacos que no han sido diseñados específicamente frente al VHC, sino que actúan principalmente reforzando la respuesta inmune del hospedador. Esta terapia es larga, muy costosa y presenta múltiples efectos adversos potencialmente graves que conllevan la disminución de las dosis o incluso su interrupción en algunos pacientes. Se considera que un paciente ha respondido a la terapia cuando alcanza una respuesta virológica sostenida (RVS), definida como la ausencia de viremia 6 meses después de finalizar la terapia. Entre los pacientes infectados por el genotipo 1, el más prevalente en el mundo y en España<sup>6</sup>, solamente responde aproximadamente la mitad de los casos, además de requerir mayores dosis de ribavirina y de una mayor duración de la terapia (48-72 semanas) en comparación con los pacientes infectados por el genotipo 2 o 3 (24 semanas)<sup>7</sup>.

Actualmente se están desarrollando varios fármacos que inhiben específicamente enzimas clave del ciclo de infección del VHC con el objetivo de mejorar las tasas de RVS en los pacientes infectados por el genotipo 1. Recientemente, dos inhibidores de la proteasa NS3 del VHC, boceprevir y telaprevir, han finalizado con éxito la fase III de desarrollo clínico. De ellos, el primero en ser aprobado en España ha sido el boceprevir<sup>8</sup>. La administración de estos nuevos fármacos en terapia triple junto a la terapia combinada estándar (pegIFN- $\alpha$  y ribavirina) en pacientes *naïve* aumenta las tasas de RVS del 50 al 70% y, en algunos casos, permite reducir la duración de la terapia hasta 24-28 semanas<sup>9,10</sup>. Sin embargo, estos fármacos también conllevan efectos adversos adicionales, un incremento considerable de los costes asociados a la terapia, y pueden dar lugar a la aparición de resistencias.

### Predicción de la respuesta a la terapia combinada con interferón alfa pegilado y ribavirina

Especialmente en los pacientes infectados por el genotipo 1 del VHC, dada su baja tasa de RVS a la terapia combinada estándar (alre-

dedor del 50%), y a la aparición de los primeros regímenes de tratamiento alternativos, es de gran relevancia predecir las probabilidades de responder a la terapia que tiene un paciente determinado antes de iniciarla. La obtención de una predicción fiable permitiría evitar la terapia estándar, así como los efectos adversos y costes relacionados, en los pacientes que tengan bajas probabilidades de responder a ésta, los cuales serían candidatos a recibir regímenes de tratamiento más efectivos. Sin embargo, debido a los mecanismos de acción del pegIFN- $\alpha$  y la ribavirina, no es posible saber con fiabilidad si un paciente concreto responderá o no basándonos en la presencia de determinadas mutaciones de resistencia en el genoma viral, como ocurriría con otras infecciones tratadas con inhibidores de las enzimas virales. Si bien los mecanismos que llevan al fracaso terapéutico no se conocen en detalle, se ha demostrado que influyen factores tanto del hospedador como del virus, y que el buen cumplimiento terapéutico en cuanto a su dosis y duración es clave para el éxito de la terapia<sup>11</sup>.

Hoy en día no hay ningún factor que permita predecir el fallo terapéutico de manera fiable antes de iniciar la terapia. El único factor predictivo que se utiliza individualizadamente en la actualidad son los valores de ARN-VHC a las 12 semanas de tratamiento; si no existe un descenso  $\geq 2$  log en la carga viral (respuesta virológica temprana, RVT) se interrumpe el tratamiento, ya que permite predecir con fiabilidad el fracaso terapéutico (valor predictivo negativo, 97-100%)<sup>12,13</sup>. Por otra parte, alcanzar una respuesta virológica rápida (RVR), definida como la ausencia de viremia a las 4 semanas de terapia, actualmente es el mejor predictor de la RVS. Un paciente con RVR tiene aproximadamente un 90% de posibilidades de alcanzar una RVS<sup>14</sup>. Por ello, el documento de consenso para el manejo de los pacientes con hepatitis C crónica señala que los pacientes con RVR son candidatos a una reducción en la duración de la terapia de 48 a 24 semanas<sup>7</sup>. Sin embargo, únicamente un 15-20% de los pacientes infectados por el genotipo 1 alcanzan una RVR, y si un paciente no presenta una RVR aún tiene hasta un 30% de posibilidades de obtener una RVS (valor predictivo negativo < 75%), por lo que no alcanzar una RVR no puede utilizarse como criterio para interrumpir la terapia<sup>14</sup>.

En los pacientes infectados por el genotipo 1, los factores basales predictivos del fallo terapéutico descritos hasta el momento incluyen tanto factores del hospedador como del propio virus. Con respecto a los factores del hospedador que se han descrito con más frecuencia, cabe destacar la edad superior a 40 años, el sexo masculino, la raza, un estadio avanzado de fibrosis hepática y la presencia de cirrosis, valores bajos en suero de la enzima hepática alanina transaminasa (ALT) y elevados de gamma glutamil transferasa (GGT), así como la obesidad y la resistencia a la insulina<sup>15</sup>. El hecho de que las mujeres respondan mejor que los varones a la terapia indica un posible papel de los estrógenos o de un menor índice de masa corporal (IMC). Un IMC indicativo de obesidad ( $\geq 30$ ) contribuye a la presencia de esteatosis hepática y de resistencia a la insulina, ambas relacionadas con el fallo terapéutico. Los valores de ALT son un indicador de daño hepático y, por lo tanto, valores más elevados podrían estar reflejando una respuesta inmune más efectiva frente a los hepatocitos infectados en los pacientes que logran erradicar el virus. La GGT es un indicador directo de consumo excesivo de alcohol y los valores elevados de GGT se han relacionado con la fibrosis avanzada, la esteatosis y la resistencia a la insulina.

Cabe destacar que en el año 2009 tres estudios independientes de asociación de genoma completo relacionaron sistemáticamente varios polimorfismos de nucleótido único (*single nucleotide polymorphism*, SNP) presentes cerca del gen *IL28B* (codifica para el IFN- $\lambda$ 3) con la respuesta a la terapia frente a la hepatitis C crónica en pacientes con VHC genotipo 1<sup>16-18</sup>. En el estudio original de Ge et al<sup>16</sup>, el SNP más correlacionado con la RVS fue el rs12979860; los individuos que presentaban el genotipo CC para este SNP mostraron un 80% de probabilidades de alcanzar una RVS, por lo que actualmente es el factor basal más significativamente asociado con la RVS. Sin embargo, entre

los pacientes de origen europeo, únicamente el 38,6% presentaba el genotipo favorable CC. Además, hasta un 40% de los individuos con genotipo desfavorable CT o TT alcanzó una RVS, por lo que este polimorfismo no puede considerarse válido por sí mismo para tomar la decisión sobre si tratar o no a un paciente determinado. La diferente prevalencia del genotipo favorable en las diferentes razas explica, en parte, las diferencias observadas entre ellas respecto a las tasas de RVS.

Recientemente se han descrito nuevos biomarcadores asociados al fallo terapéutico. Entre ellos, los valores elevados en suero de la quimiocina IP-10<sup>19</sup> y la deficiencia de vitamina D en suero<sup>20</sup>, ambos marcadores relacionados con la respuesta inmune innata. Asimismo, la presencia de ciertas sustituciones aminoacídicas cerca del gen *ITPA* (inosina trifosfato pirofosfatasa) se ha relacionado con una mayor probabilidad de anemia asociada al tratamiento con ribavirina, que en muchos casos conlleva la reducción de dosis de este fármaco durante el tratamiento, repercutiendo en las probabilidades de RVS<sup>21</sup>. Por otro lado, los valores elevados de expresión de los genes estimulados por el IFN (*interferon stimulated genes*, ISG)<sup>22</sup> e incluso la presencia de ciertos patrones de expresión de microARN en hígado también se han correlacionado con el fallo terapéutico<sup>23</sup>, aunque estos parámetros son de más difícil aplicación en la práctica clínica.

Entre los factores virológicos predictores del fallo terapéutico, aparte del genotipo del VHC, se encuentra la carga viral basal elevada, con valores >400.000-800.000 UI/ml, dependiendo del estudio<sup>24,25</sup>. Por otro lado, aunque varias proteínas del VHC son capaces de bloquear los efectos del IFN- $\alpha$  (principalmente las proteínas Core, E2, NS5A y NS3)<sup>26</sup>, hasta el momento únicamente se han identificado mutaciones específicas en la región codificante para la proteína Core que se asocian con el fallo terapéutico. Varios grupos han evaluado la relación entre el grado basal de variabilidad genética del VHC a nivel de cuasiespecies y la respuesta a la terapia con IFN- $\alpha$ , aunque los resultados obtenidos no siempre han podido ser corroborados y continúa siendo un tema polémico. Estos estudios se han centrado principalmente en: *a*) las regiones codificantes de las glucoproteínas de la envuelta E1 y E2, y *b*) la región NS5A (contiene la región ISDR, *interferon sensitivity-determining region*).

En relación con la región Core y la respuesta a la terapia, Akuta et al concluyeron en diversos estudios que la presencia de la sustitución aminoacídica arginina (R) por glutamina (Q) en la posición 70 y/o leucina (L) por metionina (M) en la 91 de la región Core respecto a la secuencia consenso del subtipo 1b antes de iniciar la terapia combinada, podía utilizarse como predictor independiente del fallo terapéutico en pacientes japoneses infectados por el VHC-1b<sup>27-30</sup>. Un estudio reciente concluyó que las variantes virales que contienen el aminoácido 70Q son seleccionadas positivamente durante la terapia combinada en pacientes no respondedores japoneses y en ratones inmunocomprometidos trasplantados con hepatocitos humanos, reforzándose la importancia de esta sustitución en el fallo terapéutico<sup>31</sup>. Los mecanismos por los cuales la proteína Core podría estar involucrada en la resistencia a las funciones antivirales del IFN- $\alpha$  han sido propuestos en diferentes trabajos<sup>32-34</sup>.

Los estudios del nivel de variabilidad genética presente en la región E1-E2 han demostrado que la región E1 muestra una menor variabilidad que la E2 y, dentro de esta última, la subregión hipervariable (HVR)-1 es la que presenta mayor variabilidad, seguida de las subregiones HVR-2 y HVR-3. Estas subregiones son diana de los anticuerpos neutralizantes generados como respuesta a la infección por el VHC, siendo la región HVR-1 la zona más variable del genoma y la diana más importante<sup>35</sup>. Además, está involucrada en el reconocimiento, adhesión y modulación de la entrada del virus en el hepatocito<sup>36,37</sup>. La región HVR-2 es capaz de interactuar con el receptor CD81 localizado en la superficie celular, cuya unión juega un papel importante en la adsorción y penetración del virus a los hepatocitos, y la región HVR-3 también podría estar involucrada en estas funciones<sup>38</sup>. La región HVR-1, al ser la zona del genoma viral con ma-

yor variabilidad genética, se ha convertido en el centro de atención de la mayoría de los investigadores que tratan de evaluar la influencia de la variabilidad genética basal del VHC en la respuesta a la terapia con IFN- $\alpha$ , especialmente en los pacientes infectados por el genotipo 1 del VHC. Varios estudios han coincidido en sugerir que una mayor heterogeneidad genética en esta región, antes de iniciar la terapia, se asocia al fallo terapéutico con IFN- $\alpha$  en monoterapia e IFN- $\alpha$  /pegIFN- $\alpha$  más ribavirina, mientras que una menor heterogeneidad genética se asocia a la RVS<sup>39-41</sup>. Generalmente, estos estudios apuntan a que las poblaciones virales con una elevada variabilidad genética tienen más posibilidades de contener o generar variantes resistentes a la terapia. Por otro lado, otros autores no detectan una asociación significativa con la RVS<sup>42-48</sup>. Aunque todos estos estudios han utilizado la misma metodología para analizar la variabilidad genética (clonaje y secuenciación), estas discrepancias probablemente sean debidas a que los pacientes han seguido diferentes regímenes de tratamiento, a diferencias en los estimadores de la variabilidad genética utilizados y a limitaciones en el tamaño de la muestra y en los análisis estadísticos.

Por lo que concierne al estudio de la variabilidad genética presente en la región NS5A, en el año 1995 Enomoto et al<sup>49</sup> identificaron la región ISDR y demostraron que el número de mutaciones en esta región se correlacionaba con la respuesta a la monoterapia con IFN- $\alpha$  en los pacientes japoneses infectados por el VHC-1b. Mientras aquellos con la secuencia *wild-type* (igual a la cepa prototipo japonesa HCV-J) no respondían al tratamiento, los que tenían 4 o más sustituciones aminoacídicas mostraban una RVS. Estos resultados no siempre han sido reproducibles en Europa y Estados Unidos, ya que los aislados del VHC-1b con múltiples mutaciones en la región ISDR no son tan frecuentes en estas regiones geográficas como en Japón<sup>50</sup>. Sin embargo, en un metaanálisis de 28 estudios procedentes de Japón, Europa y Estados Unidos se observó la existencia de correlación positiva entre el número de mutaciones en la región ISDR y la RVS, aunque esta asociación era más pronunciada en los aislados japoneses que en los europeos<sup>51</sup>. Posteriormente, varios estudios con pacientes japoneses infectados por el VHC-1b han asociado un número de mutaciones  $\geq 2$  en la región ISDR con la RVS a la terapia combinada con pegIFN- $\alpha$  y ribavirina<sup>52-55</sup>.

A pesar de la identificación de los diferentes factores predictores mencionados, tanto virológicos como del hospedador, ninguno de ellos es capaz de proporcionar una predicción de la RVS lo suficientemente fiable a nivel individual antes de iniciar la terapia. Por lo tanto, si bien disponer de toda esta información es útil para informar al paciente de sus probabilidades de responder, no es suficiente para decidir si un paciente determinado debería tratarse o no. Por todo ello, disponer de modelos predictivos que incluyan tanto factores del hospedador como del propio virus nos permitiría desarrollar algoritmos de selección de candidatos a recibir las nuevas terapias en función de sus probabilidades de responder o no a la terapia estándar antes de iniciarla, conllevando una reducción de los costes asociados al tratamiento y la mejora de la calidad de vida de los pacientes.

### **Contribución de la investigación desarrollada desde el laboratorio de microbiología a la mejora de las predicciones de la respuesta a la terapia de la hepatitis C crónica utilizando factores virológicos**

La información generada por el laboratorio de microbiología es básica, tanto para el diagnóstico como para la monitorización del tratamiento de la hepatitis C crónica; en especial, la determinación del genotipo del VHC determina la dosis y la duración inicial de la terapia, y la monitorización de la carga viral permite detectar a los pacientes que deben interrumpir el tratamiento por presentar pocas probabilidades de responder a éste, así como a los que presentan una recidiva después de completar la terapia. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, hay otros factores virológicos que pueden

contribuir a la toma de decisiones clínicas a la hora de empezar el tratamiento. Además, con los nuevos inhibidores de la proteasa para el tratamiento de los pacientes infectados por el genotipo 1, será necesaria la precisa determinación del subtipo (no siempre posible mediante las técnicas de genotipado comercializadas actualmente), así como la monitorización de la aparición de resistencias a los fármacos específicos.

Aunque han empezado a aparecer en el mercado alternativas al tratamiento estándar, actualmente estos nuevos fármacos seguirán administrándose conjuntamente con el pegIFN- $\alpha$  y la ribavirina. Por lo tanto, predecir la respuesta a la terapia actual sigue siendo un reto importante, especialmente en el genotipo 1, dada su elevada resistencia al tratamiento, y en concreto en el subtipo 1b por ser este subtipo el más prevalente en el sur de Europa<sup>56</sup>, especialmente en España<sup>57</sup>, y por asociarse con un mayor riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular<sup>58</sup>.

Recientemente se está publicando un creciente número de estudios que intentan predecir la respuesta a la terapia estándar en pacientes *naïve* basándose en modelos multivariantes que incluyen variables del hospedador y en algunos casos también virológicas (tabla 1). Entre las variables del propio VHC encontramos la carga viral basal, el número de mutaciones en la región ISDR, la presencia de determinadas sustituciones aminoácidas en la región Core o a lo largo del genoma completo, y el nivel de variabilidad genética en la región E1-E2. No obstante, hasta el momento no hay ningún modelo establecido, debido a que las predicciones no presentan el grado de fiabilidad necesario para poderse implantar en la práctica clínica. La utilidad clínica de estos modelos se puede valorar desde dos puntos de vista: *a*) que permitan la identificación de los pacientes con bajas probabilidades de responder a la terapia estándar, los cuales deberían tratarse con la terapia triple (elevado valor predictivo negativo), o bien *b*) que permitan la identificación de todos los pacientes con probabilidades de responder a la terapia estándar, para limitar los costes de la terapia triple administrándola sólo a los pacientes con prácticamente nulas posibilidades de responder a la terapia estándar (elevado valor predictivo positivo).

Como puede observarse en la tabla 1, la mayoría de modelos predictivos se basan en análisis estadísticos de regresión logística o en la elaboración de árboles de decisión. En algunos casos, estos análisis permiten definir varias categorías o grupos según su probabilidad de alcanzar una RVS. Sin embargo, aunque el modelo permita identificar a grupos de pacientes con altas probabilidades de RVS, sólo una minoría de los pacientes cumple las características necesarias para su inclusión en ese grupo, mientras que la mayor parte de los pacientes se sitúa en la categoría de riesgo intermedio<sup>52,55,59-63</sup>, con una probabilidad de RVS de alrededor de la mitad de los casos, que es la proporción que encontramos sin aplicar ningún modelo predictivo. Dado que muchos de estos estudios no reportan sus resultados en forma de sensibilidad, especificidad y valores predictivos, es difícil compararlos entre sí. Por otro lado, algunos de los estudios en que se reportan sensibilidades y especificidades más elevadas, suelen ser estudios de tamaño muestral limitado dada la laboriosidad en la obtención de algunas de las variables incluidas en los modelos<sup>64-66</sup>, y a menudo no han sido validados.

Nuestro grupo de investigación centra su actividad en el estudio de las implicaciones de la variabilidad genética del VHC en la respuesta a la terapia estándar y, en un reciente estudio<sup>65</sup>, se describió por primera vez un modelo basado en el análisis estadístico discriminante para predecir el fallo terapéutico antes de iniciar la terapia en pacientes infectados por el subtipo 1b del VHC, incluyendo variables tanto clínicas como de variabilidad genética del virus. El análisis discriminante integra la información de las variables más significativas, mejorando en nuestro estudio la predicción con respecto a la regresión logística. Asimismo, los modelos discriminantes pueden ser modificados para incluir otras variables predictoras conocidas de la respuesta a la terapia. Las variables más significativas incluidas en el

modelo obtenido fueron la ausencia de los aminoácidos R en la posición 70 y L en la 91 de la región Core, el número de variantes virales o haplotipos de la región E1-E2, y los valores de GGT y de ALT. La fiabilidad del modelo se evaluó internamente aplicando el método de validación cruzada tipo *leave-one-out*. Esta validación indicó que la aplicación del modelo en una población independiente similar a la población de estudio en términos de etnicidad, características clínicas y subtipo del VHC podría evitar la terapia en un 63,6-81,8% de los pacientes no respondedores, mientras que la mayoría de pacientes con posibilidades de responder serían identificados y tratados (sensibilidad, 85,7-95,2% dependiendo del punto de corte, tabla 1). Si bien los valores de las variables clínicas incluidas en nuestro modelo de predicción son fáciles de conseguir a partir de los datos generados en la práctica clínica rutinaria, para estimar la variabilidad genética a nivel de cuasiespecies de la región E1-E2 es necesario realizar una serie de técnicas experimentales complejas y laboriosas, seguidas de análisis bioinformáticos. Sin embargo, varios de los estudios que han generado modelos predictivos apuntan a que una mayor comprensión de la biología del VHC, y en especial de sus características genéticas, podría ayudar a predecir la respuesta a la terapia<sup>52,55,62,64</sup>. Cabe destacar que cuando se llevó a cabo el mencionado estudio aún no se había descrito la asociación entre los polimorfismos del gen *IL28B* y la respuesta al tratamiento y, por lo tanto, esta variable no se pudo tener en cuenta. No obstante, los resultados obtenidos son prometedores y actualmente se está realizando una validación del modelo incluyendo esta variable.

## Conclusiones

Después de casi una década de tratamiento combinado con pegIFN- $\alpha$  y ribavirina, el reciente desarrollo de nuevos fármacos específicos para el VHC ofrece un futuro prometedor para los pacientes con hepatitis C crónica infectados con el genotipo 1. Sin embargo, es difícil estimar cuándo podrán utilizarse regímenes de tratamiento que no incluyan el interferón, disminuyendo así los efectos adversos asociados. En breve, algunos de estos pacientes podrán empezar a beneficiarse de la terapia triple incluyendo un inhibidor de la proteasa. No obstante, dado el aumento del coste y de los efectos secundarios añadidos, ésta sólo debería ser administrada a aquellos pacientes que tengan pocas probabilidades de responder a la terapia convencional. Por ello, en la práctica clínica sería de gran utilidad su identificación mediante modelos predictivos de la respuesta a la terapia estándar, idealmente antes de iniciarla.

En conclusión, aunque se ha avanzado mucho en el conocimiento de los factores involucrados en el fallo terapéutico a la terapia estándar, es necesario seguir investigando para mejorar los modelos predictivos desarrollados hasta el momento y describir nuevos factores relacionados con la respuesta que nos ayuden a obtener predicciones más fiables y reproducibles.

## Financiación

Este trabajo ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III –Fondo de Investigaciones Sanitarias (ISCIII-FIS) en los proyectos PI05/1131 y CP09/00044–, y el contrato Miguel Servet del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), dentro del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I) (EM); y con el soporte del Comissionat per a Universitats i Recerca del Departament d'Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu (VS). Este trabajo también ha sido parcialmente financiado por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) (VS).

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Tabla 1

Estudios que han desarrollado modelos multivariantes para la predicción de la respuesta virológica sostenida (RVS) antes de iniciar la terapia con interferón alfa pegilado y ribavirina en pacientes *naïve*

Referencia	N, genotipo VHC y tasa de RVS	Etnia de la población de estudio	Método estadístico	Variables predictoras de RVS incluidas en el modelo	Validación del modelo predictivo	Predicción de la RVS	Comentarios
Martínez-Bauer E, et al, 2006 <sup>67</sup>	145 Genotipo 1 RVS <sub>desarrollo</sub> : 48% RVS <sub>validación</sub> : 55%	Caucásica (España)	Regresión logística	Hospedador: – Ratio AST/ALT – Colesterol – Índice FORNS Virus: – Carga viral	Validación en un grupo de 4 hospitales diferentes al de la población de desarrollo N <sub>desarrollo</sub> = 104 N <sub>validación</sub> = 141	AUC <sub>desarrollo</sub> = 0,856 AUC <sub>validación</sub> = 0,847 – Cut-off = 7,0 S = 47% (validación: 36%) E = 96% (validación: 95%) VPP = 92% (validación: 90%) VPN = 67% (validación: 55%) – Cut-off = 9,7 S = 43% (validación: 41%) E = 98% (validación: 96%) VPP = 96% (validación: 90%) VPN = 61% (validación: 66%)	
Shirakawa H, et al, 2008 <sup>52</sup>	120 Genotipo 1b (cargas virales altas) RVS: 45%	Asiática (Japón)	Regresión logística	Hospedador: – Ratio Th1/Th2 ≤ 15,5 – Peso ≤ 59 Kg – N.º neutrófilos ≥ 2.300/μl Virus: – N.º mutaciones región ISDR ≥ 2	No	P <sub>RVS</sub> = 91% en el 29% de la población P <sub>RVS</sub> = 15% en el 40% de la población P <sub>RVS</sub> = 41% en el 31% de la población	El 15% de los pacientes alargó a 72 semanas de tratamiento, con tasas similares de RVS a los que se trataron 48 semanas
Aurora R, et al, 2009 <sup>64</sup>	47 Genotipo 1b RVS: 55%	No especificada (Estados Unidos)	Detección de redes de covarianza entre posiciones de aa	Virus: – Covarianza entre posiciones de aa a lo largo del genoma completo	No	S = 100% E = 100%	Obtienen un modelo diferente para el subtipo 1a, con S = 96% y E = 96%
Saludes V, et al, 2010 <sup>65</sup>	43 Genotipo 1b RVS: 49%	Caucásica (España)	Regresión logística y análisis discriminante	<i>Modelo de regresión logística:</i> Virus: – N.º de haplotipos región E1-E2 – Ausencia aa R70 y L91 región Core <i>Modelo discriminante:</i> Hospedador: – ALT – GGT – Peso Virus: – N.º de haplotipos región E1-E2 – Ausencia aa R70 y L91 región Core – N.º de haplotipos región HVR-1 – N.º de sustituciones sinónimas por posición sinónima región HVR-1	Modelo discriminante: validación cruzada tipo <i>leave-one-out</i> en la misma población	<i>Modelo de regresión logística:</i> AUC = 0,876 <i>Modelo discriminante:</i> AUC = 0,970 – Cut-off = 0,550 S = 90,5% (validación: 85,7%) E = 95,5% (validación: 81,8%) VPP = 91,3% (validación: 85,7%) VPN = 95,0% (validación: 81,8%) – Cut-off = 0,900 S = 95,2% (validación: 95,2%) E = 68,2% (validación: 63,6%) VPP = 74,1% (validación: 71,4%) VPN = 93,8% (validación: 93,3%)	
Costa JM, et al, 2011 <sup>59</sup>	236 Todos los genotipos RVS <sub>desarrollo</sub> : 47% RVS <sub>validación</sub> : 63%	Mayoritariamente caucásica (Francia y Ucrania)	Regresión logística	Hospedador: – SNP rs12979860 <i>IL28B</i> – Fibrotest – ActiTest Virus: – Genotipo 2/3 – Carga viral	Validación en una población de un país diferente N <sub>desarrollo</sub> = 157 N <sub>validación</sub> = 79	AUC <sub>desarrollo</sub> = 0,743 AUC <sub>validación</sub> = 0,753 – Cut-off = 0,66 VPP = 83% – Cut-off = 0,20 VPN = 87% (estos dos grupos corresponden al 33% de la población) P <sub>RVS</sub> > 87% en el 10% de la población P <sub>RVS</sub> < 23% en el 13% de la población P <sub>RVS</sub> = 47% en el 77% de la población	Los polimorfismos de los genes humanos ITPA y UGT1A1 no se asociaron con la RVS Algunas variables clínicas y la proporción de RVS en ambos grupos eran significativamente diferentes
Lagging M, et al, 2011 <sup>60</sup>	170 Genotipo 1*	Caucásica (varios países europeos e Israel)	Regresión logística para la identificación de predictores pero no para la construcción del modelo	Hospedador: – Niveles IP-10 – SNP rs12979860 <i>IL28B</i>	No	P <sub>RVS</sub> = 85% en los pacientes con genotipo CC o IP-10 < 150 pg/ml (44,1% de la población): S = 12%, E = 98%, VPP = 85%, VPN = 50% Pacientes con genotipo CC o IP-10 < 150 pg/ml (7,6% de la población): S = 53%, E = 65%, VPP = 63%, VPN = 56%	Las dos variables fueron identificadas como predictores independientes de RVR pero no de RVS

(continúa)

**Tabla 1**

Estudios que han desarrollado modelos multivariantes para la predicción de la respuesta virológica sostenida (RVS) antes de iniciar la terapia con interferón alfa pegilado y ribavirina en pacientes *naïve* (continuación)

Referencia	N, genotipo VHC y tasa de RVS	Etnia de la población de estudio	Método estadístico	Variables predictoras de RVS incluidas en el modelo	Validación del modelo predictivo	Predicción de la RVS	Comentarios
Fattovich G, et al, 2011 <sup>61</sup>	121 Genotipo 1* RVS: 53%	Caucásica (Italia)	Regresión logística para la identificación de predictores pero no para la construcción del modelo	Modelo 1: predicción RVR (27% de los pacientes, 97% de ellos con RVS) Hospedador: - SNP rs12980275 <i>IL28B</i> Virus: - Carga viral Modelo 2: predicción RVS si no RVR (38% de ellos con RVS) Hospedador: - SNP rs12980275 <i>IL28B</i> (genotipo AA) - Edad ≤ 40 años	No	Modelo 1: P <sub>RVS</sub> = 84,4% en los pacientes con genotipo AA y VHC-ARN < 400.000 UI/ml (12% de la población) S = 39%, E = 98%, VPP = 87%, VPN = 81%. Modelo 2: S = 61%, E = 80%, VPP = 64%, VPN = 77%	La incorporación de los niveles de IP-10 al modelo 1 mostró mayor S (52%) y VPN (94%), y menor E (94%) y VPP (76%) Al utilizar sólo la edad o el SNP <i>IL28B</i> en el modelo 2 se obtenía mayor E y VPP, y menor S y VPN
Kurosaki M, et al, 2011 <sup>62</sup>	505 Genotipo 1b (cargas virales altas)	Asiática (Japón)	Minería de datos (árbol de decisión)	Hospedador: - Edad < 60 - cLDL ≥ 120 mg/dl - Estadio de fibrosis 0-1 Virus: - N.º mutaciones región ISDR ≥ 2 - Sustitución aa posición 70 región Core ( <i>wild type</i> )	Validación en la misma población N <sub>desarrollo</sub> = 304 N <sub>validación</sub> = 201	P <sub>RVS</sub> = 83% (validación: 74%) en el 28,9% de los pacientes P <sub>RVS</sub> = 64% (validación: 65%) en el 9,2% de los pacientes P <sub>RVS</sub> = 32% (validación: 36%) en el 61,9% de los pacientes R <sup>2</sup> = 0,94 entre las dos poblaciones	Se incluyen pacientes con adherencia < 80%, aun después de ajustar por esta variable se mantuvo la identificación de los 3 grupos de riesgo según su P <sub>RVS</sub>
Kurosaki M, et al, 2011 <sup>55</sup>	496 Genotipo 1b RVS: 39%	Asiática (Japón)	Minería de datos (árbol de decisión)	Hospedador: - SNP rs8099917 <i>IL28B</i> (genotipo TT) - Plaquetas ≥ 140 × 10 <sup>9</sup> /l Virus: - N.º mutaciones región ISDR ≥ 2 - Carga viral < 600.000 UI/ml	Validación en la misma población N <sub>desarrollo</sub> = 331 N <sub>validación</sub> = 165	AUC <sub>desarrollo</sub> = 0,782 P <sub>RVS</sub> = 90% en el 6% de la población P <sub>RVS</sub> = 14% en el 31% de la población P <sub>RVS</sub> entre el 27-75% para el resto de la población (63%) S = 78%, E = 70% No se proporcionan los datos obtenidos en la validación	La variable cambio de aa en las posiciones 70 y 91 de la región Core no persistió en el modelo final por presentar correlación con el genotipo del gen <i>IL28B</i>
Bitetto D, et al,	110 Genotipos 1, 4 y 5 RVS: 64%	Caucásica (Italia)	Regresión logística para la identificación de predictores pero no para la construcción del modelo	Modelo 1: Hospedador: - SNP rs12979860 <i>IL28B</i> - Vitamina D en suero Virus: - Carga viral Modelo 2: - Combinación <i>IL28B</i> y vitamina D - Carga viral	No	Modelo 1: AUC = 0,836 Modelo 2: AUC = 0,854 P <sub>RVS</sub> = 85,7% en los pacientes con genotipo CC <i>IL28B</i> y vitamina D > 20 ng/ml (19,1% de la población) P <sub>RVS</sub> = 22,5% en los pacientes con genotipo CT o TT y vitamina D ≤ 20 ng/ml (36,4% de la población) P <sub>RVS</sub> = 36,8-54,5% para el resto de la población (44,5%)	No proporcionan las fórmulas de los modelos Los pacientes que abandonaron el tratamiento por efectos adversos fueron considerados como no respondedores
Dill MT et al, 2011 <sup>66</sup>	45* Genotipos 1 y 4 RVS: 29%	Caucásica (Suiza)	Minería de datos (árbol de decisión y <i>random forest classifier</i> )	Hospedador: - Niveles de expresión de 4 ISG en hígado: IF127, ISG15, RSAD2, HTATIP2	No	AUC = 0,92 Permite la predicción de la respuesta con un error < 15%	Al añadir el SNP rs12979860 <i>IL28B</i> no mejoraron las predicciones obtenidas
Hashimoto Y et al, 2011 <sup>68</sup>	87 Genotipo 1b RVS: 51%	Asiática (Japón)	Regresión logística para la identificación de predictores pero no para la construcción del modelo	En este caso, variables predictoras de la no respuesta. Hospedador: - SNP rs8099917 <i>IL28B</i> (genotipo TT) Virus: - Sustitución aa posición 70 región Core ( <i>wild type</i> )	No	P <sub>RVS</sub> = 57% en los pacientes con genotipo TT (73,7% de la población) P <sub>RVS</sub> = 30,8% en los pacientes con genotipo no TT y Core <i>wild type</i> (17,1% de la población) P <sub>RVS</sub> = 0% en los pacientes con genotipo no TT y Core mutante (9,2% de la población)	Las variables n.º mutaciones región ISDR, y sustitución aa en la posición Core 91 no persistieron en el modelo final

aa: aminoácido/s; ALT: alanina transaminasa; AST: aspartato transaminasa; AUC: área bajo la curva ROC; cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; E: especificidad; GGT: gamma glutamil transferasa; IMC: índice de masa corporal; IP-10: proteína de 10 kDa inducible por interferón gamma; ISDR: región determinante de la sensibilidad al interferón; ISG: genes estimulados por interferón; ITPA: inosina trifosfatasa; L: leucina; P<sub>RVS</sub>: probabilidad de RVS; R: arginina; RVR: respuesta virológica rápida; S: sensibilidad; Th: linfocitos T *helper*; UGT1A1: bilirrubina uridina difosfato-glucuronosiltransferasa; VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.

Índices de fibrosis hepática: FORNS, combina el número de plaquetas, los valores de GGT, la edad y los valores de colesterol; Fibrotest, combina la edad, el sexo y los valores de alfa2-macroglobulina, haptoglobina, GGT, bilirrubina total y apolipoproteína A1.

Índice de actividad necro-inflamatoria hepática: ActiTest, combina los mismos marcadores que el Fibrotest más los valores de ALT.

\*Estudio realizado incluyendo todos los genotipos del VHC; sólo se comentan los resultados del genotipo 1.

## Bibliografía

- Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36:535-46.
- Brody H. Hepatitis C. *Nature Outlook*. 2011;474:S1-21 [consultado 1-8-2011]. Disponible en: [http://www.nature.com/nature/journal/v474/n7350\\_suppl/full/474S1a.html](http://www.nature.com/nature/journal/v474/n7350_suppl/full/474S1a.html)
- Reed KE, Rice CM. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;242:55-84.
- Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005;42:962-73.
- Farci P, Purcell RH. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin Liver Dis*. 2000;20:103-26.
- Esteban JI, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol*. 2008;48:148-62.
- European Association for the Study of the Liver. *EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection*. *J Hepatol*. 2011;55:245-64.
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Informe mensual sobre Medicamentos de Uso Humano y Productos Sanitarios. 2011 [consultado, 3-8-2011]. Disponible en: [http://www.aemps.gob.es/informa/informeMensual/2011/mayo/docs/informe-mensual\\_mayo-2011.pdf](http://www.aemps.gob.es/informa/informeMensual/2011/mayo/docs/informe-mensual_mayo-2011.pdf)
- Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2011;364:2405-16.
- Poordad F, McCone J Jr, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med*. 2011;364:1195-206.
- McHutchison JG, Manns M, Patel K, Poyndar T, Lindsay KL, Trepo C, et al. Adherence to combination therapy enhances sustained response in genotype-1-infected patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2002;123:1061-9.
- Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncalves FL Jr, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002;347:975-82.
- Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*. 2001;358:958-65.
- Ferenci P, Fried MW, Shiffman ML, Smith CI, Marinos G, Goncalves FL Jr, et al. Predicting sustained virological responses in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon alfa-2a (40 kD)/ribavirin. *J Hepatol*. 2005;43:425-33.
- Kau A, Vermehren J, Sarrazin C. Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *J Hepatol*. 2008;49:634-51.
- Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 2009;461:399-401.
- Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet*. 2009;41:1100-4.
- Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*. 2009;41:1105-9.
- Lagging M, Romero AI, Westin J, Norrkans G, Dhillion AP, Pawlotsky JM, et al. IL-10 predicts viral response and therapeutic outcome in difficult-to-treat patients with HCV genotype 1 infection. *Hepatology*. 2006;44:1617-25.
- Lange CM, Bojunga J, Ramos-López E, Von Wagner M, Hassler A, Vermehren J, et al. Vitamin D deficiency and a CYP27B1-1260 promoter polymorphism are associated with chronic hepatitis C and poor response to interferon-alfa based therapy. *J Hepatol*. 2011;54:887-93.
- Fellay J, Thompson AJ, Ge D, Gumbs CE, Urban TJ, Shianna KV, et al. ITPA gene variants protect against anaemia in patients treated for chronic hepatitis C. *Nature*. 2010;464:405-8.
- Chen L, Borozan I, Feld J, Sun J, Tannis LL, Coltescu C, et al. Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology*. 2005;128:1437-44.
- Murakami Y, Tanaka M, Toyoda H, Hayashi K, Kuroda M, Tajima A, et al. Hepatic microRNA expression is associated with the response to interferon treatment of chronic hepatitis C. *BMC Med Genomics*. 2010;3:48.
- Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med*. 2004;140:346-55.
- McHutchison JG, Lawitz EJ, Shiffman ML, Muir AJ, Galler GW, McCone J, et al. Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. *N Engl J Med*. 2009;361:580-93.
- Wohnsland A, Hofmann WP, Sarrazin C. Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20:23-38.
- Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Someya T, et al. Association of amino acid substitution pattern in Core protein of hepatitis C virus genotype 1b high viral load and non-virological response to interferon-ribavirin combination therapy. *Intervirology*. 2005;48:372-80.
- Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Someya T, et al. Predictive factors of virological non-response to interferon-ribavirin combination therapy for patients infected with hepatitis C virus of genotype 1b and high viral load. *J Med Virol*. 2006;78:83-90.
- Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, et al. Predictive factors of early and sustained responses to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b: amino acid substitutions in the Core region and low-density lipoprotein cholesterol levels. *J Hepatol*. 2007;46:403-10.
- Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, et al. A matched case-controlled study of 48 and 72 weeks of peginterferon plus ribavirin combination therapy in patients infected with HCV genotype 1b in Japan: amino acid substitutions in HCV Core region as predictor of sustained virological response. *J Med Virol*. 2009;81:452-8.
- Kurbanov F, Tanaka Y, Matsuura K, Sugauchi F, Elkady A, Khan A, et al. Positive selection of Core 70Q variant genotype 1b hepatitis C virus strains induced by pegylated interferon and ribavirin. *J Infect Dis*. 2010;201:1663-71.
- Blindenbacher A, Duong FH, Hunziker L, Stutvoet ST, Wang X, Terracciano L, et al. Expression of hepatitis C virus proteins inhibits interferon alpha signaling in the liver of transgenic mice. *Gastroenterology*. 2003;124:1465-75.
- Bode JG, Ludwig S, Ehrhardt C, Albrecht U, Ehrhardt A, Schaper F, et al. IFN-alpha antagonistic activity of HCV Core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J*. 2003;17:488-90.
- Funaoka Y, Sakamoto N, Suda G, Itsui Y, Nakagawa M, Kakinuma S, et al. Analysis of interferon signaling by infectious hepatitis C virus clones with substitutions of Core amino acids 70 and 91. *J Virol*. 2011;85:5986-94.
- Farci P, Shimoda A, Wong D, Cabezon T, De Gioannis D, Strazzer A, 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 USA*. 1996;93:15394-9.
- Penin F, Combet C, Germanidis G, Frainais PO, Deleage G, Pawlotsky JM. Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. *J Virol*. 2001;75:5703-10.
- Pawlotsky JM, Cocquerel L, Durantel D, Lavillette D, Lerat H, Pecheur EI, et al. HCV research 20 years after discovery: a summary of the 16th international symposium on hepatitis C virus and related viruses. *Gastroenterology*. 2010;138:6-12.
- Troesch M, Meunier I, Lapierre P, Lapointe N, Álvarez F, Boucher M, et al. Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. *Virology*. 2006;352:357-67.
- Yeh BI, Han KH, Lee HW, Sohn JH, Ryu WS, Yoon DJ, et al. Factors predictive of response to interferon-alpha therapy in hepatitis C virus type 1b infection. *J Med Virol*. 2002;66:481-7.
- Ueda E, Enomoto N, Sakamoto N, Hamano K, Sato C, Izumi N, et al. Changes of HCV quasispecies during combination therapy with interferon and ribavirin. *Hepatol Res*. 2004;29:89-96.
- Morishima C, Polyak SJ, Ray R, Doherty MC, Di Bisceglie AM, Malet PF, et al. Hepatitis C virus-specific immune responses and quasi-species variability at baseline are associated with nonresponse to antiviral therapy during advanced hepatitis C. *J Infect Dis*. 2006;193:931-40.
- López-Labrador FX, Ampurdanés S, Giménez-Barcons M, Guilera M, Costa J, Jiménez de Anta MT, et al. Relationship of the genomic complexity of hepatitis C virus with liver disease severity and response to interferon in patients with chronic HCV genotype 1b infection [correction of interferon]. *Hepatology*. 1999;29:897-903.
- Farci P, Strazzer A, Alter HJ, Farci S, Degioannis D, Coiana A, et al. Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:3081-6.
- Hofmann WP, Sarrazin C, Kronenberger B, Schonberger B, Bruch K, Zeuzem S. Mutations within the CD81-binding sites and hypervariable region 2 of the envelope 2 protein: correlation with treatment response in hepatitis C virus-infected patients. *J Infect Dis*. 2003;187:982-7.
- Abbate I, Lo IO, Di Stefano R, Cappiello G, Girardi E, Longo R, et al. HVR-1 quasispecies modifications occur early and are correlated to initial but not sustained response in HCV-infected patients treated with pegylated or standard-interferon and ribavirin. *J Hepatol*. 2004;40:831-6.
- Chambers TJ, Fan X, Droll DA, Hembrador E, Slater T, Nickells MW, et al. Quasispecies heterogeneity within the E1/E2 region as a pretreatment variable during pegylated interferon therapy of chronic hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2005;79:3071-83.
- Cuevas JM, Torres-Puente M, Jiménez-Hernández N, Bracho MA, García-Robles I, Carnicer F, et al. Refined analysis of genetic variability parameters in hepatitis C virus and the ability to predict antiviral treatment response. *J Viral Hepat*. 2008;15:578-90.
- Torres-Puente M, Cuevas JM, Jiménez-Hernández N, Bracho MA, García-Robles I, Wrobel B, et al. Genetic variability in hepatitis C virus and its role in antiviral treatment response. *J Viral Hepat*. 2008;15:188-99.
- Enomoto N, Sakuma I, Ashina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest*. 1995;96:224-30.
- Pawlotsky JM, Germanidis G, Neumann AU, Pellerin M, Frainais PO, Dhumeaux D. Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J Virol*. 1998;72:2795-805.
- Pascu M, Martus P, Hohne M, Wiedenmann B, Hopf U, Schreier E, et al. Sustained virological response in hepatitis C virus type 1b infected patients is predicted by the number of mutations within the NS5A-ISDR: a meta-analysis focused on geographical differences. *Gut*. 2004;53:1345-51.
- Shirakawa H, Matsumoto A, Joshita S, Komatsu M, Tanaka N, Umemura T, et al. Pretreatment prediction of virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients using viral and host factors. *Hepatology*. 2008;48:1753-60.
- Hayashi K, Katano Y, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, et al. Mutations in the Core and NS5A region of hepatitis C virus genotype 1b and correlation with

- response to pegylated-interferon-alpha 2b and ribavirin combination therapy. *J Viral Hepat.* 2011;18:280-6.
54. Yoneda S, Umemura T, Katsuyama Y, Kamijo A, Joshita S, Komatsu M, et al. Association of serum cytokine levels with treatment response to pegylated interferon and ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C patients. *J Infect Dis.* 2011;203:1087-95.
  55. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, et al. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. *J Hepatol.* 2011;54:439-48.
  56. Esteban JI, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol.* 2008;48:148-62.
  57. Bruguera M, Forns X. Hepatitis C in Spain. *Med Clin (Barc).* 2006;127:113-7.
  58. Raimondi S, Bruno S, Mondelli MU, Maisonneuve P. Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis. *J Hepatol.* 2009;50:1142-54.
  59. Costa JM, Telehin D, Munteanu M, Kobryn T, Ngo Y, Thibault V, et al. HCV-GenoFibrotest: a combination of viral, liver and genomic (IL28b, ITPA, UGT1A1) biomarkers for predicting treatment response in patients with chronic hepatitis C. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2011;35:204-13.
  60. Lagging M, Askarieh G, Negro F, Bibert S, Soderholm J, Westin J, et al. Response prediction in chronic hepatitis C by assessment of IP-10 and IL28B-related single nucleotide polymorphisms. *PLoS One.* 2011;6:e17232.
  61. Fattovich G, Covolo L, Bibert S, Askarieh G, Lagging M, Clement S, et al. IL28B polymorphisms, IP-10 and viral load predict virological response to therapy in chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;33:1162-72.
  62. Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, et al. Sequences in the interferon sensitivity-determining region and Core region of hepatitis C virus impact pretreatment prediction of response to PEG-interferon plus ribavirin: data mining analysis. *J Med Virol.* 2011;83:445-52.
  63. Bitetto D, Fattovich G, Fabris C, Ceriani E, Falletti E, Fornasiere E, et al. Complementary role of vitamin D deficiency and the interleukin-28B rs12979860 C/T polymorphism in predicting antiviral response in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2011;53:1118-26.
  64. Aurora R, Donlin MJ, Cannon NA, Tavis JE. Genome-wide hepatitis C virus amino acid covariance networks can predict response to antiviral therapy in humans. *J Clin Invest.* 2009;119:225-36.
  65. Saludes V, Bracho MA, Valero O, Ardèvol M, Planas R, González-Candela F, et al. Baseline prediction of combination therapy outcome in hepatitis C virus 1b infected patients by discriminant analysis using viral and host factors. *PLoS One.* 2010;5:e14132.
  66. Dill MT, Duong FH, Vogt JE, Bibert S, Bochud PY, Terracciano L, et al. Interferon-induced gene expression is a stronger predictor of treatment response than IL28B genotype in patients with hepatitis C. *Gastroenterology.* 2011;140:1021-31.
  67. Martínez-Bauer E, Crespo J, Romero-Gómez M, Moreno-Otero R, Solà R, Tesei N, et al. Development and validation of two models for early prediction of response to therapy in genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2006;43:72-80.
  68. Hashimoto Y, Ochi H, Abe H, Hayashida Y, Tsuge M, Mitsui F, et al. Prediction of response to peginterferon-alfa-2b plus ribavirin therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b. *J Med Virol.* 2011;83:981-8.