



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



**Facultade de Ciencias
Departamento de Bioloxía
Área de Microbioloxía**

**Caracterización de mutaciones de resistencia asociadas a
inhibidores de NS5A en pacientes con infección crónica por el
virus de la hepatitis C**

**Caracterización de mutacións de resistencia asociadas a
inhibidores de NS5A en doentes con infección crónica polo virus
da hepatitis C**

**Characterization of resistance associated variants associated to
NS5A inhibitors in patients with chronic hepatitis C**

Verónica Alexandra Gomollón Guevara

Traballo de Fin de Grao

19 de Setembro de 2017

Titores: Dra. Ángeles Cid Blanco

Dra. Eva Poveda López

INDICE

RESUMEN.....	4
1 INTRODUCCION	7
1.1 El virus de la hepatitis C.....	7
1.2 Estructura, genoma viral y región NS5A del VHC	7
1.3 Heterogeneidad genética del VHC	9
1.4 Tratamiento del VHC.....	11
1.5 Variantes asociadas a resistencia (VAR)	12
2 OBJETIVOS	14
3 MATERIAL Y MÉTODOS	15
3.1 Diseño y ámbito de estudio	15
3.2 Sujetos de estudio	15
3.3 Obtención y procesado de las muestras	15
3.4 Extracción del ARN.....	16
3.5 Secuenciación y análisis de la región NS5A	17
3.5.1 Obtención del ADN complementario a partir del ARN viral	17
3.5.2 Amplificación de la secuencia NS5A por PCR anillada y visualización de los productos en gel de agarosa.....	18
3.5.3 Purificación de los productos de PCR (EXOSAP-IT).....	20
3.5.4 Reacción de secuenciación y purificación.....	20
3.5.5 Análisis de las secuencias	21
3.6 Análisis estadístico	22
4 RESULTADOS	23
5 DISCUSIÓN	27
6 CONCLUSIONES	29
7 BIBLIOGRAFÍA	30
8 AGRADECIMIENTOS.....	35
9 ANEXOS	36
ANEXO I Modelo de Consentimiento Informado	36
ANEXO II Hoja de Recogida de Datos.....	42

RESUMEN

La presencia de variantes asociadas a resistencia (VAR) en la región NS5A puede comprometer la eficacia de los antivirales de acción directa (AADs). La resistencia en el virus de la hepatitis C (VHC) está principalmente enfocada para pacientes con VHC y genotipos 1a (G1a) y 3 (G3) con otros factores de peor respuesta (e.j. cirrosis, exposición previa a tratamiento, ARN-VHC>800.000 UI/mL). En este estudio se evaluó, en una cohorte española de pacientes con VHC G1a y G3, la prevalencia de VAR basales en el dominio I de NS5A y su impacto en la optimización de las estrategias terapéuticas actuales. Las VAR se determinaron mediante secuenciación poblacional. Se consideraron como clínicamente relevantes las siguientes VAR: M28A/G/T, Q30D/E/H/G/K/L/R, L31M/V/F, H58D y Y93C/H/N/S para G1a y Y93H para G3. Un total de 232 pacientes fueron incluidos (166 G1a y 66 G3). La prevalencia de VAR a inhibidores de NS5A para pacientes con G1a y G3 fue baja (5,5%) o nula, respectivamente. Una alta proporción de pacientes tenían otros factores de peor respuesta asociados. En general, el número de pacientes que tenían VAR basales a inhibidores de NS5A en combinación con alguno de los otros factores fue bajo y la gran mayoría de los pacientes (G1a>94% y G3 100%) podrían recibir tratamientos estándar de 12 semanas sin ribavirina. El estudio de VAR en la región de NS5A en poblaciones específicas con infección por VHC (e.g. G1a & G3, cirrosis, exposición previa a tratamiento, ARN-VHC>800.000 UI/mL) puede ser útil para optimizar las estrategias terapéuticas basadas en inhibidores de NS5A evitando las toxicidades asociadas a la ribavirina y acortando la duración del tratamiento en la mayoría de los pacientes.

Palabras clave: infección por VHC, NS5A, VAR, genotipo 1a, genotipo 3

RESUMO

A presença de variantes associadas a resistência (VAR) na região NS5A pode comprometer a eficácia dos antivirais de ação direta (AADs). A resistência ao vírus da hepatite C (VHC) está principalmente enfocada em pacientes com VHC e

xenotipos 1a (G1a) e 3 (G3) con outros factores de peor resposta (e.g. cirrosis, exposición previa a tratamento, ARN-VHC>800.000 UI/mL). Neste estudo avalíase, nunha cohorte española de doentes con VHC G1a e G3, a prevalencia de VAR basais no dominio I de NS5A e o seu impacto na optimización das estratexias terapéuticas actuais. As VAR determináronse mediante secuenciación poboacional. Consideráronse como clínicamente relevantes as seguintes VAR: M28A/G/T, Q30D/E/H/G/K/L/R, L31M/V/F, H58D e Y93C/H/N/S para G1a e Y93H para G3. Un total de 232 doentes foron incluídos (166 G1a e 66 G3). A prevalencia de VAR a inhibidores de NS5A para doentes con G1a e G3 foi baixa (5,5%) ou nula, respectivamente. Unha alta proporción de doentes tiñan outros factores de peor resposta asociados. En xeral, o número de doentes que tiñan VAR basais a inhibidores de NS5A en combinación con algún dos outros factores foi baixo e a gran maioría dos doentes (G1a>94% e G3 100%) poderían recibir tratamentos estándar de 12 semanas sen ribavirina. O test de VAR na rexión de NS5A en poboacións específicas con infección por VHC (e.g. G1a & G3, cirrosis, exposición previa a tratamento, ARN-VHC>800.000 UI/mL) pode ser útil para optimizar as estratexias terapéuticas baseadas en inhibidores de NS5A evitando as toxicidades asociadas á ribavirina e acurtando a duración do tratamento na maioría dos doentes.

Palabras chave: infección por VHC, NS5A, VAR, xenotipo 1a, xenotipo 3

SUMMARY

The presence of resistance-associated substitutions (RASs) at NS5A region might compromise the efficacy of Direct Acting Antiviral agents (DAAs). Hepatitis C virus (HCV) resistance at NS5A region is mainly focused on patients with HCV genotypes 1a (G1a) and 3 (G3) with other factors of poor treatment response (i.e. cirrhosis, prior treatment-exposure, or HCV-RNA>800,000 IU/mL). Herein, we evaluated in a Spanish cohort of patients with HCV G1a and G3 the prevalence of RASs at domain I NS5A using population-based sequencing and the impact of RASs on the optimization of current therapeutic strategies. RASs considered as clinically relevant were: M28A/G/T, Q30D/E/H/G/K/L/R, L31M/V/F, H58D and

Y93C/H/N/S for G1a and Y93H for G3. A total of 232 patients were included (166 G1a and 66 G3). The overall prevalence of NS5A RASs for G1a and G3 patients was low (5.5%) or null, respectively. A high proportion of patients harbored other factors of poor response. Overall, the rates of patients harboring NS5A RASs in combination with any of the other factors were low and the vast majority of patients (G1a > 94% and G3 100%) could be treated with standard treatments of 12 weeks without ribavirin. Testing NS5A RASs in specific HCV-infected populations (i.e. G1a & G3, cirrhosis, prior treatment experienced, HCV-RNA > 800.000 IU/mL) might be useful to optimize current NS5A-based therapies avoiding ribavirin-related toxicities and shortening treatment duration in the majority of patients.

Key words: HCV-infection, NS5A, RASs, genotype 1a, genotype 3.

1 INTRODUCCION

1.1 El virus de la hepatitis C

El virus de la hepatitis C (VHC) fue descubierto en 1989 como el agente causal de aquellas hepatitis agudas y crónicas que no podían asociarse al virus de la hepatitis A (VHA) y B (VHB) (Feinstone et al., 1975; Choo et al., 1989). Filogenéticamente, pertenece a la familia Flaviviridae, género *Hepacivirus*.

La principal vía de transmisión del VHC es la parenteral, a través de prácticas de inyección inseguras (Usuarios de Drogas por Vía Parenteral, UDVP), esterilización inadecuada de equipos médicos o transfusión sanguínea (WHO, 2016).

La historia natural de la infección por el VHC se caracteriza por ser un proceso lento, con un amplio período asintomático en la mayor parte de los pacientes. La infección se inicia con una fase aguda que cronifica en el 60-80% de los casos, muchos de los cuales desarrollarán cirrosis, descompensaciones hepáticas, complicaciones extrahepáticas y carcinoma hepatocelular (CHC). La infección crónica por el VHC es la principal causa de trasplante hepático en países desarrollados en la actualidad (Dubuisson & Cosset, 2014).

La infección por el VHC constituye un problema de salud pública a nivel mundial y es responsable de la muerte de 400.000 personas al año. Esta infección presenta una prevalencia estimada del 2%, lo que se corresponde con aproximadamente 120 millones de personas (Bialek & Terraut, 2006; Lavanchy, 2011).

1.2 Estructura, genoma viral y región NS5A del VHC

El virión del VHC posee una forma esférica con un diámetro de unos 50-60 nm. Estructuralmente presenta una envuelta, en la que se insertan las glicoproteínas E1 y E2. En el interior de la envuelta, una nucleocápside icosaédrica de proteínas del *core* protege el genoma viral (**Figura 1**).

El genoma del VHC es una única molécula de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad positiva de unos 9.600 nucleótidos (nt) de longitud. Presenta unas

regiones 5' y 3' no codificantes y altamente conservadas (*Untranslated Region*, UTR) esenciales para la replicación y la traducción.

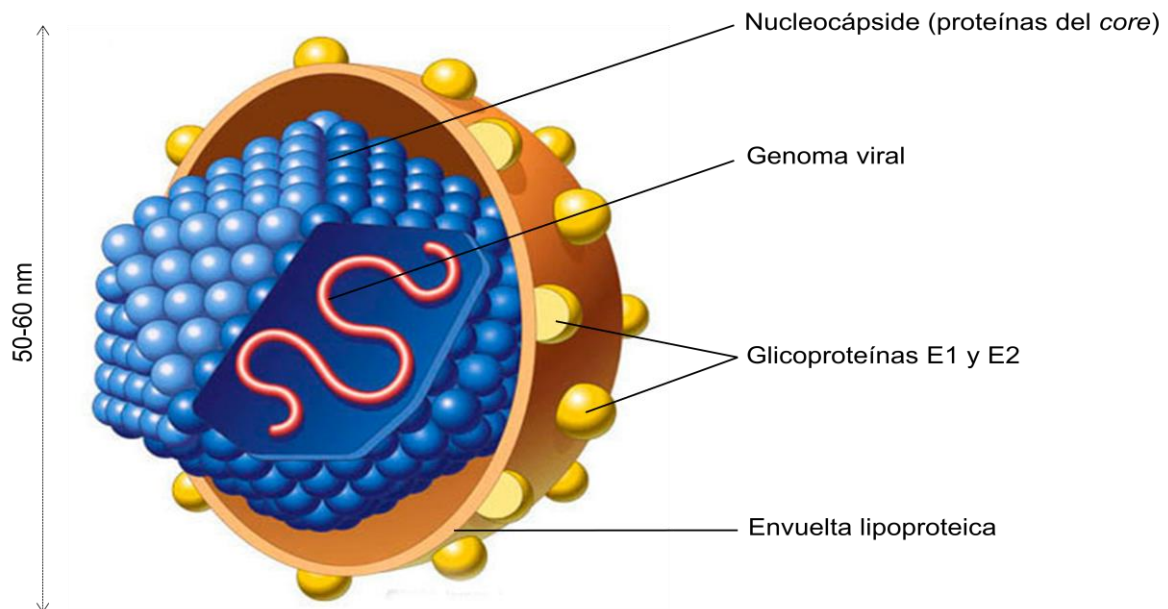


Figura 1. Modelo de la estructura del virus de la hepatitis C.

El genoma contiene un marco de lectura abierta (*Open Reading Frame*, ORF) que codifica para una poliproteína precursora de unos 3.000 aminoácidos. La poliproteína es procesada por proteasas virales y celulares para dar lugar a tres proteínas estructurales: proteínas del *core* y las glicoproteínas E1 y E2 de la envoltura; y siete no estructurales (*Non structural*, NS): p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. Las proteínas no estructurales están implicadas en el procesamiento de la poliproteína, en la replicación viral y en el ensamblaje y liberación de las partículas víricas. (Jones & McLauchlan, 2010). (Figura 2).

La proteína no estructural NS5A es una fosfoproteína implicada en la replicación y ensamblaje del VHC. Aunque su función detallada está aún sin esclarecer, juega un importante papel en la interacción célula-huésped y en la patogénesis viral. A diferencia de las otras proteínas estructurales como NS5B y NS3, NS5A no posee

actividad enzimática, lo que dificulta el desarrollo de ensayos para el descubrimiento de nuevos fármacos (Götte & Feld, 2016).

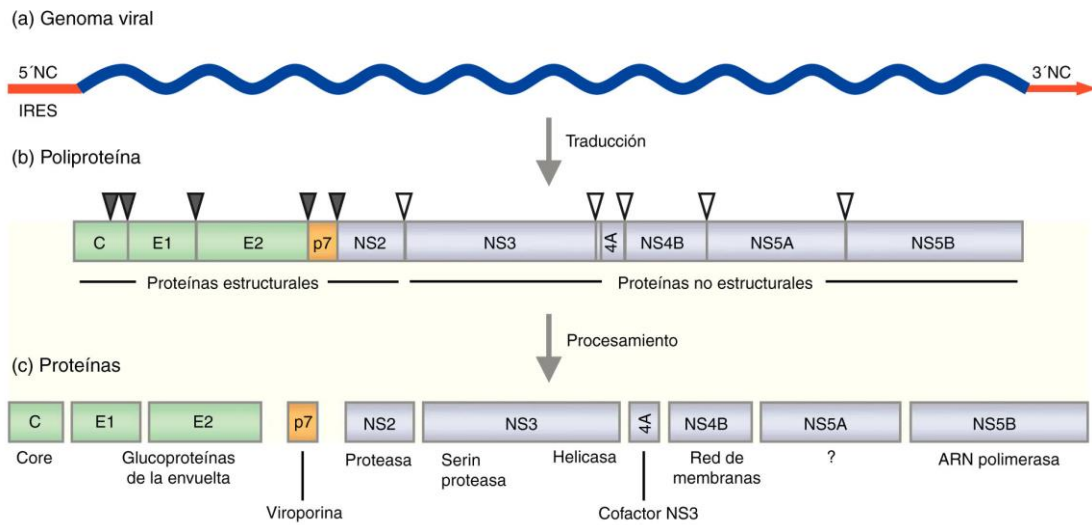


Figura 2. Organización del genoma viral del virus de la hepatitis c y de las proteínas virales. Adaptada de Koutsoudakis G et al., 2013.

NS5A está formada por 447 aminoácidos divididos en tres dominios estructurales separados por secuencias de baja complejidad (*low complexity sequences*, LCS) y por una alfa-hélice anfipática N-terminal que interviene en su asociación y localización en la membrana del retículo endoplasmático (Penin et al., 2004; Scheel et al., 2012) (**Figura 3**). El dominio I en la región N-terminal presenta un motivo de unión a zinc altamente conservado, que incluye cuatro residuos de cisteína, convirtiéndola en una metaloproteína (He et al., 2006). Se ha visto que mutaciones que afectan tanto a la alfa-hélice como a este motivo de zinc del dominio I provocan fallos graves en la replicación del ARN viral (Tellinghuisen et al., 2005).

1.3 Heterogeneidad genética del VHC

El VHC se caracteriza por presentar una alta variabilidad genética resultado de una alta tasa de mutación debida a la falta de función correctora de errores de la ARN polimerasa dependiente de ARN, una alta tasa de producción diaria de viriones (alrededor de 10^{12} /día) y una corta vida media del virus. Estos tres

factores permiten la selección de aquellas variantes con mayor eficiencia replicativa, dando lugar a una rápida diversificación de las poblaciones virales circulantes, así como la capacidad de adaptación y resistencia a nuevos fármacos antivirales (Simmonds, 2004).

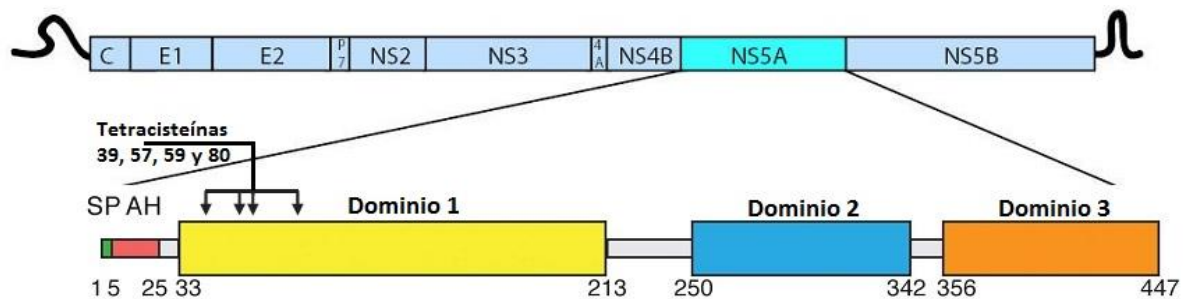


Figura 3. Esquema de la organización la región NS5A con sus correspondientes dominios. SP referencia al péptido señal y AH la hélice anfipática N-terminal. Adaptada de Ascher, 2014 y Tellinghuisen, 2005.

Dentro de la diversidad del VHC, existen distintos niveles de variabilidad genética en función de la homología de secuencia, distinguiéndose un total de 7 genotipos principales (homología del 60-70%), cada grupo formado por distintos subtipos (con homología del 78-88%). En el huésped, el VHC se presenta como un conjunto de secuencias muy relacionadas y parecidas entre sí pero no idénticas (homología del 98%), conocidas como cuasiespecies virales (Martell et al, 1992; Simmonds et al, 2005).

La alta variabilidad genética del VHC supone un desafío para el desarrollo de vacunas efectivas, así como la implementación de nuevas intervenciones terapéuticas. Conocer el genotipo es esencial a nivel clínico en el diagnóstico de la enfermedad y en el establecimiento de la duración del tratamiento, ya que las tasas de curación varían entre los distintos genotipos y subtipos, y es necesario la modificación de las pautas para la optimización de la terapia (Timm & Roggendorf, 2007).

1.4 Tratamiento del VHC

La ausencia de integración del genoma viral del VHC en las células infectadas del huésped hace posible que el virus pueda ser completamente erradicado del huésped. En este contexto, el objetivo del tratamiento, es erradicar el ARN del VHC. Se considera que un paciente se ha curado del VHC cuando el ARN viral permanece negativizado al menos 12 semanas después de finalizar el tratamiento. Esta negativización post-tratamiento es definida como respuesta viral sostenida (RVS). La RVS se relaciona con la recuperación histológica hepática y consecuentemente, con una reducción de la morbilidad y mortalidad (Wendt et al., 2014).

Hasta el año 2011, el tratamiento estándar frente al VHC se basaba en el uso de interferon pegilado (peg-IFN) co-administrado con ribavirina. Con este tratamiento, se alcanzaban bajas tasas de RVS, en torno al 55%, siendo significativamente menor en los pacientes con cirrosis o complicaciones hepáticas. Además de las bajas tasas de RVS, el tratamiento con peg-IFN se caracterizaba por un gran número de efectos adversos y largos periodos de tratamiento (24-48 semanas). (Dabbouseh & Jensen, 2013; Wendt et al., 2014).

En este contexto terapéutico, la aparición de los denominados antivirales de acción directa (AADs) en el año 2011 marca un antes y un después en el paradigma del tratamiento del VHC. Los AADs, se caracterizan por bloquear de forma específica distintas proteínas virales implicadas en el ciclo viral del VHC. Según la proteína sobre la que actúan, los AADs se dividen en tres grandes familias: inhibidores de proteasa NS3/4A, inhibidores de la proteína NS5A e inhibidores de la polimerasa NS5B. Los fármacos actualmente disponibles aparecen recogidos en la **Tabla I**.

Los AADs, han permitido incrementar las tasas de RVS en más del 90% de los casos, han reducido de forma considerable el número y la gravedad de los efectos adversos y han acortado el tiempo de duración del tratamiento a 12 semanas en la mayoría de los casos (Pawlotsky, 2016; Poveda et al., 2017).

Los inhibidores de NS5A actúan uniéndose fuertemente al dominio I de la región de la proteína NS5A y favoreciendo la aparición de una estructura dimérica que impide la unión del ARN viral (Ascher et al., 2014).

Tabla I. Antivirales de acción directa actualmente disponibles y su diana de acción.

Inhibidores de Proteasa NS3/4A	Inhibidores de la proteína NS5A	Inhibidores de la polimerasa NS5B
Simeprevir (SMV) 2014	Daclatasvir (DCV) 2014	Sofosbuvir (SOF) 2014
Paritaprevir/ritonavir (PAR/r) 2015	Ombitasvir (OMB) 2015	Dasabuvir (DAS) 2015
Grazoprevir (GZR) 2016	Elbasvir (EBR) 2016	
	Velpatasvir (VEL) 2016	

En la tabla se recogen las abreviaturas de cada uno de los fármacos entre paréntesis. El número indica el año de aprobación de los fármacos.

Los fármacos de esta familia han demostrado una fuerte actividad antiviral frente a todos los genotipos y actualmente se caracterizan por ser una de las piedras angulares de muchas de las terapias disponibles (Plaza et al., 2012).

1.5 Variantes asociadas a resistencia (VAR)

A pesar de las altas tasas de RVS alcanzadas por los AADs, la infección por VHC no siempre se cura (1-15% en función de las características de los pacientes y de la combinación terapéutica utilizada). Uno de los principales factores que comprometen la eficacia de los AADs es la aparición y selección de variantes virales resistentes a los AADs.

El fenómeno de la resistencia se produce por la elevada heterogeneidad genética del VHC. Las poblaciones virales que constituyen las cuasiespecies difieren entre sí por polimorfismos aminoacídicos que emergen debido a las altas tasas de mutación del virus. Determinadas sustituciones aminoacídicas pueden conferir una reducción en la susceptibilidad a los AADs. Cuando estas variantes emergen se produce la aparición del fenómeno resistencia. El término utilizado para

determinar estas variantes es el de variantes asociadas a resistencia (VAR) (Pawlotsky, 2016).

En el actual escenario terapéutico, la relevancia de la resistencia en el VHC está principalmente dirigida al dominio I de la región NS5A. Muchos estudios han mostrado que la presencia de VAR basales en la región NS5A puede comprometer la respuesta al tratamiento en pacientes con genotipos 1a (G1a) y 3 (G3) y factores asociados con una peor respuesta al tratamiento: cirrosis hepática, exposición previa a tratamiento, carga viral (ARN-VHC)>800.000 UI/mL. (Black et al., 2015; Foster et al., 2015; Nelson et al., 2015; Zeuzem et al., 2015a; Zeuzem et al., 2015b; Sarrazin et al., 2016; Poveda et al., 2017; Wyles et al., 2017; Zeuzem et al., 2017).

2 OBJETIVOS

- Evaluar la prevalencia basal de variantes asociadas a resistencia (VAR) a inhibidores de NS5A en pacientes con infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC) con genotipos 1a y 3 en dos hospitales del Noroeste de España.
- Evaluar las implicaciones clínicas de la prevalencia de VAR basales en la optimización de las estrategias terapéuticas actuales.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Diseño y ámbito de estudio

Se realizó un estudio observacional en una cohorte de pacientes con infección crónica por el VHC con G1a y G3 en seguimiento clínico en dos hospitales del Noroeste de España: Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC) y Complejo Hospitalario Universitario de Ferrol (CHUF).

3.2 Sujetos de estudio

Los sujetos seleccionados para este estudio fueron pacientes con serología positiva para VHC en seguimiento clínico en el CHUAC y CHUF. Sólo los pacientes naïve (pacientes que nunca han recibido tratamiento) a regímenes basados en inhibidores NS5A y con ARN-VHC >1.000 UI/mL fueron incluidos. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado correspondiente a la línea de investigación de Enfermedades Infecciosas (**Anexo I**). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación de Galicia (código de registro: C.0003724).

Con ayuda de un clínico especialista se recogieron variables sociodemográficas, epidemiológicas, clínicas y virológicas de forma retrospectiva de cada uno de los pacientes incluidos en el estudio (**Anexo II**). La fibrosis hepática fue medida mediante elastografía de transición (FibroScan, EchoSense, Francia) y los resultados expresados en kilopascales (kPa) se transformaron en la escala METAVIR de acuerdo al siguiente criterio: F0-F1 < 7,5 kPa; F2 ≥ 7,5-9,5 kPa, F3 ≥ 9,5-12,5 kPa y F4 > 12,5 kPa (cirrosis hepática). Durante todo el proceso se cumplió la garantía de confidencialidad de la información según la Ley 14/2007, de investigación biomédica y la Ley Orgánica 15/1999, de protección de datos de carácter personal.

3.3 Obtención y procesado de las muestras

El material de partida para la amplificación de la región NS5A fueron muestras de plasma almacenadas a -80°C en el Biobanco de A Coruña, dentro de la colección de muestras de la línea de investigación de Enfermedades Infecciosas. El plasma

se aisló previamente a partir de muestras de sangre periférica contenida en tubos de anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (*Ethylene diaminetetra aceticacid*, EDTA).

Como método de aislamiento del plasma se empleó la técnica de centrifugación en gradiente de densidad con *Ficoll* (*Lymphocytes Isolation Solution*, Rafer, España). El *Ficoll* permite separar los componentes de la sangre en función de su densidad gracias a la migración diferencial de éstos durante la centrifugación. Tras el proceso de centrifugado se obtienen las fases bien diferenciadas (**Figura 4**), quedando el plasma en la parte superior (componente de baja densidad).

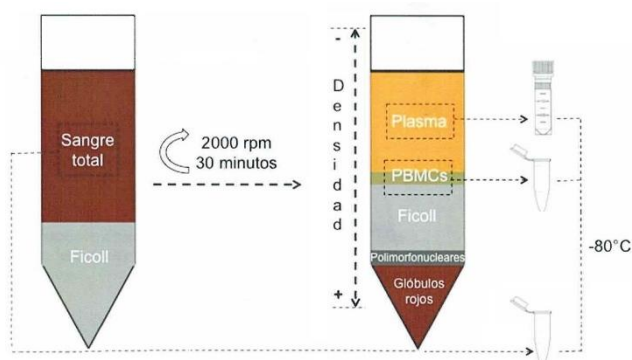


Figura 4. Técnica de centrifugación diferencial en gradiente de densidad con *Ficoll*.

3.4 Extracción del ARN

La extracción del ARN del VHC se llevó a cabo a partir de 140 μ L de plasma por medio de un sistema de extracción en columnas de gel de sílice, basado en la afinidad de la unión del material genético a una membrana. El proceso consiste en una lisis celular seguida de la unión del ARN a la membrana de sílica gel inmovilizada en una columna. Los contaminantes (cationes y proteínas) son eliminados de la membrana mediante pasos sucesivos de lavado. Finalmente, el ARN purificado se separa de la membrana y se eluye.

Se utilizó el kit comercial *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, Alemania) según las instrucciones del fabricante. El procesó se automatizó mediante el *QIAcube* (Qiagen, Alemania). La automatización del proceso permite una extracción más eficiente, de mayor calidad y con una mayor reproducibilidad de los resultados.

Una vez extraído el ARN, se evaluó la concentración y pureza del mismo utilizando el espectrofotómetro *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific, España) y según el programa informático asociado del fabricante, midiendo las absorbancias (Abs) a 280 nanómetros (nm), 260 nm y 230 nm para analizar la concentración del ARN (Abs 260) y la contaminación por sales-alcoholes y proteínas (Abs 260/230 y Abs 260/280, respectivamente).

3.5 Secuenciación y análisis de la región NS5A

El análisis del dominio I de la región NS5A (codones 1 al 213) se realizó siguiendo la metodología previamente descrita por Plaza et al., 2012, en G1a y por Pérez et al., 2016, en el caso del G3.

3.5.1 Obtención del ADN complementario a partir del ARN viral

El primer paso para la amplificación del dominio I de la región de NS5A fue la realización de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de transcripción reversa (RT-PCR) para la obtención del ADN complementario (ADNc) a partir del ARN viral aislado previamente.

Debido a la heterogeneidad del VHC, el proceso de RT-PCR fue diferente en función del genotipo viral. A continuación, se detallan los protocolos empleados para cada uno de los genotipos virales.

3.5.1.1 Obtención del ADN complementario en genotipo 1a

En el caso del G1a se utilizó el *kit* comercial *OneStep RT-PCR* (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este *kit* combina una RT-PCR seguida de una PCR convencional. Esto, permite la obtención y amplificación de una región definida de ADNc mediante el diseño de cebadores específicos. Los cebadores empleados en esta reacción aparecen recogidos en la **Tabla II**.

El programa empleado fue el siguiente: una RT-PCR inicial de 30 minutos a 50°C, seguida de una PCR convencional con un ciclo inicial de activación de 15 minutos a 95°C y 45 ciclos de amplificación con una desnaturalización a 94°C durante 35

segundos, una hibridación a 54°C 35 segundos y una elongación a 72°C durante 90 segundos. El programa se completó con una elongación final de 10 minutos a 72°C.

Tabla II. Cebadores empleados en la RT-PCR de pacientes con G1a.

Cebador	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Sentido
EF1a	GTTGGCCCGGGCGAGGG	Directo
ER1a	CGCCCATCTCCTGCCTCCA	Reverso

3.5.1.2 Obtención del ADN complementario en genotipo 3

En el caso del genotipo 3 se empleó *kit Revert H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Fisher, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este *kit* se basa en el uso de cebadores hexaméricos aleatorios (*random hexamer primer*) que permiten la obtención y amplificación de una región indefinida de ADNc.

La reacción de RT-PCR, se divide en dos subreacciones: una hibridación de los cebadores hexaméricos aleatorios (5 minutos a 65°C) seguido de la reacción de retrotranscripción: 5 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C y un paso final de 5 minutos a 72°C.

3.5.2 Amplificación de la secuencia NS5A por PCR anillada y visualización de los productos en gel de agarosa

Con el fin de incrementar la cantidad de producto de ADNc y con ello la sensibilidad y la especificidad en la posterior secuenciación del dominio I de la región NS5A, se realizó una PCR anillada (*Nested PCR*). La PCR anillada, se basa en el empleo de cebadores específicos que anillan internamente a la región amplificada durante la RT-PCR previamente realizada.

La PCR anillada, tanto en G1a como en G3, se realizó mediante el *kit* comercial *Hotstart Master Mix Kit* (Qiagen, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cebadores empleados en la PCR anillada aparecen recogidos en la **Tabla III**.

Tabla III. Cebadores empleados en la PCR anillada de pacientes con G1a y G3

Genotipo VHC	Cebador	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Sentido	Amplición
1a	IF1a	TCCCCACGCACTACGTG	Directo	859 pb
1a	IR1a	GTGCAAGTTGCCTTGAGAGA	Reverso	
3	NS5A-3a_F	CYGCATTGCTGAGTTCTCTA	Directo	557 pb
3	NS5A-3a_R	GYAGTCTCACYCCATCCACTTC	Reverso	

Abreviaturas: pb (pares de bases).

El programa de PCR anillada empleado para G1a y G3 consistió en un ciclo de activación inicial de la enzima (15 minutos a 95°C) seguido de 45 ciclos de amplificación formados por una desnaturalización de 33 segundos a 94°C, una hibridación de 30 segundos a 60°C y una elongación de 45 segundos a 72°C. Finalmente se añadió un paso de extensión final de 5 minutos a 72°C.

Una vez realizada la PCR anillada, se comprobó la correcta amplificación de la región objeto de estudio por medio de una electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR anillada. La técnica de electroforesis permite testar que el ADN resultante de la amplificación se corresponde con el tamaño de amplicón esperado (**Tabla III**).

La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1,5% teñido con *SYBR Safe DNA Gel Stain* (LifeTechnologies, Estados Unidos). Como marcador de peso molecular, se empleó el *DNA Molecular Weight Marker XIV* (Roche Applied Science, Alemania), que permite distinguir bandas de un tamaño entre 100-1500 pares de bases, con un intervalo de 100 pares de bases entre cada una de las bandas.

Para la visualización de las bandas del gel se empleó el equipo *Fujifilm Luminiscent Image Analyzer LAS 3000* (Fujifilm, Japón) y el programa informático

asociado *LAS3000 Image Reader* (Fujifilm, Japón), que permitió conservar las imágenes obtenidas.

3.5.3 Purificación de los productos de PCR (EXOSAP-IT)

Tras la realización de la PCR anillada y la comprobación de la correcta amplificación de la misma por medio de una electroforesis en gel de agarosa, se realizó una purificación de los productos de PCR obtenidos con el fin de eliminar subproductos como cebadores y deoxinucleótidos (dNTPs) no incorporados durante la PCR anillada que podrían interferir en la posterior reacción de secuenciación.

Como método de purificación se empleó una purificación enzimática por medio del *kit* comercial *ExoSap-IT* (Amersham, Reino Unido). Este método se basa en el uso simultáneo de dos enzimas hidrolíticas: una exonucleasa I (Exo-I) y una fosfatasa alcalina (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, SAP) que eliminan residuos de ADN monocatenarios (restos de cebadores) y dNTPs no incorporados. El método de purificación se llevó a cabo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y consistió en un ciclo de 15 minutos a 37°C seguido de un ciclo de 15 minutos a 80°C.

3.5.4 Reacción de secuenciación y purificación

Una vez purificadas las muestras, se llevó a cabo la reacción de secuenciación y su posterior purificación previo al análisis de las mismas en el secuenciador. Este proceso (reacción de secuencia, purificación y carga de la muestra en el secuenciador), fue llevado a cabo por la plataforma de Genómica del INIBIC.

La reacción de secuencia, fue realizada por medio del *kit Big Dye Ready Reaction V3.1* (Applied Biosystems, Estados Unidos) y un cebador específico. Los cebadores empleados en la secuenciación fueron los mismos que previamente se utilizaron durante la PCR anillada (**Tabla III**). La reacción de secuencia se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Los productos de la reacción de secuenciación fueron purificados por medio de un método físico (vacío aplicado a una membrana de nitrocelulosa). El *kit* comercial empleado en este proceso fue el *Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup Kit* (Millipore, Alemania).

Una vez purificados, los productos de la reacción de secuencia fueron introducidos en el secuenciador automático de ADN de tecnología capilar *ABI 3130 XL* (Applied Biosystems, Estados Unidos). Los datos obtenidos de la secuenciación fueron registrados mediante el programa informático *3130 Series 4* (Applied Biosystems, Estados Unidos).

3.5.5 Análisis de las secuencias

El primer paso realizado durante el análisis de las secuencias fue la creación de un archivo en formato FASTA, resultado del alineamiento de la secuencia obtenida en sentido directo (secuencia resultante de la secuenciación del cebador directo) y de la secuencia obtenida en sentido reverso (secuencia resultante de la secuenciación del cebador reverso). Además del alineamiento de las secuencias directas e inversas entre sí, las secuencias fueron alineadas con secuencias de referencia del VHC. Las secuencias de referencia empleadas en este proceso, fueron las secuencias con código de acceso *GeneBank* AF009606 y D17763 para los genotipos 1a y 3, respectivamente.

Los archivos con extensión .FASTA resultante de los alineamientos fueron analizados mediante la plataforma web *Geno2pheno* (<http://hcv.geno2pheno.org/index.php>) (Kalaghtgi et al., 2016). *Geno2pheno*, incorpora un algoritmo que permite detectar cambios aminoacídicos en las secuencias analizadas al enfrentar las mismas a secuencias de consenso del VHC. Además, la herramienta *Geno2pheno* aporta un análisis sobre la posible susceptibilidad a fármacos y una puntuación asociada a dicha susceptibilidad. Las VAR basales clínicamente relevantes evaluadas en el presente trabajo fueron: M28A/G/T, Q30D/E/H/G/K/LR, L31M/V/F, H58D e Y93C/H/N/S para el G1a e Y93H en el caso del G3 (European Association for the Study of the Liver, 2017).

3.6 Análisis estadístico

Con las variables sociodemográficas, epidemiológicas, clínicas y virológicas y las VAR basales de cada uno de los pacientes participantes en este estudio, se realizó un análisis estadístico descriptivo. Las características basales de la población de estudio se expresaron como medias (\pm desviación estándar) o medianas [rango intercuartil] en el caso de las variables cuantitativas; y como porcentaje (valor absoluto) en el caso de las variables cualitativas.

El análisis estadístico se llevó a cabo empleando el paquete estadístico *SPSS v19.0* (*SPSS Inc*, Estados Unidos).

4 RESULTADOS

El estudio incluyó 232 pacientes con infección crónica por VHC: 166 con G1a y 66 con G3. La región del dominio I de NS5A se secuenció con éxito en 162 pacientes G1a de los 166 incluidos y en todos los pacientes G3.

Las características sociodemográficas, epidemiológicas, clínicas y virológicas basales se detallan en la **Tabla IV**. Más del 75% de la población estudiada eran hombres, con una media de edad de 48 años y un tiempo desde el diagnóstico del VHC de 17 años. La prevalencia de co-infección VIH-VHC fue superior al 60% en ambos grupos de pacientes.

La prevalencia global de VAR basales a inhibidores de NS5A fue de 5,5% para G1a y de 0,0% para G3. En pacientes con G1a la variante Q30H/R fue la más frecuente (3,1%) mientras que el resto de VAR presentaron prevalencias inferiores al 1%: M28T (0,6%), L31M (0,6%), H58D (0,6%) y Y93H (0,6%).

Tabla IV. Características sociodemográficas, epidemiológicas, clínicas y virológicas de los pacientes del estudio.

	G1a (N=166)	G3 (N=66)
Hombres	132 (79,5)	50 (75,8)
Edad, años	48,7±8,3	49.4±6,7
Tiempo desde el diagnóstico, años	17±6,9	16.1±6,9
ARN-VHC, log ₁₀ UI/mL	6,13±0,85	6.15±0,77
ARN-VHC >800.000 UI/mL	120 (72,7)	42 (64,6)
ARN-VHC <800.000 UI/mL	45 (27,3)	23 (35,4)
Exposición previa a tratamiento VHC		
Naïve	119 (71,7)	53 (80,3)
Previamente expuestos	47 (28,3)	13 (19,7)
Fibrosis hepática		
F0-F1	62 (37,3)	19 (28,8)
F2	30 (18,1)	15 (22,7)
F3	29 (17,5)	9 (13,6)
F4	35 (21,1)	17 (25,8)
Desconocida	10 (6,0)	6 (9,1)
Co-infección VIH-VHC	98 (61,3)	46 (69,7)

Los datos están expresados como n (%) o media +/- desviación estándar. Abreviaturas: VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), VHC (virus de la hepatitis C), ARN-VHC (carga viral del VHC), UI/mL (Unidades Internacionales por mililitro).

Además de determinar la prevalencia de VAR basales a inhibidores de NS5A, se analizó la prevalencia de factores asociados a peor respuesta al tratamiento en ambos genotipos: presencia de cirrosis hepática (definida como un valor F4 en la escala METAVIR), exposición previa a tratamiento frente al VHC y cargas virales del VIH superiores a 800.000 UI/mL (ARN-VHC>800.000 UI/mL). Atendiendo a la presencia de cirrosis hepática, el 21,1% de los pacientes G1a y el 25,8% de los pacientes G3 presentaban cirrosis. En relación a la exposición previa a tratamiento un 28,3% de los G1a y un 19,7% de los G3 habían estado previamente expuestos a tratamientos frente al VHC. Además, una alta prevalencia de pacientes con altos niveles de ARN-VHC>800.000 UI/mL fue observada en ambos genotipos (72,7% en G1a y 64,6% en G3).

Las actuales guías de tratamiento aconsejan la realización de un estudio de VAR basales, en NS5A, en pacientes con presencia de factores asociados a peor respuesta al tratamiento. La disponibilidad de un estudio de VAR basales, permite la optimización de los tratamientos al evitar la necesidad de prologar y/o añadir ribavirina en el caso de que las VAR basales no estén presentes. En este contexto, se evaluó el impacto de las VAR basales, en NS5A, en las estrategias terapéuticas actuales con el fin definir la utilidad del estudio de resistencias en pacientes con factores de peor respuesta asociados (**Tabla V**).

Considerando las guías actuales de tratamiento (AASLD-IDSA, 2017; AEEH-SEIMC, 2017; European Association for the Study of the Liver, 2017), la combinación grazoprevir/elbasvir en pacientes G1a con ARN-VHC>800.000 UI/mL, debería prolongarse a 16 semanas con ribavirina en el caso de que el estudio de VAR no estuviese disponible. Esta recomendación, afecta al 71,6% de los pacientes G1a de nuestra cohorte. Sin embargo, una vez realizado el estudio de resistencias en este grupo de pacientes tan solo el 5,2% requerirían prolongar la duración del tratamiento y añadir ribavirina debido a la presencia de VAR basales. El 94,8% de este grupo de pacientes podrían beneficiarse de un tratamiento optimizado de 12 semanas de duración sin ribavirina.

En el contexto de los regímenes basados en sofosbuvir/ledipasvir o sofosbuvir/daclatasvir en pacientes con G1a previamente tratados frente al VHC,

las actuales guías de tratamiento recomiendan prolongar el tratamiento a 24 semanas o añadir ribavirina durante las 12 semanas de tratamiento en caso de que no se disponga de un estudio de VAR basales. Esta recomendación afecta al 29% de los pacientes G1a de nuestra cohorte. Sin embargo, una vez realizado el estudio de VAR, se determinó que tan sólo el 4,3% de este grupo de pacientes requerirían reforzar el tratamiento.

Finalmente, para los pacientes con G3, en los que la diana terapéutica sea la combinación sofosbuvir/velpatasvir, ya sean, previamente expuestos a tratamiento o naïve, con cirrosis hepática se requeriría la realización de un estudio de VAR basales para evitar prolongar la duración del tratamiento a 24 semanas o añadir ribavirina para una duración de 12 semanas de tratamiento. En nuestra cohorte, ninguno de los pacientes G3 presentó la VAR Y93H, de modo que la realización de un estudio de resistencias, permitiría que el 100% de los pacientes G3 recibieran una combinación estándar de 12 semanas sin ribavirina.

Tabla V. Prevalencia de VAR basales en NS5A e implicaciones en las actuales combinaciones de AADs.

Genotipo VHC	Combinación de AADs	Pacientes con recomendación de VAR basales	Pacientes n/N (%)		
			Total	Con VAR	Sin VAR
Genotipo 1a	GZR/EBV	Naïve o previamente tratados con ARN-VHC >800,000 UI/mL	116/162 (71,6)	6/116 (5,2) ^a	110/116 (94,8)
	SOF/LDV o SOF/DCV	Previamente tratados con o sin cirrosis	47/162 (29,0)	2/47 (4,3) ^b	45/47 (95,7)
Genotipo 3	SOF/VEL	Previamente tratados (con o sin cirrosis) y naïve con cirrosis	26/66 (39,4)	0/26 (0) ^b	26/26 (100,0)

Los datos están expresados como n/N (%). Abreviaturas: VHC (virus de la hepatitis C), AAD (antivirales de acción directa), ARN-VHC (carga viral del VHC), GZR/EBV (grazoprevir/elbasvir), SOF/LDV (sofosbuvir/ledipasvir), SOF/DCV (sofosbuvir/daclatasvir), SOF/VEL (sofosbuvir/velpatasvir). ^a En pacientes con VAR añadir ribavirina y prolongar la duración del

tratamiento de 12 a 16 semanas. ^b En pacientes con VAR añadir ribavirina o prolongar la duración del tratamiento de 12 a 24 semanas.

5 DISCUSIÓN

El presente estudio evaluó la prevalencia de VAR basales a inhibidores de NS5A en 232 pacientes con infección crónica por el VHC con G1a (n=166) y G3 (n=66), y las implicaciones clínicas del estudio basal de VAR en las actuales terapias frente a la infección por VHC (Black et al, 2015; Foster et al, 2015; Nelson et al, 2015; Zeuzem et al, 2015a; Zeuzem et al, 2015b; Sarrazin et al, 2016; Wyles et al, 2017; Zeuzem et al, 2017). La prevalencia de VAR basales a inhibidores de NS5A fue de 5,5% en G1a y nula en G3. Una alta prevalencia de factores de peor respuesta al tratamiento fue descrita en la cohorte: 21,1% cirrosis hepática, 28,3% previamente expuestos a tratamiento y 72,7% ARN-VHC>800.000 UI/mL en G1a y 25,8% cirrosis hepática, 19,7% previamente expuestos a tratamiento y 64,6% ARN-VHC>800.000 UI/mL para G3.

En el actual escenario terapéutico, la presencia de VAR basales clínicamente relevantes a inhibidores de NS5A en pacientes con G1a y G3 combinadas con factores de peor respuesta (e.g. cirrosis hepática, exposición previa a tratamiento, o niveles superiores a 800.000 UI/mL de ARN-VHC) hacen necesario el uso de ribavirina y/o la prolongación de la duración del tratamiento de 12 a 16/24 semanas para determinados regímenes basados en inhibidores de NS5A. Este es el caso de las combinaciones grazoprevir/elbasvir, sofosbuvir/ledipasvir, sofosbuvir/daclatasvir para G1a y sofosbuvir/velpatasvir para G3 (AASLD-IDSA, 2017; AEEH-SEIMC, 2017; European Association for the Study of the Liver, 2017).

A pesar de la alta prevalencia de factores asociados con peor respuesta al tratamiento en pacientes con G1a y G3, la baja de proporción de VAR basales (5,5% en G1a y 0,0% en G3) en combinación con estos factores haría posible que la gran mayoría de estos pacientes (más del 94%) puedan beneficiarse de terapias frente al VHC de corta duración (12 semanas) sin ribavirina.

Los resultados obtenidos, indican que la implementación del estudio de resistencias antes del inicio de terapias con regímenes que incluyan el uso de inhibidores de NS5A, en poblaciones G1a y G3 y factores de peor respuesta

asociados puede ser eficaz en la optimización de las terapias al evitar toxicidades asociadas al uso de ribavirina, reducir la duración del tratamiento y los costes asociados al fármaco.

Actualmente existen pocos datos acerca de la prevalencia de VAR basales en la región NS5A en pacientes con infección crónica por VHC G1a y G3 fuera de poblaciones de ensayos clínicos. Asimismo, los pocos datos existentes, no han evaluado el impacto de la presencia de mutaciones clínicamente relevantes en las actuales estrategias terapéuticas (Plaza et al, 2012; Bagaglio et al, 2016; Chen et al, 2016; Dietz et al, 2016; Pawlotsky, 2016; Pérez et al, 2016). Las últimas recomendaciones de la Asociación Europea del Estudio del Hígado (*European Association for the Study of the Liver, EASL*) señalan la utilidad del estudio de resistencias a inhibidores de NS5A para guiar las decisiones de los facultativos en caso de tener un acceso al estudio de resistencias.

Una de las principales limitaciones de la implementación del *estudio* de VAR basales en NS5A, es la ausencia de una metodología estándar globalmente disponible. A pesar de esto, los datos en vida real aportados por este trabajo reflejan la utilidad de implementar de forma basal la realización de un estudio de resistencias en determinadas poblaciones. En este contexto, más datos en vida real acerca de la prevalencia de VAR en NS5A en otras cohortes de pacientes con infección crónica por VHC G1a y G3 y su impacto en la optimización del tratamiento son necesarios.

En conclusión, a pesar de la alta proporción de pacientes con factores de peor respuesta asociados, la prevalencia de VAR en NS5A en esta cohorte de pacientes con VHC G1a y G3 fue baja (5,5%) o nula, permitiendo optimizar el tratamiento en más del 94% de este grupo de pacientes. El estudio de VAR basales en la región NS5A en estas poblaciones específicas podría ser útil para optimizar las actuales terapias basadas en inhibidores de NS5A al evitar toxicidades asociadas al uso de la ribavirina, acortar la duración del tratamiento en la mayoría de los pacientes y reducir los costes asociados a la terapia.

6 CONCLUSIONES

Conclusiones

- La prevalencia de VAR basales en NS5A fue baja para pacientes con genotipo 1a (5,5%) y nula para genotipo 3 (0,0%).
- Una alta proporción de pacientes tenían factores de peor respuesta asociados (cirrosis hepática, exposición previa a tratamiento, ARN-VHC>800.000 UI/mL).
- El estudio de VAR basales en NS5A en pacientes con VHC y factores de peor respuesta asociados permitiría optimizar las actuales terapias basadas en inhibidores de NS5A en más del 94%, evitando las toxicidades asociadas a la ribavirina y acortando la duración del tratamiento.

Conclusión

- A prevalencia de VAR basais en NS5A foi baixa para doentes con xenotipo 1a (5,5%) e nula para xenotipo 3 (0,0%).
- Unha alta proporción de doentes tiñan factores de peor resposta asociados (cirrosis hepática, exposición previa a tratamento, ARN-VHC>800.000 UI/mL).
- O estudio de VAR basais en NS5A en doentes con VHC e factores de peor resposta asociados permitiría optimizar as actuais terapias basadas en inhibidores de NS5A en máis do 94%, evitando as toxicidades asociadas á ribavirina e acortando a duración do tratamento.

Conclusions

- The prevalence of baseline RASs at NS5A was low for patients with genotype 1a (5.5%) and null in genotype 3 (0.0%).
- A high proportion of patients harbored other factors of poor response (liver cirrhosis, prior treatment-experienced, RNA-HCV>800,000 IU/mL).
- Testing NS5A RASs among HCV-patients with poor treatment response factors might optimize current NS5A-based therapies in more than 94% avoiding ribavirin-related toxicities and shortening treatment duration.

7 BIBLIOGRAFÍA

- AASLD-IDSA Guidance Panel (2017). HCV guidance: recommendations for testing, managing, and treating hepatitis C. Accessed at <http://www.hcvguidelines.org> on April 4th 2017.
- AEEH/SEIMC (2017). Guías de manejo de la hepatitis C. Accessed at https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/guiasclinicas/seimc-clinicasclinicas-2016-Manejo_HepatitisC.pdf. on April 4th 2017.
- Ascher DB, Wielens J, Nero TL, Doughty L, Morton CJ, Parker MW (2014). Potent hepatitis C inhibitors bind directly to NS5A and reduce its affinity for RNA. *Scientific Reports*, 4: 4765.
- Bagaglio S, Andolina A, Merli M, Uberti-Foppa C, Morsica G (2016). Frequency of Natural Resistance within NS5a Replication Complex Domain in Hepatitis C Genotypes 1a, 1b: Possible Implication of Subtype-Specific Resistance Selection in Multiple Direct Acting Antivirals Drugs Combination Treatment. *Viruses*; 8: 91.
- Bialek SR, Terrault NA (2006). The changing epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *Clinics in Liver Disease*, 10: 697-715.
- Black S, Pack I, Ingravallo P, McMonagle P, Chase R, Shaughnessy M, Hwang P, Haber B, Harrigan P, Brumme C (2015). P0891: Resistance analysis of virologic failures in hepatitis C genotype 1 infected patients treated with grazoprevir/elbasvir +/- ribavirin: the C-WORTHY study. *Journal of Hepatology*, 62: S677-S678.
- Chen ZW, Li H, Ren H, Hu P (2016). Global prevalence of pre-existing HCV variants resistant to direct-acting antiviral agents (DAAs): mining the GenBank HCV genome data. *Scientific Reports*, 6 :pii=20310.
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244: 359-362.
- Dabbouseh NM, Jensen DM (2013). Future therapies for chronic hepatitis C. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 10: 286-276.
- Dietz J, Susser S, Berkowski C, Perner D, Zeuzem S, Sarrazin C (2015). Consideration of Viral Resistance for Optimization of Direct Antiviral Therapy of Hepatitis C Virus Genotype 1-Infected Patients. *PLoS One*, 10: e0134395.

- Dubuisson J, Cosset FL (2014). Virology and cell biology of the hepatitis C virus lifecycle- an update. *Journal of Hepatology*, 61: S3-S13.
- European Association for the Study of the Liver, 2017. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. *Journal of Hepatology*, 66: 153-194.
- Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV (1975). Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *The New England Journal of Medicine*, 292: 767-770.
- Foster GR, Afdhal N, Roberts SK, Bräu N, Gane EJ, Pianko S, Lawitz E, Thompson A, Shiffman ML, Cooper C, Towner WJ, Conway B, Ruane P, Bourlière M, Asselah T, Berg T, Zeuzem S, Rosenberg W, Agarwal K, Stedman CA, Mo H, Dvory-Sobol H, Han L, Wang J, McNally J, Osinusi A, Brainard DM, McHutchison JG, Mazzotta F, Tran TT, Gordon SC, Patel K, Reau N, Mangia A, Sulkowski M, ASTRAL-2 Investigators (2015). Sofosbuvir and velpatasvir for HCV genotype 2 and 3 infection. *The New England Journal of Medicine*, 373: 2608-2617.
- Götte M, Feld JJ (2016). Direct-acting antiviral agents for hepatitis C: structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 13: 338-351.
- He Y, Staschke KA, Tan SL (2006). HCV NS5A: A Multifunctional Regulator of Cellular Pathways and Virus Replication. In S.L. Tan (Ed.), *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology* (pp. 267-292). Norfolk, UK: Horizon Bioscience.
- Jones DM, McLauchlan J (2010). Hepatitis C Virus: Assembly and Release of Virus Particles. *The Journal of Biological Chemistry*, 285: 22733-22739.
- Kalaghatgi P, Sikorski AM, Knops E, Rupp D, Sierra S, Heger E, Neumann-Fraune M, Beggel B, Walker A, Timm J, Walter H, Obermeier M, Kaiser R, Bartenschlager R, Lengauer T (2016). Geno2pheno[HCV] - A Web-based Interpretation System to Support Hepatitis C Treatment Decisions in the Era of Direct-Acting Antiviral Agents. *PLoS One*, 11: e0155869.
- Koutsoudakis G, Forns X, Pérez-Del-Pulgar S (2013). [The molecular biology of hepatitis C virus]. *Gastroenterología y Hepatología*, 36: 280-293.
- Lavanchy D (2011). Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clinical Microbiology and Infection*, 17: 107-115.

- Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, Guardia J, Gómez J (1992). Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *Journal of virology*, 66: 3225-3229.
- Nelson DR, Cooper JN, Lalezari JP, Lawitz E, Pockros PJ, Gitlin N, Freilich BF, Younes ZH, Harlan W, Ghalib R, Oguchi G, Thuluvath PJ, Ortiz-Lasanta G, Rabinovitz M, Bernstein D, Bennett M, Hawkins T, Ravendhran N, Sheikh AM, Varunok P, Kowdley KV, Hennicken D, McPhee F, Rana K, Hughes EA, ALLY-3 Study Team (2015). All-oral 12-week treatment with daclatasvir plus sofosbuvir in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection: ALLY-3 phase III study. *Hepatology*, 61: 1127-1135.
- Pawlotsky JM (2016). Hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral drugs in interferon-free regimens. *Gastroenterology*, 151: 70-86.
- Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM (2004). Structural Biology of Hepatitis C Virus. *Hepatology*, 39: 5-19.
- Pérez AB, Chueca N, Álvarez M, Fernández-Caballero JA, Pineda JA, Rivero A, Salmerón FJ, Santos J, Collado A, Omar M, Fernández E, Bernal E, Hidalgo C, García F (2016). CO-12: Nuevos antivirales de acción directa frente al virus de la hepatitis C: prevalencia basal de sustituciones asociadas a menor tasa de respuesta viral sostenida. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 3: 6.
- Plaza Z, Soriano V, Vispo E, del Mar Gonzalez M, Barreiro P, Seclén E, Poveda E (2012). Prevalence of natural polymorphisms at the HCV NS5A gene associated with resistance to daclatasvir, an NS5A inhibitor. *Antiviral Therapy*, 17: 921-926.
- Poveda E, Puoti M, García-Deltoro M, Pineda JA, Téllez F, Granados R, Morano L, García FI (2017). News on Viral Hepatitis in HIV: Update from the 2016 GEHEP Conference. *AIDS Reviews*, 19: 47-53.
- Sarrazin C, Dvory-Sobol H, Svarovskaia ES, Doehle BP, Pang PS, Chuang SM, Ma J, Ding X, Afdhal NH, Kowdley KV, Gane EJ (2016). Prevalence of resistance-associated substitutions in HCV NS5A, NS5B, or NS3 and outcomes of treatment with ledipasvir and sofosbuvir. *Gastroenterology*, 151: 501-512.
- Simmonds P (2004). Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *The Journal of general virology*, 85: 3173-88.

- Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspé G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 42: 962-973.
- Scheel TKH, Prentoe J, Carlsen THR, Mikkelsen LS, Gottwein JM, Bukh J (2012). Analysis of Functional Differences between Hepatitis C Virus NS5A of Genotypes 1-7 in Infectious Cell Culture Systems. *PLoS Pathogens*, 8: e1002696.
- Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Rice CM (2005). Structure of the Zinc-Binding Domain of an Essential Replicase Component of Hepatitis C Virus Reveals a Novel Fold. *Nature*, 435: 374-379.
- Timm J, Roggendorf M (2007). Sequence diversity of hepatitis C virus: implications for immune control and therapy. *World journal of gastroenterology*, 13: 4808-4817.
- Wendt A, Adhoute X, Castellani P, Oules V, Ansaldo C, Benali S, Bourlière M (2014). Chronic hepatitis C: future treatment. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*, 6: 1-17.
- WHO (2016). Hepatitis C: WHO Fact Sheet, N° 164. Accessed at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/> on April 4th 2017.
- Wyles D, Dvory-Sobol H, Svarovskaia ES, Doehle BP, Martin R, Afdhal NH, Kowdley KV, Lawitz E, Brainard DM, Miller MD, Mo H, Gane EJ (2017). Post-treatment resistance analysis of hepatitis C virus from phase II and III clinical trials of ledipasvir/sofosbuvir. *Journal of Hepatology*, 66: 703-710.
- Zeuzem S, Mizokami M, Pianko S, Mangia A, Han K, Martin R, Svarovskaia E, Dvory-Sobol H, Doehle B, Pang ZP (2015). Prevalence of pretreatment NS5A resistance associated variants in genotype 1 patients across different regions using deep sequencing and effect on treatment outcome with LDV/SOF. *Hepatology*, 62: 254A.
- Zeuzem S, Rockstroh J, Kwo PY, Roth D, Lawitz E, Sulkowski M, Forns X, Wahl J, Robertson M, Nguyen B, Barr E, Howe A, Miller M, Hwang P, Chen E, Koury K (2015). Predictors response to grazoprevir/elbasvir among HCV genotype 1 (GT1)-infected patients: integrated analysis of Phase 2-3 trials. *Hepatology*, 62: 554A-555A.

Zeuzem S, Mizokami M, Pianko S, Mangia A, Han KH, Martin R, Svarovskaia E, Dvory-Sobol H, Doehle B, Hedskog C, Yun C, Brainard DM, Knox S, McHutchison JG, Miller MD, Mo H, Chuang WL, Jacobson I, Dore GJ, Sulkowski M (2017). NS5A resistance-associated substitutions in patients with genotype 1 hepatitis C virus: Prevalence and effect on treatment outcome. *Journal of Hepatology*, 66: 910-918.

8 AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi profundo agradecimiento a la Dra. Eva Poveda López por darme la oportunidad de realizar este trabajo en el seno de un laboratorio de investigación de virología clínica y poder aprender los primeros pasos dentro de esta rama de investigación de la Biología. También agradecer a todo el grupo de investigación de Virología Clínica y al grupo de Genómica del INIBIC sin los cuales este trabajo no habría sido posible. Mi más sincero agradecimiento en especial a los investigadores predoctorales Marta Grandal Fustes y Andrés Tabernilla García, quienes me han guiado y ayudado para llevar a cabo este proyecto.

Dar agradecimientos también al equipo del Biobanco de A Coruña (SERGAS) por la facilitación de las muestras empleadas en este trabajo y a los Servicios de Medicina Interna del CHUF y CHUAC por facilitar la recogida de muestras de los pacientes.

9 ANEXOS

ANEXO I Modelo de Consentimiento Informado



BIOBANCO A CORUÑA

DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARTICIPANTE EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

TÍTULO: COLECCIÓN DE MUESTRAS PARA LA INVESTIGACIÓN DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

IDENTIDAD RESPONSABLE: DRA. EVA POVEDA LÓPEZ.

SERVICIO MÉDICO / GRUPO DE INVESTIGACIÓN: GRUPO INVESTIGACION VIROLOGIA CLINICA. SERVICIO DE MEDICINA INTERNA.

CENTRO: XERENCIA XESTION INTEGRADA A CORUÑA (XXIAC). INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE A CORUÑA (INIBIC)

D. / Dña.:

(Espacio para colocar la etiqueta con los datos del donante muestra)

FINALIDAD DE LA PARTICIPACIÓN.-

Le invitamos a colaborar en la Línea de Investigación de Enfermedades Infecciosas.

Las muestras obtenidas para el diagnóstico o control de las enfermedades una vez empleadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para ser utilizadas en investigación. De hecho, muchos de los avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios.

Toda investigación biomédica requiere recoger datos y muestras biológicas de personas afectadas por la patología a estudiar y de personas no afectadas por dicha enfermedad, para analizarlas y obtener conclusiones para conocer mejor y avanzar en el diagnóstico y/o tratamiento de las enfermedades que se van a investigar.

El objetivo principal de la Línea de Investigación de Enfermedades Infecciosas es poder utilizar estas muestras en los distintos proyectos de investigación en los que participe la responsable de la misma, la Dra. Eva Poveda López y cualquier otro personal adscrito o colaborador del Grupo de Investigación de Virología Clínica del Servicio de Medicina Interna de la XXIAC y/o del INIBIC; siempre y cuando, dichos estudios se enmarquen en el análisis de las enfermedades infecciosas en general, y particularmente aquellas enfermedades infecciosas causadas por virus.

Debe saber que la realización de los proyectos de investigación en los que se utilicen muestras humanas, será previamente autorizada por el Comité de Ética competente.

La finalidad principal de esta investigación es progresar en el conocimiento de la patología a estudiar y en su prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento, tanto médico como quirúrgico.

Toda la información que le facilitamos en este documento y la actividad del Grupo de investigación y el Biobanco están reguladas por la *Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD)*, la *Ley 14/2007, de 3 de Julio de Investigación Biomédica (LIBM)*, el *Real Decreto 1716/2011, de 11 de noviembre*.

Su participación es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos. **Su no-participación o retirada posterior del consentimiento no afectará en modo alguno a su atención sanitaria presente o futura. Antes de firmar el consentimiento puede preguntarnos cualquier duda que le surja o consultar con terceras personas.**

MUESTRAS BIOLÓGICAS E INFORMACIÓN ASOCIADA. RIESGOS.-

MUESTRAS BIOLÓGICAS (*Sangre, Líquidos Biológicos, Tejidos*) que se le han obtenido durante su atención sanitaria en este centro hospitalario y que ya no es necesario utilizarlas para la finalidad por la que se obtuvieron.

El responsable guardará y dispondrá de estas muestras sobrantes para realizar los estudios de investigación biomédica. Las muestras y la información asociada a las mismas se almacenarán en las áreas establecidas para tal fin, dentro de las instalaciones de la Xerencia Xestión Integrada A Coruña, bajo la responsabilidad de Dña. Eva Poveda López.

Es muy importante subrayar que, para la obtención de las muestras, no se le someterá a ninguna prueba ni riesgo adicional a los que deriven de su adecuada atención médica.

La donación de estas muestras no impedirá que usted o su familia puedan usarlas, cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles y no hayan sido anonimadas.

INFORMACIÓN CLÍNICA que, junto con los resultados de los estudios realizados en las muestras, nos permita extraer conclusiones útiles para el manejo de las enfermedades. Para el buen desarrollo de los estudios de investigación, es necesario obtener datos clínicos relativos al donante de las muestras, por lo que necesitaremos acceder a su historia clínica para recabar la información que será conservada junto a la muestra. (*Más información en el apartado de Confidencialidad.*)



En caso de ser necesaria alguna información o muestra adicional, y siempre que usted nos lo autorice en la hoja de consentimiento, la institución sanitaria se podría poner en contacto con usted para solicitarle nuevamente su colaboración.

CONDICIONES DE LA DONACIÓN.-

La donación y utilización de muestras biológicas humanas será gratuita, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma. Usted renuncia a cualquier derecho de naturaleza económica, patrimonial o potestativa sobre los resultados o potenciales beneficios económicos que puedan derivarse de las investigaciones que se realicen con la muestra que cede.

Tampoco obtendrá ningún otro beneficio directo para su salud como resultado de su donación. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.

La titularidad de los resultados de la investigación corresponderá al investigador y a la Institución donde se realice la investigación.

CONFIDENCIALIDAD.-

Toda la información referida a usted será considerada confidencial y tratada en base a las indicaciones establecidas en la normativa indicada al inicio de este documento. Tal información sólo estará disponible para el personal autorizado, el cual tiene el **deber legal de guardar secreto**. Sus muestras y sus datos clínicos asociados a las mismas, pasarán a formar parte del fichero de datos de la Xerencia Xestión Integrada A Coruña (XXIAC).

Para garantizar la confidencialidad de su identidad (asegurar que la información de su muestra no se relaciona con su identidad), su muestra sólo irá identificada, desde su entrada en la investigación, con un código. Sólo este código, y nunca su identidad aparecerá en el material con el que se trabaje. La relación entre su código y su identidad, quedará custodiada por el personal autorizado, en una base de datos que cumple todos los requisitos legales exigidos. De esta manera podemos asegurar que cualquier información que se obtenga a partir de sus muestras, permanezca confidencial pero pueda ser asociada a sus datos, por si fuera información de interés clínico.

La cesión de las muestras y los datos asociados a las mismas, a los investigadores colaboradores con esta investigación, se realizará de manera codificada (se mantendrá por el investigador responsable en este centro el vínculo que relaciona su identidad con la muestra cedida). A todos ellos se les exigirá que nos garanticen que trabajarán con el mismo nivel de protección de datos exigido por la normativa española.

Por otro lado, es posible que los resultados de las investigaciones sean publicados en la literatura científica, pero entendiendo estos resultados como los obtenidos de la totalidad de las muestras, no los resultados individuales. Si este fuera el caso, su identidad permanecerá completamente confidencial y nunca formará parte de ninguna publicación.

Con su aceptación a participar con la **Línea de Investigación de Enfermedades Infecciosas**, usted accede a que esta información pueda ser transferida en las mencionadas condiciones. Usted puede no autorizarnos a realizar las cesiones aquí indicadas, indicando su decisión en el apartado correspondiente de la hoja del consentimiento informado.

Puede ejercitar los **DERECHOS ACCESO, RECTIFICACIÓN, CANCELACIÓN Y/O OPOSICIÓN (DERECHOS ARCO)** que le reconoce la normativa española de protección de datos, dirigiendo su solicitud por escrito junto a una copia de su DNI (con el fin de garantizar que el ejercicio de estos derechos es realizado por la persona autorizada para ello) a:

- **ENTREGA EN PERSONA**, en la *Consulta* del Servicio de Medicina Interna de la XXIAC, a la atención de [Dra. Eva Poveda López](#)
- **CORREO POSTAL:**
Dra. Eva Poveda López
 Instituto de Investigación Biomédica A Coruña (INIBIC).
 Edificio Anexo, Hospital Materno Infantil Teresa Herrera.
 Complejo Hospitalario Universitario A Coruña – Xerencia Xestión Integrada A Coruña.
 As Xubias, 84. A Coruña. 15006.
- **FAX:** 981176398 **CORREO ELECTRÓNICO:** Eva.Poveda.Lopez@sergas.es



Usted puede contactar con la responsable de la Línea de investigación de enfermedades infecciosas, [Dña. Eva Poveda López](#), si le surge cualquier duda sobre su participación en esta investigación, en el **Teléfono: 981 17 63 99**. En todo momento se pondrán los medios necesarios para facilitarle la información más adecuada.

Si usted decide **REVOCAR SU CONSENTIMIENTO**, deberá hacernos llegar, de cualquiera de las maneras descritas anteriormente, a la atención de la responsable de esta investigación [Dña. Eva Poveda López](#), la hoja de revocación totalmente cubierta y firmada que aparece al final de este documento.

Usted debe saber que la revocación tendrá efectos a partir del momento en que se formalice y no afectará a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo hasta ese momento.

RESTRICCIONES DE USO DE LA MUESTRA.-

Usted puede indicarnos si quiere establecer algún tipo de restricción sobre sus muestras y datos, en relación a su posible uso en determinados proyectos de investigación o en cuanto a determinadas cesiones. Para ello dispone de un apartado específico en la hoja de firma del consentimiento informado.

INFORMACIÓN SOBRE RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN.-

La evaluación de los resultados se hará sólo por grupos (por ejemplo, hombres / mujeres, grupos de edad, diagnósticos, etc.) y no de forma individual. Debe comprender que los resultados de valor que se pudieran obtener provendrían del estudio de múltiples muestras, y en ningún caso de la suya exclusivamente.

Las implicaciones médicas de los resultados de las distintas pruebas, si es que los hay, sólo serán conocidas cuando se haya completado la investigación.

El responsable de la investigación tendrá a disposición de los participantes la información sobre los proyectos de investigación en los que se utilicen las muestras y datos.

En determinadas circunstancias el Comité de Ética competente podrá decidir si es necesario contactar con el participante para facilitarle información de manera individualizada.

Las diferentes investigaciones en las que se utilicen sus muestras y datos pueden requerir la realización de **estudios de biología celular y genéticos**, y a partir de ellos se puede obtener información que puede ser relevante para su salud o la de su familia. En los **estudios genéticos** se puede descubrir información no buscada, lo que se denominan hallazgos inesperados. Cuando esto se produzca, los resultados obtenidos serán validados y analizados por profesionales para determinar si son fiables en un porcentaje óptimo que aconseje su comunicación a las personas afectadas.

Usted debe saber que tiene derecho a conocer, o no, la información obtenida con el análisis de sus muestras.

En el caso de que usted decida no ser informado, la ley establece que cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares, un Comité de expertos estudiará el caso y deberá decidir entre la conveniencia o no de informar a los afectados o a sus representantes legales.

DESTINO FINAL DE LA MUESTRA

Cuando así lo determine la persona responsable de la Línea de investigación con la que usted accedió a colaborar con sus muestras y datos, y siempre que así lo autorice en la hoja de firma del consentimiento informado, las muestras sobrantes junto a los datos asociados serán depositadas en el Biobanco A Coruña.

Los Biobancos son bancos de almacenamiento de muestras de origen humano para su utilización en investigaciones nacionales o internacionales dentro del campo de la biomedicina. Su funcionamiento se centra en gestionar, bajo criterios de seguridad, calidad y eficiencia; la recepción, procesamiento, almacenamiento y posterior cesión de muestras a los investigadores solicitantes, para que utilicen las mismas en sus proyectos de investigación; siempre y cuando, éstos cumplan todos los requisitos éticos y legales exigibles para este tipo de prácticas.

El Biobanco guardará y dispondrá de estas muestras sobrantes para realizar los estudios de investigación biomédica. Las muestras y la información asociada a las mismas se almacenarán en las áreas establecidas para tal fin, dentro de las instalaciones de la Xerencia Xestión Integrada A Coruña, bajo la responsabilidad de la Dirección del Biobanco A Coruña.

La cesión de las muestras y los datos asociados a las mismas, a los investigadores solicitantes de las muestras, comunitarios (países miembros de la Unión Europea) o extracomunitarios (no miembros), se efectuará con carácter general de manera anónima o disociada, es decir, sólo se cederá la muestra asociada a datos genéricos, sin que se pueda identificar por medios razonables su identidad. En las investigaciones en las que se considere necesario para el desarrollo de las mismas, a propuesta



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE



SERVIZO
GALEGO
de SAÚDE | Xerencia Xestión Integrada
A Coruña

BIOBANCO A CORUÑA

del investigador responsable y previa autorización del comité de ética competente, podrán enviarse sus muestras codificadas (se mantendrá por el biobanco el vínculo que relaciona su identidad con la muestra cedida). A todos ellos se les exigirá que nos garanticen que trabajarán con el mismo nivel de protección de datos exigido por la normativa española.

El Biobanco A Coruña asume como propio todo lo descrito en los apartados previos de este documento en relación a la confidencialidad, los posibles hallazgos, etc.

El biobanco podrá repercutir únicamente los costes de obtención, procesado y envío de las muestras a los investigadores/instituciones que las solicitaron.

BIOBANCO A CORUÑA

TITULAR DIRECCIÓN CIENTÍFICA: Angel Concha López

TELÉFONO DE CONTACTO: 981 17 64 37. CORREO ELECTRÓNICO: BioBanco.CHUAC@sergas.es

CIERRE DEL BIOBANCO.-

De producirse un eventual cierre del biobanco o revocación de la autorización para su constitución y funcionamiento, la información sobre el destino de las muestras estará a su disposición en la página web del Biobanco y/o Centro Hospitalario http://www.inibic.es/inv_apoyo_biobanco.html y en el Registro Nacional de Biobancos para Investigación Biomédica del Instituto de Salud Carlos III (ISC III), con página web www.isciii.es, con el fin de que pueda manifestar su conformidad o disconformidad con el destino previsto para las muestras.

Muchas gracias por su colaboración.



CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PARTICIPANTE MAYOR DE EDAD

(Espacio para colocar la etiqueta con los datos del donante muestra)

Yo,..... *(Nombre y apellidos del participante manuscritos)* he leído la hoja de información y pude hacer todas las preguntas que consideré necesarias, y acepto participar en la Línea de investigación de Enfermedades Infecciosas con mis muestras y datos para que se utilicen en las condiciones que me han informado.

RESTRICCIONES DE USO (usted podrá indicarnos cruzando la correspondiente casilla las restricciones de uso que considere. En caso de no marcar ninguna casilla entenderemos que NO manifiesta ninguna condición de uso).

- NO autorizo a utilizar mis muestras y datos en investigaciones que
- NO autorizo a que consulten y obtengan información de mi historia clínica.
- NO acepto que contacten conmigo cuando sea necesario.
- NO quiero ser informado de los resultados de las investigaciones que sean de interés para mi salud.
- NO autorizo la cesión de mis muestras y datos de manera codificada (disociada).
- NO autorizo la cesión de mis muestras y datos fuera de la Unión Europea.
- NO autorizo el depósito en el **Biobanco A Coruña** de mis muestras y datos en las condiciones indicadas en la hoja de información

Si acepta que se contacte con usted cuando sea necesario, por favor indique su Teléfono / E-mail de contacto:

.....

Firma del participante

Identidad del participante:

Firma de la persona que informa

Identidad de la persona que informa:

Firma del testigo

Confirmando el consentimiento verbal del participante, el cual lo autoriza a firmar en su nombre

Identidad del testigo: DNI:

Solo se firmará en aquellos casos en los que el participante no pueda leer y/o escribir y delegue la firma en el testigo.

Firma del representante legal

Identidad representante legal: DNI:

Solo se firmará en aquellos casos en los que el participante esté incapacitado legalmente.

En, a de de

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina.



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE



SERVIZO
GALEGO
de SAÚDE | Xerencia Xestión Integrada
A Coruña

BIOBANCO A CORUÑA

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo, D./Dña: con DNI

Revoco / anulo el consentimiento prestado en fecha:

Y no deseo proseguir la donación voluntaria realizada al(nombre del Centro Sanitario), que doy con esta fecha por finalizada.

- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LAS MUESTRAS.
 SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES.
 La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.
 SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....

Yo, D./Dña: con DNI

En calidad de: (señale la opción aplicable a su caso)

- Testigo que firma en lugar
 Representante legal

de D./Dña: con DNI

Revoco / anulo el consentimiento prestado en fecha:

Y no deseo proseguir la donación voluntaria realizada al(nombre del Centro Sanitario), que doy con esta fecha por finalizada.

- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LAS MUESTRAS.
 SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES.
 La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.
 SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....

ANEXO II Hoja de Recogida de Datos

Variables epidemiológicas, clínicas y virológicas

Año de nacimiento

Nacionalidad

Género Hombre Mujer Transexual

Etnia

Peso

Altura

Fecha de diagnóstico VHC

Vía de transmisión VHC

Genotipo/subtipo VHC

ARN-VHC log₁₀ basal (UI/mL)

FibroScan (Kpa)

Grado de fibrosis (METAVIR)

Exposición previa a tratamiento VHC Si NoCo-infección VIH Si NoCirrosis Si NoDescompensación hepática Si NoTratamiento activo VHC Si NoVAR basales en la región NS5A Si No