



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

TESIS DOCTORAL

**Caracterización epidemiológica y
viroológica en pacientes con infección
crónica por el Virus de la Hepatitis C:
impacto en el tratamiento con antivirales
de acción directa**

Marta Grandal Fustes

A Coruña, 2019

Directores

Eva Poveda López

José Domingo Pedreira Andrade



La Dra. Eva Poveda López, investigadora principal del grupo de investigación Virología y Patogénesis del Instituto de Investigación Sanitaria Galicia Sur, y el Dr. José Domingo Pedreira Andrade, médico emérito del Servizo Galego de Saúde (SERGAS).

CERTIFICAN:

La presente memoria de tesis titulada "**Caracterización epidemiológica y virológica en pacientes con infección crónica por el Virus de la Hepatitis C: impacto en el tratamiento con antivirales de acción directa**", presentada por Dña. Marta Grandal Fustes, ha sido realizada bajo nuestra dirección y reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser defendida públicamente y optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste, firman el presente certificado en A Coruña, a 8 de Julio de 2019.

Fdo: Dra. Eva Poveda López

Fdo : Dr. José D. Pedreira Andrade

Fdo: Marta Grandal Fustes

(Doctorando)

"El hombre nunca sabe de lo que es capaz hasta que lo intenta."

Charles Dickens.

A mis hijos.

AGRADECIMIENTOS

La presentación de mi tesis doctoral es el culmen de muchos años de trabajo, dedicación, esfuerzo y tesón, en el que nunca me he sentido sola, sino más bien arropada por todas aquellas personas que me han acompañado durante este largo camino. A ellos, quisiera darles las gracias.

En primer lugar, quisiera agradecer profundamente a mis directores de tesis, la Dra. Eva Poveda y el Dr. José Domingo Pedreira, la oportunidad que me brindaron para realizar esta tesis doctoral así como la confianza que durante todos estos años han depositado en mí. A la Dra. Eva Poveda, que siempre me ha guiado, me ha apoyado, me ha escuchado, y me ha dado sus mejores consejos, como una madre hace con sus hijos, para ella mi más sincero agradecimiento. Como ella siempre dice, el trabajo duro tiene recompensa. Al Dr. José Domingo Pedreira, agradecerle la amabilidad y el respeto con el que siempre me ha tratado, a él gracias.

Por supuesto, quisiera dar gracias al Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) por financiar mi trabajo y darme la oportunidad de desarrollar esta tesis doctoral. Es un honor, en estos tiempos tan difíciles, recibir una financiación para poder realizar una tesis doctoral. Además, gracias a la otra parte que ha hecho posible este trabajo, los pacientes. Gracias por colaborar con la investigación, porque sin duda todo lo que hacemos, es para vosotros.

A mi compañero de batallas, el Dr. Andrés Tabernilla, le doy las gracias por todos los momentos vividos en este largo camino que estoy segura de que sin él no hubieran sido lo mismo. Juntos hemos trabajado codo con codo y aprendido tantas cosas... si de algo estoy segura es que no habría podido tener un compañero mejor a mi lado todos estos años. Te deseo lo mejor allá donde quiera que vayas, ahora que tú también comienzas una nueva etapa, pero si de algo estoy segura es que nuestra amistad perdurará para siempre.

Muchas gracias también a los demás miembros del grupo de Virología y Patogénesis, así como al resto de grupos integrantes del Instituto de Investigación Sanitaria Galicia Sur (IISGS). Gracias por habernos acogido en un momento tan complicado y hacernos sentir como en casa. Y por supuesto gracias a la Fundación

Biomédica Galicia Sur por todo el apoyo que me han dado, siempre dispuestos a ayudar con una sonrisa y la puerta abierta.

Mis más sentidas gracias a todos los integrantes del grupo de Virología Clínica de A Coruña. Quisiera agradecerles a cada uno de ellos las horas de trabajo compartidas. A la Dra. Berta Pernas, con la que he tenido la oportunidad de trabajar tan estrechamente, quisiera darle las gracias ayudarme a comprender ciertos aspectos de la clínica. Así, me ha acercado al mundo del paciente, haciéndome un poco más humana. Pero sobre todo gracias por ser una amiga y por estar siempre ahí cuando a uno le hace falta. A ti, que eres tan trabajadora, te deseo los mejores logros.

Mi más sentido agradecimiento a mis compañeros del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC). Les agradezco a todos los Grupos de Investigación, la amabilidad con la que siempre han resuelto mis dudas, que sin duda han sido muchas. Pero una mención aparte es para el grupo de Genómica, que lidera el Dr. Ignacio Rego, y con el que tanto he trabajado. Quisiera darles las gracias por estar siempre dispuestos a ayudarme, en especial a Sara. A mis amigos del laboratorio gracias a todos: Isabel Santamarina, María Moreno, la Dra. Rocío Castro, la Dra. Marta Varela, Adrián Lavaz, María Camacho, Bea Lema, Paula Juiz, la Dra. Paula Carpinteiro, la Dra. Raquel Gago, Laura Hermida, el Dr. Juan Fafián, el Dr. Ángel Soto... Todos ellos han hecho que este camino esté lleno de recuerdos felices. Sin olvidarme de ti mi querida amiga Noa Goyanes, gracias por todos los momentos a tu lado, por los desayunos, por las comidas al sol, por hacer los días tristes más alegre, gracias. No hay como un buen amigo para sentirse como en casa.

Quisiera dar las gracias también al resto de las entidades con las que he trabajado en el INIBIC, a la Fundación Profesor Novoa Santos, al Biobanco de A Coruña y al Servicio de Estadística del XXIAC, por todo el soporte prestado.

No podría terminar sin olvidarme de mi familia y amigos. A Alba Ferreira, Paula Porto, María Carril y Leila Alberte, gracias por mantener la amistad después de tantos años. A Chus y Andrea, les doy las gracias por estar ahí y por hacer los días tan divertidos entre niños, meriendas, berrinches y pañales.

A mis padres, que tanto os quiero, os doy las gracias por apoyarme siempre y por educarme con amor y humildad. Mi padre Fernando, mi ejemplo a seguir, con el que siempre he tenido una conexión especial, le doy las gracias por apoyarme en mi camino profesional aunque no fuera el que el anhelaba. A mi madre, mi súper madre, que puedo decir de una madre, no tengo palabras. Ahora puedo entender y entiendo, todos sus cuidados, todas sus riñas, todos sus temores. A los dos os quiero con todo mi corazón. A mi hermana, con la que tantas cosas he compartido, le doy las gracias por todos nuestros recuerdos. A mis cuñados y cuñadas, a mis sobrinos y sobrinas, que no son pocos, gracias por alegrarme la vida.

A Miguel, mi compañero de viaje, gracias por estar junto a mí en los buenos y en los malos momentos. Sé que nuestras profesiones pertenecen a mundos totalmente diferentes, pero, a pesar de ello, siempre has estado a mi lado para apoyarme. Lo que sentí cuando te conocí no puedo describirlo con palabras, solo puedo desear a tu lado un para siempre.

Y a las personas más importantes de mi vida, mis hijos Anaís y Martín, que han nacido durante el desarrollo de mi tesis doctoral les doy las gracias por ser mi luz. Cuando uno es madre, se inicia una nueva etapa en la que uno haría cualquier cosa por aquel pequeño ser. Ser madre significa dar todo tu corazón sin esperar nada a cambio, por tan sólo una sonrisa que lo cura todo. El amor de una madre es el más sincero, eterno e infinito. Ser madre no es un camino fácil, está repleto de horas de insomnio, de un sinfín de preocupaciones, de horas de purés, de meriendas, de baños, de cuidados... Pero también es un camino lleno de alegrías y de amor. A mis hijos solo puedo desearles que trabajen con ahínco y con esfuerzo para lograr alcanzar aquello que deseen en la vida. "Enseñarás a volar, pero no volarán tu vuelo. Enseñarás a soñar, pero no soñarán tu sueño. Enseñarás a vivir, pero no vivirán tu vida. Sin embargo... en cada vuelo, en cada vida, en cada duelo, perdurará siempre la huella del camino enseñado", *Madre Teresa de Calcuta*.

ÍNDICE

ÍNDICE	
LISTADO DE ABREVIATURAS	17
ÍNDICE DE FIGURAS	19
ÍNDICE DE TABLAS	21
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	9
1. Características del Virus de la Hepatitis C (VHC)	11
1.1. Estructura molecular del VHC	11
1.2. Ciclo replicativo del VHC	17
2. Epidemiología de la infección por VHC	19
2.1. Situación mundial de la infección por el VHC	19
2.2. Epidemiología molecular del VHC	22
2.2.1. Cuasiespecies virales	22
2.2.2. Genotipos del VHC	24
3. Historia natural de la infección por VHC	26
4. Tratamiento de la infección crónica por VHC	29
4.1. Objetivos del tratamiento	29
4.2. La era del interferón (IFN)	29
4.3. Los nuevos antivirales de acción directa (AADs)	31
4.4. Evolución de las indicaciones de tratamiento	36
4.5. Retos del tratamiento para los próximos años	37
5. Resistencia a los AADs	38
5.1. Definición de resistencia y factores que la influyen	38
5.2. Perfiles de resistencia por familia para los actuales AADs	39
5.2.1. Inhibidores de proteasa NS3	41
5.2.2. Inhibidores de NS5A	42
5.2.3. Inhibidores análogos de nucleótido de la polimerasa NS5B	43
5.2.4. Inhibidores no análogos de nucleósido de la polimerasa NS5B	43
5.3. Utilidad de estudios de resistencias en la práctica clínica	44
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	47
ESTUDIO 1. Caracterización de la infección crónica por VHC en el noroeste de España: impacto del Plan Estratégico para el Abordaje de la Hepatitis C (PEAHC) en el Sistema Nacional de Salud en la cura del VHC	51
MATERIALES Y MÉTODOS. ESTUDIO 1	53
1. Diseño y ámbito de estudio	55

2.	Sujetos de estudio	55
2.1.	Procesamiento de las muestras y obtención del plasma	56
2.2.	Extracción del ARN de las muestras de plasma	57
2.3.	Determinación del genotipo viral del VHC	58
2.4.	Interpretación de los resultados obtenidos	61
3.	Análisis estadístico	61
	RESULTADOS. ESTUDIO 1	63
1.	Características basales de la población de estudio	65
2.	Impacto del Plan Estratégico español y las características del tratamiento para el VHC	69
3.	Características de la población co-infectada VIH/VHC	70
4.	Respuesta viral sostenida en función de diferentes subgrupos	75
5.	Características de los pacientes que no alcanzaron respuesta viral sostenida	76
	ESTUDIO 2. Prevalencia de RASs en la región NS5A en pacientes con infección por VHC y genotipos 1a y 3: impacto en las estrategias terapéuticas actuales	79
	MATERIALES Y MÉTODOS. ESTUDIO 2	81
1.	Diseño, ámbito de estudio	83
2.	Sujetos de estudio	83
2.1.	Procesamiento de las muestras y obtención del plasma	84
2.2.	Extracción del ARN de las muestras de plasma	84
2.3.	Amplificación de la región NS5A	85
2.4.	Purificación de los productos de PCR	88
2.5.	Secuenciación de los productos	89
2.6.	Análisis de las secuencias	90
3.	Análisis estadístico	91
	RESULTADOS. ESTUDIO 2	93
1.	Características basales de la población de estudio	95
2.	Prevalencia de RASs basales clínicamente relevantes	97
3.	Impacto RASs basales en las pautas de tratamiento con AADs	98
4.	Evaluación de la respuesta al tratamiento de los pacientes con RASs basales	100
	DISCUSIÓN	101
	CONCLUSIONES	115
	BIBLIOGRAFÍA	119
	ANEXOS	135

LISTADO DE ABREVIATURAS

aa	aminoácido
AADs	antivirales de acción directa
Abs	absorbancias
ADNc	ADN complementario
ALT	alanina aminotransferasa
ARN	ácido ribonucleico
AST	aspartato aminotransferasa
BOC	boceprevir
CLDN	claudina-1
cop/mL	copias/mL
C-terminal	carboxi-terminal
D1	dominio 1
D2	dominio 2
D3	dominio 3
DCV	daclatasvir
DSV	dasabuvir
EBR	elbasvir
EC50	concentración mediana efectiva
EDTA	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>
EEUU	Estados Unidos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GAG	glucosaminoglucanos
GGT	gamma glutamil transpeptidasa
GLE	glecaprevir
GT1	genotipo 1
GT1a	genotipo 1a
GT1b	genotipo 1b
GT2	genotipo 2
GT3	genotipo 3
GT4	genotipo 4
GT5	genotipo 5
GT6	genotipo 6
GT7	genotipo 7
GZR	grazoprevir
IFN	interferón
IL-28B	interleuquina 28B
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Sites</i>
ISDR	<i>interferon sensitivity determining region</i>
kPa	kilopascales
LCS	<i>low complexity sequences</i>
LD	<i>lipid droplets</i>
LDLR	<i>low density lipoprotein receptor</i>
LDV	ledipasvir
log₁₀	logaritmo en base 10

MGB	<i>Minor Groove Binder</i>
mm³	milímetro cúbico
NANB	no A-, no B
nm	nanómetros
nt	nucleótidos
N-terminal	amino-terminal
OBV	ombitasvir
OCLN	occludina
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	<i>open reading frame</i>
pb	pares de bases
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PEAHC	Plan Estratégico para el Abordaje de la Hepatitis C
peg-IFN	interferón pegilado
PIB	pibrentasvir
PTV	paritaprevir
r	ritonavir
r.p.m.	revoluciones por minuto
RASs	<i>resistance associated substitutions</i>
RBV	ribavirina
RdRp	<i>RNA dependent RNA polymerase</i>
RER	retículo endoplasmático rugoso
RT-PCR	PCR de transcripción reversa
RVS	respuesta virológica sostenida
SERGAS	<i>Servizo Galego de Saúde</i>
SMV	simeprevir
SNS	Sistema Nacional de Salud
SOF	sofosbuvir
SR-B1	<i>scavenger receptor B1</i>
TAR	tratamiento antirretroviral
TVR	telaprevir
UI/mL	unidades internacionales/mililitro
UTR	<i>untranslated region</i>
VEL	velpatasvir
VHA	virus de la hepatitis A
VHB	virus de la hepatitis B
VHC	virus de la hepatitis C
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
VOX	voxilaprevir
X²	<i>test Chi cuadrado</i>
XXIAC	<i>Xerencia de Xestión Integrada de A Coruña</i>
XXIF	<i>Xerencia de Xestión Integrada de Ferrol</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del virión del VHC.	11
Figura 2. Estructura y organización del genoma del VHC y procesado de la poliproteína del virus.	13
Figura 3. Estructura de NS5A en la que se representan los tres dominios D1, D2 y D3; las regiones LCS y la α -hélice.	15
Figura 4. NS5A actuando como un soporte para otras proteínas en el complejo de replicación..	16
Figura 5. Ciclo viral del VHC.	17
Figura 6. Incidencia de la infección por VHC en la población general y por región.....	21
Figura 7. Representación esquemática de la formación de una nube de cuasiespecies virales.	23
Figura 8. Distribución mundial de los genotipos del VHC.	25
Figura 9. Historia natural de la infección por el VHC.	28
Figura 10. Antivirales de acción directa (AADs) aprobados actualmente en EEUU y Europa y sus dianas de acción.	32
Figura 11. Descripción de la evolución de la eficacia y los efectos adversos relacionadas con el tratamiento del VHC a lo largo de los últimos años, desde la terapia estándar con peg-IFN+RBV, pasando por las primeras combinaciones con AADs a las combinaciones actuales.....	34
Figura 12. Evolución de las terapias con AADs desde la aparición de la primera generación de inhibidores de proteasa de primera generación en 2011 hasta la actualidad.....	36
Figura 13. Principales posiciones en las que se localizan las RASs que se han descrito, en ensayos <i>in vitro</i> y/o seleccionadas o en pacientes que fallaron a las terapias, y que confieren una reducción en la susceptibilidad AADs (excluyendo los inhibidores de proteasa de primera generación BOC y TPV).	40
Figura 14. Distribución de los genotipos de los pacientes con infección crónica por VHC.	66
Figura 15. Distribución de la fibrosis hepática (atendiendo a la escala METAVIR) de los pacientes con infección crónica por VHC.	66
Figura 16. Distribución de las combinaciones de AADs utilizadas durante el tratamiento de la infección crónica por VHC.	70
Figura 17. Distribución de la duración del tratamiento con AADs en el tratamiento de la infección crónica por VHC.	70
Figura 18. Comparación del tiempo medio de infección entre la sub-población mono infectada por el VHC y la co-infectada VIH/VHC.	71
Figura 19. Comparación del tiempo medio de infección entre la sub-población mono infectada por el VHC y la co-infectada VIH/VHC.	72
Figura 20. Comparación de genotipos y subtipos entre la sub-población mono infectada por el VHC y la co-infectada VIH/VHC.	73
Figura 21. Comparación de la carga viral del VHC entre la sub-población mono infectada por el VHC y la co-infectada VIH/VHC..	73
Figura 22. Comparación del polimorfismo IL-28B entre la sub-población mono infectada por el VHC y la co-infectada VIH/VHC.	74
Figura 23. Comparación de los regímenes utilizados para el tratamiento del VHC entre la sub-población mono infectada por el VHC y la co-infectada VIH/VHC.....	75

Figura 24. Tasas de RVS en relación a factores del virus y del huésped: genotipo del VHC, fibrosis hepática, co-infección por VIH y exposición previa a tratamiento.	76
Figura 25. Tasas de RVS en relación a factores relacionados con el tratamiento frente al VHC: regimen de AADs y duración del tratamiento.....	77
Figura 26. Prevalencia de las características de los pacientes con impacto clínico en las RASs en los genotipos 1a y 3.....	96
Figura 27. Prevalencia de RASs basales clínicamente relevantes en los genotipos 1a y 3.	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. RASs clínicamente relevantes asociadas con resistencia a inhibidores de NS5A, agrupadas por régimen y genotipo.....	42
Tabla II. Características sociodemográficas, epidemiológicas, clínicas y virológicas de los pacientes con Hepatitis C crónica.	68
Tabla III. Cebadores empleados en la <i>RT-PCR</i> de la región NS5A en pacientes con VHC y G1a.	86
Tabla IV. Cebadores empleados en la <i>Nested PCR</i> de la región NS5A en pacientes con VHC y genotipos 1a y 3.	87
Tabla V. Características sociodemográficas, epidemiológicas, clínicas y virológicas de los pacientes con genotipos 1a y 3 incluidos en el estudio.	95
Tabla VI. Prevalencia de RASs basales a inhibidores de NS5A e implicaciones en las combinaciones con AADs.	99

RESUMEN

Resumen

La infección por el Virus de la Hepatitis C (VHC) es un problema grave de salud pública mundial, que actualmente afecta a más de 71 millones de personas en todo el mundo, y que lidera una significativa morbilidad y mortalidad. Desde la aprobación de los nuevos antivirales de acción directa (AADs), el paradigma de la infección por VHC ha cambiado. Los regímenes con AADs son ahora el nuevo estándar de tratamiento frente al VHC con tasas de respuesta virológica sostenida (RVS) de más del 90%, de corta duración y sin apenas efectos adversos asociados. Sin embargo, en un primer momento, sus elevados costes supusieron una limitación para ofrecer un tratamiento global a los pacientes con infección por VHC. Esta situación fue resuelta en mayo de 2015 cuando el Sistema Nacional de Salud (SNS) español publicó el Plan Estratégico para el Abordaje de la Hepatitis C (PEAHC) que establecía los criterios para la priorización del tratamiento con los nuevos AADs.

A pesar de las altas tasas de curación asociadas a los nuevos AADs superiores al 90%, existe todavía una proporción de pacientes entre un 2-10% que no alcanza una RVS. Entre las diferentes causas asociadas a esta falta de respuesta están numerosos factores como el grado de fibrosis hepática, la exposición previa a terapias con IFN, la carga viral, el genotipo viral o la presencia de mutaciones de resistencia (*RASs*) en regiones del genoma viral que son las dianas terapéuticas de los AADs (como NS5A). Además, las *RASs* generalmente se asocian a fracaso terapéutico cuando su presencia se combina con algunos de los demás factores relacionados con menores tasas de RVS. Todos estos factores han de tenerse en cuenta para optimizar la elección de tratamiento y su duración, con el fin de asegurar la mejor respuesta posible.

En este contexto, los objetivos de este trabajo fueron, en primer lugar, caracterizar el perfil de la infección crónica por VHC en el área sanitaria de A Coruña, y evaluar el impacto del PEAHC en el abordaje del tratamiento de la infección en esta población. En segundo lugar, los objetivos fueron evaluar la prevalencia de *RASs* basales en NS5A en pacientes con genotipo 1a (G1a) y genotipo 3 (G3), y evaluar los

beneficios de la realización de un estudio de resistencias para optimizar las estrategias terapéuticas disponibles.

Los resultados obtenidos en el primer estudio, señalaron que el perfil de la infección crónica por VHC en el área sanitaria de A Coruña se caracterizaba por una prevalencia mayoritaria en varones (76,2%) con una media de edad de $50 \pm 9,5$ años, donde la cirrosis hepática (28,7%) y la co-infección por VIH (60,9%) fueron frecuentes. A nivel virológico, el virus presentó cargas virales elevadas y el genotipo mayoritario fue el 1 (66,1%), subtipo 1a (41,5%), seguido del G3 (16,8%). Durante el año 2015 el 52,7% de los pacientes iniciaron tratamiento con una tasa de RVS global superior al 96%. No se observaron diferencias significativas entre esta RVS y factores relacionados con peor respuesta al tratamiento como cirrosis, co-infección por VIH, genotipo viral, o exposición previa a tratamiento. De los pacientes que iniciaron tratamiento el 72,9% fueron reconocidos como prioritarios para el tratamiento frente al VHC de acuerdo al PEAHC ($\geq F2$, trasplantados o con manifestaciones extrahepáticas), indicando que el PEAHC ha sido crítico para el avance en la cura frente al VHC en el área sanitaria de A Coruña.

Los resultados obtenidos en el segundo estudio, describieron en el área sanitaria de A Coruña una baja prevalencia de RASs en la región NS5A en pacientes con G1a y G3 (5,5% *versus* 0,0%) así como una alta proporción de pacientes con factores asociados a menores tasas de RVS (78,9% para G1a y 75,8% para G3). En consecuencia, las tasas de pacientes que combinaban estos factores con la presencia de RASs fueron bajas, por lo que en la gran mayoría de los pacientes (G1a más del 94% y G3 el 100%) el tratamiento podría optimizarse. Es decir, todos ellos podrían ser tratados con regímenes estándar de 12 semanas sin ribavirina (RBV). De esta forma se concluyó que el estudio de resistencias en determinadas poblaciones podría ser útil para optimizar las estrategias de tratamiento, lo que conlleva además un ahorro en los costes de las terapias para el SNS y una reducción de los efectos adversos asociados al uso de RBV.

Resumo

A infección polo Virus da Hepatite C (VHC) é un problema grave de saúde pública mundial, que actualmente afecta a máis de 71 millóns de persoas en todo o mundo, e que lidera unha significativa morbilidad e mortalidade. Desde a aprobación dos novos antivirais de acción directa (AADs), o paradigma da infección por VHC cambiou. Os réximes con AADs son agora o novo estándar de tratamento fronte ó VHC con taxas de resposta virolóxica sostida (RVS) de máis do 90%, de curta duración e sen apenas efectos adversos asociados. Sen embargo, nun primeiro momento, os seus elevados custos supuxeron unha limitación para ofrecer un tratamento global ós pacientes con infección por VHC. Esta situación foi resolta en maio de 2015 cando o Sistema Nacional de Saúde (SNS) español publicou un Plan Estratéxico para a Abordaxe da Hepatite C (PEAHC) que establecía os criterios para a priorización do tratamento cos novos AADs.

A pesar das altas taxas de curación asociadas ós novos AADs superiores ó 90%, existe todavía unha proporción de pacientes entre un 2-10% que non alcanza unha RVS. Entre as diferentes causas asociadas a esta falta de resposta están numerosos factores como o grao de fibrose hepática, a carga viral, o xenotipo viral ou a presenza de mutacións de resistencia (*RASs*) en rexións do xenoma viral que son as dianas terapéuticas dos AADs (como NS5A). Ademais, as *RASs* xeralmente asóciase a fracaso terapéutico cando a súa presenza combinase con algúns dos demais factores relacionados con menores taxas de RVS. Todos estes factores han de terse en conta para optimizar á elección do tratamento e a súa duración, co fin de garantir a mellor resposta posible.

Neste contexto, os obxectivos desde traballo foron, en primeiro lugar, caracterizar o perfil da infección crónica por VHC na área sanitaria de A Coruña, e avaliar o impacto do PEAHC na abordaxe do tratamento da infección nesta poboación. En segundo lugar, os obxectivos foron avaliar a prevalencia de *RASs* basais en NS5A en pacientes con xenotipo 1a (X1a) e xenotipo 3 (X3), e avaliar os beneficios da realización dun estudo de resistencias para optimizar as estratexias terapéuticas dispoñibles.

Os resultados obtidos no primeiro estudo, sinalaron que o perfil da infección crónica por VHC na área sanitaria da Coruña caracterizábase por unha prevalencia maioritaria en varóns (76,2%) cunha media de idade de $50 \pm 9,5$ anos, donde a cirrose hepática (28,7%) e a co-infección polo Virus da Inmunodeficiencia Humana (VIH) (60,9%) foron frecuentes. A nivel virolóxico, o virus presentou cargas virales elevadas e o xenotipo maioritario foi o 1 (66,1%), X1a (41,5%), seguido do X3 (16,8%). Durante o ano 2015 o 52,7% dos pacientes iniciaron tratamento cunha taxa de RVS global superior ó 96%. Non se observaron diferencias significativas entre esta RVS e factores relacionados con peor resposta ó tratamento como a cirrose, co-infección por VIH, xenotipo viral, ou exposición previa a tratamento. Dos pacientes que iniciaron tratamento o 72,9% foron recoñecidos como prioritarios para o tratamento fronte ó VHC de acordo ó PEAHC ($\geq F2$, trasplantados o con manifestacións extrahepáticas), indicando que o PEAHC foi crítico para o avance da cura fronte ó VHC na área sanitaria da Coruña.

Os resultados obtidos no segundo estudo, describiron na área sanitaria da Coruña unha baixa prevalencia de RASs na rexión NS5A en pacientes con X1a e X3 (5,5% *versus* 0,0%) así como unha alta proporción de pacientes con factores asociados a menores taxas de RVS (78,9% para X1a e 75,8% para X3). En consecuencia, as taxas de pacientes que combinaban estes factores coa presenza de RASs foron baixas, polo que na gran maioría dos pacientes (X1a mais do 94% e X3 o 100%) o tratamento podería optimizarse. É dicir, todos eles poderían ser tratados con réximes estándar de 12 semanas sen ribavirina (RBV). Desta forma concluíuse que o estudo de resistencias en determinadas poboacións podería ser útil para optimizar as estratexias de tratamento, o que conleva ademáis un aforro nos custos das terapias para o SNS e unha redución dos efectos adversos asociados ó uso da RBV.

Summary

Hepatitis C Virus (HCV) infection is an important healthcare problem affecting more than 71 million people worldwide, and can lead to significant morbidity and mortality. Since the approval of Direct Acting Antiviral agents (DAAs), the face of HCV infection has dramatically changed. DAAs combinations are the new standard of treatment for HCV with high sustained virological response (SVR) rates of more than 90%, with a short duration and almost without adverse events. Nevertheless, in the first stages, the high price of these medications has limited the spread of a global treatment to HCV infected patients. This situation was resolved in May 2015 when the Spanish National Health Service published a Strategic Plan that established the criteria for the prioritization of new DAAs treatments.

Despite the high cure rates associated with new DAAs greater than 90%, there are still a proportion of patients that range between 2-10% who do not reach SVR. Among the different causes associated with the lack of response there are several factors such as the degree of liver fibrosis, prior IFN-based therapy, viral load, viral genotype or the presence of resistant mutations (RASs) located in viral genome regions which are therapeutic targets of DAAs (like NS5A). Indeed, RASs are usually associated with therapeutic failure when they appear together with other factors related to lower rates of SVR. All of these factors must be taken into account to optimize treatment choice and treatment duration, in order to ensure the best patient response.

In this context, the objectives of this study were, at first, to characterize the chronic HCV infection profile in the healthcare area of A Coruña, and to evaluate the impact of the Spanish Strategic Plan in the treatment of this population. Secondly, the objectives were to assess the prevalence of baseline RASs in NS5A in patients with genotypes 1a (G1a) and 3 (G3), and to evaluate the benefits of performing a resistance study in order to optimize the current therapeutic strategies.

The results obtained in the first study, indicated that the profile of chronic HCV infection in the healthcare area of A Coruña was characterized by a major prevalence of males (76,2%) with a median age of 50 ± 9.5 years, where liver cirrhosis (28.7%) and

Human Immunodeficiency Virus (HIV) co-infection (60.9%) were frequent. At virological level, the virus presented high viral loads and the major genotype was 1 (66.1%), subtype 1a 41.5%, followed by G3 (16.8%). During 2015 the 52.7% of patients started treatment with an overall SVR rate higher than 96%. We did not observed significant differences between the SVR and other factors related to worse treatment response such as cirrhosis, HIV co-infection, viral genotype, or prior exposure to treatment. Of patients who initiated treatment, the 72.9% were recognized as priority according to the Spanish Strategic Plan (\geq F2, transplanted or with extrahepatic manifestations), indicating that this Plan has been critical for the advance in the cure against HCV in the healthcare area of A Coruña.

The results obtained in the second study, described in the healthcare area of A Coruña a low prevalence of RASs in NS5A region in patients with G1a and G3 (5.5% versus 0.0%) as well as a high proportion of patients with other factors related to lower SVR rates (78.9% for G1a and 75.8% for G3). As a result, the rates of patients harboring NS5A RASs in combination with the other factors were low, so in the vast majority of patients (G1a more than 94% and G3 100%) treatment could be optimized. Hence, all of them could be treated with standard treatments of 12 weeks without ribavirin (RBV). In conclusion, resistance studies in specific HCV-infected populations might be useful to optimize current NS5A-based therapies, so it might afford costs to the healthcare systems and it also might avoid the adverse effects related to the use of RBV.

INTRODUCCIÓN

1. Características del Virus de la Hepatitis C (VHC)

1.1. Estructura molecular del VHC

El Virus de la Hepatitis C (VHC) es la principal causa de las enfermedades hepáticas en todo el mundo. El virus fue originalmente reconocido por Feinstone y colaboradores a mediados de la década de los 70, cuando describieron que la mayoría de los casos de hepatitis asociadas a transfusiones no estaban asociadas al virus de la hepatitis A (VHA) ni al virus de la hepatitis B (VHB), por lo que éste fue denominado como el principal agente causal de las hepatitis conocidas como no A-, no B (NANB) ¹. En 1989, Houghton y colaboradores identificaron y caracterizaron el VHC ^{2,3}.

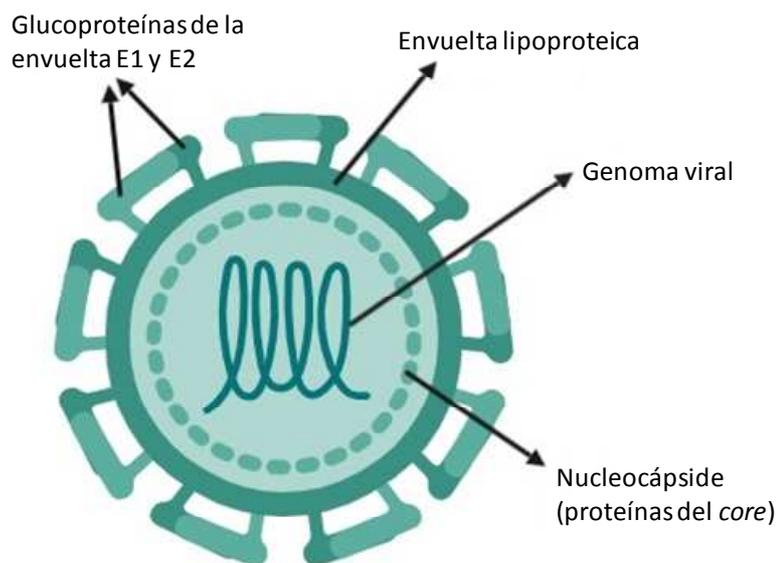


Figura 1. Estructura del virión del VHC.

El VHC es un virus hepatotrofo miembro del género *Hepacivirus* y que pertenece a los virus de la familia *Flaviridae* ⁴. Los viriones del VHC son partículas pequeñas, con forma esférica, de unos 50-60 nanómetros (nm) de diámetro. Estructuralmente (**Figura 1**) el VHC es un virus con envuelta. Esta envuelta contiene dos glucoproteínas virales E1 y E2 implicadas en la entrada del virus en las células

huésped. En su interior, una nucleocápside icosaédrica formada por múltiples copias de la proteína del *core* alberga el genoma viral.

El genoma del VHC está formado por una única cadena monocatenaria de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad positiva de aproximadamente 9.600 nucleótidos (nt) de longitud. Presenta un único marco de lectura abierto (*open reading frame, ORF*) que codifica para una única poliproteína precursora de unos 3.000 aminoácidos (aa). La región de ARN codificante está flanqueada por dos zonas no codificantes (*untranslated region, UTR*), que resultan clave para el proceso de replicación. La región 5'-*UTR* se encuentra altamente conservada y actúa como lugar de entrada del ribosoma (*Internal Ribosome Entry Sites, IRES*) desde el cual se puede iniciar la síntesis proteica. Además, contiene señales de replicación esenciales para la síntesis de intermediarios que servirán como moldes para la replicación viral. La región 3'-*UTR* presenta mayor variabilidad en relación a los diferentes genotipos virales y participa en el inicio de la replicación de la cadena de polaridad negativa y en la unión con ciertas proteínas celulares. Estructuralmente, esta región consta de 3 partes: una primera región de longitud variable de unos 30-40 nt, una cola poli-U/UC también de longitud variable y una secuencia terminal de 98 nt muy conservada denominada 3'X⁵.

La poliproteína precursora es co-traducciona y post-traduccionalmente procesada por enzimas del huésped y por enzimas virales, dando lugar a tres proteínas estructurales (*core*, E1 y E2), a la proteína p7 y a seis proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) (**Figura 2**). En primer lugar, las proteínas estructurales son aquellas que forman parte de la partícula viral, e incluyen a la proteína del *core* y a las glucoproteínas transmembrana E1 y E2. La proteína del *core*, formada por 191 aa, representa la región más conservada y se sitúa en el extremo amino-terminal (N-terminal) a continuación del *IRES*. Su función principal es la de formar la cubierta de la cápside que albergará y protegerá el ARN genómico del virus. Además, la proteína del *core* también modula muchas otras rutas del huésped al interactuar con una gran variedad de factores celulares como por ejemplo la apoptosis, la transcripción de genes, la respuesta inmunitaria, etcétera^{6,7}. Por su parte, las dos glucoproteínas de la envuelta, E1 y E2, se caracterizan por presentar una amplia variabilidad genética, sobre

todo en las regiones hipervariables HVR1 y HVR2, y su función es la de presentarse en la superficie de los viriones como un heterodímero que media en la unión viral con receptores de las células huésped facilitando la fusión y la entrada del virus ⁸.

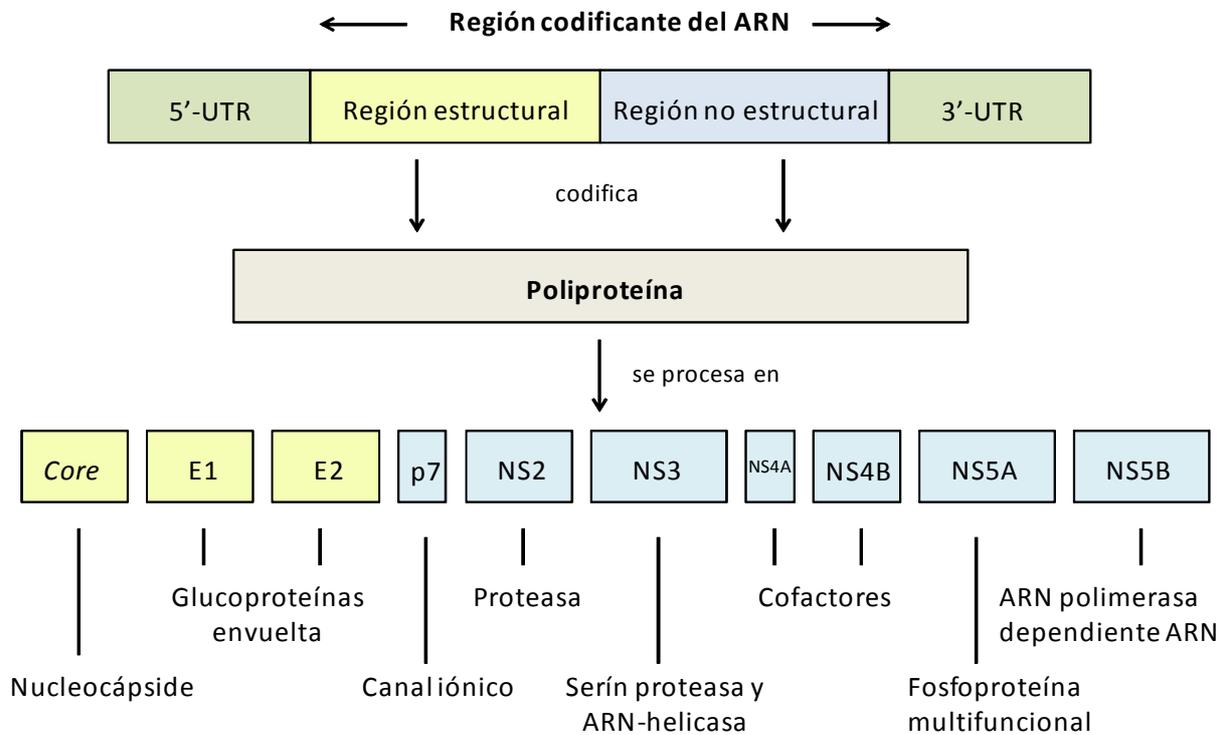


Figura 2. Estructura y organización del genoma del VHC y procesado de la poliproteína del virus.

En segundo lugar, la región entre los genes estructurales y no estructurales codifica para una proteína de canal iónico denominada p7 o viroporina. Esta proteína no es necesaria para la replicación del ARN y su función precisa es desconocida, aunque estudios recientes indican que está implicada en el ensamblaje viral y en la liberación de partículas infecciosas ⁹⁻¹¹.

En tercer lugar, las proteínas no estructurales son aquellas que están implicadas en el procesamiento de la poliproteína y en la replicación viral. Estas son NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B.

La proteína NS2 tiene actividad proteasa en su dominio carboxi-terminal (C-terminal) que se ve reforzada junto con el dominio N-terminal de NS3, y cuya función es la escisión de la unión del complejo NS2/NS3, liberando así a la proteína NS3 totalmente funcional ¹².

La proteína NS3 tiene múltiples funciones y presenta actividad serín-proteasa en su extremo N-terminal y ARN-helicasa/NTPasa en el extremo C-terminal. La actividad serín-proteasa es la responsable de romper todas las uniones restantes entre las demás proteínas que hay corriente abajo de la poliproteína. Por su parte, la actividad helicasa es la responsable de desenrollar el molde de ARN durante la replicación del genoma viral ^{13,14}.

La proteína NS4A se une al dominio proteasa de NS3 y actúa como un cofactor esencial para la actividad serín-proteasa de NS3.

La proteína NS4B es una proteína integral transmembrana que participa en la formación de la red membranosa, una estructura intracelular de membranas donde se sugiere que tiene lugar la replicación del ARN ¹⁵.

La proteína NS5A, está compuesta por 447 aa, y su importancia radica en sus múltiples funciones. Ésta juega un papel esencial en el ciclo viral del VHC, tanto por afectar directamente a la replicación del ARN viral como por modular la fisiología de la célula huésped para favorecer así la replicación viral. Por su parte, no tiene actividad enzimática conocida pero es probable que ejerza sus funciones a través de interactuar con factores virales y celulares ¹⁶⁻¹⁸. Además, NS5A juega un papel importante en la evasión de la respuesta inmune innata, ya que contiene la llamada región determinante de la sensibilidad al interferón (IFN) (*interferon sensitivity determining region, ISDR*). La *ISDR* se ha correlacionado con la eficacia del tratamiento con IFN, aunque este hallazgo sigue siendo controvertido ¹⁹. Estructuralmente, NS5A está formada por tres dominios distintos, los dominios 1 (D1), 2 (D2), y 3 (D3); separados por dos secuencias de baja complejidad (*low complexity sequences, LCS*) (**Figura 3**). Además, en su extremo N-terminal, NS5A forma una α -hélice anfipática que regula la unión de la proteína a membranas celulares. El D1 (aa 36-213) y el D2 (aa

250-342) están involucrados principalmente en la replicación del ARN, mientras que el D3 (aa 356-447) es esencial para el ensamblaje de partículas virales infecciosas, probablemente interactuando con la proteína del *core* en las gotas lipídicas (*lipid droplets, LD*)²⁰⁻²². Los estudios de cristalografía realizados en el D1 han revelado un dominio de unión de zinc que estabiliza el D1 para su correcta función. Además, este dominio puede adoptar dos conformaciones homodiméricas distintas que pueden atribuirse a sus diferentes funciones en el ciclo viral. Estas conformaciones se denominan "dímero en forma de garra" y "dímero espalda con espalda". La arquitectura del D1 en "forma de garra" ha sido propuesta como un canal, que podría ser una especie de "rail ferroviario" por el que el ARN se anclaría y se deslizaría, y que podría estar involucrado en la unión al ARN a las membranas intracelulares protegiéndolo de la degradación así como de ser percibido por receptores de reconocimiento²³ (**Figura 4**).

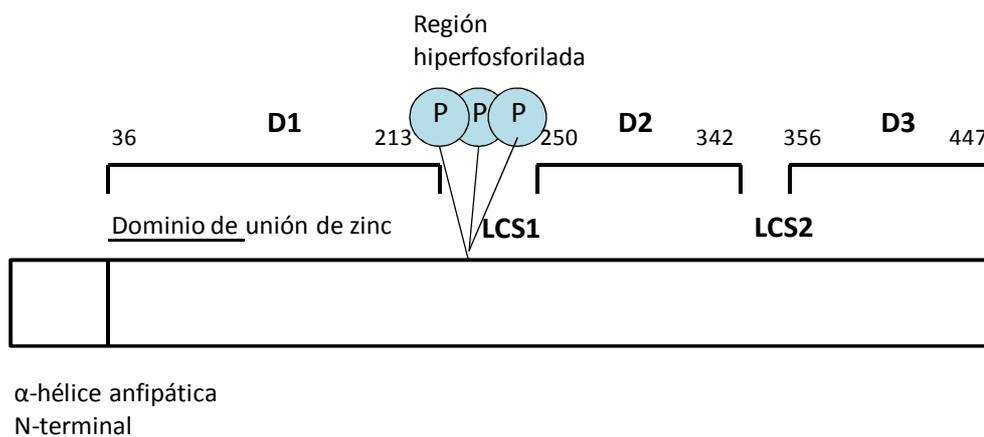


Figura 3. Estructura de NS5A en la que se representan los tres dominios D1, D2 y D3; las regiones LCS y la α -hélice.

Además, se ha descrito la existencia de otra posible forma de regulación de la proteína, relacionada con la presencia de un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína 142 y 190. El papel clave de NS5A radica en esta habilidad de dimerizarse/multimerizarse, unirse al ARN e interactuar con otras proteínas virales y celulares implicadas en la replicación viral. Además, NS5A es una fosfoproteína que presenta dos isoformas, es decir, puede encontrarse en una conformación basal o en

una conformación hiperfosforilada (denominadas p56 y p58, respectivamente). Esta hiperfosforilación parece actuar, de nuevo, como un botón que regula las diferentes funciones de la proteína y se produce en las partes centrales y C-terminales de la proteína a través de residuos de serina.

NS5B es la enzima responsable de la replicación del ARN vía síntesis *de novo* de una cadena negativa de ARN complementaria, que actúa como un intermediario de la replicación, y la posterior síntesis de una cadena positiva de ARN empleando como molde la cadena de ARN negativa. Esta enzima, compuesta de 591 aa, es una polimerasa dependiente de ARN (*RNA dependent RNA polymerase, RdRp*). Estructuralmente, está formada por un dominio catalítico en el extremo N-terminal (530 aa), una unión (40 aa) y un anclaje de membrana C-terminal (21 aa). Además, NS5B forma una estructura típica de polimerasa de "mano derecha" con el centro catalítico en la "base de la palma", rodeado por los clásicos dominios de los "dedos" y el "pulgar" ²⁴. Estos dominios, rodean completamente el centro activo creando un canal para la unión a la cadena molde.

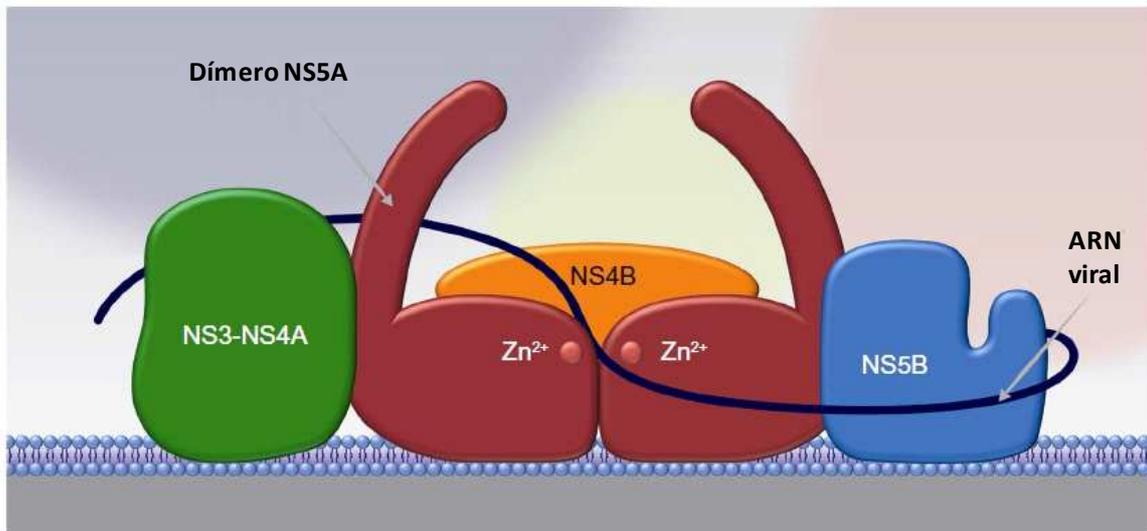


Figura 4. NS5A actuando como un soporte para otras proteínas en el complejo de replicación. Adaptada de Janardhan y colaboradores, 2015.

1.2. Ciclo replicativo del VHC

El VHC replica principalmente en los hepatocitos y todo este proceso tiene lugar en el citoplasma celular, por lo que el genoma viral no presenta fase de integración en el núcleo. También se ha descrito la presencia del VHC en otros compartimentos o tipos celulares como es el caso del sistema nervioso central, las células mononucleares de sangre periférica o las células dendríticas²⁵⁻²⁷.

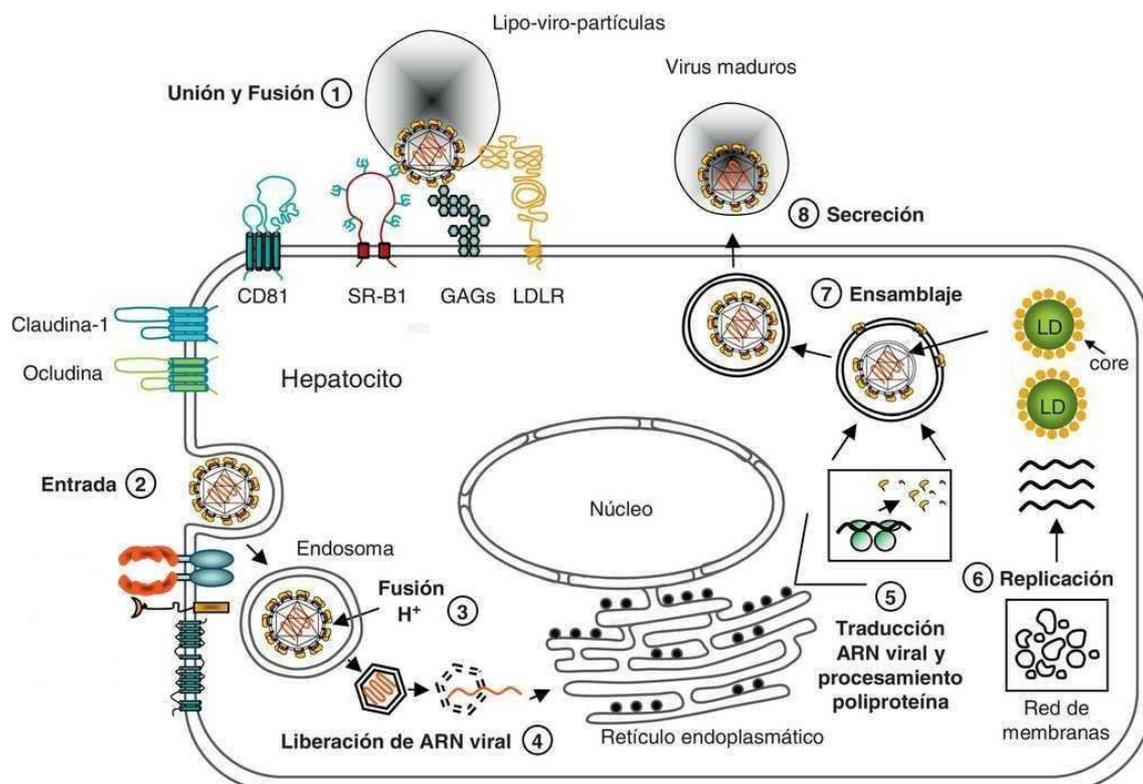


Figura 5. Ciclo viral del VHC.

1) Interacción del virión con la membrana celular mediado por unión secuencial a varios receptores de membrana como GAG, LDLR, SR-B1, tetraspanina CD81, claudina-1 y ocludina. 2) Entrada del virión en el hepatocito dependiente de clatrina. 3) Fusión de la envuelta de la membrana del endosoma con la envuelta viral, proceso mediado por la acidificación del endosoma. 4) Descapsidación y liberación del ARN viral. 5) Traducción del ARN viral y procesamiento de la poliproteína. 6) Replicación del ARN viral en el complejo de replicación asociado a la red membranosa. 7) Formación de la cápside y ensamblaje de los nuevos viriones alrededor de las LD. 8) Liberación de los nuevos viriones por la vía de secreción celular. Adaptado de Koutsoudakis y colaboradores, 2013.

Las partículas virales circulan por la sangre libres o asociadas a lipoproteínas. El contacto del virus con la célula se produce por contacto directo con la superficie basolateral de los hepatocitos. El mecanismo por el cual el VHC alcanza el citoplasma del hepatocito e inicia la replicación no se conoce con precisión. La interacción inicial del virión con la membrana celular de la célula hospedadora está mediada por las proteínas de la envuelta E1 y E2 y la interacción de estas con varios receptores de la superficie celular como es el caso de glucosaminoglucanos (GAG) y/o de receptores de lipoproteínas de baja densidad (*low density lipoprotein receptor, LDLR*). Una vez el virión se ha unido a la superficie, estos receptores transfieren el virus a otros receptores de entrada de alta afinidad como el *SR-B1 (scavenger receptor B1)*²⁸ y la tetraspanina CD81²⁹; y las proteínas de las uniones estrechas, claudina-1 (CLDN)³⁰ y ocludina (OCLN)³¹ (**Figura 5, paso 1**). La interacción con estos receptores celulares produce cambios en la estructura de la membrana del hepatocito que inducen una endocitosis del virus a través de una vesícula (endosoma) en un sistema dependiente de clatrina (**Figura 5, paso 2**). Una vez el virus se encuentra en el citoplasma, se produce la descapsidación y la liberación del ARN viral. Esto se produce por la presencia de un pH ácido en el endosoma que genera la fusión de la envuelta del virus con la membrana del endosoma (**Figura 5, pasos 3 y 4**)³². Una vez en el citoplasma, este ARN es traducido a nivel del retículo endoplasmático rugoso (RER). En este proceso el ribosoma interacciona con el *IRES* dando lugar a una única poliproteína que es procesada por proteasas celulares y virales (proteasa NS2-3 y serín-proteasa NS3-4A) (**Figura 5, paso 5**). Las proteínas virales maduras van a quedarse fuertemente unidas a membranas intracelulares formando así el complejo de replicación, un complejo multiproteico en donde tiene lugar la copia del material genético (**Figura 5, paso 6**). El ARN de polaridad positiva es copiado en un ARN complementario de polaridad negativa, que a su vez sirve de molde para la síntesis de nuevas cadenas positivas de ARN que formarán el ARN genómico de la progenie viral. Las nuevas copias de ARN interactúan con proteínas del *core* formando la nucleocápside que adquirirá su envuelta en el lumen del RER (**Figura 5, paso 7**). Una vez ensamblados los nuevos viriones, estos serán liberados a través de la vía secretora de la red de Golgi (**Figura 5, paso 8**). La exportación de los viriones fuera de la célula, a día de hoy

continúa siendo un tema poco conocido, en el que parecen jugar un papel importante las *LD*, el RER y las vías de secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (*very low density lipoprotein, VLDL*)³³.

2. Epidemiología de la infección por VHC

2.1. Situación mundial de la infección por el VHC

La epidemia por el VHC representa un problema grave de salud pública mundial. Actualmente, y según el último informe presentado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2018³⁴, se estima que en el mundo hay 71 millones de personas con infección por VHC, aproximadamente el doble del número de personas que viven con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), lo que representa una prevalencia global de en torno al 1%³⁵. Además, las últimas estimaciones señalan que cada año mueren unas 399.000 personas debido a las complicaciones derivadas de esta infección como la cirrosis o el hepatocarcinoma. Actualmente, el VHC es una de las principales causas de trasplante hepático en Europa y Estados Unidos (EEUU)^{36,37}. Mientras que la mortalidad asociada a otras infecciones como la infección por VIH está en retroceso, la mortalidad asociada al VHC todavía está en alza. Además, una gran parte de la población con infección por VHC lo desconoce debido a que en la mayoría de los casos la infección presenta un período asintomático de varios años hasta que se presentan los síntomas clínicos cuando el paciente ya se encuentra en un estadio avanzado de la enfermedad.

A nivel global, la distribución del VHC es muy heterogénea y su prevalencia varía según el área geográfica y los diferentes grupos de riesgo (**Figura 6**). Según la OMS, las regiones más afectadas son las del mediterráneo oriental y Europa, con una prevalencia que varía entre el 2,3% y el 1,5%, respectivamente. La región del mediterráneo oriental donde se describe una mayor prevalencia de VHC, es la que

tradicionalmente abarca el suroeste de Asia y regiones del norte de África, incluyendo a Egipto. En la actualidad, Egipto es considerado como el país de mayor prevalencia de infecciones por VHC en el que se estima que el 14,7% de la población es seropositiva para el virus ³⁸. En esta región del mediterráneo oriental, la principal causa de transmisión son las infecciones que tienen lugar en el ámbito sanitario por prácticas no seguras ^{39,40}. Sin embargo, en la región europea, el uso de drogas por vía intravenosa (usuarios de drogas por vía parenteral, UDVP) representa el mayor número de infecciones ⁴¹. En otras regiones, la prevalencia de la infección por VHC oscila entre el 0,5% y el 1,0%.

A nivel europeo, la prevalencia del VHC oscila entre los diferentes países, encontrándose las tasas de prevalencia más elevadas (superiores al 2%) en los países del sur de Europa, como es el caso de Italia, Rumanía, Grecia o España ⁴². En España, se han realizado diversos estudios con el objetivo de evaluar la prevalencia del VHC. En el año 2015, los datos disponibles estiman una prevalencia en torno al 1,7% para población seropositiva con anticuerpos frente al VHC y en torno al 1,2% para aquellos con una infección activa, lo que se correspondería en valores absolutos de un total de 688.000 adultos con anticuerpos y 472.000 adultos con viremia ^{43,44}. Según los últimos datos presentados en el Plan Estratégico para el Abordaje de la Hepatitis C (PEAHC) por el Sistema Nacional de Salud (SNS) en octubre de 2018, entre enero de 2015 y octubre de 2018, en España 117.452 pacientes fueron tratados frente al VHC ⁴⁵. Estudios recientes han descrito que la prevalencia actual del VHC actualmente es menor a al anteriormente indicada, situando la prevalencia de anticuerpos frente al VHC en torno al 1,1% y de pacientes con una infección activa inferior al 1%⁴⁶. Los últimos datos reportados por el Ministerio de Sanidad en Octubre de 2018 van más allá todavía, situando la prevalencia de anticuerpos frente al VHC en torno al 0,8% y del 0,17% para una infección activa. Según esto, actualmente el número de personas en España que presentaría una infección activa por VHC en torno a las 70.000 personas.



Incidencia de la infección por VHC

Región OMS	Color mapa	Tasa de incidencia (por 100.000)		Número total	
		Estimación	Intervalo	Estimación	Intervalo
Región africana		31,0	22,5-54,4	309	222-544
Región americana		6,4	5,9-7,0	63	59-69
Región mediterráneo oriental		62,5	55,6-62,5	409	363-246
Región europea		61,8	50,3-66,0	565	460-603
Región sudeste de Asia		14,8	12,5-26,9	287	243-524
Región Pacífico occidental		6,0	5,6-6,6	111	104-124
Global		23,7	21,3-28,7	1.751	1.572-2.120

Figura 6. Incidencia de la infección por VHC en la población general y por región. Adaptado de World Health Organization (WHO), 2018.

La transmisión del VHC se produce principalmente por exposición a sangre infectada. Los principales grupos de riesgo incluyen receptores de transfusiones sanguíneas o hemoderivados previos a 1992, el uso de drogas intravenosas, pacientes en hemodiálisis, trasplantados de órganos de donantes infectados; y en menor medida, exposición ocupacional, exposición en el hogar, realización de tatuajes o piercings, la realización de actividad sexual de riesgo, el nacimiento a través de una madre infectada y el uso de cocaína intranasal. Ya que comparte rutas de transmisión con el VIH, las tasas de co-infección entre ambos virus son elevadas. Esta población co-

infectada VIH/VHC es más vulnerable debido a que, generalmente, la progresión de la enfermedad se acelera.

2.2. Epidemiología molecular del VHC

2.2.1. Cuasiespecies virales

Al igual que la mayoría de los virus ARN, el VHC es un virus que se caracteriza por poseer una elevada variabilidad genética. Esta heterogeneidad se produce a diferentes niveles entre las poblaciones virales de un individuo infectado en un momento dado (cuasiespecies), y a nivel mundial entre variantes virales de diferentes pacientes (genotipos, subtipos y variantes virales). La principal fuente de variación del VHC se basa en el proceso de mutación espontánea y se debe a que la ARN polimerasa dependiente de ARN codificada por el gen NS5B, enzima encargada de la replicación del material genético del virus, es propensa a cometer errores y además carece de actividad correctora (se estima que la tasa de mutación de esta ARN polimerasa es de 10^{-4} sustituciones/nucleótido/ronda de replicación)^{47,48}. Como resultado, se producen cambios aleatorios a nivel nucleotídico en el genoma viral. Esta característica combinada con la alta tasa de replicación del virus (alrededor de 10^{12} viriones/día) y su corta vida media (2-5 horas), desembocan en una producción significativa de múltiples variantes virales o cuasiespecies.

El concepto de cuasiespecies virales (también conocido como nube de mutantes o nube de cuasiespecies) (**Figura 7**) actualmente se define como una mezcla de genomas virales distintos pero muy relacionados entre sí (con una homología del 98%) y que co-existen en un momento dado en el organismo *in vivo*⁴⁹⁻⁵². Cada variante viral emerge durante proceso de mutagénesis aleatoria y después, es sujeta a un proceso de selección basado en el efecto de la mutación en la capacidad de replicación en el ambiente global (definida como *fitness* viral). En un momento dado, la

distribución de las poblaciones virales en el organismo refleja un equilibrio entre la capacidad replicativa o *fitness* de cada variante, la generación continua de nuevas variantes y la presión selectiva positiva aplicada por el ambiente ⁵³.

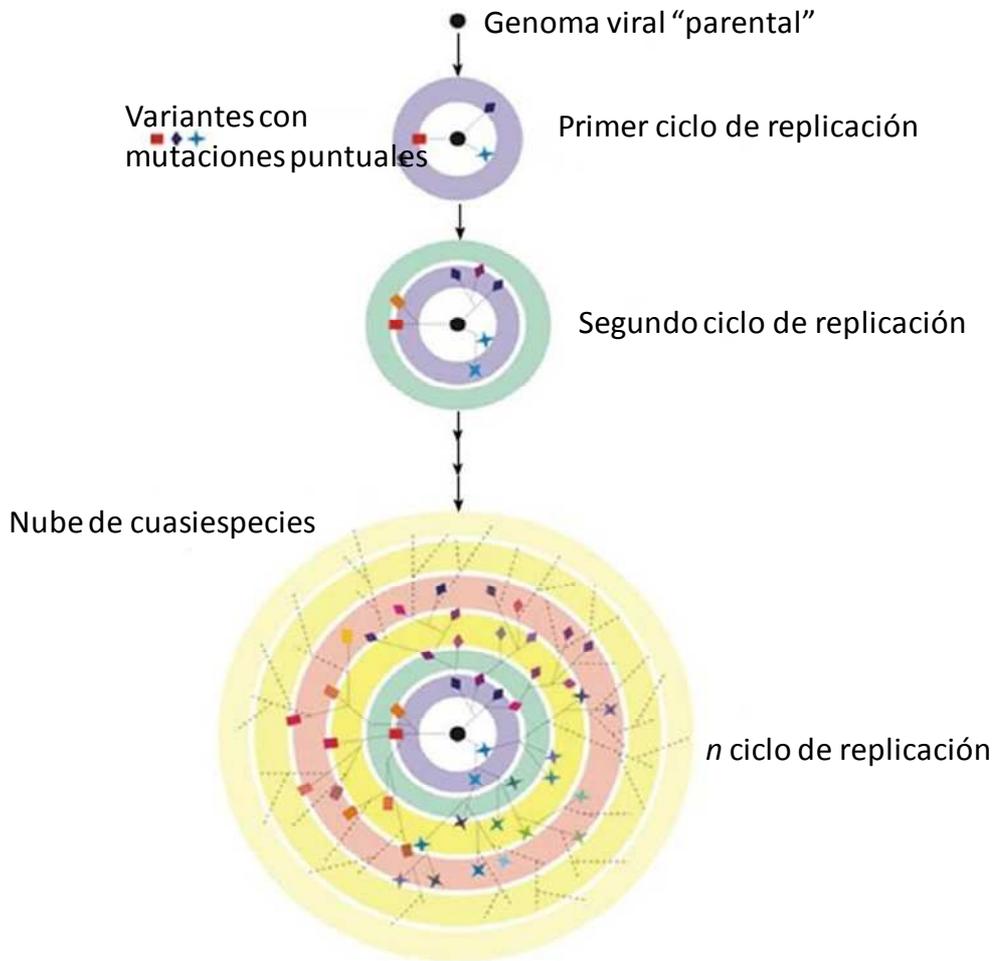


Figura 7. Representación esquemática de la formación de una nube de cuasiespecies virales. El genoma "parental" (círculo negro) da lugar a diferentes variantes (coloreadas con cuadrados, rombos y estrellas) unidas unas a otras por una mutación puntual. Los círculos concéntricos representan los ciclos de replicación. Adaptado de Echeverría y colaboradores, 2015.

Un aspecto importante del concepto de cuasiespecies es que estos mutantes actúan como una unidad de selección y no como poblaciones aisladas que pudieran actuar independientemente unas de otras. Esto es debido a que se produce un equilibrio entre las interacciones positivas y negativas de las diferentes poblaciones

virales ⁵³. Generalmente, existe una secuencia dominante que es la más frecuentemente representada en la población. Esta secuencia dominante se conoce como virus salvaje o *wild-type*. Clásicamente, se asume que la secuencia dominante es la mejor adaptada al ambiente en el que se observa aunque esta puede cambiar a lo largo del curso de la infección bajo la presión selectiva que ejerce el sistema inmune del hospedador. Se cree que esta deriva genética proporciona un mecanismo por el cual el VHC escapa a la respuesta inmune del hospedador y que puede influenciar la respuesta a las terapias ⁵⁴.

La variabilidad genética del VHC no se distribuye por igual en todas las áreas del genoma. Las regiones del genoma que corresponden con funciones virales esenciales (como aquellas implicadas en la traducción o la replicación) o aquellas que forman parte de dominios estructurales principales (5'-*UTR* y 3'-*UTR*) son las más conservadas, así como la proteína del *core*. La región más variable del genoma es aquella que se encuentra en la región que codifica para los genes de las glucoproteínas de la envuelta E1 y E2 concretamente en las zonas hipervariables conocidas como HVR1 y HVR2 ^{55,56}. Esta característica tiene implicaciones en la patogenia y persistencia del virus, en el diseño de vacunas, en la selección de mutantes resistentes durante el tratamiento, y en el diseño e interpretación de los métodos diagnósticos.

2.2.2. Genotipos del VHC

Los análisis filogenéticos de las cepas del VHC han permitido clasificar el virus en grupos genéticamente distintos llamados genotipos. Estos genotipos son el resultado de la acumulación de mutaciones durante la evolución de estos virus y presentan entre sí una homología del 65-70%. Además, cada uno de estos genotipos está a su vez dividido en subtipos, los cuales presentan una homología del 75-80% y son designados por letras (1a, ab, 2a, 2b, 3a, etcétera). Incluso dentro de los subtipos, diferentes variantes virales pueden variar hasta un 10%. En 2014, Smith y colaboradores confirmaron la existencia de

7 genotipos principales, denominados del 1 al 7 según el orden de descubrimiento; y 67 subtipos⁵⁷. Estudios posteriores han confirmado subtipos adicionales⁵⁸⁻⁶⁰.

El impacto que tienen los genotipos en la evolución de la infección a largo plazo parece ser mínimo. Así, todos ellos se han asociado con enfermedades hepáticas severas, aunque los pacientes con genotipo 3 (G3) podrían tener una mayor tendencia a desarrollar esteatosis hepática⁶¹. Está bien documentado el impacto que clásicamente ha tenido el genotipo en la respuesta a las terapias clásicas basadas en IFN, siendo los genotipos 1 (G1) y 4 (G4) los que mostraban peores tasas de respuesta⁶². Sin embargo, en el contexto de las nuevas terapias actuales frente al VHC, el G3 se ha convertido en el genotipo más difícil de tratar^{63,64}.

Aunque los seis genotipos principales (1-6) se han descrito en todo el mundo, hay claras diferencias en su distribución geográfica (**Figura 8**). Los genotipos 1 y 3 son los más prevalentes, contabilizando respectivamente el 46,2% y 30,1% de las infecciones en todo el mundo, seguidos del genotipo 2 (G2) (9,1%), el 4 (8,3%) y el 6 (G6) (5,4%). Se estima que el genotipo 5 (G5) es responsable de menos de un 1% de los casos⁶⁵. En cuanto al G1, a nivel global el subtipo 1b (G1b) es el más prevalente representando el 68% de las infecciones por G1.

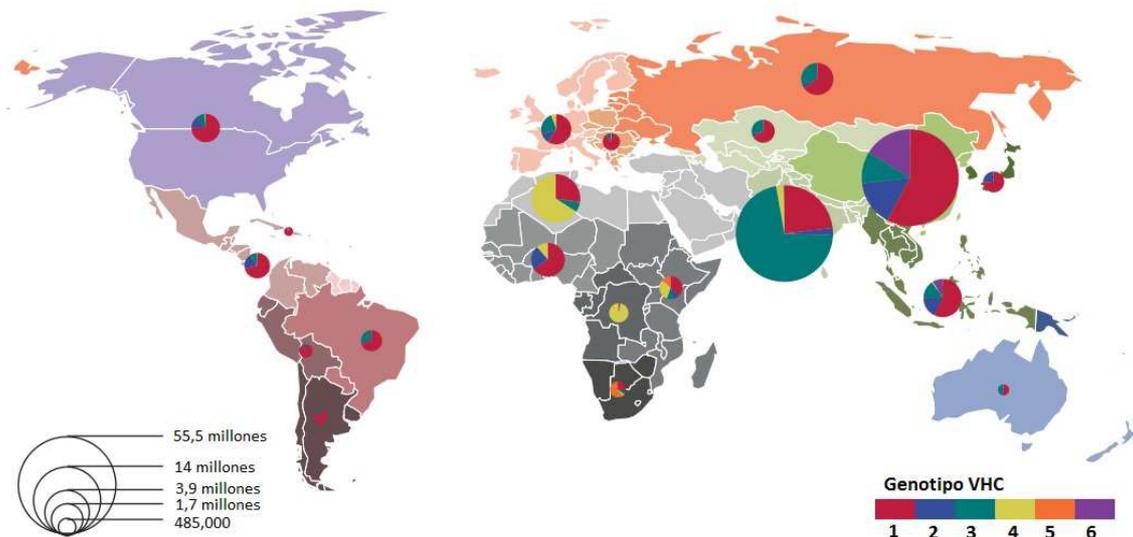


Figura 8. Distribución mundial de los genotipos del VHC. Adaptado de World Health Organization (WHO), 2018.

El patrón de distribución de estos genotipos ha estado influenciado por su diferente epidemiología así como por los eventos históricos y las actuales migraciones humanas ^{65,66}. Los subtipos 1a, 1b, 2a y 3a, también conocidos como "subtipos epidémicos", se encuentran ampliamente distribuidos por todo el mundo, aunque con diferencias según el área geográfica, siendo el G1 el que presenta una distribución más cosmopolita y contabilizando la mayor parte de las infecciones en Norteamérica, América latina y Europa ⁶⁵. Estos genotipos epidémicos probablemente se expandieron en la década de 1970 y 1980, previamente al cribado del VHC, a través de transfusiones, productos contaminados, así como por el consumo de drogas intravenosas ^{57,67-69}. Los demás genotipos, las llamadas cepas endémicas, son más raros y se encuentran restringidos a regiones más específicas. Así, el G4 se encuentra principalmente en el Norte de África y en Oriente Medio, y los genotipos 5 y 6 se encuentran confinados en el Sur de África y el Sudeste Asiático ^{65,66}. Hasta la fecha, solo se ha descrito un caso de genotipo 7 (G7) en Canadá proveniente de un inmigrante de África Central ⁷⁰.

La distribución de los genotipos en España ha sido recientemente actualizada por el estudio GEHEP 005, y sus autores han concluido que ésta es similar a la encontrada en el resto de Europa Occidental, siendo las infecciones por G1 las más frecuentes (66,9%), seguidas del G3 (17,3%), el G4 (11,3%), el G2 (2,8%) y finalmente los genotipos 5 y 6 con 0,1% y 0,02%, respectivamente. El G1b es el subtipo mayoritario dentro del G1, representando el 56,6% de las infecciones ⁷¹.

3. Historia natural de la infección por VHC

La historia natural de la infección por VHC se caracteriza por ser un proceso lento, con un amplio período asintomático. La mayoría de los pacientes son diagnosticados de infección por VHC en los estadios finales de la enfermedad cuando la sintomatología hepática se hace evidente en forma de cirrosis, descompensaciones hepáticas, complicaciones extrahepáticas y hepatocarcinoma celular.

La fase inicial de la infección se denomina fase aguda y abarca, aproximadamente, los primeros 6 meses de la enfermedad. En la mayoría de los casos (más del 70%) este período es asintomático. Entre los pacientes que desarrollan algún tipo de síntoma, estos son inespecíficos e incluyen fiebre, cansancio, inapetencia, náuseas, vómitos, dolor abdominal, coluria, acolia, dolores articulares e ictericia; y éstos se producen entre los tres y seis primeros meses de la infección ⁷². Esta fase se caracteriza por la detección del virus en sangre entre los 2-14 días después de la exposición; el incremento de los niveles séricos de las transaminasas, como la alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST); y la aparición gradual de anticuerpos específicos contra el VHC entre los 20-150 días ⁷³⁻⁷⁵. Tras fase de infección aguda, entre un 15-20% de los pacientes resuelven favorablemente la infección, negativizando los niveles de ARN-VHC sérico y normalizando los niveles de transaminasas ⁷⁶. Se han descrito diversos factores del huésped y del virus que determinan una mayor probabilidad de aclaramiento espontáneo de la infección como son el sexo femenino, una edad más joven, la presencia de síntomas en la infección aguda, la co-infección con otros virus, la presencia de polimorfismos como la interleuquina 28B (IL-28B) y el estado inmune del paciente ⁷⁷.

El 75-80% restante son pacientes que no aclaran espontáneamente la infección, y en ellos la enfermedad progresa y cronifica (**Figura 9**). Los pacientes con infección crónica por VHC mantienen niveles séricos más o menos fluctuantes de ARN-VHC y niveles de transaminasas elevados, aunque en menor medida que en la fase anterior. De forma general, los pacientes con infección crónica se caracterizan por presentar una alteración hepática inflamatoria persistente, que desemboca en cirrosis en aproximadamente un 10-20% de los casos a los 20-30 años desde el inicio de la infección ⁷⁸. Una vez la cirrosis se ha estabilizado, la progresión de la enfermedad se vuelve impredecible, en algunos casos ésta puede permanecer estable durante muchos años mientras que en otros ésta puede progresar a descompensaciones hepáticas, hepatocarcinoma celular o muerte. Una vez que la cirrosis se ha desarrollado, el riesgo de hepatocarcinoma celular anual es del 1-5% y el de descompensación hepática es del 3-6%. Después de un episodio de descompensación,

el riesgo de muerte en el año siguiente al mismo varía del 15-20% ⁷⁹. Este estadio final de la infección es una de las principales indicaciones de trasplante hepático y, desafortunadamente, una vez realizado, la infección se restablece prematuramente y la progresión de la enfermedad se acelera.

El riesgo de desarrollo de fibrosis hepática es multifactorial y se han descrito numerosos co-factores implicados en el incremento del riesgo de desarrollar una fibrosis significativa o cirrosis. Estos incluyen factores relacionados con el huésped como son el sexo masculino, una edad de más de 40 años en el momento de la infección, la inmunosupresión, la co-infección con otros virus, la diabetes, la resistencia a la insulina, la obesidad y la esteatosis hepática; con factores ambientales como la ingesta de alcohol y con factores virales ⁸⁰⁻⁸⁹.

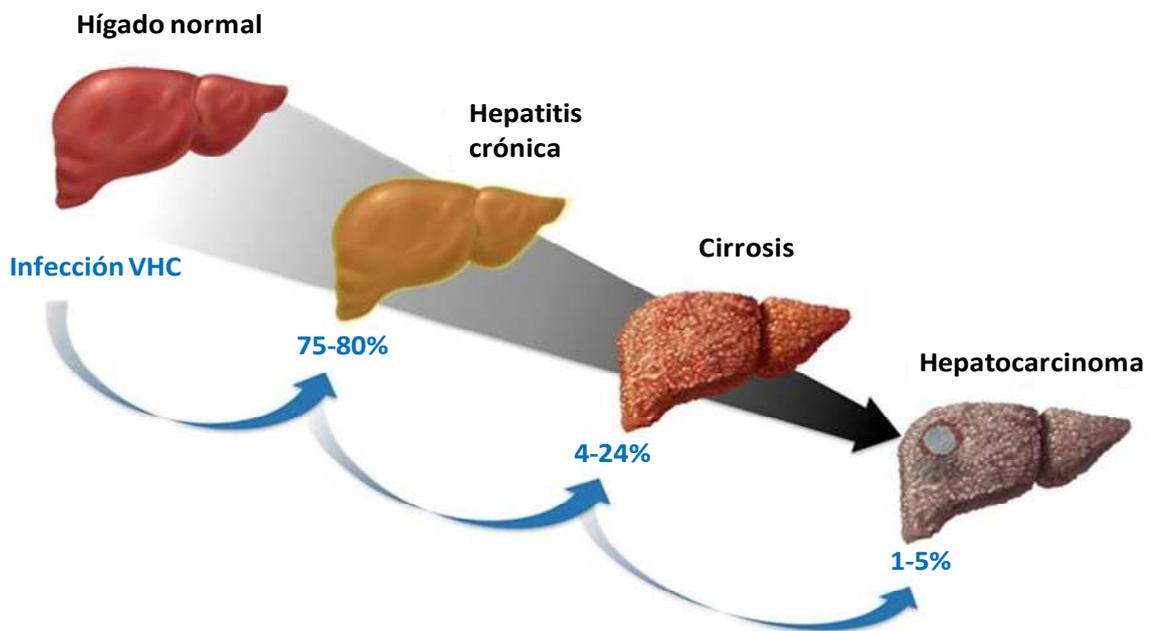


Figura 9. Historia natural de la infección por el VHC. Adaptado de Lingala y colaboradores, 2015.

4. Tratamiento de la infección crónica por VHC

4.1. Objetivos del tratamiento

El principal objetivo del tratamiento frente al VHC es curar la infección, es decir, conseguir una respuesta virológica sostenida (RVS) definida como la presencia de ARN-VHC indetectable 12 ó 24 semanas después de completar el tratamiento. Una RVS se asocia con una cura de la infección por VHC dada la baja probabilidad de recaída⁹⁰. Otros objetivos del tratamiento frente al VHC incluyen reducir las complicaciones clínicas asociadas a la enfermedad, así como disminuir futuras transmisiones del virus y su prevalencia global. Además, alcanzar una RVS disminuye el riesgo de desarrollar complicaciones asociadas a la fase final de la enfermedad como la cirrosis hepática, el hepatocarcinoma celular y la muerte^{91,92}. Aunque alcanzar la RVS se asocia con una normalización de las transaminasas hepáticas y una mejoría de la función hepática y la fibrosis, en los pacientes con cirrosis, la curación se asocia a una disminución, pero no eliminación, del riesgo de eventos clínicos relacionados con el VHC⁹³⁻⁹⁷.

4.2. La era del interferón (IFN)

En los últimos años se ha producido una revolución en el arsenal terapéutico frente al VHC con la introducción de nuevos fármacos conocidos como antivirales de acción directa (AADs). La historia del desarrollo del tratamiento frente al VHC comienza en 1991, poco después del descubrimiento del virus, cuando la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EEUU (*FDA, Food and Drug Administration*) aprobó la primera terapia frente al VHC, la monoterapia con IFN. La función del IFN radica en proporcionar una importante respuesta antiviral, inhibiendo la replicación viral, estimulando la apoptosis de las células infectadas, y modulando además el sistema inmune⁹⁸. Aunque aproximadamente un tercio de los pacientes respondía a la terapia, la mayoría de ellos presentaban una recaída virológica una vez

alcanzada la RVS. La tasa de RVS en monoterapia con IFN a 48 semanas de tratamiento era tan sólo del 16% ^{99,100}. Además, la administración del IFN era un proceso tedioso que requería la administración de inyecciones subcutáneas tres veces por semana.

La monoterapia con IFN fue el estándar de tratamiento hasta finales de la década de 1990, cuando, en 1998, la efectividad del IFN se vio significativamente incrementada con la adición de ribavirina (RBV), un nucleósido sintético que produce una inhibición sinérgica de la replicación intracelular del VHC ¹⁰¹. Esta combinación de IFN+RBV resultaba en mayores tasas de RVS con respecto a los resultados reportados hasta el momento, incrementando la RVS hasta un 34% con un tratamiento de 24 semanas de duración y hasta un 42% con un tratamiento de 48 semanas ^{102,103}.

Un nuevo avance significativo en la era del IFN se produjo en 2001 con la introducción del interferón pegilado (peg-IFN). La pegilación mejoraba la farmacocinética del IFN ya que mejoraba su eficacia terapéutica, su vida media plasmática, hacía la molécula más soluble y disminuía su toxicidad. Este proceso incrementó las tasas de RVS hasta un 54-56%, y redujo la frecuencia de inyecciones subcutáneas de IFN a una vez a la semana ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Esta combinación de peg-IFN+RBV fue, en la década siguiente, el estándar de tratamiento frente al VHC.

La duración del tratamiento basado en IFN era altamente dependiente de ciertos factores como el genotipo y la cinética del descenso del ARN-VHC durante las primeras semanas de la terapia. Numerosos estudios describieron la importancia del genotipo en la respuesta al tratamiento concluyendo que los genotipos 1 y 4 tenían menores tasas de RVS frente a los genotipos 2 y 3 (40-50% vs. 80-90%) ^{102,107,108}. Además, la eficacia obtenida era dependiente del grado de tolerabilidad y de adherencia al tratamiento, que estaba muy relacionado con la presencia de efectos adversos. La frecuencia y el número de efectos adversos que el IFN tenía en el paciente eran numerosos, llegando incluso a describirse efectos adversos en más del 95% de los casos ^{102,108,109}. La mayoría de ellos estaban relacionados con complicaciones constitucionales (fatiga, dolor de cabeza, fiebre, náuseas), hematológicas (anemia, neutropenia, trombocitopenia), neuropsiquiátricas (depresión, ansiedad, ideas

suicidas), endocrinas (principalmente problemas relacionados con la función de la tiroides) y dermatológicas (erupciones, eritemas, prurito) ¹⁰⁹⁻¹¹³. El desarrollo de estas complicaciones contraindicaban las terapias con IFN en un gran número de pacientes. Este era el caso de pacientes con comorbilidades neuropsiquiátricas, enfermedades autoinmunes, así como con descompensaciones o en estadios avanzados de la enfermedad.

4.3. Los nuevos antivirales de acción directa (AADs)

Las bajas tasas de RVS obtenidas con la terapia estándar de peg-IFN+RBV generaron la necesidad de desarrollar nuevas terapias frente al tratamiento del VHC. En 2011, se produjo una revolución terapéutica en el tratamiento de la infección por VHC con la aparición de los primeros AADs. El desarrollo de estas moléculas fue posible gracias a los avances que se produjeron en el conocimiento del ciclo viral del VHC, su virología estructural y molecular, y la patogénesis de la infección ¹¹⁴. El término AADs engloba diversos fármacos que se basan en diferentes mecanismos de acción. Lo que tienen en común todos ellos es que actúan a nivel del ciclo celular del VHC, bloqueando uno o más de sus pasos, e induciendo una progresiva desaparición del virus a través de la muerte celular de las células infectadas ^{115,116}. La cura del VHC es posible ya que éste no integra su material genético en el núcleo de las células huésped, por lo que, la persistencia de la infección requiere de una generación continua de nuevas moléculas de ARN viral, de forma que, si el tratamiento consigue bloquear la replicación viral, conseguirá erradicar el virus.

De acuerdo a su mecanismo de acción, los AADs pueden ser clasificados en 3 familias:

1. Inhibidores de proteasa NS3/4A. Estas moléculas bloquean la enzima serín-proteasa NS3/4A inhibiendo su correcto funcionamiento e impidiendo así la creación de proteínas virales funcionales ^{117,118}. Estas moléculas se agrupan bajo el sufijo -previr

(Figura 10) y se caracterizan por tener una alta potencia, sin embargo, tienen una cobertura de genotipos limitada y una baja barrera genética para el desarrollo de resistencia ¹¹⁹.

Inhibidores proteasa NS3/4A	Inhibidores NS5A	Inhibidores polimerasa NS5B
Boceprevir (BOC)	Daclatasvir (DCV)	Dasabuvir (DSV)
Glecaprevir (GLE)	Elbasvir (EBR)	Sofosbuvir (SOF)
Grazoprevir (GZR)	Ledipasvir (LDV)	
Paritaprevir (PTV)	Ombitasvir (OBV)	
Simeprevir (SMV)	Pibrentasvir (PIB)	
Telaprevir (TVR)	Velpatasvir (VEL)	
Voxilaprevir (VOX)		

Figura 10. Antivirales de acción directa (AADs) aprobados actualmente en EEUU y Europa y sus dianas de acción.

2. **Inhibidores de la proteína NS5A.** Estas moléculas bloquean tanto la replicación viral como el ensamblaje de nuevos virus. Se ha sugerido que su mecanismo de acción se produce a través de la inhibición de la hiperfosforilación de NS5A, alterando así la localización de la proteína en el retículo endoplasmático, y probablemente causando un montaje defectuoso del VHC ¹²⁰⁻¹²². Estas moléculas se agrupan bajo el sufijo -asvir (**Figura 10**), y se caracterizan por tener una alta potencia y una cobertura multigenotípica aunque, generalmente, presentan una barrera genética baja para el desarrollo de resistencia ¹²².

3. Inhibidores de la polimerasa *RdRp* NS5B. En esta familia se han desarrollado dos subclases, por un lado, los inhibidores no nucleósidos, que se unen a la enzima *RdRp* NS5B y bloquean su actividad catalítica; y por otro lado, los inhibidores análogos de nucleós(t)ido, que son aceptados por la enzima como sustrato donde se unen competitivamente al centro activo y posteriormente, son incorporados por ésta al nuevo genoma viral bloqueando la replicación e impidiendo que ésta continúe ^{123,124}. Estas moléculas se denominan con el sufijo -buvir. (**Figura 10**). La primera subclase tiene una baja barrera genética para el desarrollo de resistencia pero, por el contrario, la segunda subclase se caracteriza por una alta barrera de resistencia, una cobertura pangénica y una potencia intermedia.

La primera generación de AADs, se aprobó por la FDA en 2011 y estaba formada por los inhibidores de proteasa NS3/4A de primera generación boceprevir (BOC) y telaprevir (TVR). Con el fin de prevenir la emergencia de variantes virales resistentes, ya que ambas moléculas presentaban una baja barrera genética para el desarrollo de resistencia, BOC y TVR se autorizaron en combinación con peg-IFN+RBV como parte de una "triple terapia". Estos regímenes incrementaron las tasas de RVS descritas previamente para la terapia convencional de peg-IFN+RBV en pacientes con G1 (40-50%) hasta un 64-75% (**Figura 11**). Sin embargo estos regímenes presentaron ciertas limitaciones, como su uso exclusivo en pacientes con G1, un elevado número de efectos adversos ¹²⁵⁻¹²⁸, y una baja eficacia en pacientes con características asociadas a peor respuesta al tratamiento como es el caso de pacientes previamente tratados o con cirrosis hepática ¹²⁵⁻¹²⁸.

Afortunadamente, la era de las terapias con AADs no había hecho más que comenzar y el escenario del tratamiento del VHC siguió desarrollándose con la aparición de nuevos agentes. A finales de 2013 se produjo la aprobación de simeprevir (SMV), un inhibidor de proteasa NS3/4A, para utilizarse en combinación con peg-IFN+RBV en el tratamiento de pacientes con G1. Las tasas de RVS para esta terapia fueron similares a las descritas para sus predecesores pero con mejor perfil de tolerabilidad ¹²⁹. El principal avance en la era de los AADs se produjo en 2014 con la aprobación de sofosbuvir (SOF), un inhibidor de la polimerasa NS5B. Su importancia

radica en que SOF es un agente activo frente a todos los genotipos, que posee una elevada barrera genética para el desarrollo de resistencia, y para el que se describieron tasas de RVS de más del 90% ¹³⁰. En un primer momento, la FDA aprobó su uso en combinación con peg-IFN+RBV para los genotipos 1 y 4, y sólo con RBV para los genotipos 2 y 3.

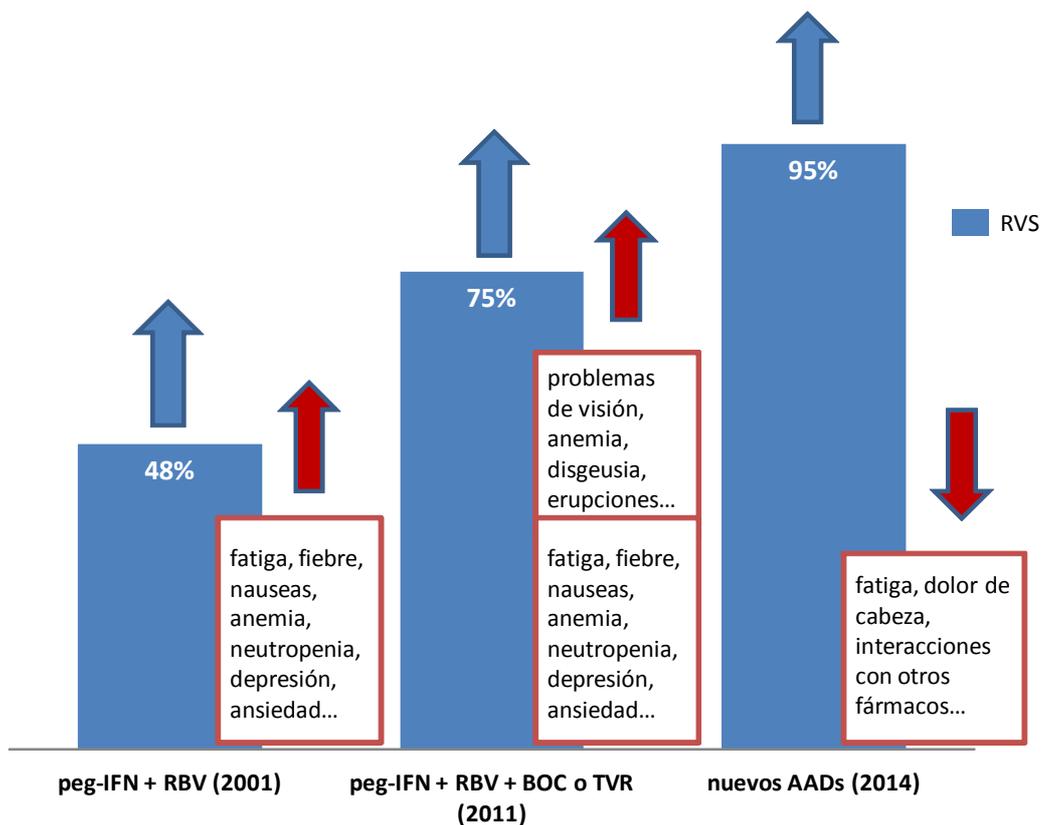


Figura 11. Descripción de la evolución de la eficacia y los efectos adversos relacionadas con el tratamiento del VHC a lo largo de los últimos años, desde la terapia estándar con peg-IFN+RBV, pasando por las primeras combinaciones con AADs a las combinaciones actuales. En azul se describe la tasa de RVS y en rojo la frecuencia de efectos adversos.

Además, ha sido de gran relevancia el desarrollo de regímenes libres de IFN combinando dos o más clases de AADs. Este concepto se desarrolló, en Octubre de 2014, con la aprobación de la combinación sofosbuvir/ledipasvir (SOF/LDV) (nombre comercial Harvoni). SOF/LDV se desarrolló, en un primer momento, co-formulado para el tratamiento del G1, y numerosos estudios y ensayos clínicos describieron para esta pauta tasas de RVS de entre el 94-99% ¹³¹⁻¹³³. En noviembre de ese mismo año, la FDA

aprobó la combinación de SOF/SMV para el tratamiento del G1, tras demostrar tasas de RVS superiores al 90% y buenos perfiles de tolerabilidad y eficacia ¹³⁴. Finalmente, en diciembre de 2014, se aprobó para el G1 la combinación dasabuvir /ombitasvir/paritaprevir potenciado con ritonavir (DSV/OBV/PTV/r) (nombre comercial pack Viekira), para la que se describieron tasas de RVS de más del 90% ^{135,136}. A partir de ese momento, se siguieron aprobando diferentes regímenes con AADs, como la combinación ombitasvir/paritaprevir potenciado con ritonavir (OBV/PTV/r) (nombre comercial Technivie) para el tratamiento del G4 ¹³⁷, la combinación daclatasvir (DCV) (nombre comercial Dakilnza) combinado con SOF para el tratamiento de los genotipos 1 y 3 ¹³⁸, o la combinación grazoprevir/elbasvir (GZR/EBR) (nombre comercial Zepatier) para el tratamiento del G1 ^{139,140}. Además, se produjo la expansión a otros genotipos de combinaciones ya aprobadas hasta el momento, como es el caso de la combinación SOF/LDV para los genotipos 4, 5 o 6 ¹⁴¹⁻¹⁴⁴. Por último, se desarrollaron también combinaciones con eficacia pangenotípica como es el caso de sofosbuvir/velpatasvir (SOF/VEL) (nombre comercial Eplclusa), sofosbuvir/velpatasvir/voxilaprevir (SOF/VEL/VOX) (nombre comercial Vosevi), y glecaprevir/pibrentasvir (GLE/PIB) (nombre comercial Maviret) ¹⁴⁵⁻¹⁴⁸ (**Figura 12**).

Actualmente, las guías de tratamiento recomiendan el uso de terapias con AADs como pautas de primera línea en el manejo de la infección por VHC, lo que ha permitido crear regímenes libres de IFN ^{90,91,149}. Su éxito radica en que este nuevo arsenal ha incrementado las tasas de RVS hasta un 95% o incluso un 100% ^{132,133,139,140,145,146,148,150}. Además, estos regímenes han acortado la duración de las terapias, mejorado la posología de las mismas y además han mejorado la tolerancia de éstos por parte del paciente, reduciendo los efectos adversos asociados ¹⁵¹. Además, la aparición de combinaciones pangenotípicas ha generado una nueva era en la terapia con AADs, la era de un tratamiento igual para todos, que permite simplificar el manejo del paciente obviando la necesidad de la determinación genotípica del VHC previa al tratamiento. El nuevo paradigma del tratamiento del VHC es altamente variable en función del paciente, dependiendo todavía del genotipo en ciertos regímenes; y dependiendo además de la presencia o no de factores asociados con peor respuesta al

tratamiento como es el caso de cirrosis, descompensaciones, historia de fracaso previo a tratamiento, e incluso poblaciones especiales como es el caso de pacientes co-infectados por VIH, con insuficiencia renal, trasplantados, o con posibles interacciones farmacológicas.^{90,91,149,152,153}. De forma sencilla, estos parámetros determinan la duración del tratamiento y/o la adición de ribavirina a la combinación de AADs.

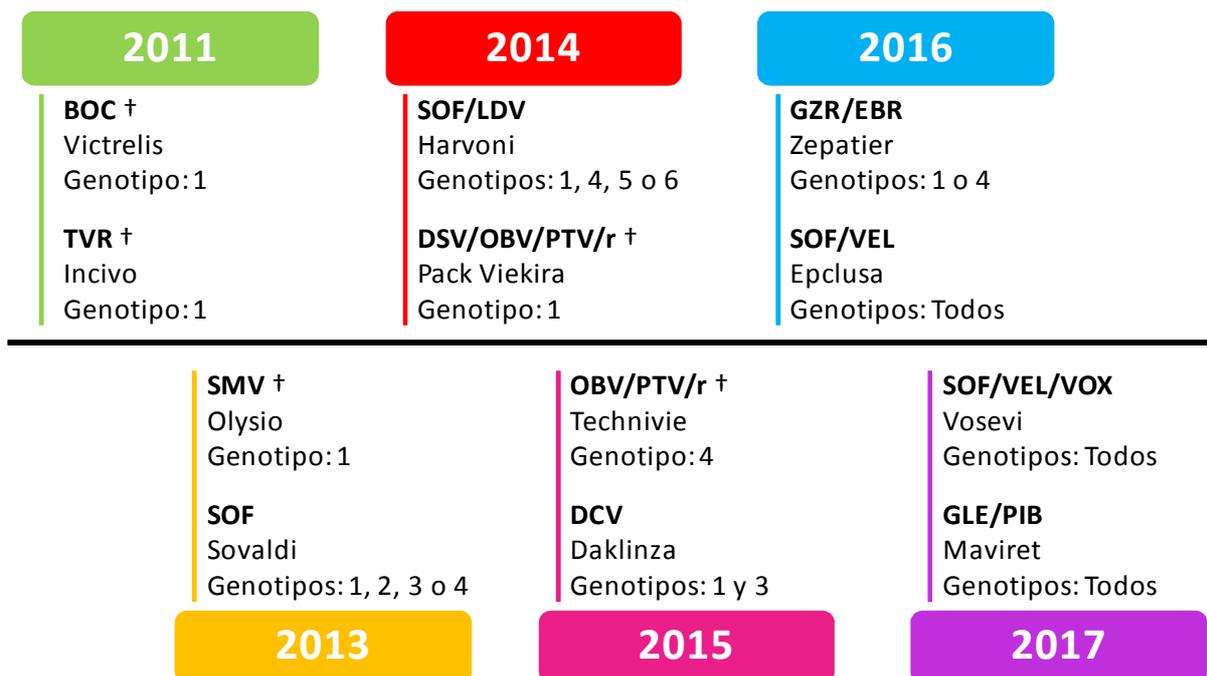


Figura 12. Evolución de las terapias con AADs desde la aparición de la primera generación de inhibidores de proteasa de primera generación en 2011 hasta la actualidad. De cada agente o combinación de ellos, se especifica la abreviatura del nombre genérico, el nombre comercial y los genotipos frente a los que es activo. Las combinaciones señaladas con el símbolo † se encuentran actualmente en desuso.

4.4. Evolución de las indicaciones de tratamiento

El SNS aprobó en mayo de 2015 el PEAHC¹⁵⁴, con el objetivo de asegurar un camino en el que el acceso al tratamiento para los pacientes con infección por VHC fuese sostenible para el Sistema Sanitario. Según este Plan Estratégico, el tratamiento antiviral debería priorizarse en ciertos grupos de pacientes. Los criterios de

priorización de este Plan incluían pacientes con fibrosis hepática avanzada (\geq F2), trasplantados o en lista de espera de trasplante, pacientes que no hubieran respondido a triple terapia con inhibidores de proteasa de primera generación, y pacientes con manifestaciones extrahepáticas. El diseño de esta estrategia fue necesario dado el elevado número de pacientes que tenían una infección por el VHC, el elevado coste de los tratamientos, y la limitación de los recursos económicos para el SNS. Sin embargo, una vez pasados los tres primeros años, a finales de 2017 este Plan Estratégico fue actualizado ⁴⁵ y, actualmente, las guías ya recomiendan el tratamiento en todos los pacientes con Hepatitis C crónica, a excepción de aquellos con una corta esperanza de vida que no pueda remediarse con un tratamiento frente al VHC, trasplante hepático u otra terapia ^{90,91,149}.

4.5. Retos del tratamiento para los próximos años

Actualmente y con una cura disponible, las barreras para eliminar el VHC recaen en diagnosticar aquella población que lo desconoce y fomentar el acceso a los tratamientos. En 2016, la Asamblea Mundial de la Salud aprobó un ambicioso Plan Estratégico con el objetivo de eliminar las hepatitis del ámbito sanitario para el año 2030. Para ello, los países necesitarían reducir el número de nuevas infecciones (incidencia) en el 90% y reducir el número de muertes (mortalidad) en un 65% ¹⁵⁵. Sin embargo, el acceso al tratamiento todavía se encuentra limitado, principalmente en países con ingresos medios-bajos donde los recursos son inadecuados y limitan el diagnóstico de la infección. Además el acceso a los nuevos tratamientos se ha visto obstaculizado por sus elevados precios y el lento registro de genéricos. Como resultado, solo una pequeña proporción de pacientes, el 20% (14 millones de personas), son conocedores de su estado y tan sólo el 7% (1,1 millones de personas) habría recibido tratamiento frente al VHC en el año 2015. En el año 2016, 1,76 millones de personas se habrían sumado a la población que habría recibido tratamiento, por lo que el número de tratados en el período 2015-2016 habría ascendido a 3 millones de personas ³⁴. De acuerdo a los últimos datos presentados, tan sólo 12 países entre ellos

Australia, Islandia, Suiza, Italia, Mongolia, España, Egipto, Francia, Georgia, Japón, Países bajos, y Reino Unido están en camino de conseguir los objetivos del Plan Estratégico para el año 2030 ¹⁵⁶.

5. Resistencia a los AADs

5.1. Definición de resistencia y factores que la influyen

La predisposición del VHC a la aparición constante de variantes virales genéticamente diferentes que pueden conferir resistencia tiene su origen en la dinámica de cuasiespecies. Las proporciones en las que las diferentes variantes virales se encuentran en el organismo depende de las capacidades replicativas de las mismas en el ambiente (definida como capacidad replicativa o *fitness viral*). Las diferentes variantes coexisten en equilibrio, pero cualquier cambio en el ambiente altera este equilibrio cambiando la distribución de la población de cuasiespecies.

Las poblaciones virales que constituyen las cuasiespecies difieren en polimorfismos aminoacídicos que emergen por mutación durante el proceso de replicación y son, a continuación, seleccionadas basándose en su impacto en la *fitness viral*. Cuando estos polimorfismos se localizan en las regiones donde los AADs tienen su efecto antiviral, pueden conferir al virus una reducción en la susceptibilidad a un fármaco o incluso a una familia de AADs. Aunque estos polimorfismos pueden presentarse en las poblaciones virales mayoritarias (*wild-type*), generalmente se encuentran en poblaciones minoritarias debido a que les confieren menor *fitness* en comparación con las poblaciones *wild-type* ⁶⁴. En presencia de un tratamiento con AADs lo que sucede es que los fármacos realizan una selección positiva de aquellas variantes con menor susceptibilidad al mismo. Con la inhibición de los virus *wild-type* sensibles al fármaco, el espacio de replicación se abre permitiendo que las variantes resistentes puedan expandirse rápidamente, generando un fracaso virológico a la

terapia. Estos polimorfismos pueden encontrarse de forma natural en el espectro de mutantes, o bien, pueden adquirirse por mutación durante la replicación de virus resistentes durante la administración del fármaco ⁶⁴.

El término de mutaciones asociadas a resistencia (*resistance associated substitutions, RASs*) se utiliza para describir los polimorfismos o cambios aminoacídicos que se producen en una determinada posición con respecto a la secuencia viral de referencia, y que aportan al virus una reducción en la susceptibilidad a uno o más fármacos antivirales. El término de variante resistente se utiliza para describir una variante del virus que se caracteriza por la presencia de una o más *RASs* ^{64,91}.

La resistencia a AADs se basa en al menos 5 parámetros interconectados ¹⁵⁷: (I) la elevada tasa de mutación que tiene lugar durante el proceso de replicación viral debido a la falta de actividad correctora de errores la ARN polimerasa *RdRp*; (II) la elevada tasa de replicación del VHC que genera numerosas copias del virus (10^{12} viriones/día); (III) la barrera genética para el desarrollo de resistencia del fármaco, que implica el número y el tipo de mutaciones que se necesitan para conferir resistencia; (IV) el *fitness* de las variantes virales resistentes que determina la probabilidad de que estas persistan en la gran población de virus; (V) el nivel de exposición al fármaco ya que concentraciones sub-óptimas de mismo permiten que la replicación viral se mantenga en presencia de un medio de presión selectivo.

5.2. Perfiles de resistencia por familia para los actuales AADs

Se han identificado diferentes *RASs* que confieren una reducción en la susceptibilidad a AADs. Diferentes guías de tratamiento numeran el listado de *RASs* como lo hacen las actuales guías de tratamiento europeas ⁹⁰. Las principales posiciones aminoacídicas a las que afectan estas *RASs* se muestran en la **Figura 13**. Actualmente la mayoría de las técnicas para la detección de *RASs* se basan en protocolos caseros de secuenciación poblacional (tipo Sanger) o de secuenciación

profunda. Se ha determinado que el 15% es el límite de detección o *cut-off* por debajo del cual la presencia de *RASs* debe ser ignorada⁹⁰.

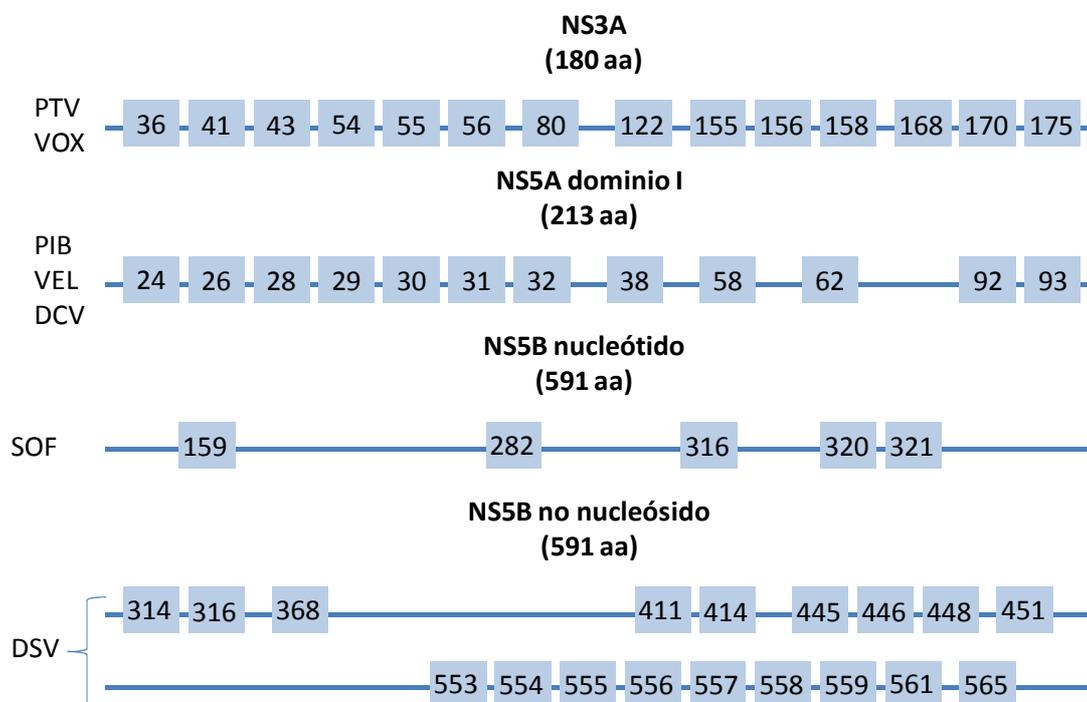


Figura 13. Principales posiciones en las que se localizan las *RASs* que se han descrito, en ensayos *in vitro* y/o seleccionadas o en pacientes que fallaron a las terapias, y que confieren una reducción en la susceptibilidad AADs (excluyendo los inhibidores de proteasa de primera generación BOC y TPV). El aa de la secuencia consenso varía según el genotipo. Entre fármacos de una misma familia existen diferencias, lo que significa que no todos los fármacos de la familia pueden verse afectados por una *RAS*. Información adaptada de EASL *guidelines*, 2018.

La prevalencia global de *RASs* es altamente variable atendiendo a los diferentes genotipos virales y los diferentes orígenes geográficos¹⁵⁸⁻¹⁶¹. Además, la magnitud y el impacto negativo de las *RASs* en la respuesta al tratamiento antiviral varía de acuerdo diversos factores como el regimen de AADs, factores del paciente que impactan en la respuesta al tratamiento (como la cirrosis), la importancia cuantitativa de la *RASs*, y como ésta disminuye la potencia del tratamiento. Las *RASs* que se producen en las regiones NS3/4A y NS5A son las más prevalentes en pacientes que

fracasan a la terapia antiviral. En cuanto a su nomenclatura, cada *RASs* se indica por una primera letra que hace referencia al aminoácido presente en la secuencia de referencia *wild-type* (que varía según el genotipo), un número que indica la posición aminoacídica en la proteína, y una segunda letra que representa el aminoácido presente en la variante resistente.

5.2.1. Inhibidores de proteasa NS3

La primera generación de inhibidores de proteasa como BOC y TVR mostraron una baja barrera genética para el desarrollo de resistencia y una resistencia cruzada considerable en las posiciones V36, T54, R155, A156 y D168¹⁶². Así mismo, los estudios basados en terapias con SMV mostraron mutaciones de resistencia similares a aquellas descritas anteriormente, incluyendo las posiciones 155, 156 y 168, junto con un polimorfismo único, el Q80K^{163,164}. Las *RASs* en las posiciones 155, 156 y 168 también han sido identificadas en pacientes tratados con regímenes que contienen PTV o GZR^{165,166}. Sin embargo, los inhibidores de proteasa de segunda generación, como GZR, GLE, VOX han mostrado mejoras en la barrera genética para la resistencia, y han aumentado la actividad antiviral frente múltiples genotipos, aunque de momento, el G3 se caracteriza por la presencia de algunos polimorfismos (e.j. R123, I132, D168) que dificultan su tratamiento con inhibidores de proteasa¹⁶⁷.

De forma global, la prevalencia basal de *RASs* en NS3 es baja (0,1-3,1%)¹⁶⁸, a excepción del polimorfismo Q80K que se encuentra en la mayoría de los pacientes con genotipo 1a¹⁶³. Tras la retirada del tratamiento, las *RASs* en NS3 desaparecen gradualmente con el tiempo dado que la presión selectiva que ha seleccionado estas sub-poblaciones se ha eliminado.

5.2.2. Inhibidores de NS5A

Los inhibidores de NS5A muestran una barrera media/baja para el desarrollo de resistencia, con una rápida selección de *RASs* en la región del D1. Además, estos fármacos presentan resistencia cruzada, por lo que el desarrollo de resistencias a un inhibidor de NS5A puede condicionar la resistencia al resto de fármacos de la misma familia. Las *RASs* más significativas han sido identificadas en el G1 e incluyen las posiciones M28, Q30, L31 e Y93, todas ellas con un alto nivel de resistencia a inhibidores de NS5A^{64,168,169}. Además, la *RAS* L31M ha sido descrita por tener una alta prevalencia en los genotipos 2 y 4. De forma global, la prevalencia de *RASs* en NS5A ha sido descrita en torno al 8,5%¹⁷⁰.

Tabla I. *RASs* clínicamente relevantes asociadas con resistencia a inhibidores de NS5A, agrupadas por régimen y genotipo.

Regimen AADs	Genotipo		
	G1a	G1b	G3
LDV/SOF	Q30H/R	L31V	n/a
	L31M/V	Y93H	
	Y93C/H/N		
GZR/EBR	M28A/T	Y93H	n/a
	Q30H/R		
	L31M/V		
	Y93C/H/N		
SOF/VEL	n/a	n/a	Y93H

Información adaptada de AASLD-IDSA *guidelines*, 2018. Abreviaturas: AADs: antivirales de acción directa; EBR: elbasvir; GZR: grazoprevir; LDV: ledipasvir; n/a: no aplica; SOF: sofosbuvir; vel:velpatasvir.

Al contrario que las *RASs* en NS3, las *RASs* de NS5A que emergen durante el tratamiento han demostrado persistir durante largos períodos de tiempo (incluso

diversos estudios sugieren que para siempre) en la población de cuasiespecies y pueden permanecer como la población dominante durante años ¹⁷¹. Esta característica, hace que las RASs en NS5A limiten las opciones de tratamiento de segunda línea con inhibidores de NS5A, limitando así las opciones de retratamiento ¹⁶⁹. Las guías de tratamiento actuales describen que las únicas RASs con una trascendencia clínica relevante son aquellas que afectan a la región NS5A y a los genotipos 1a y 3 (Tabla I).

5.2.3. Inhibidores análogos de nucleótido de la polimerasa NS5B

El fármaco actualmente aprobado en esta familia es SOF, que se caracteriza por una elevada barrera de resistencia además de ser activo frente todos los genotipos. Numerosos estudios han sugerido que las RASs para SOF son raramente detectadas, por lo que su importancia en la selección de variantes resistentes no está clara todavía ¹³⁸. La RAS S282T es la que principalmente afecta a SOF, y ha sido identificada *in vitro* para todos los genotipos ¹⁷², aunque en la práctica clínica se ha descrito solamente en el 1% de pacientes que han fallado a SOF ¹⁷³. Otros estudios de poblaciones en vida real han descrito la emergencia de otras RASs como L159F, a veces en combinación con L320F o C316N ^{174,175}.

5.2.4. Inhibidores no análogos de nucleósido de la polimerasa NS5B

En contraste con los inhibidores análogos de nucleótido, el perfil de resistencias para los inhibidores no análogos de nucleósido, como es el caso de DSV, es el de una baja barrera genética para el desarrollo de resistencia. Las RASs que confieren resistencia a DSV también han sido descritas y se localizan entre los aminoácidos 314 y 565 de NS5B, siendo las más frecuentes M414, M423, C316, A421, C445, I482, V495, V499 y S556. La RAS más prevalente para los pacientes que fallan al tratamiento con

DSV es la S556G que se encuentra de forma natural en los genotipos 2 y 3 (100% de los casos), así como en el 97% de los pacientes con G4, siendo considerablemente menos común en el G1, variando en el genotipo 1a (G1a) entre del 0,6-3,1% y en el G1b entre el 7-16%^{174,176}.

5.3. Utilidad de estudios de resistencias en la práctica clínica

Actualmente, el fracaso al tratamiento con AADs afecta a un 2-10% de los pacientes, y en muchos casos, aunque no en todos, este es debido a la aparición de resistencias.^{64,168} Dada la importancia clínica que tienen las RASs en la respuesta al tratamiento con determinados regímenes de AADs, las actuales guías de tratamiento han abordado la utilidad del estudio de RASs basal en la práctica clínica^{90,91}.

Actualmente, las guías de tratamiento no recomiendan la realización de un test de resistencias antes del inicio de un tratamiento de primera línea frente al VHC^{90,91}. Sin embargo, lo que indican es que, idealmente, sí sería deseable analizar el patrón de resistencias en cada paciente previo al inicio de tratamiento, ya que esta información ayudaría a elegir la mejor opción de tratamiento para cada paciente, incrementando así la probabilidad de alcanzar una RVS. No obstante, la realización de un test de resistencias sí se recomienda en determinadas circunstancias, como es el caso de pacientes que no han respondido a las terapias con AADs. Este también se recomienda antes del inicio del tratamiento con determinados regímenes que incluyen inhibidores de NS5A (SOF/LDV; GZR/EBR; SOF/VEL; y SOF/DCV) y cuando están presentes ciertas características del paciente; como es el caso de cirrosis, historia de fallo previo a tratamiento, y altos niveles de ARN-VHC. La mayoría de los datos que hacen referencia al impacto y la selección RASs se refieren a las infecciones por G1a y por G3. En el caso de que las RASs estuviesen presentes en estos pacientes, sería necesario reforzar el tratamiento, bien añadiendo RBV y/o prolongando la duración del mismo, para enmascarar el efecto que estas RASs pudieran tener en la respuesta al tratamiento. Para evitar tener que evaluar las RASs basales en estos casos, lo que las guías de

tratamiento actuales recomiendan es utilizar regímenes de tratamiento de primera línea que no necesiten ningún estudio de resistencias previo al inicio del mismo ^{90,91}. En resumen, la utilidad del estudio de *RASs* en este momento depende de las características del paciente así como de la combinación de AADs ⁹¹ y su utilidad es relevante cuando los resultados podrían modificar el manejo del paciente, en cuanto a la duración de la terapia y/o la utilización de RBV.

Las recomendaciones actuales realizadas en torno a la realización de un de resistencias basales han sido motivadas por diversos factores, como son el limitado acceso a la determinación de resistencias, la falta de consenso para las técnicas utilizadas y la interpretación de los resultados, todo ello sumado a las altas tasas de RVS descritas para las actuales combinaciones con AADs ⁶⁴. Actualmente, solo se disponen de estudios comerciales para la detección de *RASs* en EEUU pero estos son muy costosos. En Europa, estos estudios comerciales no están disponibles por lo que los estudios de resistencias se basa en técnicas "caseras" basadas en secuenciación poblacional o secuenciación profunda.

En cuanto al retratamiento de pacientes que no han respondido a terapias con regímenes que contenían inhibidores de proteasa o inhibidores de NS5A, numerosos estudios han sugerido que la presencia de *RASs* puede tener un impacto significativo en la eficacia del régimen de segunda o tercera línea ^{64,90,91,168,174}. Por lo tanto, y principalmente debido al carácter persistente de las *RASs* que emergen durante el tratamiento para los inhibidores de NS5A, el retratamiento debe ser optimizado basándose en el estudio de resistencias ^{90,91}. Sin embargo, la reciente aprobación de nuevas combinaciones pangenotípicas con alta barrera genética para el desarrollo de resistencia y elevada potencia antiviral podrían cambiar este debate. Así, las combinaciones SOF/VEL/VOX y GLE/PIB combinado con SOF parecen ser efectivas en erradicar el VHC en pacientes sin cirrosis o cirrosis compensada que han fracasado previamente a regímenes con AADs ^{177,178}. Además, cuando las *RASs* se combinan con características propias de los pacientes que los hacen muy difíciles de curar, las combinaciones anteriores pueden beneficiarse teóricamente de añadir RBV y/o aumentar la duración del tratamiento a 16 o 24 semanas. Sin embargo, actualmente

no se dispone de datos que apoyen estas indicaciones. En relación a la presencia de cirrosis descompensada, ésta hace que estos pacientes no se puedan retratar con regímenes que contengan inhibidores de NS3, por lo que dado la urgencia de retratarlos, actualmente se recomienda el uso de la combinación SOF/VEL con RBV durante 24 semanas.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El objetivo del tratamiento frente al VHC es eliminar el virus y así prevenir las complicaciones asociadas con la infección. Durante la última década, el escenario del tratamiento de la infección por VHC ha cambiado drásticamente debido al desarrollo de nuevos agentes denominados antivirales de acción directa (AADs). Las nuevas terapias con AADs han transformado el paradigma del tratamiento y el pronóstico de la infección por VHC, abandonando la era de los tratamientos basados en IFN generalmente de eficacia reducida, inyectables, y muy mal tolerados, a una nueva era donde la enfermedad puede ser erradicada con terapias altamente eficaces, de administración oral y bien toleradas. Además, los tratamientos con AADs ofrecen nuevas oportunidades de tratamiento para aquellos grupos de pacientes que tradicionalmente habrían sido difíciles de tratar, o incluso en aquellos grupos en los que las terapias basadas en IFN estaban contraindicadas, incluyendo aquellos con cirrosis descompensada o enfermedad hepática severa.

La aprobación de diferentes AADs en un corto período de tiempo, ha permitido disponer en la actualidad de un amplio arsenal terapéutico frente al VHC. En un primer momento, la principal limitación para implementar las nuevas terapias era su elevado coste, lo que se solventó con el diseño e implementación en mayo de 2015, del Plan Estratégico para el Abordaje de la Hepatitis C (PEAHC) para establecer una estrategia coste-efectiva y regular el acceso a los nuevos tratamientos. El objetivo del PEAHC era dirigir de forma efectiva la prevención, el diagnóstico, el tratamiento y la monitorización de los pacientes con infección por VHC.

A pesar de las altísimas tasas de curación (superiores al 90%) asociadas a los nuevos AADs, existe todavía una proporción de pacientes (entre el 2-10%) que no alcanza una RVS. Entre las causas asociadas a esta falta de respuesta al tratamiento con AADs se han identificado numerosos factores como el grado de fibrosis hepática, la exposición previa a terapias con IFN, la carga viral, el genotipo viral o la presencia de *RASs* en determinadas regiones del genoma que limita la actividad antiviral de los AADs. Además, las *RASs* generalmente se han asociado a fracaso terapéutico cuando su presencia se combina con algunos de los demás factores relacionados con menores tasas de RVS. En el momento del desarrollo de la tesis, la presencia de *RASs* era

especialmente relevante en la respuesta a los AADs en el contexto de terapias basadas en inhibidores de NS5A y en los genotipos 1a y 3. De manera que la presencia de *RASs* específicas en la región NS5A podría comprometer la respuesta al tratamiento con inhibidores de NS5A para estos genotipos y en presencia de otros factores de peor respuesta previamente descritos. Todos estos factores han de tenerse en cuenta para optimizar la elección de tratamiento con el fin de asegurar la mejor respuesta posible.

En este contexto se desarrolló esta tesis para conocer las características de la población con infección crónica por VHC en el área sanitaria de A Coruña con los siguientes objetivos:

1. Caracterizar el perfil de la infección crónica por VHC en el área sanitaria de A Coruña, y evaluar el impacto del PEAHC en el abordaje de la infección por VHC en esta población.
2. Evaluar la prevalencia de *RASs* basales en la región NS5A en pacientes con infección crónica por VHC y genotipos 1a y 3 en el área sanitaria de A Coruña, y la necesidad y beneficios de la realización de un estudio de resistencias previo al inicio del tratamiento para optimizar las estrategias terapéuticas con los AADs.

ESTUDIO 1

Caracterización de la infección crónica por VHC en el noroeste de España: impacto del Plan Estratégico para el Abordaje de la Hepatitis C (PEAHC) en el Sistema Nacional de Salud en la cura del VHC

MATERIALES Y MÉTODOS.

ESTUDIO 1

1. Diseño y ámbito de estudio

Se realizó un estudio observacional, de corte transversal en base a los datos clínicos de pacientes con infección crónica por VHC en seguimiento clínico por el Servicio de Medicina Interna B de la *Xerencia de Xestión Integrada de A Coruña (XXIAC)* y por la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Servicio de Medicina Interna de la *Xerencia de Xestión Integrada de Ferrol (XXIF)*, ambos integrados dentro de la red del *Servizo Galego de Saúde (SERGAS)* durante el período comprendido entre Junio de 2014 y Diciembre de 2015.

Este estudio de investigación cuenta con la aprobación del Comité Ético de Investigación (CEI) de Galicia con código de registro 2013/249 y se realizó acorde a las normas de Buena Práctica Clínica establecidas de acuerdo a los principios de la Declaración de Helsinki, el Convenio relativo a los derechos humanos y la biomedicina, y a la normativa vigente en materia de investigación.

2. Sujetos de estudio

Los criterios de inclusión para los pacientes de estudio fueron: ser mayor de 18 años, presentar una serología positiva para VHC, una carga viral de ARN-VHC superior a 1.000 unidades internacionales/mililitro (UI/mL), y estar en seguimiento clínico en el *XXIAX* o *XXIF*. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado correspondiente a la línea de investigación de Enfermedades Infecciosas debidamente autorizada por el CEI de Galicia con código 2013/244 y registrada en la Sección de Colecciones del Registro Nacional de Biobancos con código C.0002530.

De cada uno de los pacientes incluidos en el estudio, se recogieron con ayuda de un clínico especialista, variables sociodemográficas, epidemiológicas, clínicas y virológicas de forma retrospectiva (**Anexo A**) con las que se elaboró una base de datos. 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, ambas vigentes en el momento de desarrollo del estudio.

El tamaño muestral necesario para permitir estimar los parámetros de interés con un intervalo de confianza del 95% ($\alpha=0,05$) y una precisión de $\pm 5\%$, fue estimado en 384 pacientes. La fibrosis hepática fue medida mediante elastografía de transición (FibroScan, EchoSense, Francia) y los resultados obtenidos en kilopascales (kPa) se transformaron teniendo en cuenta los siguientes criterios de la escala METAVIR: F0-F1 $< 7,5$ kPa; F2 $\geq 7,5-9,5$ kPa; F3 $\geq 9,5-12,5$ kPa y F4 $> 12,5$ kPa (definido como cirrosis hepática). La pauta y la duración del tratamiento frente al VHC fue recogida en aquellos pacientes que iniciaron tratamiento durante el año 2015. La eficacia al tratamiento fue definida como una RVS (definida como el ARN-VHC por debajo del límite de detección) a las 12 semanas después de finalizar el tratamiento

2.1. Procesamiento de las muestras y obtención del plasma

El material de partida para la determinación del genotipo fue el ARN viral, que se aisló a partir de muestras de plasma. Para la obtención del plasma de cada uno de los pacientes se realizó el siguiente protocolo.

Las muestras de plasma fueron aisladas a partir de muestras de 8 mL de sangre periférica total, almacenada en un tubo con anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (*ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA*). El método empleado para el aislamiento del plasma de las muestras de sangre, fue una centrifugación en gradiente de densidad con *Ficoll*. El *Ficoll* permite separar los componentes de la sangre en función de su densidad, debido a la migración diferencial que presentan dichos componentes durante la centrifugación. Así, tras el proceso de centrifugación, los componentes quedan distribuidos en función de su densidad, así,

los de menor densidad quedan localizados en la parte superior del tubo mientras los que de mayor densidad quedan en la parte inferior.

Para ello, se añadieron 6 mL de Ficoll (*Lymphocytes Isolation Solution*; Rafer, España) (previamente atemperado a 20°C) a un tubo Falcon de 50 mL (*Corning Science*, EEUU), al que posteriormente se añadieron, con cuidado de no mezclar ambas fases, 8 mL de sangre periférica total. El tubo Falcon fue centrifugado a temperatura ambiente durante 30 minutos a 2.000 revoluciones por minuto (r.p.m) sin ni aceleración ni deceleración, para no romper así el gradiente generado. Tras la centrifugación, la fracción correspondiente al plasma quedó en la parte superior del tubo, y a continuación se encontraron otras dos fases, una formada por el *Ficoll*, y otra, la más densa de todas, compuesta por glóbulos rojos y granulocitos. Entre las fases del plasma y el *Ficoll*, se formó un halo de células compuesto por las células mononucleares de sangre periférica (*Peripheral blood mononuclear cells*, *PBMCs*). Con ayuda de una pipeta pasteur, se procedió al aislamiento del plasma en crioviales correctamente identificados.

Las alícuotas de plasma obtenidas tras el procedimiento descrito fueron almacenadas a -80°C en el Biobanco de A Coruña de la *XXIAC*, dentro de la colección de Enfermedades Infecciosas descrita anteriormente, debidamente autorizada por el CEI de Galicia con código 2013/244 y registrada en la Sección de Colecciones del Registro Nacional de Biobancos con código C.0002530.

2.2. Extracción del ARN de las muestras de plasma

La extracción del ARN viral, se realizó a partir de muestras de plasma y con el *kit QIAamp Viral RNA Mini Kit* (*Qiagen*, Alemania). Las muestras de plasma se descongelaron, al igual que los controles, que fueron tratados como una muestra más en todo el proceso, a 4°C toda la noche. El primer paso, fue la mezcla del tampón AVL con el *Carrier RNA*. Para cada muestra se añadieron 69 µL de control interno, 560 µL de

la mezcla de tampón AVL + *Carrier RNA*, y 500 µL de plasma. Todo ello se incubó a temperatura ambiente 10 minutos y a continuación se añadieron a cada muestra 560 µL de etanol absoluto. Todo ello se pasó por el tubo colector, por medio de centrifugaciones a 8.000 r.p.m., y el resto del proceso de extracción se automatizó en el QIAcube (*Qiagen*, Alemania). Todas las extracciones fueron programadas para un volumen final de elución del ARN de 60 µL en el tampón AVE, compuesto por agua libre de ribonucleasas (*RNAsas*) y NaN₃ al 0,04%. La automatización del proceso permitió una extracción más eficiente del ARN y una mayor reproducibilidad de los resultados. En cada una de las rondas de extracción, se extrajo el ARN presente en las muestras control.

El principio del *kit* de extracción del ARN viral, se basa la realización de una lisis, bajo condiciones altamente desnaturalizantes que inactivan las ARNasas, para liberar el ARN viral y facilitar su posterior unión específica a una membrana de sílica gel inmovilizada en una columna. Mientras el ARN permanece unido a la membrana, el resto de los contaminantes pasan a través de la misma y son eficientemente eliminados por medio de dos lavados con tampones. Finalmente, el ARN purificado es separado de la membrana por medio de un tampón de elución (libre de ARNasas, proteínas, nucleasas y otros contaminantes) y es recogido para su almacenamiento o procesamiento directo. En nuestro ensayo, el procesamiento del ARN viral fue realizado inmediatamente después de su recolección.

2.3. Determinación del genotipo viral del VHC

En aproximadamente un tercio de los pacientes incluidos en el estudio, fue necesaria la determinación del genotipo del VHC.

Para la discriminación del genotipo del VHC se realizó un ensayo molecular por medio del kit comercial *Abbott RealTime HCV Genotype II* (*Abbott Molecular*, EEUU) en el sistema *m2000rt II* (*Abbott Laboratories*, EEUU). Este es un ensayo *in vitro*, que

permite determinar todos los genotipos (1-6) así como los subtipos 1a y 1b, a partir del material genético extraído de muestras de plasma de los pacientes. Este ensayo proporciona resultados con una exactitud superior al 95%.

La técnica se basa utilizar una PCR de transcripción reversa (*RT-PCR*) para amplificar las regiones 5'-*UTR* y NS5B del genoma del VHC, y detectar la fluorescencia emitida por sondas específicas con marcaje fluorescente. El primer paso es la retrotranscripción del ARN, para lo que los cebadores reversos específicos para el VHC y del control interno hibridan con sus dianas correspondientes y, por medio de la actividad retrotranscriptasa de la enzima ADN polimerasa termoestable *rTth* (*thermostable rTth Polymerase Enzyme*), el ARN es copiado en ADN complementario (ADNc). Después, se produce una fase de desnaturalización, y tras ella, un segundo cebador hibrida con la cadena de ADNc y, mediante la actividad ADN polimerasa de la enzima *rTth*, se genera un ADN de cadena doble. La amplificación exponencial del producto se consigue mediante la repetición de ciclos de ascenso y descenso de la temperatura, dando lugar a una amplificación de las secuencias diana.

En el ensayo se utilizan cuatro conjuntos de cebadores: el primer conjunto de cebadores se unen a la región 5'-*UTR* y están diseñados para amplificar todas las cepas del VHC; el segundo conjunto de cebadores están diseñados para amplificar la región NS5B del G1a; el tercer conjunto de cebadores del VHC están diseñados para amplificar la región NS5b del G1b; y el cuarto conjunto de cebadores están diseñados para amplificar el control interno.

La siguiente parte del ensayo es la detección de la fluorescencia emitida por diferentes sondas marcadas con distintos fluoróforos, lo que permite la discriminación simultánea de los productos amplificados específicos del VHC así como del control interno. En cada ciclo de amplificación, las sondas hibridan con la diana de amplificación correspondiente, en el caso de estar presente. El extremo 5' de cada sonda específica del VHC está marcado con un fluoróforo, mientras que el extremo 3' está marcado con un extintor de fluorescencia y un grupo para la unión con el surco menor (*Minor Groove Binder, MGB*). En ausencia de secuencias diana del VHC, la

fluorescencia de la sonda es extinguida. En presencia de secuencias diana del VHC, la sonda hibrida con su secuencia complementaria. Durante la fase de elongación, la actividad exonucleasa 5'-3' de la polimerasa rTth degrada la sonda hibridada en los constituyentes nucleotídicos, separando el extintor de fluorescencia del fluoróforo, y permitiendo así la emisión de la fluorescencia y su detección.

Este ensayo cuenta con dos sistemas de control de calidad de la técnica. Para el primero, en cada muestra se introduce un control interno que es una secuencia de ARN no relacionada con la secuencia diana del VHC que se amplifica simultáneamente por *RT-PCR*. Este control interno es un conjunto de cebadores que están diseñados para amplificar una región del gen de la hidroxipiruvato reductasa de la calabaza, *Curcubita pepo*, y que se suministra diluido en plasma humano negativo. Además del control interno, el ensayo requiere de un segundo control de calidad de la técnica. Para ello se utilizan dos muestras control (un control positivo y un control negativo), contenidos en el kit de controles anteriormente mencionado, que con extraídos y cuantificados como una muestra más durante todo el proceso. Las muestras de los controles positivo y negativo están formadas por plasma humano testado frente a anticuerpos del VHC, y que contienen secuencias de ARN viral no infectivas, encapsuladas y con concentraciones conocidas. Todos los viales de controles, tanto el del control interno como los de los controles negativos y positivos, fueron desechados en cada ronda de extracción, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El primer paso del ensayo fue la calibración óptica del sistema *m2000rt II* para la correcta medición y diferenciación de los distintos fluoróforos durante el ensayo. Para ello se empleó el kit de calibradores previamente mencionado, que se compone de las siguientes placas para calibrar el instrumento: la Placa FAM (carboxifluoresceína); la placa ROX (carboxi-X-rodamina); la placa VIC (fluoróforo patentado por Abbott); la placa NED (fluoróforo patentado por Abbott); y la placa Cy5 (cianina).

Una vez elaborada la recta de calibrado, se procedió a la detección del genotipo de las muestras. Para ello, se utilizó el kit de reactivos de amplificación anteriormente

mencionado. Atendiendo a las recomendaciones del fabricante, se prepararon tres mezclas: A, B y C. Cada reactivo de oligonucleótidos (A, B o C) (*Oligonucleotide Reagent*) fue preparado con la enzima polimerasa termoestable rTth (*thermostable rTth Polymerase Enzyme*) y con el reactivo de activación (*Activation Reagent*). A continuación se cargaron 40 µL de los reactivos de amplificación A, B y C en la placa de PCR *Abbott 96-Well Optical Reaction Plate* (Abbott Molecular, EEUU) para cada una de las muestras, a los que se añadieron 20 µL del ARN previamente aislado. Las placas fueron cubiertas con el sellador *Abbott Optical Adhesive Cover* (Abbott Molecular, EEUU) e introducidas en el termociclador *m2000rt II* (Abbott Molecular, EEUU). En todas las placas de PCR analizadas, además de las muestras de los pacientes, fueron incluidas las muestras control.

2.4. Interpretación de los resultados obtenidos

El instrumento Abbott *m2000rt II* detecta la fluorescencia en cada pocillo de reacción y después de cada ciclo. La reacción A detecta todas las cepas del VHC, el G1a y el G3; la reacción B detecta los genotipos 1 y 2 y el G1b; y la reacción C detecta los genotipos 4, 5 y 6. Si los controles son válidos, el sistema Abbott *m2000rt II* comunica automáticamente la asignación del genotipo para cada muestra.

3. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico *SPSS v19.0* (SPSS Inc, EEUU) y en colaboración con la Unidad de Epidemiología del XXIAC. Este se realizó a partir de las variables epidemiológicas, sociodemográficas, clínicas y virológicas recogidas en la base de datos para cada uno de los pacientes del incluidos en el estudio.

Las características basales de la población de estudio se expresaron como medias (\pm desviación estándar) o medianas [rango intercuartílico] en el caso de las variables cuantitativas; y como porcentaje (valor absoluto) en el caso de las variables cualitativas. En todos los estudios se comprobó la normalidad en la distribución de las diferentes variables cuantitativas mediante el *test* de *Kolmogorov-Smirnov*. Para la comparación de variables se utilizó el *test* *Chi cuadrado* (X^2) o el *test* exacto de *Fisher* para variables cualitativas y el *test* *T de Student* o el *test* U de *Mann-Whitney* para variables cuantitativas, en función de si se trataba de una variable con distribución normal o no, respectivamente. Los *test* se consideraron estadísticamente significativos cuando los *p-valores* obtenidos fueron inferiores a 0,05.

RESULTADOS.

ESTUDIO 1

1. Características basales de la población de estudio

Se incluyeron un total de 387 pacientes en el estudio, de los cuales 143 eran pacientes monoinfectados por VHC y 223 co-infectados VIH/VHC. En 21 pacientes se desconocía si existía co-infección por VIH.

Las principales características sociodemográficas, epidemiológicas, clínicas y virológicas de la población de estudio aparecen recogidas en la **Tabla II**. La mayoría eran varones (76,2%, n=281) con una edad media de $50\pm 9,5$ años.

A nivel de la infección por VHC, el tiempo medio desde el diagnóstico hasta la muestra fue de 16 ± 7 años. La vía de transmisión más prevalente en la cohorte fue la de UDVP (66,5%, n=256). En un 26,2% (n=101) de los pacientes se desconocía la vía de transmisión. El grupo *otras*, agrupa a las transmisiones de tipo sexual y nosocomial, que tuvieron una prevalencia baja (7,3%, n=28). La mediana de la carga viral del VHC, en el momento de la realización del estudio, fue de 6,01 [5,03-6,48] \log_{10} (logaritmo en base 10) UI/mL. Atendiendo al genotipo viral del VHC (**Figura 14**), el G1 fue el más prevalente representando más de la mitad de las infecciones (66,1%, n=255), seguido del G3 (16,8%, n=65). Dentro del G1, el G1a fue el más prevalente (63,1%, n=161) y en un 1,6% (n=6) de los pacientes el subtipo del G1 no pudo ser determinado. Además, no se detectó ningún paciente con los genotipos 5 y 6. En relación al polimorfismo de la IL-28B, el 67,3% (n=157) de la cohorte presentó los polimorfismos CT o TT que son aquellos menos favorables para responder al tratamiento con IFN.

A nivel del daño hepático y las complicaciones asociadas a la progresión de la enfermedad, el 28,2% (n=100) eran pacientes cirróticos, es decir, eran F4 en la escala METAVIR (**Figura 15**). Además, el 60,71% (n/N=17/28) de estos pacientes cirróticos presentaban una cirrosis descompensada, lo que a nivel global representó una prevalencia de descompensación hepática previa del 4,4% (n=17). La más frecuentes fueron la descompensación hidrópica (3,9%, n=15), la encefalopatía (1,3%, n=5) y/o el sangrado gastrointestinal (0,8%, n=3). Además, el 1% de los pacientes tenía un hepatocarcinoma celular (n=4) y el 3,9% presentaba manifestaciones extrahepáticas

como crioglobulinemia (0,8%, n=3), neuropatía (0,3%, n=1), porfiria cutánea tarda (1,6%, n=6), glomerulonefritis (1%, n=4) o trombopenia (0,3%, n=1). La mediana de las enzimas hepáticas AST, ALT y gamma glutamil transpeptidasa (GGT) fue de 39 [28-61] UI/mL, 45 [29-78] UI/mL, 60 [31-114] UI/mL, respectivamente.

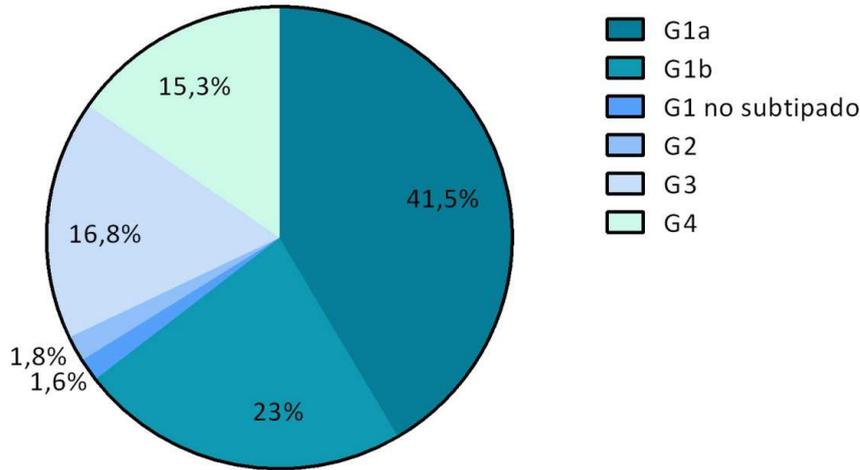


Figura 14. Distribución de los genotipos de los pacientes con infección crónica por VHC.

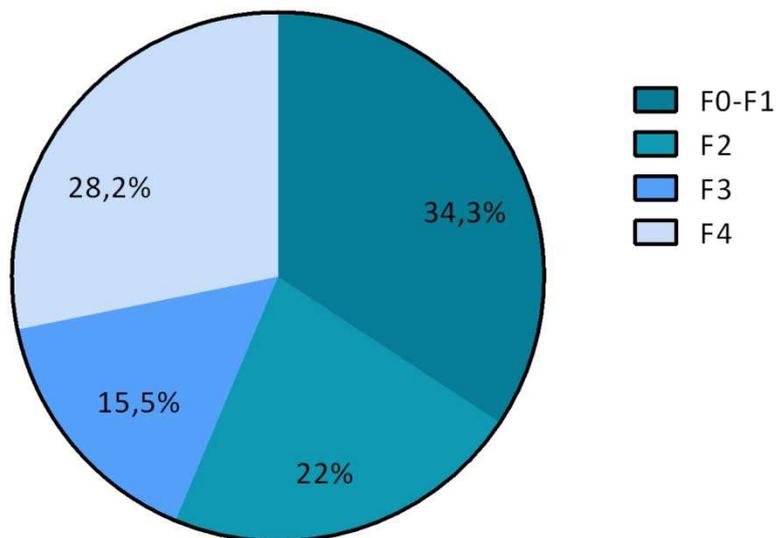


Figura 15. Distribución de la fibrosis hepática (atendiendo a la escala METAVIR) de los pacientes con infección crónica por VHC.

En relación a la exposición previa a tratamiento, más de un tercio de la cohorte (34,4%, n=133) eran pacientes pretratados, el 81,8% (n=108) había recibido el régimen clásico de peg-IFN+RBV y el 15,2% (n=20) combinaciones de peg-IFN+RBV con inhibidores de proteasa de primera generación como BOC o TPV. El tipo de respuesta al mismo fue como sigue: 31,8% (n=42) respuesta nula, 25,8% (n=34) recaída, 21,2% (n=28) intolerancia a peg-IFN+RBV, 10,6% (n=14) respuesta parcial, y 10,6% (n=14) respuesta desconocida.

Atendiendo a la co-infección por otros virus la prevalencia de co-infección VHC/VHB fue baja (0,3%, n=1). Sin embargo, más de la mitad de los pacientes incluidos en el estudio presentaba co-infección por VIH (60,9%, n=223) mientras que el 39,1% (n=143) restante eran pacientes mono infectados por el VHC. En relación a las características de la infección por VIH de los pacientes co-infectados VIH/VHC, la mayoría de los pacientes (95,9%, n=213) se encontraban recibiendo tratamiento antirretroviral (TAR) y el 80% de ellos (n/N=170/213) tenía una viremia suprimida [ARN-VIH<50 copias/mL (cop/mL)]. La pautas de TAR estaban compuestas, principalmente, por dos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido combinados con otra molécula. La más prevalente fue la combinación con un inhibidor de proteasa (43,8%, n=91), seguido de la combinación con un no análogo de nucleósido (28,8%, n=60), un inhibidor de la integrasa (13,5%, n=28) y finalmente otros regímenes (13,5%, n=28). A nivel inmunológico, la mediana de linfocitos CD4+ fue de 566 [312-750] células/mm³.

Tabla II. Características sociodemográficas, epidemiológicas, clínicas y virológicas de los pacientes con Hepatitis C crónica.

Características	Monoinfección VHC (n=143)	Co-infección VIH/VHC (n=223)	p-valor	Total (n=387)
Tiempo con infección por VHC (años)	15 [8-19]	18 [13-23]	<0,001	17 [11-21]
Edad (años)	50 [43-55]	49 [44-53]	0,163	49 [45-54]
Género masculino	75,5 (108)	74 (165)	0,742	72,6 (281)
Vía de transmisión			<0,001	
UDVP	44,8 (64)	85,7 (190)		66,5 (256)
Desconocido	47,6 (67)	7,6 (17)		26,2 (101)
Otras	7,7 (11)	6,7 (15)		7,3 (28)
AST (mg/dL)	37 [26-59]	42 [30-65]	0,051	39 [28-61]
ALT (mg/dL)	47 [25-88]	46 [32-78]	0,595	45 [29-78]
Exposición previa a tratamiento			0,901	
Naive	65,7 (94)	66,4 (148)		65,6 (254)
Pretratado	34,3 (49)	33,6 (75)		34,4 (133)
ARN-VHC (log ₁₀ UI/mL)	6,01 [5,03-6,48]	6,21 [5,59-6,65]	0,007	6,13 [5,24-6,58]
Polimorfismo IL-28B			0,019	
CC	24,3 (17)	41,5 (68)		36,3 (87)
CT	61,4 (43)	42,1 (69)		47,9 (119)
TT	14,3 (10)	16,5 (27)		15,8 (38)
Genotipo VHC			0,001*	
1a	43 (61)	41,7 (93)		41,5 (160)
1b	30,3 (43)	16,1 (36)		23 (89)
1 (no subtipado)	0,7 (1)	1,3 (3)		1,6 (6)
2	3,5 (5)	0,4 (1)		1,8 (7)
3	13,4 (19)	20,6 (46)		16,8 (65)
4	9,2 (13)	19,7 (44)		15,3 (59)
Fibrosis hepática			0,364	
F0-F1	29,2 (38)	38,5 (79)		34,3 (122)
F2	24,6 (32)	20 (41)		22 (78)
F3	16,9 (22)	14,6 (30)		15,5 (55)
F4	29,2 (38)	26,8 (55)		28,2 (100)
Fibrosis hepática (kPa)	8,8 (6,9-14,5)	8,5 (6,1-13,4)	0,299	8,7 (6,3-14,3)
Tratamiento VHC durante 2015	64,3 (92)	42,4 (94)	<0,001	52,7 (204)
Régimen de tratamiento				
AAD (SOF o SMV)+peg-IFN+RBV	6,5 (6)	0 (0)		3 (6)
SOF/DCV±RBV	14,1 (13)	25,5 (24)		18,6 (38)
SOF/LDV±RBV	43,5 (40)	62,8 (59)		51 (104)
SOF/SMV±RBV	9,8 (14)	8,5 (8)		10,3 (21)
SOF+RBV	6,5 (6)	0 (0)		3,4 (7)
DSV/OBV/PTV/r	15,2 (14)	2,1 (2)		10,3 (21)
OBV/PTV/r	4,3 (4)	1,1 (1)		3,4 (7)
Duración del tratamiento			0,103**	
8 semanas	1,1 (1)	0 (0)		0,5 (1)
12 semanas	74,4 (67)	64,5 (60)		70,6 (142)
24 semanas	24,4 (22)	35,5 (33)		28,9 (58)
Co-infección VHB	0 (0)	0,5 (1)	0,999	0,3 (1)

Los datos se expresan como mediana [rango intercuartílico] para las variables cuantitativas o % (n) para las variables cualitativas. Los *p*-valores significativos aparecen resaltados en negrita. Abreviaturas: AAD: antiviral de acción directa; ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; DCV: daclatasvir; DSV: dasabuvir; IL-28B: interleuquina 28B; kPa: kiloPascal; LDV: ledipasvir; OBV: ombitasvir; peg-IFN: interferón pegilado; PTV: paritaprevir; r; RBV: ribavirina; SMV: simeprevir; SOF: sofosbuvir;

UDVP: usuarios de drogas por vía parenteral; UI/mL: unidades internacionales por mililitro; VHB: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana. * Comparando los genotipos 1a, 1b, 3 y 4. ** Comparando 8-12 semanas vs. 24 semanas.

2. Impacto del Plan Estratégico español y las características del tratamiento para el VHC

Durante el 2015, el 52,7% (n=204) de los pacientes iniciaron tratamiento para el VHC. El 64,9% (n=251) de los pacientes incluidos en el estudio presentaban alguna de las características propuestas por el PEAHC para la priorización de tratamiento frente al VHC, y durante el año 2015 se inició tratamiento contra el VHC en el 73,7% (n=185) de los mismos.

Las principales combinaciones de AADs utilizadas, así como la duración del tratamiento se muestran en la **Figura 16** y en la **Figura 17**, respectivamente. La pauta más prevalente fue SOF/LDV±RBV (nombre comercial Harvoni), utilizada en más del 50% (51%, n=104) de los pacientes. Le siguieron las combinaciones de SOF/DCV±RBV (nombre comercial Solvaldi + Daklinza), SOF+SMV±RBV (nombre comercial Sovaldi + Olysio) y DSV/OBV/PTV/r (nombre comercial Pack Viekira) utilizadas en un 18,6% (n=38), 10,3% (n=21), y 10,3% (n=21) de los pacientes, respectivamente. El 38,2% (n/N= 78/204) de estos regímenes con AADs incluyeron RBV. Además, la duración del tratamiento frente al VHC principalmente seleccionada, fue de 12 semanas en aproximadamente 3/4 de los pacientes (70,6%, n=142), seguida de la duración de 24 semanas (28,9%, n=58). Tan sólo un paciente se trató frente al VHC con un tratamiento de 8 semanas de duración.

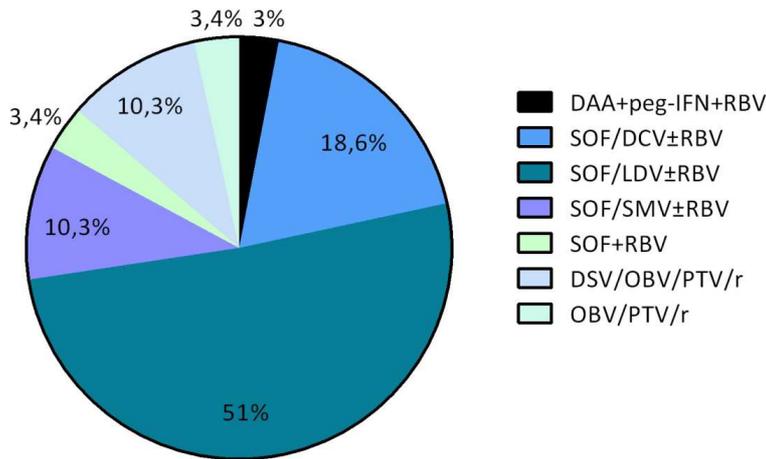


Figura 16. Distribución de las combinaciones de AADs utilizadas durante el tratamiento de la infección crónica por VHC.

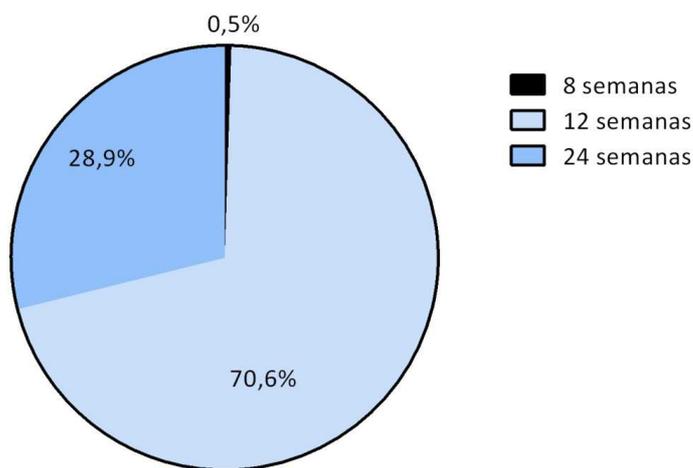


Figura 17. Distribución de la duración del tratamiento con AADs en el tratamiento de la infección crónica por VHC.

3. Características de la población co-infectada VIH/VHC

En el estudio se diferenciaron dos sub-poblaciones, la de pacientes mono-infectados por VHC y la de pacientes co-infectados VIH/VHC. Las principales características sociodemográficas, epidemiológicas, clínicas y virológicas de ambas sub-

poblaciones aparecen recogidas en la **Tabla II**. Ambas sub-poblaciones fueron comparadas entre sí.

A nivel epidemiológico se observaron diferencias significativas entre ambas sub-poblaciones en relación al tiempo medio de infección por VHC donde este fue mayor en la población co-infectada VIH/VHC (13,7 años vs. 17,6 años; p-valor < 0,001) (**Figura 18**).

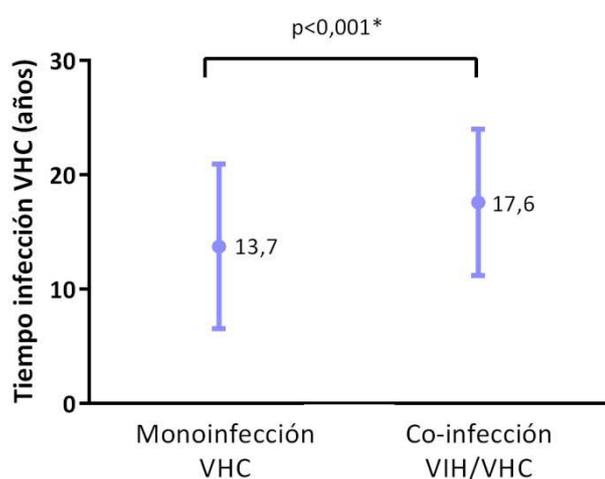


Figura 18. Comparación del tiempo medio de infección entre la sub-población mono infectada por el VHC y la co infectada VIH/VHC. El punto representa la media y las líneas la desviación típica.

En relación a las características de la infección por VHC también se observaron diferencias significativas entre los pacientes mono infectados por VHC y los co infectados VIH/VHC. En cuanto a la distribución de las vías de transmisión del VHC en la población mono infectada por el VHC se observó una mayor proporción de pacientes con una vía de transmisión desconocida y menor de UDVP (47,6% vs. 7,6%, y 44,8% vs. 85,7%; respectivamente, p-valor <0,001) (**Figura 19**).

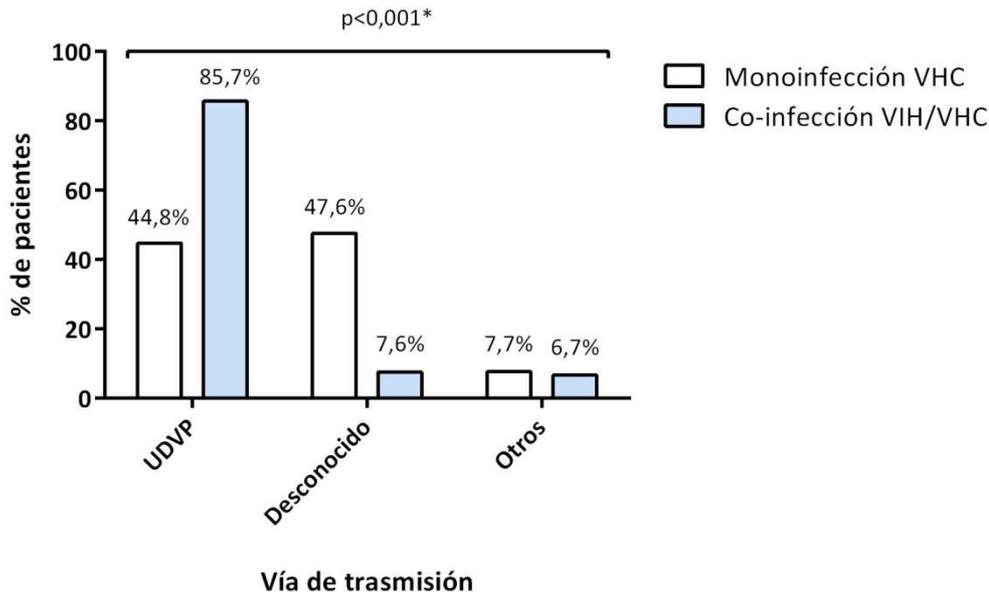


Figura 19. Comparación del tiempo medio de infección entre la sub-población mono infectada por el VHC y la co-infectada VIH/VHC.

A nivel de la distribución de los genotipos y subtipos virales, también se observaron diferencias significativas entre ambas sub-poblaciones. Los pacientes mono infectados por el VHC presentaron mayor porcentaje de pacientes con genotipos 1b y 2 y menor porcentaje de G3 y G4 en comparación con los pacientes co-infectados VIH/VHC (30,3% vs. 16,1% para G1b; 3,5% vs. 0,4% para G2; 13,4% vs. 20,6% para G3; y 9,2% vs. 19,7% para G4; p-valor < 0,001) (**Figura 20**). Además, en relación con la carga viral del VHC (ARN-VHC) esta fue significativamente mayor en la población co-infectada VIH/VHC (6,1 \log_{10} UI/mL vs. 5,9 \log_{10} UI/mL; p-valor = 0,007) (**Figura 21**). Atendiendo al polimorfismo IL-28B, la población mono infectada por el VHC presentó un menor porcentaje de pacientes con el polimorfismo CC y un mayor porcentaje de pacientes con el polimorfismo CT en comparación con los pacientes co-infectados VIH/VHC (24,3% vs. 41,5%; 61,4% vs. 42,1%, respectivamente, p-valor = 0,019) (**Figura 22**).

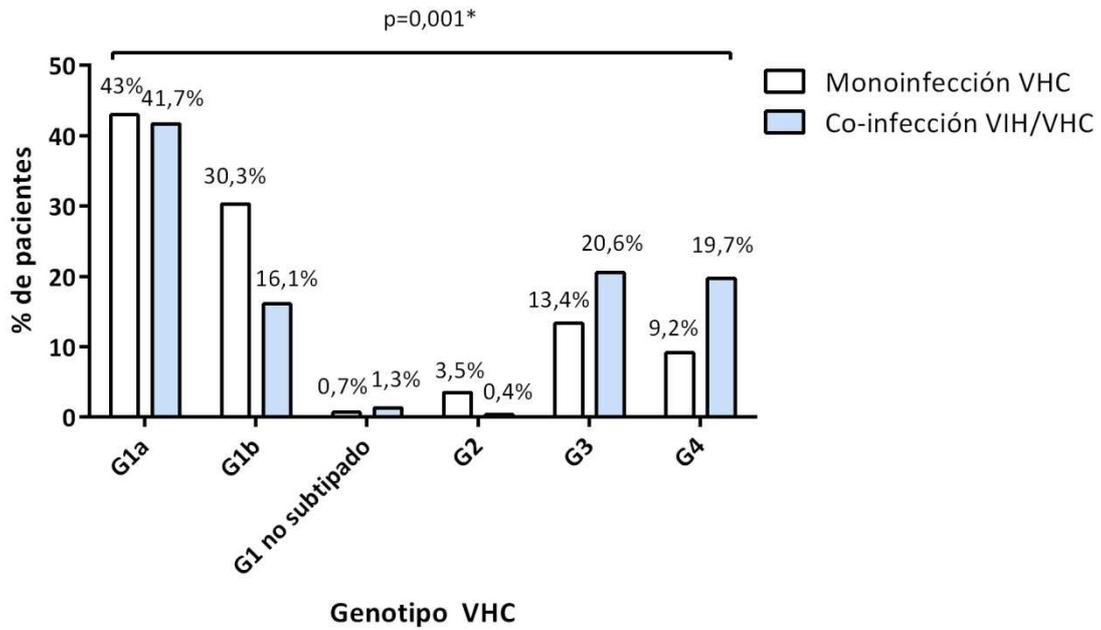


Figura 20. Comparación de genotipos y subtipos entre la sub-población mono infectada por el VHC y la co-infectada VIH/VHC.

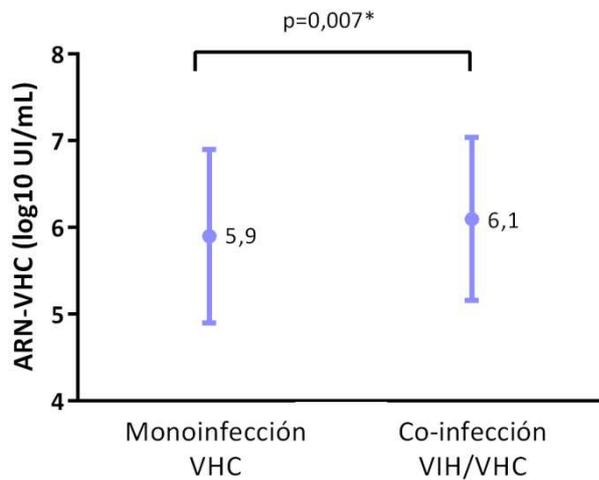


Figura 21. Comparación de la carga viral del VHC entre la sub-población mono infectada por el VHC y la co-infectada VIH/VHC. El punto representa la media y las líneas la desviación típica.

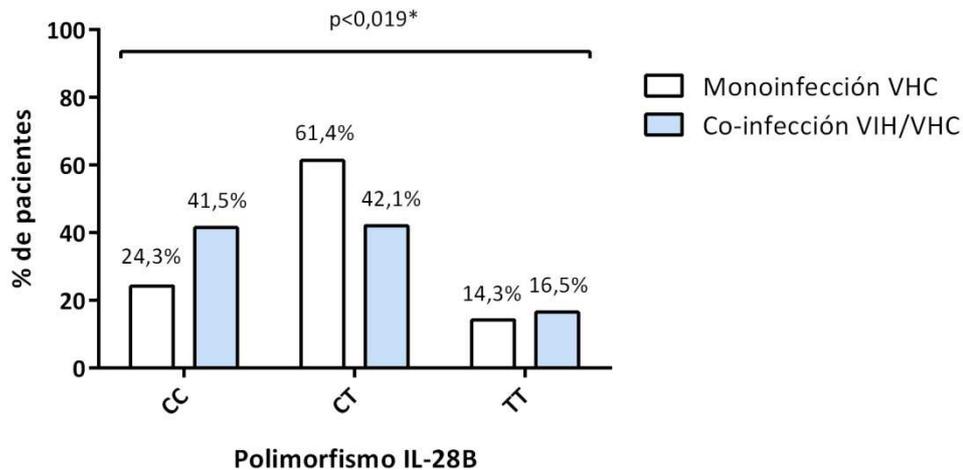


Figura 22. Comparación del polimorfismo IL-28B entre la sub-población mono infectada por el VHC y la co-infectada VIH/VHC.

En relación a la pauta de tratamiento contra el VHC empleada también se observaron diferencias significativas entre la población mono infectada por el VHC y la co-infectada VIH/VHC (p -valor $< 0,001$) (**Figura 23**). Las combinaciones SOF/DCV±RBV o SOF/LDV±RBV fueron más prevalentes en la población co-infectada VIH/VHC (25,5% vs. 14,1%; 62,8% vs. 43,5%; respectivamente), las combinaciones SOF o SMV±peg-IFN+RBV o SOF+RBV no se seleccionaron en ningún paciente, y las combinaciones DSV/OBV/PTV/r o OBV/PTV/r tuvieron una prevalencia menor en comparación con la población mono infectada por el VHC (2,1% vs. 15,2%, 1,1% vs. 4,3%; respectivamente).

En cuanto al resto de características, las sub-poblaciones fueron homogéneas. Atendiendo a las características epidemiológicas, no se observaron diferencias significativas de acuerdo en cuanto a la edad (p -valor = 0,163) o género (0,742). En relación a los parámetros clínicos tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles de las enzimas hepáticas AST (p -valor = 0,051) o ALT (p -valor = 0,595). En cuanto a las características propias de la infección por VHC no se observaron diferencias significativas entre ambas sub-poblaciones en relación al tratamiento previo para el VHC (p -valor = 0,901) o a la fibrosis hepática (p -valor = 0,364). En relación al tratamiento seleccionado frente al VHC, tampoco se observaron diferencias

significativas en relación a la duración seleccionada para el mismo (p-valor = 0,103; comparando 8-12 semanas frente a 24 semanas).

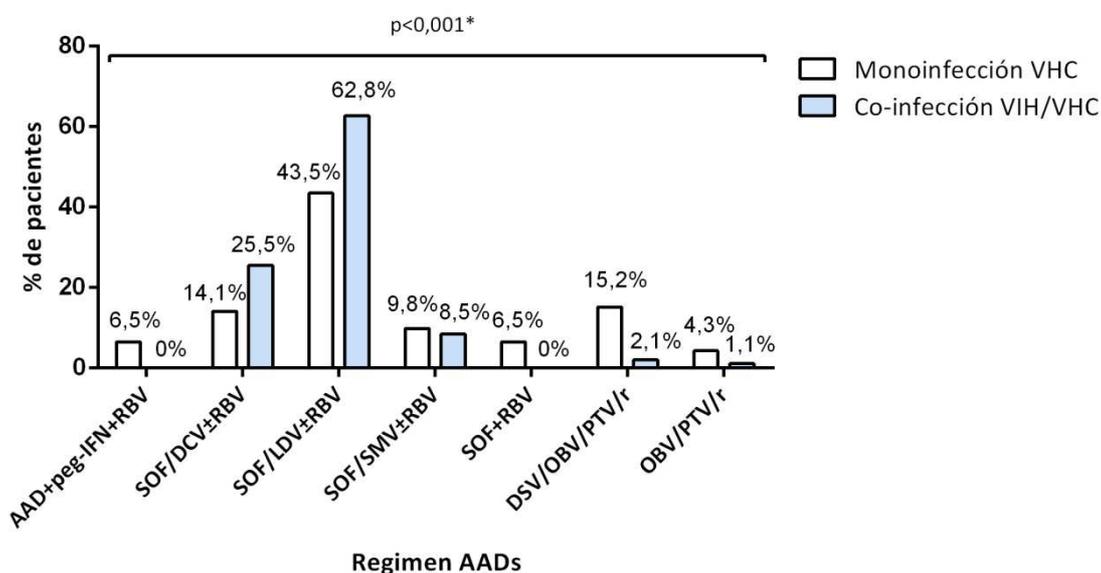


Figura 23. Comparación de los regímenes utilizados para el tratamiento del VHC entre la subpoblación mono infectada por el VHC y la co-infectada VIH/VHC.

4. Respuesta viral sostenida en función de diferentes subgrupos

De forma global, el 96,5% (n=147) de los pacientes alcanzaron RVS. Esta RVS se analizó en relación a diferentes subgrupos tanto relacionados con factores virológicos y del huésped como el genotipo del VHC, la fibrosis hepática, la co-infección con el VIH y la exposición previa al tratamiento (**Figura 24**); como con factores relacionados con las características del tratamiento frente al VHC utilizado como la pauta y la duración del mismo (**Figura 25**). No se observaron diferencias significativas en relación a la RVS atendiendo al genotipo del VHC (96,2% G1 vs. 95,7% no G1; p-valor = 0,999; y 88,2% G3 vs. 97,1% no G3, p-valor = 0,181), a la fibrosis hepática (97,2% F2-F3 vs. 93,5% F4, p-valor = 0,408), a la co-infección por VIH (95,5% mono infectados VHC vs. 98,5% vs. co-infectados VIH/VHC; p-valor = 0,395), ni a la exposición previa a tratamiento (99% mono infectados VHC vs. 93,2% vs. co-infectados VIH/VHC; p-valor = 0,086).

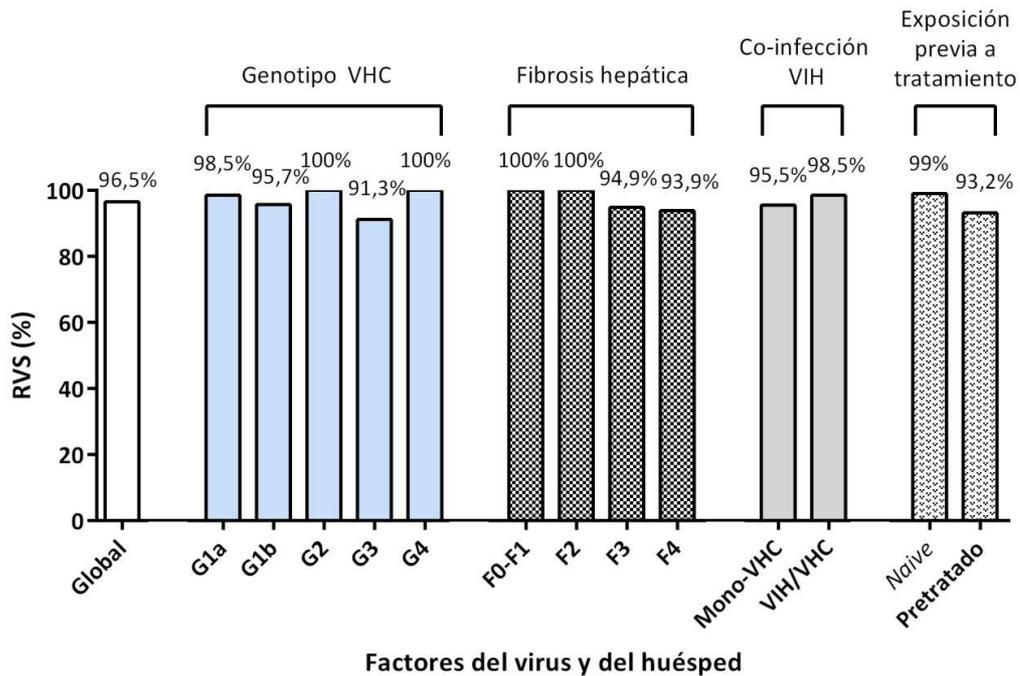


Figura 24. Tasas de RVS en relación a factores del virus y del huésped: genotipo del VHC, fibrosis hepática, co-infección por VIH y exposición previa a tratamiento.

5. Características de los pacientes que no alcanzaron respuesta viral sostenida

En relación a los pacientes que no alcanzaron una RVS (n=6), cinco habían sido tratados previamente con regímenes basados en IFN, cuatro eran cirróticos, y uno era co-infectado VIH/VHC. Atendiendo a los genotipos del VHC, había cuatro pacientes con G1 y dos con G3. En relación a los subtipos del G1, sólo uno de ellos era G1a aunque en otro paciente el subtipo no pudo ser determinado. Cuatro de los fracasos se definieron como recaída, otro por intolerancia a un régimen de AADs combinado con peg-IFN y otro fue el caso de un paciente que sufrió una descompensación hepática que le provocó la muerte. De seis pacientes que fracasaron, tres fueron re-tratados, uno con SOF+peg-IFN+RBV, otro con SOF/LDV+RBV y otro con SOF/DCV+RBV. Los dos primeros alcanzaron RVS tras el re-tratamiento, y el último se encontraba todavía en tratamiento en el momento del análisis de los datos. Además, un paciente falleció tras el re-tratamiento por hepatocarcinoma celular.

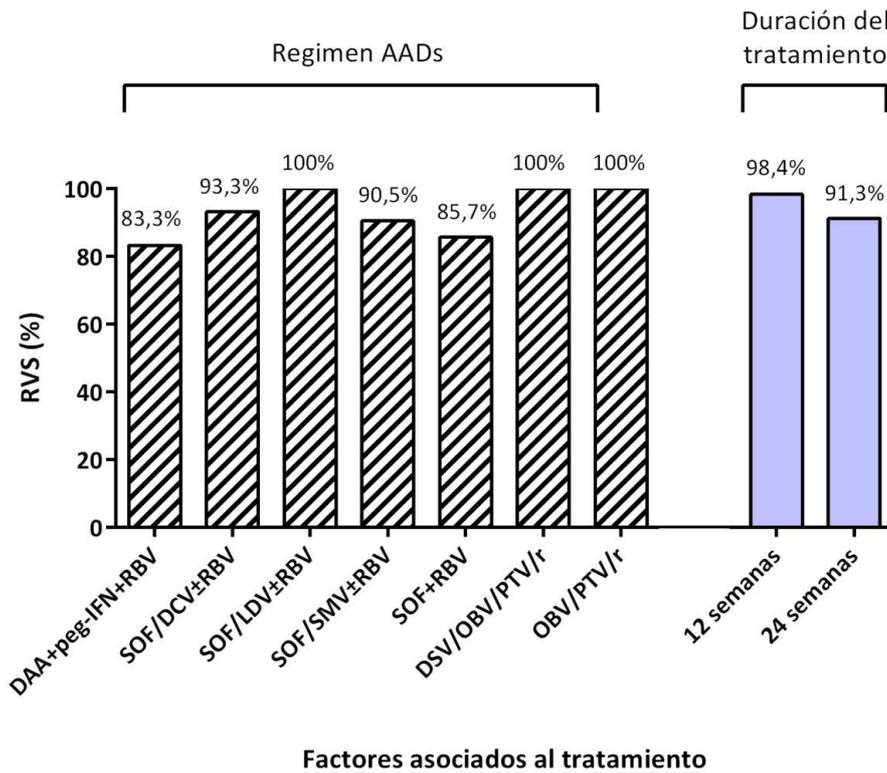


Figura 25. Tasas de RVS en relación a factores relacionados con el tratamiento frente al VHC: regimen de AADs y duración del tratamiento.

Los resultados obtenidos en este estudio aparecen recogidos en el artículo: ***Characterization of chronic HCV infection in Northwest Spain: Impact of the treatment strategic plan of the Spanish National Health Service on HCV cure***, publicado en enero de 2017 en la revista *J Med Virol- Journal of Medical Virology* (Anexo B). **Factor de Impacto (JCR 2017): 1,988.** Q2 Infectious Diseases.

ESTUDIO 2

Prevalencia de *RASs* en la región NS5A en pacientes con infección por VHC y genotipos 1a y 3: impacto en las estrategias terapéuticas actuales

MATERIALES Y MÉTODOS.

ESTUDIO 2

1. Diseño, ámbito de estudio

Se realizó un estudio observacional en una cohorte de pacientes con infección crónica por el VHC y genotipos 1a y 3 en seguimiento clínico por el Servicio de Medicina Interna B del *XXIAC* y por la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Servicio de Medicina Interna del *XXIF*, ambos integrados dentro de la red *SERGAS*, en el período comprendido entre junio de 2014 y junio de 2016.

Este estudio ha sido aprobado por el CEI de Galicia (código de registro C.0003724) y ha sido realizado de acuerdo con las exigencias éticas y legales establecidas por la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, el Convenio relativo a los derechos humanos y la biomedicina, y a la normativa vigente en materia de investigación.

2. Sujetos de estudio

Los criterios de inclusión para los pacientes incluidos en el estudio fueron: ser mayor de 18 años, tener una serología positiva para el VHC, estar en seguimiento clínico en el *XXIAX* o *XXIF*, ser pacientes *naive* a regímenes basados en inhibidores NS5A, y tener un ARN-VHC >1.000 UI/mL. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado correspondiente a la línea de investigación de Enfermedades Infecciosas debidamente autorizada por el CEI de Galicia con código 2013/244 y registrada en la Sección de Colecciones del Registro Nacional de Biobancos con código C.0002530.

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 C**). La fibrosis hepática fue medida mediante elastografía de transición (FibroScan, EchoSense, Francia) y los resultados expresados kPa se transformaron en la escala METAVIR atendiendo al criterio explicado en el

estudio 1. 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, ambas vigentes en el momento del estudio.

2.1. Procesamiento de las muestras y obtención del plasma

El análisis de la región NS5A se realizó a partir de muestras de plasma obtenidas siguiendo la metodología descrita en el Estudio 1 (apartado 3.1.).

Las alícuotas de plasma obtenidas tras el procedimiento descrito fueron almacenadas a -80°C en el Biobanco de A Coruña de la XXIAC, dentro de la colección de Enfermedades Infecciosas descrita anteriormente, debidamente autorizada por el CEI de Galicia con código 2013/244 y registrada en la Sección de Colecciones del Registro Nacional de Biobancos con código C.0002530.

2.2. Extracción del ARN de las muestras de plasma

La extracción del ARN viral, se realizó a partir de las muestras de plasma. Para ello se utilizó el *kit* comercial *QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Alemania)*, atendiendo a las recomendaciones del fabricante, mediante su automatización en el *QIAcube (Qiagen, Alemania)*, lo que permite una extracción más eficiente, de mayor calidad y con una mayor reproducibilidad de los resultados. El volumen de plasma necesario para la extracción fueron 140 µL de plasma. Todas las muestras fueron descongeladas a 4°C toda la noche previa al proceso de extracción. El principio del *kit* de extracción del ARN viral es el mismo que el explicado en el Estudio 1 (apartado 3.2).

Una vez extraído el ARN viral, se evaluó su concentración y pureza utilizando el espectrofotómetro *NanoDrop 1000 (Thermo Fischer Scientific, EEUU)* y el *software*

asociado del fabricante, midiendo las absorbancias (Abs) a 280 nm, 260 nm y 230 nm para analizar: la concentración del ARN (Abs 260); la contaminación por sales-alcoholes (Abs 260/230); y la contaminación por proteínas (Abs 260/280).

2.3. Amplificación de la región NS5A

El primer paso para la amplificación del dominio I de la región de NS5A fue la realización de una *RT-PCR*, por la que, mediante la retrotranscripción del ARN, este es copiado en ADNc.

Debido a la elevada heterogeneidad del VHC, el ensayo de *RT-PCR* fue diseñado de forma diferente atendiendo al genotipo viral. A continuación, se describen los protocolos empleados para cada uno de los genotipos.

Genotipo 1a. Para la *RT-PCR* del G1a se utilizó el *kit* comercial *OneStep RT-PCR* (*Qiagen*, Alemania), atendiendo a las recomendaciones del fabricante. El *kit* se basa en una combinación de una *RT-PCR* seguida de una PCR convencional. Esto, permite la obtención y amplificación de la región de ADNc de interés, mediante el diseño de cebadores específicos. Los cebadores empleados en esta reacción aparecen recogidos en la **Tabla III**.

La *RT-PCR* se realizó a un volumen final de 50 μ L para cada una de las muestras: 25 μ L agua ultrapura para biología molecular (*Ultrapure Water tested for Molecular Biology applications; Merck-Millipore*, Alemania), 10 μ L tampón (5x *QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer; Qiagen*, Alemania), 2 μ L mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (*dNTPs*) (*Qiagen*, Alemania), 2 μ L enzima (*QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme; Qiagen*, Alemania), 3 μ L cebador EF1a, 3 μ L cebador ER1a y 5 μ L ARN viral.

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 III. Cebadores empleados en la RT-PCR de la región NS5A en pacientes con VHC y G1a.

Cebador	Posiciones polimórficas	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Sentido	Amplicón
EF1a	6057	GTTGGCCCCGGGCGAGGG	Directo	999 pb
ER1a	7056	CGCCCATCTCCTGCCTCCA	Reverso	

Durante todo el proceso de amplificación, se utilizaron controles negativos, sin ARN, con el fin de comprobar las posibles contaminaciones externas.

Genotipo 3. Para la RT-PCR del G3 se empleó *kit Revert H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific, EEUU)*, atendiendo a las recomendaciones del fabricante. Este *kit* se basa en el uso de cebadores hexaméricos aleatorios que permiten la obtención y amplificación de una región indefinida de ADNc.

La reacción de RT-PCR, se divide en dos sub-reacciones. La primera reacción, se caracteriza por la hibridación de los cebadores hexaméricos aleatorios. Esta reacción se realizó a un volumen final de 12 µL: 11 µL de ARN viral y 1 µL de los cebadores hexaméricos aleatorios (*Random Hexamer Primer; Thermo Fisher Scientific, EEUU*). Se incubó 5 minutos a 65°. La segunda reacción es la propia retrotranscripción. Esta reacción se realizó a un volumen final de 8 µL: 5 µL tampón (*5X Reaction Buffer; Thermo Fisher Scientific, EEUU*), 1 µL de inhibidor de ARNasas (*RiboLock RNase Inhibitor; Thermo Fisher Scientific, EEUU*), 2 µL de mezcla de dNTPs (*10 mM dNTP Mix; Thermo Fisher Scientific, EEUU*), 1 µL de enzima (*RevertAid H Minus Reverse Transcriptase; Thermo Fisher Scientific, EEUU*). Para la síntesis del ADNc, se incubó 5 minutos a 25°C, seguido de 60 minutos a 42°C, y un paso final de 5 minutos a 72°C.

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

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

Tabla IV. Cebadores empleados en la *Nested PCR* de la región NS5A en pacientes con VHC y genotipos 1a y 3.

Genotipo VHC	Posición polimórfica	Cebador	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Sentido	Amplicón
G1a	6129	IF1a	TCCCCACGCACTACGTG	Directo	859 pb
	6988	IR1a	GTGCAAGTTGCCTTGAGAGA	Reverso	
G3	6191	NS5A-3a_F	CYGCATTGCTGAGTTCTCTA	Directo	557 pb
	6748	NS5A-3a_R	GYAGTCTCACYCCATCCACTTC	Reverso	

La PCR anidada se realizó a un volumen final de 25 µL para cada una de las muestras: 7 µL agua ultrapura para biología molecular (*Ultrapure Water tested for Molecular Biology applications; Merck-Millipore*, Alemania), 12,5 µL mezcla de dNTPS, tampón y enzima (*HotStarTaq Master Mix; Qiagen*, Alemania), 1,25 µL primer directo, 1,25 µL primer reverso y 3 µL ADNc.

El programa de PCR anidada empleado para los genotipos 1a y 3 consistió en un ciclo de activación inicial de la enzima a 95°C durante 15 minutos, seguido de 45 ciclos

de amplificación formados cada uno de ellos por un primer ciclo de desnaturalización de 33 segundos a 94°C, seguido de una hibridación de 30 segundos a 60°C y una elongación final de 45 segundos a 72°C. Por último, se añadió un paso de extensión final de 5 minutos a 72°C.

Una vez realizada la PCR, 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 anidada. La técnica de electroforesis permite testar que el ADN resultante de la amplificación se corresponde con el tamaño de amplicón esperado.

La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1,5% tenido con 3 µL de *SYBR Safe DNA Gel Stain* (LifeTechnologies, EEUU). Las muestras fueron mezcladas con tampón de carga (azul de xianol, azul de bromofenol y glicerol en relación 1:10) y se dejaron correr a 80 mV. Como marcador de peso molecular, se empleó el *DNA Molecular Weight Marker XIV* (Roche Applied Science, Alemania), el cual permite distinguir bandas de un tamaño entre 100-1.500 pares de bases (pb), con un intervalo de 100 pb entre cada una de las bandas.

Para la visualización del gel se empleó el equipo *Fujifilm Luminiscent Image Analyzer LAS 3000* (Fujifilm, Japón), un transiluminador conectado a una cámara y el programa informático asociado *LAS3000 Image Reader* (Fujifilm, Japón).

2.4. Purificación de los productos de PCR

Tras la realización de la PCR anidada 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 posibles contaminantes (como cebadores y dNTPs no incorporados durante la PCR anidada), que podrían interferir en la posterior reacción de secuenciación.

Como método de purificación se empleó el *kit ExoSAP-IT (Thermo Fischer Scientific, EEUU)*. 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, respectivamente.

El método *ExoSAP-IT* se llevó a cabo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Así, se añadieron 0,6 μL de mezcla de enzimas por cada 1,5 μL de producto de PCR y posteriormente se realizó un ciclo de activación de las enzimas a 37°C durante 15 minutos, seguido de un ciclo de inactivación a 80°C durante 15 minutos.

2.5. Secuenciación de los productos

Una vez purificadas las muestras, se llevó a cabo la reacción de secuenciación y su posterior purificación, previamente al análisis de las mismas en el secuenciador automático de ADN de tecnología capilar *ABI 3130 XL (Applied Biosystems, EEUU)*. 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, EEUU)*, siguiendo las recomendaciones del fabricante, y los cebadores utilizados previamente en la reacción de la PCR anidada (**Tabla IV**). 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)*. El sistema de configuración se basa en un capilar de 36 centímetros de longitud, que contiene un polímero con urea que permite la

migración de los productos [*Performance Optimized Polymer 4 (POP4)*; *Applied Biosystems*, EEUU]. El módulo de ejecución de la carrera en el secuenciador consistió en 22 segundos de inyección y 16 minutos de carrera, con una tensión de funcionamiento de 15 Kvolt. Los datos obtenidos de la secuenciación fueron registrados mediante el programa informático *3130 Series 4* (*Applied Biosystems*, EEUU).

2.6. 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 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* (<https://hcv.geno2pheno.org/>)¹⁷⁹. *Geno2pheno*, incorpora un algoritmo que permite detectar cambios aminoacídicos en las secuencias analizadas al enfrentar las mismas a secuencias diversas secuencias consenso del VHC. Además, la herramienta *Geno2pheno* aporta un análisis sobre la posible susceptibilidad a fármacos y una puntuación asociada a dicha susceptibilidad. Las RASs 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 G3¹⁸⁰.

3. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico *SPSS v19.0* (*SPSS Inc*, EEUU). A partir de las variables sociodemográficas, epidemiológicas, clínicas y virológicas y de los resultados obtenidos a partir de las *RASs* basales de cada uno de los pacientes incluidos en el 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 intercuartílico] en el caso de las variables cuantitativas; y como porcentaje (valor absoluto) en el caso de las variables cualitativas.

RESULTADOS.

ESTUDIO 2

1. Características basales de la población de estudio

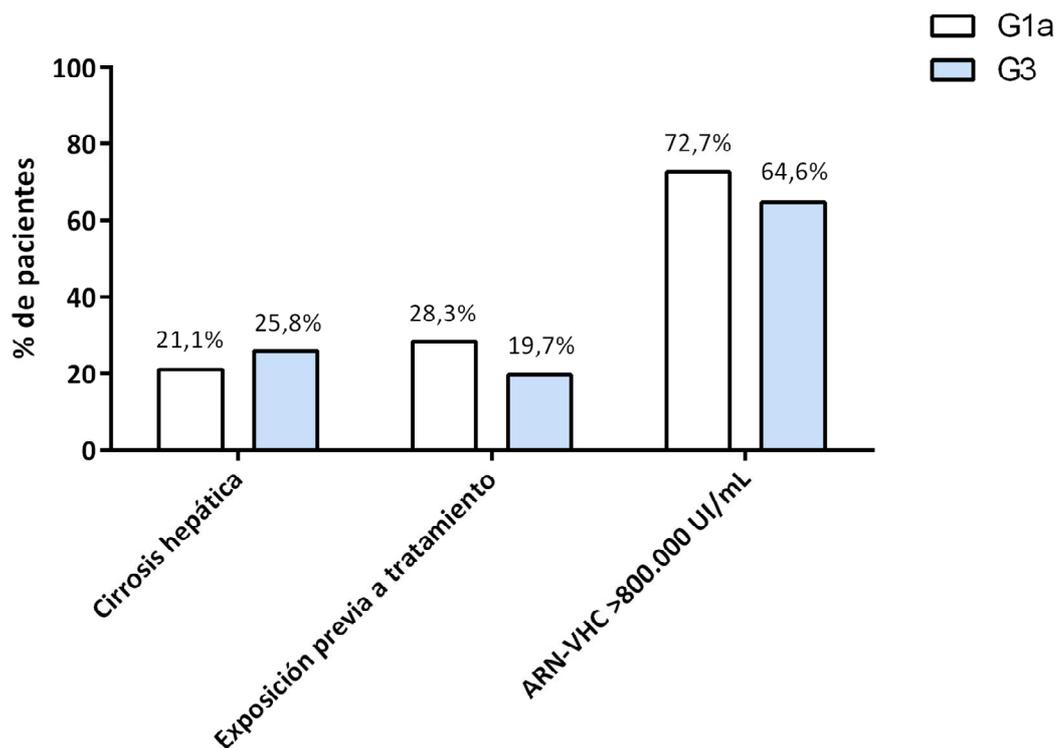
El estudio incluyó 232 pacientes con infección crónica por el VHC: 166 con G1a y 66 con G3. La región del dominio I de NS5A se secuenció con éxito en 162 de los 166 pacientes con G1a incluidos en el estudio, y en todos los pacientes (n/N= 66/66) G3. Las características sociodemográficas, epidemiológicas, clínicas y virológicas de los pacientes incluidos en el estudio se recogen en la **Tabla V**, y se describen para cada genotipo del VHC por separado.

La mayor parte de los pacientes incluidos en el estudio eran varones (G1a 79,5%, n=132; vs. G3 75,8%, n=66), con una edad media de 47-48 años y un tiempo medio desde el diagnóstico hasta la recogida de la muestra de 16-17 años. La prevalencia de co-infección VIH-VHC fue superior al 60% en ambos grupos de pacientes (G1a 61,3%, n=98; y G3 69,7%, n=46).

Tabla V. Características sociodemográficas, epidemiológicas, clínicas y virológicas de los pacientes con genotipos 1a y 3 incluidos en el estudio.

	G1a (N=166)	G3 (N=66)
Género masculino	79,5% (132)	75,8% (50)
Edad (años)	48,7±8,3	49,4±6,7
Tiempo desde el diagnóstico (años)	17±6,9	16,1±6,9
Co-infección VIH/VHC	61,3% (98)	69,7% (46)
Características de los pacientes con impacto clínico en las RASs		
ARN-VHC >800.000 UI/mL	72,7% (120)	64,6% (42)
Exposición previa a terapias basadas en IFN	28,3% (47)	19,7% (13)
Cirrosis hepática	21,1% (35)	25,8% (17)

Los datos se expresan como media±desviación típica para las variables cuantitativas y como % (n) para las variables cualitativas. Abreviaturas: ARN-VHC: carga viral del VHC; G1a: genotipo 1a; G3: genotipo 3; UI/mL: unidades internacionales por mililitro; VHC: virus de la hepatitis C; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.



Características de los pacientes con impacto clínico en las RASs

Figura 26. Prevalencia de las características de los pacientes con impacto clínico en las RASs en los genotipos 1a y 3.

Las características de los pacientes con impacto clínico en las RASs (cirrosis hepática, exposición previa a tratamiento y ARN-VHC > 800.000 UI/mL) fueron evaluadas en ambos genotipos (**Figura 26**). Atendiendo a la fibrosis hepática, el 21,1% (n/N= 35/166) de los pacientes con G1a y el 25,8% (n=17) de los pacientes con G3 tenían fibrosis hepática. La proporción de pacientes con exposición previa al tratamiento fue 28,3% (n=47) para G1a y 19,7% (n=13) para G3. Todos los pacientes G3 pretratados (n/N= 13/13) habían sido expuestos a la combinación estándar de peg-IFN+RBV. En el caso de los pacientes G1a, el 83% (n/N= 39/47) habían sido pretratados con la combinación estándar de peg-IFN+RBV, y el 17% restante (n/N= 8/47) con los inhibidores de proteasa de primera generación BOC y TPV combinados con peg-IFN+RBV. Además, se observó una alta prevalencia de pacientes con niveles basales de

ARN-VHC superiores a 800.000 UI/mL en ambos genotipos (72,7%, n=122 G1a; y 64,4%, n= 42 G3].

2. Prevalencia de RASs basales clínicamente relevantes

La prevalencia global de RASs basales a inhibidores de NS5A clínicamente relevantes fue del 5,5% (9/162) para G1a. Las substitución más frecuente fue la variante Q30H/R (3,1%), el resto de substituciones presentaron prevalencias inferiores al 1%: M28T (0,6%), L31M (0,6%), H58D (0,6%) y Y93H (0,6%) (**Figura 27**). No se observaron RASs basales clínicamente relevantes para los pacientes con G3.

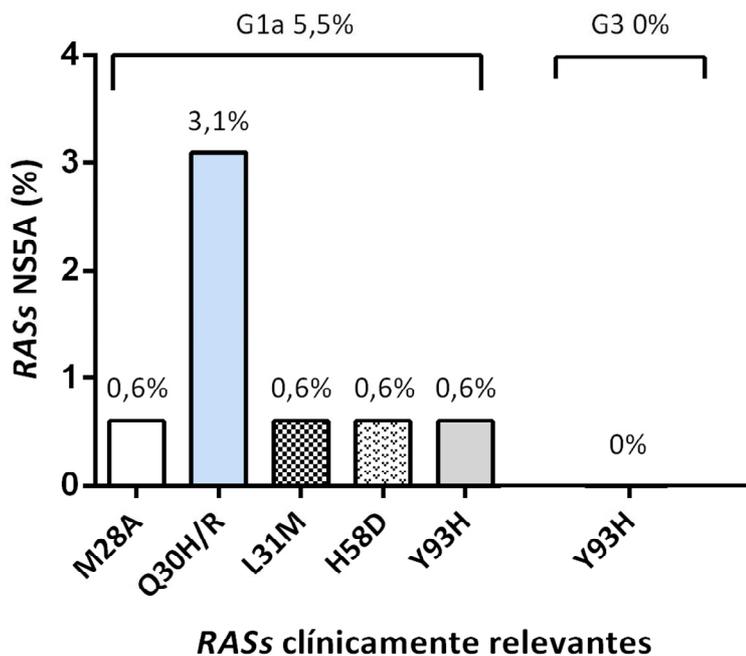


Figura 27. Prevalencia de RASs basales clínicamente relevantes en los genotipos 1a y 3.

3. Impacto *RASs* basales en las pautas de tratamiento con AADs

Se evaluó el impacto de las *RASs* basales en NS5A, que se ha demostrado que tienen un impacto clínico en la respuesta al tratamiento con regímenes que contienen inhibidores de NS5A, sobre las pautas de tratamiento disponibles en las guías terapéuticas vigentes en el momento de la realización del estudio, para determinar la utilidad de la realización de un estudio de resistencias en pacientes con características asociadas con un impacto clínico en las *RASs* (**Tabla VI**). Una característica asociada con el impacto clínico en las *RASs* es la presencia de valores de ARN-VHC superiores a 800.000 UI/mL para la combinación GZR/EBR. En la población de estudio, el 71,6% (n=116) de los pacientes con G1a tenía valores de ARN-VHC superiores a 800.000 UI/mL. Teniendo en cuenta las recomendaciones de las guías de tratamiento, en el caso de que no estuviese disponible el resultado de un estudio de *RASs* basales, todos los pacientes G1a y con ARN-VHC superior a 800.000 UI/mL, necesitarían aumentar la duración del tratamiento a 16 semanas además de añadir RBV. Sin embargo, después de haber determinado las *RASs* basales, y teniendo en cuenta éstas tan sólo estaban presentes en el 5,2% (n/N= 6/116) de los pacientes candidatos a tratarse con GZR/EBR, el número real de pacientes, en los que se requeriría prolongar la duración del tratamiento y añadir RBV, sería muy pequeño. Por lo tanto, el resto de pacientes podrían beneficiarse de un tratamiento optimizado de 12 semanas de duración sin RBV.

Otra característica asociada con el impacto clínico en las *RASs* en el G1a fue la exposición previa a tratamiento, en pacientes con o sin cirrosis, para el uso de las combinaciones SOF/LDV o SOF/DCV. El 29% (n=47) de los pacientes incluidos en el estudio cumplían estas características. Las guías de tratamiento recomendaban en estos pacientes, prolongar la duración del tratamiento a 24 semanas o añadir RBV para un tratamiento de 12 semanas para los regímenes SOF/LDV o SOF/DCV, en el caso de no disponer de un estudio de *RASs* basales. Teniendo en cuenta que en nuestra población tan sólo el 4,3% (n/N= 2/47) de los pacientes tenían *RASs*, sólo este pequeño grupo de pacientes requerirían reforzar el tratamiento. El resto de los pacientes con

exposición previa a tratamiento con o sin cirrosis, podrían beneficiarse de un tratamiento optimizado de 12 semanas de duración sin RBV.

Finalmente, para los pacientes con G3, otra característica asociada con el impacto clínico en las RASs era la presencia de cirrosis, tanto en pacientes pretratados como en pacientes *naive*, para los cuales las guías recomendaban prolongar la duración del tratamiento a 24 semanas o añadir RBV durante 12 semanas para el uso de la combinación SOF/VEL si la RAS Y93H estuviera presente. El 39,4% (n=26) de nuestra población cumplía estas características pero, sin embargo, ninguno de ellos presentó esta substitución, por lo que todos los pacientes con G3 y cirrosis de nuestra población, podrían beneficiarse de un tratamiento estándar de SOF/VEL de 12 semanas de duración y sin RBV.

Tabla VI. Prevalencia de RASs basales a inhibidores de NS5A e implicaciones en las combinaciones con AADs.

Genotipo VHC	Escenario para el estudio de RASs a inhibidores de NS5A		Tasa de pacientes n/N (%)		
	Combinación AADs	Pacientes con recomendaciones de determinar RASs basales	Total	Con RASs ^a	Sin RASs ^b
1a	GZR/EBR	<i>Naive</i> o pretratados con ARN-VHC > 800.000 UI/mL	116/162 (71.6)	6/116 (5.2)	110/116 (94.8)
	SOF/LDV o SOF/DCV	Pretratados con o sin cirrosis	47/162 (29.0)	2/47 (4.3)	45/47 (95.7)
3	SOF/VEL	Pretratados (con o sin cirrosis) y <i>naive</i> con cirrosis	26/66 (39.4)	0/26 (0)	26/26 (100.0)

Los datos están expresados como n/N (%). Abreviaturas: AADs: antivirales de acción directa; DCV: daclatasvir; EBR: elbasvir; GZR: grazoprevir ;LDV:ledipasvir; RASs: *resistance associated substitutions*; SOF: sofosbuvir; UI/mL: unidades internacionales por mililitro; VEL: velpatasvir; VHC: virus de la hepatitis C. ^a En pacientes con RASs se debe reforzar el tratamiento añadiendo ribavirina y/o prolongando la duración del mismo. ^b En pacientes sin RASs se debe tratar con los estándares de tratamiento de AADs.

4. Evaluación de la respuesta al tratamiento de los pacientes con RASs basales

La respuesta al tratamiento fue retrospectivamente evaluada en el grupo de pacientes con RASs basales a inhibidores de NS5A (N=8). De ellos, 2 (25%, n/N=2/8) se encontraban en el momento del estudio todavía bajo tratamiento para el VHC; 2 (25%, n/N=2/8) habían sido tratados sin inhibidores de NS5A; y 4 (50%, n/N=4/8) habían sido tratadas con terapias con inhibidores de NS5A (100%, n/N=4/4 con SOF/LDV). Tan sólo uno de esos pacientes presentó factores de peor respuesta asociados con menores tasas de RVS (por ser pretratado). Este paciente presentó la RAS L31M, que confiere > 100 *fold-change* para LDV. Este paciente fue tratado de acuerdo a las recomendaciones de las guías de tratamiento en el caso de la presencia de RASs, es decir, fue tratado con un tratamiento reforzado con RBV durante 12 semanas, por lo que el efecto de las RASs pudo ser enmascarado. Todos los pacientes que presentaron RASs basales (100% n/N=6/6) alcanzaron RVS.

Los resultados obtenidos en este estudio aparecen recogidos en el artículo: ***Prevalence of NS5A resistance associated substitutions in patients with hepatitis C virus genotypes 1a and 3: Impact on current therapeutic strategies***, publicado en febrero de 2018 en la revista *J Med Virol- Journal of Medical Virology* (**Anexo D**). **Factor de Impacto (JCR 2017): 1,988**. Q2 Infectious Diseases.

DISCUSIÓN

La infección por VHC es un problema de salud pública a nivel mundial que afecta a más de 71 millones de personas en todo el mundo ^{34,35}. Cuando la infección por VHC crónica, se produce una lesión hepática continua que con el tiempo puede desembocar en cirrosis, hepatocarcinoma celular, e incluso en la muerte, siendo la infección por VHC una de las principales causas de trasplante hepático en Europa y EEUU ^{36,37}. Actualmente, la infección por VHC es curable, y una vez alcanzada la RVS la lesión hepática mejora reduciendo el riesgo de morbilidad ¹⁸¹. El paradigma del tratamiento del VHC ha cambiado drásticamente a lo largo de estos últimos años, lo que ha revolucionado por completo el manejo clínico del paciente. En 2011, se produjo la aprobación de la primera generación de AADs, que incrementaron de forma muy significativa las tasas de curación de la infección. Sin embargo, esta primera generación de fármacos está en desuso debido a los elevados efectos adversos que demostraron en su uso a vida real. No obstante, estas moléculas abrieron el camino hacia la aprobación de nuevos AADs con mejores perfiles de seguridad y eficacia ^{182,183}. Desde el año 2014 y hasta la actualidad se han aprobado un total de 13 AADs para el tratamiento frente a la infección por VHC. El éxito de estas nuevas terapias radica en el incremento de las tasas de RVS, desde el 40-50% asociadas al único tratamiento estándar disponible previo a la aprobación de los AADs, la combinación de peg-IFN+RBV, hasta un 95% o incluso un 100% ^{104,106,184}. Además, estas nuevas terapias presentan otras ventajas para el paciente como el acortamiento de la duración del tratamiento, la mejora en la posología y la reducción de los efectos adversos asociados. Así, los AADs han reducido la mortalidad, han mejorado la calidad de vida, han reducido los costes a largo plazo de las complicaciones asociadas a la infección y, además, han contribuido al control de la expansión de la epidemia a nivel mundial.

A pesar de sus múltiples ventajas, el problema al que se enfrentaron los sistemas sanitarios fue su elevado coste inicial que dificultó el acceso simultáneo del tratamiento a todos los pacientes. Para abordar este problema, en España, y al igual que en otros países europeos, se aprobó el PEHC en 2015 con el objetivo de establecer una estrategia terapéutica que regulase el acceso al tratamiento ^{154,185,186}. A pesar de todas las mejoras que ofrece el tratamiento del VHC, se continúa trabajando

para hacer frente a diferentes retos para el control de la infección y para ofrecer tratamientos cada vez más óptimos. Algunos pacientes con infección crónica por VHC presentan características clínicas y relacionadas con el virus que se han asociado con peor respuesta a los tratamientos especialmente cuando aparecen de forma conjunta como son determinados genotipos virales (e.j 1a y 3), cargas virales elevadas (> 800.000 UI/mL), el grado de fibrosis hepática, la exposición previa a terapias con IFN o la presencia de RASs.

En este contexto, en el primero de los estudios propuestos en esta tesis doctoral se centró en la caracterización del perfil de la infección crónica por VHC en el área sanitaria de A Coruña en una cohorte de 387 pacientes y, además, se evaluó en esta misma cohorte, el impacto del PEAHC durante su primer año de aplicación. El objetivo de PEAHC era establecer una adecuada estrategia terapéutica considerando el uso de AADs para el tratamiento del VHC en el SNS ¹⁵⁴. Su aprobación vino motivada por la dificultad que suponía dar acceso simultáneo al tratamiento con AADs a todos los pacientes con infección por VHC, en un corto período de tiempo, y con los elevados costes que estas terapias suponían para el SNS. El PEAHC estableció unos criterios de priorización de tratamiento que fueron: pacientes con una fibrosis hepática de moderada a grave (\geq F2), pacientes trasplantados o en lista de espera de trasplante, pacientes que no hubieran respondido a triple terapia con inhibidores de proteasa de primera generación, y pacientes con manifestaciones extrahepáticas.

A nivel general, las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes con infección crónica por VHC incluidos en nuestra cohorte, fueron principalmente varones (76,2%) con una media de edad de $50 \pm 9,5$ años, donde el tiempo medio transcurrido desde el diagnóstico hasta el momento del estudio fue de 16 ± 7 años. Además, la co-infección por el VIH fue frecuente (60,9%), así como la exposición previa a tratamiento (34,4%) o la presencia de cirrosis hepática (28,7%). La vía de transmisión parenteral por UDVP fue la más frecuente (66,5%). A nivel virológico, las cargas virales del VHC fueron elevadas (superiores a 800.000 UI/mL) en el 72,7% de los pacientes con G1a y en el 64,6% de los pacientes con G3.

En este contexto, otro concepto de interés desde el punto de vista virológico es la distribución de los genotipos del VHC. La distribución presentada por estos genotipos en el área sanitaria de A Coruña, fue similar a la previamente descrita para el oeste de Europa aunque con algunas diferencias locales^{77,187-189}. La prevalencia de la infección por VHC en España está entre las más altas de Europa y muchos estudios han descrito que el G1 es el más común, en línea con lo encontrado en nuestra cohorte (66,2%)¹⁹⁰⁻¹⁹². Así mismo, los datos de nuestra cohorte son muy similares a los publicados recientemente en España en el estudio GEHEP 005⁷¹ (G1 66,1% vs. 66,9%; G2 1,8% vs. 2,8%; G3 16,8% vs. 17,3%; G4 15,3% vs. 11,4%, respectivamente) aunque con algunas pequeñas diferencias dentro del G1. Así, en el resto de España, el G1b parece ser el subtipo mayoritario dentro del G1 (representado el 56,7% de las infecciones por G1) y, sin embargo, en el área sanitaria de A Coruña se ha observado que el subtipo mayoritario es el G1a (representando el 63,1% de las infecciones por G1). Esta mayor prevalencia del G1a dentro del G1 con respecto al resto de España puede ser fácilmente explicada si tenemos en cuenta que en los pacientes co-infectados VIH/VHC el G1a predomina sobre el 1b y que, como se ha indicado anteriormente, nuestra cohorte presenta una alta prevalencia de co-infección por VIH (60,9%)¹⁹³. Así mismo, además de la asociación descrita para los genotipos del VHC con ciertas co-infecciones como es el caso del VIH, también se han descrito otras asociaciones con otros factores como las diferentes vías de transmisión o el género^{77,187-189,191,194}. En el estudio GEHEP 005, los genotipos 1a, 3 y 4 se asociaron con el género masculino, una vía de transmisión parenteral y la co-infección por VIH⁷¹. Así mismo, en nuestra cohorte, los genotipos 1a, 3 y 4, representaron el 79,1% de los varones, el 84,8% de los UDVP y el 83,2% de los co-infectados VIH/VHC.

En relación al perfil de tratamiento utilizado para el uso de AADs, la combinación más prevalente fue SOF/LDV±RBV (nombre comercial Harvoni) contabilizando aproximadamente la mitad de todos los casos (51%), seguida de SOF/DCV±RBV (nombre comercial Sovaldi y Daklinza) con una prevalencia del 18,6%. Estos resultados pueden ser explicados si tenemos en cuenta que uno de los principales parámetros en los que se basa la elección del tratamiento es el genotipo

viral. Según las guías de tratamiento vigentes en el momento de la realización del estudio, la pauta SOF/DCV±RBV era la pauta de elección para los pacientes con G3 y por ello su prevalencia es tan similar a la de la infección por G3 anteriormente mencionada (18,6% vs. 16,8%, respectivamente). Además del genotipo del VHC, las guías de tratamiento consideraban otros factores a tener en cuenta para la elección del tratamiento como el nivel de fibrosis hepática, una historia de fracaso a tratamiento previo, la existencia de otras comorbilidades y posibles interacciones farmacológicas con otros tratamientos concomitantes (e.j. antirretrovirales frente a la infección por VIH). Además, la elección del tratamiento en ocasiones también puede variar en función de la Comunidad Autónoma debido a los diferentes acuerdos de precio-volumen ^{195,196}. Además de lo indicado, la duración del tratamiento seleccionada en la mayoría de los casos fue de 12 semanas (70,6%). Sin embargo, una parte importante de los pacientes que recibieron tratamiento antiviral frente al VHC necesitaron de tratamientos más largos de 24 semanas de duración (28,9%) y/o de la inclusión de RBV (38,2%).

Por su parte, el desarrollo de los AADs ha permitido una significativa mejora en las tasas de RVS y numerosos autores han cifrado esta tasa en más del 95% o incluso casi en un 100% ¹⁸⁴. Sin embargo, aquellos pacientes incluidos en los ensayos clínicos tienen a tener respuestas más favorables que los pacientes de la vida real principalmente debido a la estricta selección de los mismos. En nuestro estudio, la tasa de RVS global fue muy elevada siendo superior al 96%. Además, las tasa de RVS fue considerablemente elevada entre todos los subgrupos evaluados, variando desde un 83,3% hasta el 100%. Los factores como la cirrosis hepática, la historia de fracaso previo a tratamiento y la co-infección por VIH han sido previamente identificados como predictores independientes de peor respuesta al tratamiento ¹⁹⁷. Sin embargo, en nuestra cohorte no observamos diferencias significativas en la RVS atendiendo a estos factores. A pesar de lo indicado, las tasas de RVS sí fueron menores en ciertos subgrupos con factores relacionados con peor respuesta al tratamiento. Así, en relación a la fibrosis hepática, la tasa de RVS fue menor en pacientes con niveles altos de fibrosis (F3 y F4) comparado con los que presentaban niveles bajos (F0-F2) (94,9%

vs. 100%). En relación a la historia de fracaso previo a tratamiento, la RVS también fue menor en pacientes con exposición previa a tratamiento que en aquellos que se trataban por primera vez (93,2% vs. 99%, $p=0,071$). En relación a la co-infección por VIH no se observó esta disminución de la RVS (98,5% vs. 95,8%, $p=0,636$). En este contexto, a pesar de las altas tasas de RVS (98,5%) observadas en nuestra cohorte de pacientes co-infectados VIH/VHC, es destacable que también fueron menos los pacientes que iniciaron tratamiento comparado con aquellos mono-infectados por VHC (42,4% vs. 64,3%, respectivamente). En este contexto cabe destacar que la co-infección por VIH no era uno de los criterios de priorización de tratamiento en el PEAHC. Así, la eficacia de los AAD en pacientes co-infectados VIH/VHC fue similar a los pacientes mono-infectados por VHC, en concordancia con los datos publicados en los ensayos clínicos y en la vida real ^{198,199}. Así, la población co-infectada VIH/VHC parece que no será más una población difícil de tratar y que deberá ser tratada por igual que la mono-infectada por VHC ²⁰⁰.

Además en este contexto, en la nueva era de AADs se ha descrito que el G3 es el genotipo más difícil de tratar cuando se compara con otros genotipos, especialmente en aquellos con cirrosis o exposición previa a tratamiento ^{90,91,201}. Además este G3 se ha asociado con mayores tasas de progresión de fibrosis, una mayor prevalencia de esteatosis severa, un mayor riesgo de carcinoma hepatocelular, y una mayor mortalidad ²⁰²⁻²⁰⁴. Atendiendo a los resultados obtenidos en nuestro estudio en relación a la RVS en función del genotipo viral, la RVS del G3 fue la más baja (91,3% G3 vs. 95,3% G1, $p=0,354$) de todos los genotipos, en concordancia con los resultados publicados hasta ahora y que ya se refieren al G3 como el "genotipo más difícil de tratar" con combinaciones de AADs. En nuestra cohorte, cabe destacar que de los dos pacientes con G3 que fracasaron al tratamiento, ambos tenían asociados factores de mala respuesta al tratamiento, siendo uno de ellos cirrótico y otro pretratado.

Por su parte, el elevado número de pacientes co-infectados VIH/VHC permitió comparar características de la infección por VHC en entre la población co-infectada VIH/VHC y mono-infectada VHC. En relación a la prevalencia de la cirrosis hepática, esta

fue similar tanto en pacientes monoinfectados por el VHC como en pacientes co-infectados VIH/VHC (29,2% vs. 26,8%, respectivamente). En nuestra cohorte, el porcentaje de pacientes que recibían tratamiento antirretroviral para el VIH fue del 95,9%, y de éstos, la gran mayoría (85,8%) tenían niveles de ARN-VIH indetectables. En este contexto, desde la introducción generalizada del tratamiento antirretroviral, los datos de los efectos de la co-infección por VIH en la progresión de la fibrosis hepática y sus complicaciones han estado en controversia^{81,205-207}. La mejora en el control de la infección por VIH, con combinaciones terapéuticas menos tóxicas que permiten preservar el sistema inmunológico de los pacientes, pueden explicar las tasas similares de cirrosis observadas en nuestra cohorte entre pacientes monoinfectados VHC y co-infectados VIH/VHC.

En este escenario, la erradicación del VHC es el objetivo que se desea alcanzar en los próximos años. Un tratamiento exitoso resulta en la cura de la infección por VHC y en la disminución del riesgo de complicaciones asociadas con la enfermedad. Sin embargo, a pesar de los prometedores resultados en cuanto la eficacia y seguridad de las terapias con AADs, que revolucionaron por completo el panorama terapéutico de la infección, muchos países tuvieron que restringir el uso de estas moléculas a pacientes en estadios avanzados de la enfermedad debido a sus elevados precios. Este fue el caso de España, donde la implementación del PEAHC, cuyo objetivo era establecer una adecuada estrategia terapéutica para el acceso a las terapias con AADs estableció ciertas recomendaciones para la priorización del tratamiento antiviral¹⁵⁴. De acuerdo a esto, más de la mitad de los pacientes (52,7%) de nuestra cohorte eran pacientes que iniciaron tratamiento en el área sanitaria de A Coruña durante el año 2015, y de ellos, el 73,5% eran candidatos a priorizar tratamiento según estas recomendaciones. A finales de 2017, y tras tres años en los que el PEAHC aprobado en 2015 reguló el acceso al tratamiento para el VHC, el SNS actualizó ese Plan Estratégico y estableció que todos los pacientes con VHC deberían ser candidatos a tratamiento antiviral, independientemente de su grado de fibrosis⁴⁵. Esta nueva estrategia, tiene como objetivo alcanzar la estrategia mundial de la OMS para eliminar la hepatitis viral como un problema de salud pública para el año 2030¹⁵⁵. Uno de los factores que posibilitó la

reestructuración de este Plan, fue la disminución del coste de los AADs, reduciendo así el gasto por paciente.

Este estudio presenta ciertas limitaciones que deben ser tenidas en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos. Una de ellas es la alta prevalencia de pacientes co-infectados VIH/VHC que podría representar un sesgo en la selección de los pacientes incluidos en el estudio. Esto es debido a que, ya que ambos virus comparten muchas similitudes, su seguimiento y control se realiza por la misma Unidad a nivel hospitalario. Ya que, tradicionalmente, los pacientes con VIH tenían una vigilancia más estrecha para el control de su infección, es probable que por ello los pacientes co-infectados acudiesen a las consultas de forma más frecuente que los pacientes monoinfectados por VHC. Otra limitación de este estudio es que aquí no se evaluaron parámetros como la seguridad del tratamiento ni los parámetros de coste-eficacia.

El objetivo del segundo estudio desarrollado en esta tesis fue evaluar la prevalencia de *RASs* basales a los inhibidores de NS5A en pacientes con infección crónica por el VHC por los genotipos 1a y 3 en el área sanitaria de A Coruña. Puesto que la presencia de *RASs* en combinación con otros factores de peor respuesta se ha asociado con una peor respuesta al tratamiento^{138,169,170,191,208-214}, se quería evaluar en esta población la necesidad y beneficios de la realización de un estudio de resistencias para optimizar la selección de tratamiento siguiendo las recomendaciones de las guías de tratamiento vigentes en el momento de la realización de la tesis^{180,215,216}. La cohorte seleccionada para llevar a cabo este estudio, estaba formada por 166 pacientes con G1a y por 66 pacientes con G3. Tanto los pacientes G1a como G3 presentaron una alta prevalencia de características asociadas con un impacto en las *RASs*: cirrosis 21,1% vs. 25,8%; exposición previa a tratamiento 28,3% vs. 19,7%; ARN-VHC > 800.000 UI/mL 72,7% vs. 64,6%, respectivamente. La prevalencia de *RASs* basales para inhibidores de NS5A fue del 5,5% para el G1a, siendo la mutación Q30H/R la identificada de forma más prevalente. Además, la mutación Y93H, responsable del fenómeno de resistencia para el G3, no fue encontrada en ningún paciente.

En lo que respecta a la prevalencia de *RASs* basales en NS5A, esta puede variar de acuerdo a la región geográfica. Así, en EEUU ha sido descrita una prevalencia de *RASs* para el G1a que varía del 9 al 12%^{64,160,168,169}. En Europa, estudios recientes han descrito tasas de prevalencia que varían del 1,6% en Suecia hasta el 12,5% en Italia^{217,218}. En España, los autores Calleja y colaboradores, así como Palladino y colaboradores, han descrito tasas de prevalencia alrededor del 6%. Estos datos de prevalencia descritos para España son similares a los observados en este estudio. Para el G3, los pocos datos disponibles acerca de la prevalencia de *RASs* han descrito una prevalencia del 3,8% al 8,8%^{138,219}. Sin embargo, la información disponible acerca de la prevalencia de *RASs* para inhibidores de NS5A debe ser interpretada teniendo en cuenta que no existe un método estandarizado para su identificación, la selección de las *RASs* consideradas para el análisis, el tamaño de la población de estudio y las características clínicas de los pacientes incluidos en los diferentes estudios.

Por otro lado, los datos fenotípicos generados por los ensayos clínicos indican que solo las *RASs* que confieren desde un nivel medio a elevado de resistencia podrían afectar a la respuesta al tratamiento con AADs. En este contexto, la *RAS* más prevalente identificada en este estudio, la Q30H/R, confiere un nivel alto de resistencia (*fold-change* > 100) a inhibidores de NS5A^{64,216}. El *fold-change* es definido como el aumento del valor de la concentración mediana efectiva (EC50) de un fármaco para una variante en comparación con el *wild-type*.

En este escenario terapéutico, la presencia de *RASs* clínicamente relevantes en pacientes con G1a y G3, en combinación con características de los pacientes con un impacto en las *RASs* como es el caso de cirrosis, exposición previa al tratamiento, y valores de ARN-VHC superiores a 800.000 UI/mL, harían necesario intensificar el tratamiento mediante el uso de RBV o la extensión de la duración del tratamiento (a 16 ó 24 semanas) siguiendo las recomendaciones de la guías de tratamiento en el momento del estudio. Las *RASs* en la región NS5A tienen un impacto clínico en ciertas combinaciones de AADs que incluyen inhibidores de NS5A. Este es el caso de las combinaciones GZR/EBR y SOF/LDV para el G1a, y SOF/VEL para el G3¹⁸⁰.

En este contexto, en base a los resultados obtenidos a la prevalencia de *RASs* y a las recomendaciones de las guías de tratamiento, analizamos el impacto de las *RASs* en esta cohorte de pacientes con infección crónica por VHC con genotipos 1a y 3. En esta cohorte, muchos de los pacientes tenían, al menos, una característica asociada con una peor respuesta al tratamiento en presencia de *RASs* en la región NS5A (78,9% en pacientes con G1a, y 75,8% en pacientes con G3). Sin embargo, dado que la proporción de pacientes con *RASs* en NS5A fue baja (5,5% vs. 0,0%, respectivamente), más del 94% de estos pacientes podrían curar la infección por VHC con un tratamiento optimizado de 12 semanas de duración sin RBV si el estudio basal de *RASs* en NS5A estuviese disponible.

La RVS fue retrospectivamente analizada en aquellos pacientes con *RASs*, de ellos, la mitad ($n/N= 4/8$) habían recibido una terapia basada en inhibidores de NS5A. Notoriamente, tan solo uno de ellos tenía factores de peor respuesta asociados y en este paciente la terapia que fue utilizada fue un tratamiento estándar potenciado con RBV, por lo que el efecto de la *RAS* basal fue enmascarado.

Estos datos indican que la implementación de un estudio de *RASs* basales en NS5A previo al inicio del tratamiento con inhibidores de NS5A, es de utilidad para ayudar a optimizar las estrategias de tratamiento y evitar las toxicidades asociadas a la RBV, acortar la duración del tratamiento, y los costes. Sin embargo, este estudio de *RASs* en NS5A deberá estar principalmente enfocado a las poblaciones de pacientes con genotipos 1a y 3 y que tengan asociados otros factores que asociados a la presencia de *RASs* se asocien con una peor respuesta al tratamiento.

En cuanto al retratamiento de pacientes que no han respondido a terapias con regímenes que contenían inhibidores de proteasa o inhibidores de NS5A, numerosos estudios han sugerido que la presencia de *RASs* puede tener un impacto significativo en la eficacia del tratamiento de segunda o tercera línea^{64,90,91,168,174}. Por lo tanto, y principalmente debido al carácter persistente de las *RASs* que emergen durante el tratamiento en NS5A, el retratamiento debe ser optimizado basándose en el estudio de resistencias^{90,91}.

Sin embargo, la reciente aprobación de nuevas combinaciones pangénóticas con alta barrera de resistencia y elevada potencia antiviral podrían cambiar este debate. Así, las combinaciones SOF/VEL/VOX y GLE/PIB combinado con SOF parecen ser efectivas en erradicar el VHC en pacientes sin cirrosis o cirrosis compensada que han fracasado previamente a regímenes con AADs ^{177,178}. Además, cuando las RASs se combinan con características propias de los pacientes que los hacen difíciles de tratar, las combinaciones anteriores pueden beneficiarse teóricamente de añadir RBV y/o aumentar la duración del tratamiento a 16 ó 24 semanas. Sin embargo, actualmente no se dispone de datos que apoyen estas indicaciones. La presencia de cirrosis descompensada, hace que estos pacientes no se puedan retratar con regímenes que contengan inhibidores de proteasa, por lo que dado la urgencia de retratarlos, actualmente se recomienda el uso de la combinación SOF/VEL con RBV durante 24 semanas ⁹⁰.

En lo que respecta la prevalencia de RASs en NS5A en la población con infección crónica por VHC y genotipos 1a y 3, hay pocos datos de éstas en poblaciones fuera de los ensayos clínicos ^{64,159,160,210,219,220}. Además, las guías de tratamiento para el VHC en el momento del desarrollo de la tesis recomendaban señalar el uso del estudio de resistencias en la región NS5A para guiar las decisiones de los clínicos a la hora de elegir el tratamiento para el paciente. Aunque los datos de secuenciación profunda pueden aportar información adicional, estudios recientes han mostrado que las RASs presentes en bajas proporciones (1-15%) no influyen significativamente la respuesta a las terapias con AADs ^{168,169}. Así, los datos obtenidos por técnicas de secuenciación poblacional son los apropiados para guiar las decisiones terapéuticas ^{180,216}.

Una de las principales limitaciones de la implementación del estudio de RASs basales en NS5A, es la ausencia de una metodología estándar globalmente disponible. No obstante, en EEUU ya se dispone de un método comercializado para la detección de RASs, aunque su precio es elevado. En este contexto, serían necesarios más datos sobre la prevalencia de RASs en pacientes con G1a y G3 en cohortes de pacientes en la vida real, y que evaluaran el impacto de las RASs en la respuesta al tratamiento, ya que podrían ser útiles para el diseño de estrategias terapéuticas optimizadas.

A pesar de que, según las últimas guías de tratamiento frente al VHC ^{90,91,149}, donde se presentan nuevas combinaciones pangenotípicas con una alta barrera de resistencia y potencia antiviral que parece que minimizan el problema de las RASs, la extensión a países poco desarrollados de estas nuevas combinaciones todavía es un tema controvertido debido a los elevados costes de las terapias. Además, en los próximos años el estudio de RASs en NS5A será una herramienta fundamental para la realización de tratamientos personalizados, particularmente después de un fracaso a AADs. Por ello, y hasta que los nuevos AADs se encuentren ampliamente disponibles en todos los países, el problema de las resistencias deberá de ser considerado.

CONCLUSIONES

1. El perfil clínico-epidemiológico de la infección por VHC en el área sanitaria de A Coruña se caracteriza por una prevalencia mayoritaria en varones (76,2%), con una edad media de $50 \pm 9,5$ años y un tiempo medio desde el diagnóstico de 16 ± 7 años. Además, la co-infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es frecuente (60,9%) y hasta un 28,7% presenta cirrosis hepática.
2. A nivel virológico, los pacientes con infección crónica por VHC presentaron cargas virales elevadas, del orden de $6,01 \log_{10}$ UI/mL. La distribución de genotipos en el área sanitaria de A Coruña es similar a la del oeste de Europa, siendo el genotipo 1 (G1) el más frecuente (66,1%) seguido del genotipo 3 (G3) (16,8%). Notoriamente, el subtipo 1a (G1a) es el subtipo más prevalente dentro del G1 representando el 66,1% de las infecciones.
3. Durante el año 2015 el 52,7% de los pacientes iniciaron tratamiento frente al VHC con AADs. La combinación terapéutica más utilizada fue la de sofosbuvir/ledipasvir (SOF/LDV) (51%) seguida de sofosbuvir/daclatasvir (SOF/DCV) (18,6%), ambas con o sin RBV. La duración del tratamiento fue generalmente de 12 semanas (70,6%) y el uso de ribavirina (RBV) fue frecuente (38,2%).
4. La tasa de respuesta viral sostenida (RVS) fue muy elevada (superior al 96%), y no se observaron diferencias significativas entre ésta y factores asociados con peor respuesta al tratamiento como el genotipo viral, el grado de fibrosis hepática, la exposición previa a tratamiento y la co-infección por VIH.
5. El Plan Estratégico para el Abordaje de la Hepatitis C (PEAHC) en España tuvo un gran impacto en el área sanitaria de A Coruña, donde el 73,7% de pacientes que presentaban algún criterio de priorización, pudo acceder al tratamiento con AADs durante el primer año de implementación del PEAHC.
6. La prevalencia de RASs a los inhibidores de NS5A en el área sanitaria de A Coruña fue baja, del orden del 5,5% para los pacientes con G1a y nula (0%) para los pacientes con G3.

7. La variante Q30H/R fue la substitución más frecuentemente observada en la región NS5A en los pacientes con G1a, con una prevalencia del 3,1%. El resto de las mutaciones se encontraron con una prevalencia inferior al 1% y fueron las siguientes: M28T, L31M, H58D e Y93H.

8. En el área sanitaria de A Coruña la proporción de pacientes con factores asociados a menores tasas de RVS en presencia de *RASs* a los inhibidores de NS5A fue elevada (siendo del 78,9% para el G1a y del 75,8% para el G3).

9. Las tasas de pacientes con *RASs* en NS5A en combinación con alguno de los factores asociados a menores tasas de RVS fueron bajas, por lo que la gran mayoría de los pacientes (G1a más del 94% y G3 el 100%) podrían ser tratados con regímenes estándares de tratamiento.

10. La realización de un estudio de *RASs* basales en la región NS5A en poblaciones específicas (como el G1a y el G3 con factores asociados a menores tasas de RVS) podría ser útil para optimizar las estrategias terapéuticas actuales con terapias basadas en NS5A, evitando las toxicidades asociadas a la RBV y acortando la duración del tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., Alter, H. J. & Holland, P. V. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *The New England journal of medicine* **292**, 767-770, doi:10.1056/NEJM197504102921502 (1975).
- 2 Choo, Q. L. *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359-362 (1989).
- 3 Houghton, M. Discovery of the hepatitis C virus. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **29 Suppl 1**, 82-88, doi:10.1111/j.1478-3231.2008.01925.x (2009).
- 4 Simmonds, P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *The Journal of general virology* **85**, 3173-3188, doi:10.1099/vir.0.80401-0 (2004).
- 5 Tanaka, T., Kato, N., Cho, M. J., Sugiyama, K. & Shimotohno, K. Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *Journal of virology* **70**, 3307-3312 (1996).
- 6 Polyak, S. J., Klein, K. C., Shoji, I., Miyamura, T. & Lingappa, J. R. in *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology* (ed S. L. Tan) (2006).
- 7 McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G. & Martoglio, B. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *The EMBO journal* **21**, 3980-3988, doi:10.1093/emboj/cdf414 (2002).
- 8 McCaffrey, K., Gouklani, H., Boo, I., Poubourios, P. & Drummer, H. E. The variable regions of hepatitis C virus glycoprotein E2 have an essential structural role in glycoprotein assembly and virion infectivity. *The Journal of general virology* **92**, 112-121, doi:10.1099/vir.0.026385-0 (2011).
- 9 Steinmann, E. *et al.* Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS pathogens* **3**, e103, doi:10.1371/journal.ppat.0030103 (2007).
- 10 Steinmann, E. & Pietschmann, T. Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy. *Viruses* **2**, 2078-2095, doi:10.3390/v2092078 (2010).
- 11 Vieyres, G. *et al.* Subcellular localization and function of an epitope-tagged p7 viroporin in hepatitis C virus-producing cells. *Journal of virology* **87**, 1664-1678, doi:10.1128/JVI.02782-12 (2013).
- 12 Schregel, V., Jacobi, S., Penin, F. & Tautz, N. Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 5342-5347, doi:10.1073/pnas.0810950106 (2009).
- 13 Moradpour, D. & Penin, F. Hepatitis C virus proteins: from structure to function. *Current topics in microbiology and immunology* **369**, 113-142, doi:10.1007/978-3-642-27340-7_5 (2013).
- 14 Moradpour, D., Penin, F. & Rice, C. M. Replication of hepatitis C virus. *Nature reviews. Microbiology* **5**, 453-463, doi:10.1038/nrmicro1645 (2007).
- 15 Sillanpaa, M. *et al.* Hepatitis C virus core, NS3, NS4B and NS5A are the major immunogenic proteins in humoral immunity in chronic HCV infection. *Virology journal* **6**, 84, doi:10.1186/1743-422X-6-84 (2009).
- 16 Masaki, T. *et al.* Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *Journal of virology* **82**, 7964-7976, doi:10.1128/JVI.00826-08 (2008).
- 17 Romero-Brey, I. *et al.* Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS pathogens* **8**, e1003056, doi:10.1371/journal.ppat.1003056 (2012).
- 18 Shimakami, T. *et al.* Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *Journal of virology* **78**, 2738-2748 (2004).

- 19 Ross-Thriepfand, D. & Harris, M. Hepatitis C virus NS5A: enigmatic but still promiscuous 10 years on! *The Journal of general virology* **96**, 727-738, doi:10.1099/jgv.0.000009 (2015).
- 20 Appel, N. *et al.* Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS pathogens* **4**, e1000035, doi:10.1371/journal.ppat.1000035 (2008).
- 21 Kim, S., Welsch, C., Yi, M. & Lemon, S. M. Regulation of the production of infectious genotype 1a hepatitis C virus by NS5A domain III. *Journal of virology* **85**, 6645-6656, doi:10.1128/JVI.02156-10 (2011).
- 22 Tellinghuisen, T. L., Foss, K. L. & Treadaway, J. Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS pathogens* **4**, e1000032, doi:10.1371/journal.ppat.1000032 (2008).
- 23 Moradpour, D., Brass, V. & Penin, F. Function follows form: the structure of the N-terminal domain of HCV NS5A. *Hepatology* **42**, 732-735, doi:10.1002/hep.20851 (2005).
- 24 Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F. A., Moradpour, D. & Pawlotsky, J. M. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* **39**, 5-19, doi:10.1002/hep.20032 (2004).
- 25 Dahari, H., Feliu, A., Garcia-Retortillo, M., Forn, X. & Neumann, A. U. Second hepatitis C replication compartment indicated by viral dynamics during liver transplantation. *Journal of hepatology* **42**, 491-498, doi:10.1016/j.jhep.2004.12.017 (2005).
- 26 Forton, D. M., Karayiannis, P., Mahmud, N., Taylor-Robinson, S. D. & Thomas, H. C. Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants. *Journal of virology* **78**, 5170-5183 (2004).
- 27 Goutagny, N. *et al.* Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *The Journal of infectious diseases* **187**, 1951-1958, doi:10.1086/375350 (2003).
- 28 Scarselli, E. *et al.* The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *The EMBO journal* **21**, 5017-5025 (2002).
- 29 Pileri, P. *et al.* Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**, 938-941 (1998).
- 30 Evans, M. J. *et al.* Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**, 801-805, doi:10.1038/nature05654 (2007).
- 31 Benedicto, I. *et al.* The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection. *Journal of virology* **83**, 8012-8020, doi:10.1128/JVI.00038-09 (2009).
- 32 Meertens, L., Bertaux, C. & Dragic, T. Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *Journal of virology* **80**, 11571-11578, doi:10.1128/JVI.01717-06 (2006).
- 33 Lindenbach, B. D. Virion assembly and release. *Current topics in microbiology and immunology* **369**, 199-218, doi:10.1007/978-3-642-27340-7_8 (2013).
- 34 WHO. *Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection*, <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/273174/9789241550345-eng.pdf?ua=1>> (2018).
- 35 Polaris Observatory, H. C. V. C. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *The lancet. Gastroenterology & hepatology* **2**, 161-176, doi:10.1016/S2468-1253(16)30181-9 (2017).
- 36 Bhamidimarri, K. R., Satapathy, S. K. & Martin, P. Hepatitis C Virus and Liver Transplantation. *Gastroenterology & hepatology* **13**, 214-220 (2017).

- 37 Terrault, N. A. & Pageaux, G. P. A changing landscape of liver transplantation: King HCV is dethroned, ALD and NAFLD take over! *Journal of hepatology* **69**, 767-768, doi:10.1016/j.jhep.2018.07.020 (2018).
- 38 Fallahian, F. & Najafi, A. Epidemiology of hepatitis C in the Middle East. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia* **22**, 1-9 (2011).
- 39 Khan, A. J. *et al.* Unsafe injections and the transmission of hepatitis B and C in a periurban community in Pakistan. *Bulletin of the World Health Organization* **78**, 956-963 (2000).
- 40 Mohsen, A. *et al.* Hepatitis C virus acquisition among Egyptians: analysis of a 10-year surveillance of acute hepatitis C. *Tropical medicine & international health : TM & IH* **20**, 89-97, doi:10.1111/tmi.12410 (2015).
- 41 Mitruka, K. *et al.* Launch of a Nationwide Hepatitis C Elimination Program--Georgia, April 2015. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* **64**, 753-757 (2015).
- 42 Negro, F. Epidemiology of hepatitis C in Europe. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* **46 Suppl 5**, S158-164, doi:10.1016/j.dld.2014.09.023 (2014).
- 43 Bruggmann, P. *et al.* Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in selected countries. *Journal of viral hepatitis* **21 Suppl 1**, 5-33, doi:10.1111/jvh.12247 (2014).
- 44 Gower, E., Estes, C., Blach, S., Razavi-Shearer, K. & Razavi, H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *Journal of hepatology* **61**, S45-57, doi:10.1016/j.jhep.2014.07.027 (2014).
- 45 Ministerio de Sanidad, S. S. e. I. Plan estratégico para el abordaje de la Hepatitis C en el SNS (PEAHC). (2017).
- 46 Lavin, A. C. *et al.* Prevalence of hepatitis C in the spanish population. The prevhep study (ethon cohort). *Journal of hepatology* **66**, doi:10.1016/S0168-8278(17)30857-7 (2017).
- 47 Bartenschlager, R. & Lohmann, V. Replication of hepatitis C virus. *The Journal of general virology* **81**, 1631-1648, doi:10.1099/0022-1317-81-7-1631 (2000).
- 48 Gonzalez-Candelas, F., Lopez-Labrador, F. X. & Bracho, M. A. Recombination in hepatitis C virus. *Viruses* **3**, 2006-2024, doi:10.3390/v3102006 (2011).
- 49 Domingo, E. *et al.* Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerging infectious diseases* **4**, 521-527, doi:10.3201/eid0404.980402 (1998).
- 50 Domingo, E., Escarmis, C., Lazaro, E. & Manrubia, S. C. Quasispecies dynamics and RNA virus extinction. *Virus research* **107**, 129-139, doi:10.1016/j.virusres.2004.11.003 (2005).
- 51 Martell, M. *et al.* 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 (1992).
- 52 Simmonds, P. *et al.* Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **42**, 962-973, doi:10.1002/hep.20819 (2005).
- 53 Andino, R. & Domingo, E. Viral quasispecies. *Virology* **479-480**, 46-51, doi:10.1016/j.virol.2015.03.022 (2015).
- 54 Bukh, J., Miller, R. H. & Purcell, R. H. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Seminars in liver disease* **15**, 41-63, doi:10.1055/s-2007-1007262 (1995).
- 55 Argentini, C., Genovese, D., Dettori, S. & Rapicetta, M. HCV genetic variability: from quasispecies evolution to genotype classification. *Future microbiology* **4**, 359-373, doi:10.2217/fmb.09.8 (2009).

- 56 Le Guillou-Guillemette, H. *et al.* Genetic diversity of the hepatitis C virus: impact and issues in the antiviral therapy. *World journal of gastroenterology* **13**, 2416-2426 (2007).
- 57 Smith, D. B. *et al.* Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* **59**, 318-327, doi:10.1002/hep.26744 (2014).
- 58 Li, C., Lu, L., Murphy, D. G., Negro, F. & Okamoto, H. Origin of hepatitis C virus genotype 3 in Africa as estimated through an evolutionary analysis of the full-length genomes of nine subtypes, including the newly sequenced 3d and 3e. *The Journal of general virology* **95**, 1677-1688, doi:10.1099/vir.0.065128-0 (2014).
- 59 Lu, L. *et al.* Analysis of HCV-6 isolates among Asian-born immigrants in North America reveals their high genetic diversity and a new subtype. *Virology* **492**, 25-31, doi:10.1016/j.virol.2016.01.028 (2016).
- 60 Lu, L., Xu, Y., Yuan, J., Li, C. & Murphy, D. G. The full-length genome sequences of nine HCV genotype 4 variants representing a new subtype 4s and eight unclassified lineages. *Virology* **482**, 111-116, doi:10.1016/j.virol.2015.03.038 (2015).
- 61 Negro, F. Mechanisms and significance of liver steatosis in hepatitis C virus infection. *World journal of gastroenterology* **12**, 6756-6765, doi:10.3748/wjg.v12.i42.6756 (2006).
- 62 Pawlotsky, J. M. New hepatitis C therapies: the toolbox, strategies, and challenges. *Gastroenterology* **146**, 1176-1192, doi:10.1053/j.gastro.2014.03.003 (2014).
- 63 Goossens, N. & Negro, F. Is genotype 3 of the hepatitis C virus the new villain? *Hepatology* **59**, 2403-2412, doi:10.1002/hep.26905 (2014).
- 64 Pawlotsky, J. M. Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antiviral Drugs in Interferon-Free Regimens. *Gastroenterology* **151**, 70-86, doi:10.1053/j.gastro.2016.04.003 (2016).
- 65 Messina, J. P. *et al.* Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **61**, 77-87, doi:10.1002/hep.27259 (2015).
- 66 Pybus, O. G. *et al.* Genetic history of hepatitis C virus in East Asia. *Journal of virology* **83**, 1071-1082, doi:10.1128/JVI.01501-08 (2009).
- 67 Magiorkinis, G. *et al.* The global spread of hepatitis C virus 1a and 1b: a phylodynamic and phylogeographic analysis. *PLoS medicine* **6**, e1000198, doi:10.1371/journal.pmed.1000198 (2009).
- 68 Pybus, O. G., Cochrane, A., Holmes, E. C. & Simmonds, P. The hepatitis C virus epidemic among injecting drug users. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **5**, 131-139, doi:10.1016/j.meegid.2004.08.001 (2005).
- 69 Smith, D. B. *et al.* The origin of hepatitis C virus genotypes. *The Journal of general virology* **78 (Pt 2)**, 321-328, doi:10.1099/0022-1317-78-2-321 (1997).
- 70 Murphy, D. G. *et al.* Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. *Journal of clinical microbiology* **45**, 1102-1112, doi:10.1128/JCM.02366-06 (2007).
- 71 Aguilera, A. *et al.* Prevalence and distribution of hepatitis C virus genotypes in Spain during the 2000-2015 period (the GEHEP 005 study). *Journal of viral hepatitis* **24**, 725-732, doi:10.1111/jvh.12700 (2017).
- 72 Orland, J. R., Wright, T. L. & Cooper, S. Acute hepatitis C. *Hepatology* **33**, 321-327, doi:10.1053/jhep.2001.22112 (2001).

- 73 Cox, A. L. *et al.* Prospective evaluation of community-acquired acute-phase hepatitis C virus infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **40**, 951-958, doi:10.1086/428578 (2005).
- 74 Glynn, S. A. *et al.* Dynamics of viremia in early hepatitis C virus infection. *Transfusion* **45**, 994-1002, doi:10.1111/j.1537-2995.2005.04390.x (2005).
- 75 Page-Shafer, K. *et al.* Testing strategy to identify cases of acute hepatitis C virus (HCV) infection and to project HCV incidence rates. *Journal of clinical microbiology* **46**, 499-506, doi:10.1128/JCM.01229-07 (2008).
- 76 Micallef, J. M., Kaldor, J. M. & Dore, G. J. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *Journal of viral hepatitis* **13**, 34-41, doi:10.1111/j.1365-2893.2005.00651.x (2006).
- 77 Hajarizadeh, B., Grebely, J. & Dore, G. J. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **10**, 553-562, doi:10.1038/nrgastro.2013.107 (2013).
- 78 Westbrook, R. H. & Dusheiko, G. Natural history of hepatitis C. *Journal of hepatology* **61**, S58-68, doi:10.1016/j.jhep.2014.07.012 (2014).
- 79 Thein, H. H., Yi, Q., Dore, G. J. & Krahn, M. D. Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression. *Hepatology* **48**, 418-431, doi:10.1002/hep.22375 (2008).
- 80 Gaeta, G. B. *et al.* Epidemiological and clinical burden of chronic hepatitis B virus/hepatitis C virus infection. A multicenter Italian study. *Journal of hepatology* **39**, 1036-1041 (2003).
- 81 Graham, C. S. *et al.* Influence of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **33**, 562-569, doi:10.1086/321909 (2001).
- 82 Hourigan, L. F. *et al.* Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis. *Hepatology* **29**, 1215-1219, doi:10.1002/hep.510290401 (1999).
- 83 Hui, J. M. *et al.* Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression [corrected]. *Gastroenterology* **125**, 1695-1704 (2003).
- 84 Hutchinson, S. J., Bird, S. M. & Goldberg, D. J. Influence of alcohol on the progression of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* **3**, 1150-1159 (2005).
- 85 Leandro, G. *et al.* Relationship between steatosis, inflammation, and fibrosis in chronic hepatitis C: a meta-analysis of individual patient data. *Gastroenterology* **130**, 1636-1642, doi:10.1053/j.gastro.2006.03.014 (2006).
- 86 Minola, E. *et al.* Age at infection affects the long-term outcome of transfusion-associated chronic hepatitis C. *Blood* **99**, 4588-4591, doi:10.1182/blood-2001-12-0192 (2002).
- 87 Poynard, T., Bedossa, P. & Opolon, P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* **349**, 825-832 (1997).
- 88 Ratziu, V. *et al.* Fibrogenic impact of high serum glucose in chronic hepatitis C. *Journal of hepatology* **39**, 1049-1055 (2003).
- 89 Wiley, T. E., Brown, J. & Chan, J. Hepatitis C infection in African Americans: its natural history and histological progression. *The American journal of gastroenterology* **97**, 700-706, doi:10.1111/j.1572-0241.2002.05555.x (2002).

- 90 Liver, E. A. f. t. S. o. t. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. *Journal of hepatology* **69**, 461-511, doi:10.1016/j.jhep.2018.03.026 (2018).
- 91 Panel, A.-I. H. G. Hepatitis C Guidance 2018 Update: AASLD-IDS A Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C Virus Infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **67**, 1477-1492, doi:10.1093/cid/ciy585 (2018).
- 92 Nahon, P. *et al.* Eradication of Hepatitis C Virus Infection in Patients With Cirrhosis Reduces Risk of Liver and Non-Liver Complications. *Gastroenterology* **152**, 142-156 e142, doi:10.1053/j.gastro.2016.09.009 (2017).
- 93 Aziz, B., Nazar, T. & Akhlaq, S. The frequency of occurrence of Hepatocellular Carcinoma after direct antiviral therapy in Hepatitis C virus patients. *Pakistan journal of medical sciences* **35**, 101-105, doi:10.12669/pjms.35.1.109 (2019).
- 94 Giannini, E. G. *et al.* Improvement in hepatitis C virus patients with advanced, compensated liver disease after sustained virological response to direct acting antivirals. *European journal of clinical investigation* **49**, e13056, doi:10.1111/eci.13056 (2019).
- 95 Ioannou, G. N. & Feld, J. J. What Are the Benefits of a Sustained Virologic Response to Direct-Acting Antiviral Therapy for Hepatitis C Virus Infection? *Gastroenterology* **156**, 446-460 e442, doi:10.1053/j.gastro.2018.10.033 (2019).
- 96 Pinero, F. *et al.* Treatment with direct-acting antivirals for HCV decreases but does not eliminate the risk of hepatocellular carcinoma. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, doi:10.1111/liv.14041 (2019).
- 97 Su, F. & Ioannou, G. N. The impact of direct-acting antiviral therapy for hepatitis C on hepatocellular carcinoma risk. *Current hepatology reports* **17**, 377-384, doi:10.1007/s11901-018-0424-8 (2018).
- 98 Huang, M., Jiang, J. D. & Peng, Z. Recent advances in the anti-HCV mechanisms of interferon. *Acta pharmaceutica Sinica. B* **4**, 241-247, doi:10.1016/j.apsb.2014.06.010 (2014).
- 99 Davis, G. L. *et al.* Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa. A multicenter randomized, controlled trial. *The New England journal of medicine* **321**, 1501-1506, doi:10.1056/NEJM198911303212203 (1989).
- 100 Di Bisceglie, A. M. *et al.* Recombinant interferon alfa therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The New England journal of medicine* **321**, 1506-1510, doi:10.1056/NEJM198911303212204 (1989).
- 101 Tanabe, Y. *et al.* Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by combination of ribavirin and interferon- alpha. *The Journal of infectious diseases* **189**, 1129-1139, doi:10.1086/382595 (2004).
- 102 McHutchison, J. G. *et al.* Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *The New England journal of medicine* **339**, 1485-1492, doi:10.1056/NEJM199811193392101 (1998).
- 103 Poynard, T. *et al.* Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* **352**, 1426-1432 (1998).
- 104 Lindsay, K. L. *et al.* A randomized, double-blind trial comparing pegylated interferon alfa-2b to interferon alfa-2b as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* **34**, 395-403, doi:10.1053/jhep.2001.26371 (2001).

- 105 Reddy, K. R. *et al.* Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon alpha-2a compared with interferon alpha-2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **33**, 433-438, doi:10.1053/jhep.2001.21747 (2001).
- 106 Zeuzem, S. *et al.* Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *The New England journal of medicine* **343**, 1666-1672, doi:10.1056/NEJM200012073432301 (2000).
- 107 Antaki, N. *et al.* The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **30**, 342-355, doi:10.1111/j.1478-3231.2009.02188.x (2010).
- 108 Fried, M. W. *et al.* Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine* **347**, 975-982, doi:10.1056/NEJMoa020047 (2002).
- 109 Russo, M. W. & Fried, M. W. Side effects of therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **124**, 1711-1719 (2003).
- 110 Fried, M. W. Side effects of therapy of hepatitis C and their management. *Hepatology* **36**, S237-244, doi:10.1053/jhep.2002.36810 (2002).
- 111 FDA. *PegIntron* [package insert], <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/103949s5306lbl.pdf> (2017).
- 112 Manns, M. P. *et al.* Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* **358**, 958-965 (2001).
- 113 FDA. *Pegasys* [package insert], <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/103964s5270lbl.pdf> (2017).
- 114 Pawlotsky, J. M. New hepatitis C virus (HCV) drugs and the hope for a cure: concepts in anti-HCV drug development. *Seminars in liver disease* **34**, 22-29, doi:10.1055/s-0034-1371007 (2014).
- 115 Delang, L. *et al.* Hepatitis C virus-specific directly acting antiviral drugs. *Current topics in microbiology and immunology* **369**, 289-320, doi:10.1007/978-3-642-27340-7_12 (2013).
- 116 Heim, M. H. 25 years of interferon-based treatment of chronic hepatitis C: an epoch coming to an end. *Nature reviews. Immunology* **13**, 535-542, doi:10.1038/nri3463 (2013).
- 117 Berman, K. & Kwo, P. Y. Boceprevir, an NS3 protease inhibitor of HCV. *Clinics in liver disease* **13**, 429-439, doi:10.1016/j.cld.2009.05.008 (2009).
- 118 Lamarre, D. *et al.* An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* **426**, 186-189, doi:10.1038/nature02099 (2003).
- 119 Banerjee, D. & Reddy, K. R. Review article: safety and tolerability of direct-acting antiviral agents in the new era of hepatitis C therapy. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **43**, 674-696, doi:10.1111/apt.13514 (2016).
- 120 Berger, C. *et al.* Daclatasvir-like inhibitors of NS5A block early biogenesis of hepatitis C virus-induced membranous replication factories, independent of RNA replication. *Gastroenterology* **147**, 1094-1105 e1025, doi:10.1053/j.gastro.2014.07.019 (2014).
- 121 McGivern, D. R. *et al.* Kinetic analyses reveal potent and early blockade of hepatitis C virus assembly by NS5A inhibitors. *Gastroenterology* **147**, 453-462 e457, doi:10.1053/j.gastro.2014.04.021 (2014).
- 122 Pawlotsky, J. M. NS5A inhibitors in the treatment of hepatitis C. *Journal of hepatology* **59**, 375-382, doi:10.1016/j.jhep.2013.03.030 (2013).

- 123 Eltahla, A. A., Luciani, F., White, P. A., Lloyd, A. R. & Bull, R. A. Inhibitors of the Hepatitis C Virus Polymerase; Mode of Action and Resistance. *Viruses* **7**, 5206-5224, doi:10.3390/v7102868 (2015).
- 124 Hong, Z. *et al.* A novel mechanism to ensure terminal initiation by hepatitis C virus NS5B polymerase. *Virology* **285**, 6-11, doi:10.1006/viro.2001.0948 (2001).
- 125 Bacon, B. R. *et al.* Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *The New England journal of medicine* **364**, 1207-1217, doi:10.1056/NEJMoa1009482 (2011).
- 126 Jacobson, I. M. *et al.* Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine* **364**, 2405-2416, doi:10.1056/NEJMoa1012912 (2011).
- 127 Poordad, F. *et al.* Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *The New England journal of medicine* **364**, 1195-1206, doi:10.1056/NEJMoa1010494 (2011).
- 128 Zeuzem, S. *et al.* Telaprevir for retreatment of HCV infection. *The New England journal of medicine* **364**, 2417-2428, doi:10.1056/NEJMoa1013086 (2011).
- 129 Manns, M. *et al.* Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a or 2b plus ribavirin in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* **384**, 414-426, doi:10.1016/S0140-6736(14)60538-9 (2014).
- 130 Lawitz, E. *et al.* Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. *The New England journal of medicine* **368**, 1878-1887, doi:10.1056/NEJMoa1214853 (2013).
- 131 Afdhal, N. *et al.* Ledipasvir and sofosbuvir for previously treated HCV genotype 1 infection. *The New England journal of medicine* **370**, 1483-1493, doi:10.1056/NEJMoa1316366 (2014).
- 132 Afdhal, N. *et al.* Ledipasvir and sofosbuvir for untreated HCV genotype 1 infection. *The New England journal of medicine* **370**, 1889-1898, doi:10.1056/NEJMoa1402454 (2014).
- 133 Kowdley, K. V. *et al.* Ledipasvir and sofosbuvir for 8 or 12 weeks for chronic HCV without cirrhosis. *The New England journal of medicine* **370**, 1879-1888, doi:10.1056/NEJMoa1402355 (2014).
- 134 Lawitz, E. *et al.* Simeprevir plus sofosbuvir, with or without ribavirin, to treat chronic infection with hepatitis C virus genotype 1 in non-responders to pegylated interferon and ribavirin and treatment-naïve patients: the COSMOS randomised study. *Lancet* **384**, 1756-1765, doi:10.1016/S0140-6736(14)61036-9 (2014).
- 135 Feld, J. J. *et al.* Treatment of HCV with ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with ribavirin. *The New England journal of medicine* **370**, 1594-1603, doi:10.1056/NEJMoa1315722 (2014).
- 136 Poordad, F. *et al.* ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with ribavirin for hepatitis C with cirrhosis. *The New England journal of medicine* **370**, 1973-1982, doi:10.1056/NEJMoa1402869 (2014).
- 137 Hezode, C. *et al.* Ombitasvir plus paritaprevir plus ritonavir with or without ribavirin in treatment-naïve and treatment-experienced patients with genotype 4 chronic hepatitis C virus infection (PEARL-I): a randomised, open-label trial. *Lancet* **385**, 2502-2509, doi:10.1016/S0140-6736(15)60159-3 (2015).
- 138 Nelson, D. R. *et al.* 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, doi:10.1002/hep.27726 (2015).

- 139 Kwo, P. *et al.* Effectiveness of Elbasvir and Grazoprevir Combination, With or Without Ribavirin, for Treatment-Experienced Patients With Chronic Hepatitis C Infection. *Gastroenterology* **152**, 164-175 e164, doi:10.1053/j.gastro.2016.09.045 (2017).
- 140 Zeuzem, S. *et al.* Grazoprevir-Elbasvir Combination Therapy for Treatment-Naive Cirrhotic and Noncirrhotic Patients With Chronic Hepatitis C Virus Genotype 1, 4, or 6 Infection: A Randomized Trial. *Annals of internal medicine* **163**, 1-13, doi:10.7326/M15-0785 (2015).
- 141 Abergel, A. *et al.* Ledipasvir-sofosbuvir in patients with hepatitis C virus genotype 5 infection: an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 study. *The Lancet. Infectious diseases* **16**, 459-464, doi:10.1016/S1473-3099(15)00529-0 (2016).
- 142 Abergel, A. *et al.* Ledipasvir plus sofosbuvir for 12 weeks in patients with hepatitis C genotype 4 infection. *Hepatology* **64**, 1049-1056, doi:10.1002/hep.28706 (2016).
- 143 Gane, E. J. *et al.* Efficacy of ledipasvir and sofosbuvir, with or without ribavirin, for 12 weeks in patients with HCV genotype 3 or 6 infection. *Gastroenterology* **149**, 1454-1461 e1451, doi:10.1053/j.gastro.2015.07.063 (2015).
- 144 Kohli, A. *et al.* Ledipasvir and sofosbuvir for hepatitis C genotype 4: a proof-of-concept, single-centre, open-label phase 2a cohort study. *The Lancet. Infectious diseases* **15**, 1049-1054, doi:10.1016/S1473-3099(15)00157-7 (2015).
- 145 Feld, J. J. *et al.* Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 1, 2, 4, 5, and 6 Infection. *The New England journal of medicine* **373**, 2599-2607, doi:10.1056/NEJMoa1512610 (2015).
- 146 Forns, X. *et al.* Glecaprevir plus pibrentasvir for chronic hepatitis C virus genotype 1, 2, 4, 5, or 6 infection in adults with compensated cirrhosis (EXPEDITION-1): a single-arm, open-label, multicentre phase 3 trial. *The Lancet. Infectious diseases* **17**, 1062-1068, doi:10.1016/S1473-3099(17)30496-6 (2017).
- 147 Lawitz, E. *et al.* Sofosbuvir-velpatasvir-voxilaprevir with or without ribavirin in direct-acting antiviral-experienced patients with genotype 1 hepatitis C virus. *Hepatology* **65**, 1803-1809, doi:10.1002/hep.29130 (2017).
- 148 Zeuzem, S. *et al.* Glecaprevir-Pibrentasvir for 8 or 12 Weeks in HCV Genotype 1 or 3 Infection. *The New England journal of medicine* **378**, 354-369, doi:10.1056/NEJMoa1702417 (2018).
- 149 Calleja, J. L. *et al.* Guidelines on treatment of hepatitis C virus infection. Spanish Association for the Study of the Liver (AEEH). *Gastroenterologia y hepatologia* **41**, 597-608, doi:10.1016/j.gastrohep.2018.07.010 (2018).
- 150 Naggie, S. *et al.* Ledipasvir and Sofosbuvir for HCV in Patients Coinfected with HIV-1. *The New England journal of medicine* **373**, 705-713, doi:10.1056/NEJMoa1501315 (2015).
- 151 Chung, R. T. & Baumert, T. F. Curing chronic hepatitis C--the arc of a medical triumph. *The New England journal of medicine* **370**, 1576-1578, doi:10.1056/NEJMp1400986 (2014).
- 152 Bonacci, M., Lens, S., Marino, Z. & Forns, X. Challenges in Special Populations: HIV/HCV Coinfection, Liver Transplantation and Patients with End-Stage Renal Disease. *Digestive diseases* **34**, 317-326, doi:10.1159/000444470 (2016).
- 153 Maan, R. *et al.* Safety and Effectiveness of Direct-Acting Antiviral Agents for Treatment of Patients With Chronic Hepatitis C Virus Infection and Cirrhosis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* **14**, 1821-1830 e1826, doi:10.1016/j.cgh.2016.07.001 (2016).
- 154 Ministerio de Sanidad, S. S. e. I. *Plan Estratégico Nacional para el Abordaje de la Hepatitis C,*

- <http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/docs/plan_estrategico_hepatitis_C.pdf> (2015).
- 155 WHO. Global Health Sector Strategy on Viral Hepatitis. (2016).
- 156 Waheed, Y., Siddiq, M., Jamil, Z. & Najmi, M. H. Hepatitis elimination by 2030: Progress and challenges. *World journal of gastroenterology* **24**, 4959-4961, doi:10.3748/wjg.v24.i44.4959 (2018).
- 157 Li, D. K. & Chung, R. T. Overview of Direct-Acting Antiviral Drugs and Drug Resistance of Hepatitis C Virus. *Methods in molecular biology* **1911**, 3-32, doi:10.1007/978-1-4939-8976-8_1 (2019).
- 158 Bertoli, A. *et al.* Prevalence of Single and Multiple Natural NS3, NS5A and NS5B Resistance-Associated Substitutions in Hepatitis C Virus Genotypes 1-4 in Italy. *Scientific reports* **8**, 8988, doi:10.1038/s41598-018-26862-y (2018).
- 159 Chen, Z. W., Li, H., Ren, H. & Hu, P. Global prevalence of pre-existing HCV variants resistant to direct-acting antiviral agents (DAAs): mining the GenBank HCV genome data. *Scientific reports* **6**, 20310, doi:10.1038/srep20310 (2016).
- 160 Dietz, J. *et al.* Consideration of Viral Resistance for Optimization of Direct Antiviral Therapy of Hepatitis C Virus Genotype 1-Infected Patients. *PLoS one* **10**, e0134395, doi:10.1371/journal.pone.0134395 (2015).
- 161 Yang, S. *et al.* Prevalence of NS5B resistance-associated variants in treatment-naive Asian patients with chronic hepatitis C. *Archives of virology* **163**, 467-473, doi:10.1007/s00705-017-3640-6 (2018).
- 162 Kieffer, T. L. *et al.* Hepatitis C viral evolution in genotype 1 treatment-naive and treatment-experienced patients receiving telaprevir-based therapy in clinical trials. *PLoS one* **7**, e34372, doi:10.1371/journal.pone.0034372 (2012).
- 163 Lenz, O. *et al.* Virology analyses of HCV isolates from genotype 1-infected patients treated with simeprevir plus peginterferon/ribavirin in Phase IIb/III studies. *Journal of hepatology* **62**, 1008-1014, doi:10.1016/j.jhep.2014.11.032 (2015).
- 164 Lenz, O. *et al.* In vitro resistance profile of the hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor TMC435. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**, 1878-1887, doi:10.1128/AAC.01452-09 (2010).
- 165 Howe, A. Y. *et al.* Virologic resistance analysis from a phase 2 study of MK-5172 combined with pegylated interferon/ribavirin in treatment-naive patients with hepatitis C virus genotype 1 infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **59**, 1657-1665, doi:10.1093/cid/ciu696 (2014).
- 166 Summa, V. *et al.* MK-5172, a selective inhibitor of hepatitis C virus NS3/4a protease with broad activity across genotypes and resistant variants. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**, 4161-4167, doi:10.1128/AAC.00324-12 (2012).
- 167 Soumana, D. I., Kurt Yilmaz, N., Ali, A., Prachanronarong, K. L. & Schiffer, C. A. Molecular and Dynamic Mechanism Underlying Drug Resistance in Genotype 3 Hepatitis C NS3/4A Protease. *Journal of the American Chemical Society* **138**, 11850-11859, doi:10.1021/jacs.6b06454 (2016).
- 168 Sarrazin, C. The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice. *Journal of hepatology* **64**, 486-504, doi:10.1016/j.jhep.2015.09.011 (2016).
- 169 Zeuzem, S. *et al.* NS5A resistance-associated substitutions in patients with genotype 1 hepatitis C virus: Prevalence and effect on treatment outcome. *Journal of hepatology* **66**, 910-918, doi:10.1016/j.jhep.2017.01.007 (2017).

- 170 Sarrazin, C. *et al.* Prevalence of Resistance-Associated Substitutions in HCV NS5A, NS5B, or NS3 and Outcomes of Treatment With Ledipasvir and Sofosbuvir. *Gastroenterology* **151**, 501-512 e501, doi:10.1053/j.gastro.2016.06.002 (2016).
- 171 Komatsu, T. E. *et al.* Regulatory Analysis of Effects of Hepatitis C Virus NS5A Polymorphisms on Efficacy of Elbasvir and Grazoprevir. *Gastroenterology* **152**, 586-597, doi:10.1053/j.gastro.2016.10.017 (2017).
- 172 Xu, S. *et al.* In vitro selection of resistance to sofosbuvir in HCV replicons of genotype-1 to -6. *Antiviral therapy* **22**, 587-597, doi:10.3851/IMP3149 (2017).
- 173 Gane, E. J. *et al.* The emergence of NS5B resistance associated substitution S282T after sofosbuvir-based treatment. *Hepatology communications* **1**, 538-549, doi:10.1002/hep4.1060 (2017).
- 174 Di Maio, V. C. *et al.* Multiclass HCV resistance to direct-acting antiviral failure in real-life patients advocates for tailored second-line therapies. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **37**, 514-528, doi:10.1111/liv.13327 (2017).
- 175 Donaldson, E. F., Harrington, P. R., O'Rear, J. J. & Naeger, L. K. Clinical evidence and bioinformatics characterization of potential hepatitis C virus resistance pathways for sofosbuvir. *Hepatology* **61**, 56-65, doi:10.1002/hep.27375 (2015).
- 176 Krishnan, P. *et al.* Resistance analysis of baseline and treatment-emergent variants in hepatitis C virus genotype 1 in the AVIATOR study with paritaprevir-ritonavir, ombitasvir, and dasabuvir. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **59**, 5445-5454, doi:10.1128/AAC.00998-15 (2015).
- 177 Bourliere, M. *et al.* Sofosbuvir, Velpatasvir, and Voxilaprevir for Previously Treated HCV Infection. *The New England journal of medicine* **376**, 2134-2146, doi:10.1056/NEJMoa1613512 (2017).
- 178 Wyles, D. *et al.* Retreatment of patients who failed glecaprevir/pibrentasvir treatment for hepatitis C virus infection. *Journal of hepatology*, doi:10.1016/j.jhep.2019.01.031 (2019).
- 179 Kalaghatgi, P. *et al.* 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, doi:10.1371/journal.pone.0155869 (2016).
- 180 Liver, E. A. f. t. S. o. t. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. *Journal of hepatology* **66**, 153-194, doi:10.1016/j.jhep.2016.09.001 (2016).
- 181 Aleman, S. *et al.* A risk for hepatocellular carcinoma persists long-term after sustained virologic response in patients with hepatitis C-associated liver cirrhosis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **57**, 230-236, doi:10.1093/cid/cit234 (2013).
- 182 Kiser, J. J. & Flexner, C. Direct-acting antiviral agents for hepatitis C virus infection. *Annual review of pharmacology and toxicology* **53**, 427-449, doi:10.1146/annurev-pharmtox-011112-140254 (2013).
- 183 Mousa, O. Y., Pungpapong, S. & Ankoma-Sey, V. The era of first direct-acting antiviral agents: What did we learn? *Clinical liver disease* **8**, 72-75, doi:10.1002/cld.574 (2016).
- 184 Asselah, T., Marcellin, P. & Schinazi, R. F. Treatment of hepatitis C virus infection with direct-acting antiviral agents: 100% cure? *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **38 Suppl 1**, 7-13, doi:10.1111/liv.13673 (2018).
- 185 Gentile, I. *et al.* Limiting the access to direct-acting antivirals against HCV: an ethical dilemma. *Expert review of gastroenterology & hepatology* **10**, 1227-1234, doi:10.1080/17474124.2016.1234375 (2016).

- 186 Rosenthal, E. S. & Graham, C. S. Price and affordability of direct-acting antiviral regimens for hepatitis C virus in the United States. *Infectious agents and cancer* **11**, 24, doi:10.1186/s13027-016-0071-z (2016).
- 187 Cornberg, M. *et al.* A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **31 Suppl 2**, 30-60, doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02539.x (2011).
- 188 Esteban, J. I., Sauleda, S. & Quer, J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *Journal of hepatology* **48**, 148-162, doi:10.1016/j.jhep.2007.07.033 (2008).
- 189 Kartashev, V. *et al.* New findings in HCV genotype distribution in selected West European, Russian and Israeli regions. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **81**, 82-89, doi:10.1016/j.jcv.2016.05.010 (2016).
- 190 Echeverria, N., Moratorio, G., Cristina, J. & Moreno, P. Hepatitis C virus genetic variability and evolution. *World journal of hepatology* **7**, 831-845, doi:10.4254/wjh.v7.i6.831 (2015).
- 191 Poveda, E. *et al.* News on HIV-HCV Coinfection: Update From the 2015 GEHEP Conference. *AIDS reviews* **17**, 231-237 (2015).
- 192 Ramos, B. *et al.* Changes in the distribution of hepatitis C virus (HCV) genotypes over time in Spain according to HIV serostatus: implications for HCV therapy in HCV/HIV-coinfected patients. *The Journal of infection* **54**, 173-179, doi:10.1016/j.jinf.2006.02.006 (2007).
- 193 Berenguer, J. *et al.* Human Immunodeficiency Virus/Hepatitis C Virus Coinfection in Spain: Prevalence and Patient Characteristics. *Open forum infectious diseases* **3**, ofw059, doi:10.1093/ofid/ofw059 (2016).
- 194 Wiessing, L. *et al.* Hepatitis C virus infection epidemiology among people who inject drugs in Europe: a systematic review of data for scaling up treatment and prevention. *PLoS one* **9**, e103345, doi:10.1371/journal.pone.0103345 (2014).
- 195 Douglass, C. H. *et al.* Pathways to ensure universal and affordable access to hepatitis C treatment. *BMC medicine* **16**, 175, doi:10.1186/s12916-018-1162-z (2018).
- 196 Iyengar, S. *et al.* Prices, Costs, and Affordability of New Medicines for Hepatitis C in 30 Countries: An Economic Analysis. *PLoS medicine* **13**, e1002032, doi:10.1371/journal.pmed.1002032 (2016).
- 197 Arias, A. *et al.* Rate and predictors of treatment failure to all-oral HCV regimens outside clinical trials. *Antiviral therapy* **22**, 307-312, doi:10.3851/IMP3061 (2017).
- 198 Walker, D. R., Pedrosa, M. C., Manthena, S. R., Patel, N. & Marx, S. E. Early View of the Effectiveness of New Direct-Acting Antiviral (DAA) Regimens in Patients with Hepatitis C Virus (HCV). *Advances in therapy* **32**, 1117-1127, doi:10.1007/s12325-015-0258-5 (2015).
- 199 Zoulim, F. *et al.* Hepatitis C virus treatment in the real world: optimising treatment and access to therapies. *Gut* **64**, 1824-1833, doi:10.1136/gutjnl-2015-310421 (2015).
- 200 Saeed, S. *et al.* How Generalizable Are the Results From Trials of Direct Antiviral Agents to People Coinfected With HIV/HCV in the Real World? *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **62**, 919-926, doi:10.1093/cid/civ1222 (2016).
- 201 Fathi, H., Clark, A., Hill, N. R. & Dusheiko, G. Effectiveness of current and future regimens for treating genotype 3 hepatitis C virus infection: a large-scale systematic review. *BMC infectious diseases* **17**, 722, doi:10.1186/s12879-017-2820-z (2017).

- 202 Kanwal, F., Kramer, J. R., Ilyas, J., Duan, Z. & El-Serag, H. B. HCV genotype 3 is associated with an increased risk of cirrhosis and hepatocellular cancer in a national sample of U.S. Veterans with HCV. *Hepatology* **60**, 98-105, doi:10.1002/hep.27095 (2014).
- 203 Nkontchou, G. *et al.* HCV genotype 3 is associated with a higher hepatocellular carcinoma incidence in patients with ongoing viral C cirrhosis. *Journal of viral hepatitis* **18**, e516-522, doi:10.1111/j.1365-2893.2011.01441.x (2011).
- 204 Probst, A. *et al.* Role of hepatitis C virus genotype 3 in liver fibrosis progression--a systematic review and meta-analysis. *Journal of viral hepatitis* **18**, 745-759, doi:10.1111/j.1365-2893.2011.01481.x (2011).
- 205 Arends, J. E. *et al.* Natural history and treatment of HCV/HIV coinfection: Is it time to change paradigms? *Journal of hepatology* **63**, 1254-1262, doi:10.1016/j.jhep.2015.06.034 (2015).
- 206 Grunhage, F. *et al.* Transient elastography discloses identical distribution of liver fibrosis in chronic hepatitis C between HIV-negative and HIV-positive patients on HAART. *European journal of medical research* **15**, 139-144, doi:10.1186/2047-783x-15-4-139 (2010).
- 207 Sterling, R. K. *et al.* Similar progression of fibrosis between HIV/HCV-infected and HCV-infected patients: Analysis of paired liver biopsy samples. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* **8**, 1070-1076, doi:10.1016/j.cgh.2010.08.004 (2010).
- 208 Black, S. *et al.* 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 (2015).
- 209 Foster, G. R. *et al.* Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 2 and 3 Infection. *The New England journal of medicine* **373**, 2608-2617, doi:10.1056/NEJMoa1512612 (2015).
- 210 Plaza, Z. *et al.* Prevalence of natural polymorphisms at the HCV NS5A gene associated with resistance to daclatasvir, an NS5A inhibitor. *Antiviral therapy* **17**, 921-926, doi:10.3851/IMP2091 (2012).
- 211 Poveda, E. *et al.* Update on hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral agents. *Antiviral research* **108**, 181-191, doi:10.1016/j.antiviral.2014.05.015 (2014).
- 212 Wyles, D. *et al.* Post-treatment resistance analysis of hepatitis C virus from phase II and III clinical trials of ledipasvir/sofosbuvir. *Journal of hepatology* **66**, 703-710, doi:10.1016/j.jhep.2016.11.022 (2017).
- 213 Zeuzem, S. *et al.* Prevalence of Pre-Treatment 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-255A (2015).
- 214 Zeuzem, S. *et al.* Predictors of Response to Elbasvir/Grazoprevir Among HCV Genotype 1 (GT1)-Infected Patients: Integrated Analysis of Phase 2-3 Trials -2 *Hepatology* **66**, 910-918 (2015).
- 215 AEEH/SEIMC. *Guías de manejo de la hepatitis C* , <<http://aeeh.es/wp-content/uploads/2017/03/documento-consenso.pdf>> (2017).
- 216 Panel, A.-I. H. G. *HCV guidance: recommendations for testing, managing, and treating hepatitis C*, <<https://www.hcvguidelines.org/>> (2017).
- 217 Lindstrom, I. *et al.* Prevalence of polymorphisms with significant resistance to NS5A inhibitors in treatment-naive patients with hepatitis C virus genotypes 1a and 3a in Sweden. *Infectious diseases* **47**, 555-562, doi:10.3109/23744235.2015.1028097 (2015).

- 218 Paolucci, S. *et al.* Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naive patients. *Virology journal* **10**, 355, doi:10.1186/1743-422X-10-355 (2013).
- 219 Pérez, A. B. *et al.* 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 clinica* **3**, 6 (2016).
- 220 Bagaglio, S., Andolina, A., Merli, M., Uberti-Foppa, C. & Morsica, G. 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, doi:10.3390/v8040091 (2016).

ANEXOS

Anexo A. Hoja de recogida de datos de los pacientes del Estudio 1.

Variables sociodemográficas y epidemiológicas			
Año de nacimiento			
Nacionalidad			
Género	<input type="checkbox"/> Varón	<input type="checkbox"/> Mujer	<input type="checkbox"/> Transexual
Etnia			
Fumador	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Ex-fumador
En caso afirmativo especificar nº cigarrillos/día			
Consumo alcohol >30gr/día	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Ex-bebedor
Consumo activo de drogas (especificar)			
Comorbilidad	<input type="checkbox"/> Ósea	<input type="checkbox"/> Toxicidad renal	
En caso afirmativo indicar tipo de comorbilidad			
	<input type="checkbox"/> Cardiovascular	<input type="checkbox"/> Neuropsiquiátrica	
	<input type="checkbox"/> Diabetes	<input type="checkbox"/> Digestiva	
Parámetros clínicos			
AST/ALT/GGT (UI/mL)			
Parámetros virológicos infección por VHC			
Fecha de diagnóstico VHC			
Vía de transmisión VHC			
Genotipo/subtipo VHC			
ARN-VHC basal (log ₁₀ UI/mL)			
ARN-VHC actual (log ₁₀ UI/mL)			
Fibroscan actual (kPa) y grado de fibrosis			
Cirrosis hepática (>12,5 kPa)	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	
Polimorfismo IL-28B	<input type="checkbox"/> CC	<input type="checkbox"/> CT	<input type="checkbox"/> TT
Descompensación hepática	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	
En caso afirmativo indicar que tipo			
Exposición previa a tto	<input type="checkbox"/> <i>Naive</i>	<input type="checkbox"/> Pretratado	
En caso afirmativo describir pauta y tipo de respuesta			
Inicio tratamiento activo VHC en 2015	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	
En caso afirmativo describir pauta y duración			
RVS	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	
En caso negativo describir si el paciente se retrató y con que			
Co-infección con otros virus			
En caso afirmativo describir tipo de virus			
Parámetros virológicos co-infección por VIH			
Fecha de diagnóstico VIH			
Vía de transmisión VIH			
En tratamiento antirretroviral	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	
En caso afirmativo describir pauta y fecha de inicio			
Recuento linfocitos CD4+ (células/mm ³)			
ARN-VIH indetectable	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	

Anexo B. Publicación científica derivada del Estudio 1.

Received: 21 October 2016 | Accepted: 6 January 2017

DOI 10.1002/jmv.24766

SHORT COMMUNICATION

WILEY **JOURNAL OF
MEDICAL VIROLOGY**

Characterization of chronic HCV infection in Northwest Spain: Impact of the treatment strategic plan of the Spanish National Health Service on HCV cure

Marta Grandal¹ | Berta Pernas¹ | Ana Mariño² | Hortensia Álvarez² |
Andrés Tabernilla¹ | Ángeles Castro-Iglesias¹ | Álvaro Mena¹ |
Manuel Delgado¹ | Sonia Pértega³ | Eva Poveda¹ 

¹Grupo de Virología Clínica, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC)-Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), SERGAS Universidad de A Coruña, A Coruña, Spain

²Unidad de Enfermedades Infecciosas, Servicio de Medicina Interna, Complejo Hospitalario Universitario de Ferrol (CHUF), SERGAS, Ferrol, Spain

³Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC)-Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), A Coruña, Spain

Correspondence

Eva Poveda, Grupo de Virología Clínica, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), As Xubias s/n, A Coruña 15006, Spain.

Email: eva.poveda.lopez@sergas.es

Funding information

Fondo de Investigación Sanitaria, Grant numbers: CPII14/00014, PI10/02166, PI13/02266, CM15/00233, FI14/00557; Fundación Profesor Novoa Santos, A Coruña

The aim of the study was to characterize HCV infection in Northwest Spain and assess the impact of the Spanish Strategic Plan to cure HCV infection. Overall, 387 patients were included (60.9% HIV/HCV coinfecting and 28.2% cirrhotic). Of these, 72.9% of patients that were recognized as priority for HCV treatment according to the Spanish Strategic Plan (\geq F2, transplant or extrahepatic manifestations), initiated treatment during 2015. Globally, SVR12 was achieved in 96.5% of patients. The implementation of the Spanish Strategic Plan has been critical to advance in HCV cure, but 27.1% of priority patients still remain awaiting HCV treatment initiation.

KEYWORDS

HCV infection, HCV treatment, HIV/HCV coinfection

1 | BACKGROUND

HCV infection is an important health problem affecting more than 150 million people worldwide and about 475 000 people in Spain,^{1,2} and can lead to significant morbidity and mortality.³ The introduction of high-effective and well tolerated direct-acting antivirals (DAA) has allowed for shorter treatment regimens and offered new opportunities for previously excluded groups. Additionally, these newer regimens have shown to be cost-effective across all fibrosis stages.^{4,5} However, their current high cost only allows a restricted number of patients to access treatment. In May 2015, the Spanish National Health Service published a Strategic Plan to face HCV infection. The objective of this Plan was to effectively address the prevention, diagnosis, treatment, and monitoring of HCV-infected patients.²

The aim of the study was to characterize HCV infection in Northwest Spain and evaluate the impact of the Spanish Strategic Plan in this population.

2 | MATERIALS AND METHODS

This is a transversal observational study. Patients with chronic HCV infection in two hospitals of Northwest Spain were included in the period June 2014 to December 2015 ($n = 387$). This sample size allows to estimate parameters of interest with a confidence interval of 95% ($\alpha = 0.05$) and a precision $\pm 5\%$.

The research protocol was approved by the regional ethics committee ("Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia," register

code 2013/249). All patients participating in the study signed the informed consent.

Epidemiological, clinical, and virological characteristics were recorded. Liver fibrosis was measured by transient elastography. Regimen and duration of treatment were recorded in those patients who initiated HCV treatment during 2015. Treatment efficacy was measured as sustained virological response (SVR12) defined as HCV-RNA below the level of detection recorded 12 weeks after treatment discontinuation.

The statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS 19.0, Chicago, IL). Categorical variables were presented as number of cases or percentage and compared by χ^2 test or Fisher's exact test, when appropriate. Continuous variables were expressed as median (interquartile range) and compared by non-parametric Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test, when appropriate. A *P*-value <0.05 was considered statistically significant.

3 | RESULTS

A total of 387 patients were included. Of these, 72.6% were men; 60.9% (*n* = 223) HIV/HCV coinfecting patients and 28.2% (*n* = 100) cirrhotic. Epidemiological, clinical, laboratory parameters, and virological characteristics previous to HCV-treatment initiation are shown in Table 1. Genotype 1 was the most common one (66.2%) followed by genotype 3 (16.8%). Overall, 4.4% of patients had previous hepatic decompensation: hydropic decompensation (3.9%), encephalopathy (1.3%), and/or gastrointestinal bleeding (0.8%). In addition, 1% of patients had hepatocellular carcinoma and 3.9% extrahepatic manifestations of HCV infection. Among treatment-experienced (34.4%) patients, 81.8% had received pegylated-interferon (Peg-IFN) and ribavirin (RBV) regimen, and 15.2% Peg-IFN + RBV + boceprevir/telaprevir. Response to previous HCV treatment was: 31.8% null response, 25.8% relapse, 21.2% intolerance to Peg-IFN + RBV, 10.6% partial response, and 10.6% unknown response.

Regarding HIV/HCV patients, 95.9% received antiretroviral treatment (ART) with a combination of two nucleoside reverse transcriptase inhibitors and a protease inhibitor (43.8%), a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (28.8%) or an integrase inhibitor (13.5%) while 13.5% received other regimens. Median CD4 count at the moment of the study was 566 (312-750) cells/mm³ and 86.7% of patients under ART had suppressed viremia.

During 2015, 52.7% of HCV-infected patients initiated treatment. According to the Spanish Strategic Plan for HCV infection, 66.5% of all patients should be prioritized for HCV treatment (liver fibrosis \geq F2, transplant or extrahepatic manifestations). Of these, 72.9% initiated HCV treatment during 2015. Combinations of DAA and duration of HCV treatment are shown in Table 1.

Overall, 96.5% of HCV patients achieved SVR12. SVR12 rates in different subgroups are shown in Figure 1. No differences were observed according to previous HCV treatment (*P* = 0.086), HIV/HCV coinfection (*P* = 0.395), HCV genotype (1 vs. non-1 genotype,

P = 0.999; and 3 vs. non-3, *P* = 0.181) or liver fibrosis (F2-F3 vs. F4, *P* = 0.408).

Among failures (*n* = 6), five were treatment-experienced (Peg-IFN-based regimens), four cirrhotic, and one was HIV/HCV coinfecting. Regarding HCV genotypes, there were four patients with genotype 1 (only one with genotype 1a although subtype was not determined in one patient) and two with genotype 3. All failures but two (intolerance to Peg-IFN-based regimen and hepatic decompensation with death) were relapses. Of these, three patients were re-treated (Peg-IFN + RBV + sofosbuvir (SOF) and SOF + ledipasvir + RBV, and both achieved SVR12 while another is on-treatment with SOF + daclatasvir + RBV) and one patient died before re-treatment due to hepatocellular cancer. Resistance test was performed in only one patient and no resistance mutations were found.

4 | DISCUSSION

This study characterizes chronic HCV infection in 387 patients in Northwest Spain and the impact of the Spanish Strategic Plan on HCV cure last year. This cohort had 28.2% of patients with cirrhosis and a high prevalence of HIV/HCV patients (60.9%). The introduction of the Spanish Strategic Plan in 2015 has allowed to treat half (52.7%) of all HCV patients with different DAA-combinations and SVR12 rates over 96%.

The distribution of HCV genotypes is similar throughout Western Europe with some local differences.^{1,6,7,88} The prevalence of HCV infection in Spain is among the highest in Europe and several studies reported genotype 1 as the most common one, similarly to our cohort (66.2%).^{9,10,11} In addition, HCV genotypes are usually associated to different routes of transmission. In fact, genotypes 1a, 3, and 4 are more common among intravenous drug users^{1,6,7,8,10,12} and represent 82% of HIV/HCV patients in our cohort.

Cirrhosis had similar prevalence in both HCV-monoinfected and HIV/HCV patients (29.2% vs. 26.8%, respectively). Since the widespread introduction of ART regimens, data on the effect of HIV coinfection on liver fibrosis progression and its complications have been controversial.^{13,14,15,16} An improved control of HIV infection with earlier initiation of a less hepatotoxic ART and higher CD4 counts could explain similar rates of cirrhosis in both HCV-monoinfected and HIV/HCV patients observed in our cohort.

The development of DAA has allowed a significant improvement in rates of SVR12. However, those patients involved in clinical trials tend to have more favorable outcomes than patients in the real-world mainly due to strict patient selection. In our cohort, rates of SVR12 were consistently high across all subgroups evaluated, ranging from 83.3% to 100%. Cirrhosis and HIV/HCV coinfection had been previously identified as independent predictors of virological failure.¹⁷ However, we found no significant differences in SVR12 based on HIV/HCV coinfection or liver fibrosis. Despite the high rate (98.5%) of SVR12 observed in our cohort of HIV/HCV patients, it is noteworthy that less patients have initiated treatment compared with HCV-monoinfected (42.4% and 64.3%, respectively). Effectiveness in HIV/HCV patients was similar to HCV-monoinfected and concordant with

code 2013/249). All patients participating in the study signed the informed consent.

Epidemiological, clinical, and virological characteristics were recorded. Liver fibrosis was measured by transient elastography. Regimen and duration of treatment were recorded in those patients who initiated HCV treatment during 2015. Treatment efficacy was measured as sustained virological response (SVR12) defined as HCV-RNA below the level of detection recorded 12 weeks after treatment discontinuation.

The statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS 19.0, Chicago, IL). Categorical variables were presented as number of cases or percentage and compared by χ^2 test or Fisher's exact test, when appropriate. Continuous variables were expressed as median (interquartile range) and compared by non-parametric Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test, when appropriate. A *P*-value <0.05 was considered statistically significant.

3 | RESULTS

A total of 387 patients were included. Of these, 72.6% were men; 60.9% (*n* = 223) HIV/HCV coinfecting patients and 28.2% (*n* = 100) cirrhotic. Epidemiological, clinical, laboratory parameters, and virological characteristics previous to HCV-treatment initiation are shown in Table 1. Genotype 1 was the most common one (66.2%) followed by genotype 3 (16.8%). Overall, 4.4% of patients had previous hepatic decompensation: hydropic decompensation (3.9%), encephalopathy (1.3%), and/or gastrointestinal bleeding (0.8%). In addition, 1% of patients had hepatocellular carcinoma and 3.9% extrahepatic manifestations of HCV infection. Among treatment-experienced (34.4%) patients, 81.8% had received pegylated-interferon (Peg-IFN) and ribavirin (RBV) regimen, and 15.2% Peg-IFN + RBV + boceprevir/telaprevir. Response to previous HCV treatment was: 31.8% null response, 25.8% relapse, 21.2% intolerance to Peg-IFN + RBV, 10.6% partial response, and 10.6% unknown response.

Regarding HIV/HCV patients, 95.9% received antiretroviral treatment (ART) with a combination of two nucleoside reverse transcriptase inhibitors and a protease inhibitor (43.8%), a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (28.8%) or an integrase inhibitor (13.5%) while 13.5% received other regimens. Median CD4 count at the moment of the study was 566 (312-750) cells/mm³ and 86.7% of patients under ART had suppressed viremia.

During 2015, 52.7% of HCV-infected patients initiated treatment. According to the Spanish Strategic Plan for HCV infection, 66.5% of all patients should be prioritized for HCV treatment (liver fibrosis \geq F2, transplant or extrahepatic manifestations). Of these, 72.9% initiated HCV treatment during 2015. Combinations of DAA and duration of HCV treatment are shown in Table 1.

Overall, 96.5% of HCV patients achieved SVR12. SVR12 rates in different subgroups are shown in Figure 1. No differences were observed according to previous HCV treatment (*P* = 0.086), HIV/HCV coinfection (*P* = 0.395), HCV genotype (1 vs. non-1 genotype,

P = 0.999; and 3 vs. non-3, *P* = 0.181) or liver fibrosis (F2-F3 vs. F4, *P* = 0.408).

Among failures (*n* = 6), five were treatment-experienced (Peg-IFN-based regimens), four cirrhotic, and one was HIV/HCV coinfecting. Regarding HCV genotypes, there were four patients with genotype 1 (only one with genotype 1a although subtype was not determined in one patient) and two with genotype 3. All failures but two (intolerance to Peg-IFN-based regimen and hepatic decompensation with death) were relapses. Of these, three patients were re-treated (Peg-IFN + RBV + sofosbuvir (SOF) and SOF + ledipasvir + RBV, and both achieved SVR12 while another is on-treatment with SOF + daclatasvir + RBV) and one patient died before re-treatment due to hepatocellular cancer. Resistance test was performed in only one patient and no resistance mutations were found.

4 | DISCUSSION

This study characterizes chronic HCV infection in 387 patients in Northwest Spain and the impact of the Spanish Strategic Plan on HCV cure last year. This cohort had 28.2% of patients with cirrhosis and a high prevalence of HIV/HCV patients (60.9%). The introduction of the Spanish Strategic Plan in 2015 has allowed to treat half (52.7%) of all HCV patients with different DAA-combinations and SVR12 rates over 96%.

The distribution of HCV genotypes is similar throughout Western Europe with some local differences.^{1,6,7,88} The prevalence of HCV infection in Spain is among the highest in Europe and several studies reported genotype 1 as the most common one, similarly to our cohort (66.2%).^{9,10,11} In addition, HCV genotypes are usually associated to different routes of transmission. In fact, genotypes 1a, 3, and 4 are more common among intravenous drug users^{1,6,7,8,10,12} and represent 82% of HIV/HCV patients in our cohort.

Cirrhosis had similar prevalence in both HCV-monoinfected and HIV/HCV patients (29.2% vs. 26.8%, respectively). Since the widespread introduction of ART regimens, data on the effect of HIV coinfection on liver fibrosis progression and its complications have been controversial.^{13,14,15,16} An improved control of HIV infection with earlier initiation of a less hepatotoxic ART and higher CD4 counts could explain similar rates of cirrhosis in both HCV-monoinfected and HIV/HCV patients observed in our cohort.

The development of DAA has allowed a significant improvement in rates of SVR12. However, those patients involved in clinical trials tend to have more favorable outcomes than patients in the real-world mainly due to strict patient selection. In our cohort, rates of SVR12 were consistently high across all subgroups evaluated, ranging from 83.3% to 100%. Cirrhosis and HIV/HCV coinfection had been previously identified as independent predictors of virological failure.¹⁷ However, we found no significant differences in SVR12 based on HIV/HCV coinfection or liver fibrosis. Despite the high rate (98.5%) of SVR12 observed in our cohort of HIV/HCV patients, it is noteworthy that less patients have initiated treatment compared with HCV-monoinfected (42.4% and 64.3%, respectively). Effectiveness in HIV/HCV patients was similar to HCV-monoinfected and concordant with

code 2013/249). All patients participating in the study signed the informed consent.

Epidemiological, clinical, and virological characteristics were recorded. Liver fibrosis was measured by transient elastography. Regimen and duration of treatment were recorded in those patients who initiated HCV treatment during 2015. Treatment efficacy was measured as sustained virological response (SVR12) defined as HCV-RNA below the level of detection recorded 12 weeks after treatment discontinuation.

The statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS 19.0, Chicago, IL). Categorical variables were presented as number of cases or percentage and compared by χ^2 test or Fisher's exact test, when appropriate. Continuous variables were expressed as median (interquartile range) and compared by non-parametric Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test, when appropriate. A *P*-value <0.05 was considered statistically significant.

3 | RESULTS

A total of 387 patients were included. Of these, 72.6% were men; 60.9% (*n* = 223) HIV/HCV coinfecting patients and 28.2% (*n* = 100) cirrhotic. Epidemiological, clinical, laboratory parameters, and virological characteristics previous to HCV-treatment initiation are shown in Table 1. Genotype 1 was the most common one (66.2%) followed by genotype 3 (16.8%). Overall, 4.4% of patients had previous hepatic decompensation: hydropic decompensation (3.9%), encephalopathy (1.3%), and/or gastrointestinal bleeding (0.8%). In addition, 1% of patients had hepatocellular carcinoma and 3.9% extrahepatic manifestations of HCV infection. Among treatment-experienced (34.4%) patients, 81.8% had received pegylated-interferon (Peg-IFN) and ribavirin (RBV) regimen, and 15.2% Peg-IFN + RBV + boceprevir/telaprevir. Response to previous HCV treatment was: 31.8% null response, 25.8% relapse, 21.2% intolerance to Peg-IFN + RBV, 10.6% partial response, and 10.6% unknown response.

Regarding HIV/HCV patients, 95.9% received antiretroviral treatment (ART) with a combination of two nucleoside reverse transcriptase inhibitors and a protease inhibitor (43.8%), a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (28.8%) or an integrase inhibitor (13.5%) while 13.5% received other regimens. Median CD4 count at the moment of the study was 566 (312-750) cells/mm³ and 86.7% of patients under ART had suppressed viremia.

During 2015, 52.7% of HCV-infected patients initiated treatment. According to the Spanish Strategic Plan for HCV infection, 66.5% of all patients should be prioritized for HCV treatment (liver fibrosis \geq F2, transplant or extrahepatic manifestations). Of these, 72.9% initiated HCV treatment during 2015. Combinations of DAA and duration of HCV treatment are shown in Table 1.

Overall, 96.5% of HCV patients achieved SVR12. SVR12 rates in different subgroups are shown in Figure 1. No differences were observed according to previous HCV treatment (*P* = 0.086), HIV/HCV coinfection (*P* = 0.395), HCV genotype (1 vs. non-1 genotype,

P = 0.999; and 3 vs. non-3, *P* = 0.181) or liver fibrosis (F2-F3 vs. F4, *P* = 0.408).

Among failures (*n* = 6), five were treatment-experienced (Peg-IFN-based regimens), four cirrhotic, and one was HIV/HCV coinfecting. Regarding HCV genotypes, there were four patients with genotype 1 (only one with genotype 1a although subtype was not determined in one patient) and two with genotype 3. All failures but two (intolerance to Peg-IFN-based regimen and hepatic decompensation with death) were relapses. Of these, three patients were re-treated (Peg-IFN + RBV + sofosbuvir (SOF) and SOF + ledipasvir + RBV, and both achieved SVR12 while another is on-treatment with SOF + daclatasvir + RBV) and one patient died before re-treatment due to hepatocellular cancer. Resistance test was performed in only one patient and no resistance mutations were found.

4 | DISCUSSION

This study characterizes chronic HCV infection in 387 patients in Northwest Spain and the impact of the Spanish Strategic Plan on HCV cure last year. This cohort had 28.2% of patients with cirrhosis and a high prevalence of HIV/HCV patients (60.9%). The introduction of the Spanish Strategic Plan in 2015 has allowed to treat half (52.7%) of all HCV patients with different DAA-combinations and SVR12 rates over 96%.

The distribution of HCV genotypes is similar throughout Western Europe with some local differences.^{1,6,7,88} The prevalence of HCV infection in Spain is among the highest in Europe and several studies reported genotype 1 as the most common one, similarly to our cohort (66.2%).^{9,10,11} In addition, HCV genotypes are usually associated to different routes of transmission. In fact, genotypes 1a, 3, and 4 are more common among intravenous drug users^{1,6,7,8,10,12} and represent 82% of HIV/HCV patients in our cohort.

Cirrhosis had similar prevalence in both HCV-monoinfected and HIV/HCV patients (29.2% vs. 26.8%, respectively). Since the widespread introduction of ART regimens, data on the effect of HIV coinfection on liver fibrosis progression and its complications have been controversial.^{13,14,15,16} An improved control of HIV infection with earlier initiation of a less hepatotoxic ART and higher CD4 counts could explain similar rates of cirrhosis in both HCV-monoinfected and HIV/HCV patients observed in our cohort.

The development of DAA has allowed a significant improvement in rates of SVR12. However, those patients involved in clinical trials tend to have more favorable outcomes than patients in the real-world mainly due to strict patient selection. In our cohort, rates of SVR12 were consistently high across all subgroups evaluated, ranging from 83.3% to 100%. Cirrhosis and HIV/HCV coinfection had been previously identified as independent predictors of virological failure.¹⁷ However, we found no significant differences in SVR12 based on HIV/HCV coinfection or liver fibrosis. Despite the high rate (98.5%) of SVR12 observed in our cohort of HIV/HCV patients, it is noteworthy that less patients have initiated treatment compared with HCV-monoinfected (42.4% and 64.3%, respectively). Effectiveness in HIV/HCV patients was similar to HCV-monoinfected and concordant with

REFERENCES

- Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hep.* 2013;10:553–562.
- Plan estratégico para el abordaje de la hepatitis C en el Sistema nacional de salud. 2015. Available from: http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLlesiones/enfTransmisibles/docs/plan_estrategico_hepatitis_C.pdf
- Sandler MD, Lee SS. Revolution in hepatitis C antiviral therapy. *Br Med Bull.* 2015;113:31–44.
- Leidner AJ, Chesson HW, Xu F, Ward JW, Spradling PR, Holmberg SD. Cost-effectiveness of hepatitis C treatment for patients in early stages of liver disease. *Hepatology.* 2015;61:1860–1869.
- Walker DR, Pedrosa MC, Manthena SR, Patel N, Marx SE. Early view of the effectiveness of new direct-acting antiviral (DAA) regimens in patients with hepatitis C virus (HCV). *Adv Ther.* 2015;32:1117–1127.
- Cornberg M, Razavi HA, Alberti A, Bernasconi E, Buti M, Cooper C, Dalgard O, Dillon JF, Flisiak R, Forns X, Frankova S, Goldis A, Goullis I, Halota W, Hunyady B, Lagging M, Largen A, Makara M, Manolakopoulos S, Marcellin P, Marinho RT, Pol S, Poynard T, Puoti M, Sagalova O, Sibel S, Simon K, Wallace C, Young K, Yurdaydin C, Zuckerman E, Negro F, Zeuzem S. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. *Liver Int.* 2011;31:30–60.
- Esteban JI, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol.* 2008;48:148–162.
- Kartashev V, Döring M, Nieto L, Coletta E, Kaiser R, Sierra S, HCV EuResist Study Group. New findings in HCV genotype distribution in selected West European, Russian and Israeli regions. *J Clin Virol.* 2016;81:82–89.
- Echevarria JM, Leon P, Pozo F, Avellon A. Follow-up of the prevalence of hepatitis C virus genotypes in Spain during a nine-year period (1996–2004). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24:20–25.
- Poveda E, Wyles D, Morano L, Pineda JA, García F, GEHEP. News on HIV-HCV coinfection: update from the 2015 GEHEP conference. *AIDS Rev.* 2015;17:231–237.
- Ramos B, Nunez M, Toro C, Sheldon J, García-Samaniego J, Ríos P, Soriano V. Changes in the distribution of hepatitis C virus (HCV) genotypes over time in Spain according to HIV serostatus: implications for HCV therapy in HCV/HIV-coinfecting patients. *J Infect.* 2007;54:173–179.
- Wiessing L, Ferri M, Grady B, Kantzanou M, Sperle I, Cullen KJ, EMCDDA DRID Group, Hatzakis A, Prins M, Vickerman P, Lazarus JV, Hope VD, Mathel C. Hepatitis C virus infection epidemiology among people who inject drugs in Europe: a systematic review of data for scaling up treatment and prevention. *PLoS ONE.* 2014;9:e103345.
- Arends JE, Lieveid FI, Boeijen LL, de Kanter CT, van Erpecum KJ, Salmon D, Hoepelman AI, Asselah T, Ustianowski A. Natural history and treatment of HCV/HIV coinfection: is it time to change paradigms. *J Hepatol.* 2015;63:1254–1262.
- Graham CS, Badem LR, Yu E, Mrus JM, Carnie J, Heeren T, Koziel MJ. Influence of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2001;33:562–569.
- Grünhage F, Wasmuth JC, Herkenrath S, Vidovic N, Goldmann G, Rockstroh J, Lammert F, Oldenburg J, Sauerbruch T, Spengler U. Transient elastography discloses identical distribution of liver fibrosis in chronic hepatitis C between HIV-negative and HIV-positive patients on HAART. *Eur J Med Res.* 2010;15:139–144.
- Sterling RK, Wegelin JA, Smith PG, Stravitz RT, Luketic VA, Fuchs M, Puri P, Shiffman ML, Contos MA, Mills AS, Sanyal AJ. Similar progression of fibrosis between HIV/HCV-infected and HCV-infected patients: Analysis of paired liver biopsy samples. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2010;8:1070–1076.
- Arias A, Aguilera A, Soriano V, Benítez-Gutiérrez L, Lledó G, Navarro D, Treviño A, Otero E, Peña JM, Cuervas-Mons V, de Mendoza D. Rate and predictors of treatment failure to all-oral HCV regimens outside clinical trials. *Antivir Ther.* 2016; doi: 10.3851/IMP3961 [Epub ahead of print].
- Zoulim F, Liang TJ, Gerbes AL, Aghemo A, Deuffic-Burban S, Dusheiko G, Fried MW, Pol S, Rockstroh JK, Terrault NA, Wiktor S. Hepatitis C virus treatment in the real world: optimising treatment and access to therapies. *Gut.* 2015;64:1824–1833.
- Saeed S, Strumpf EC, Walmsley SL, Rollet-Kurhajec K, Pick N, Martel-Laferrère V, Hull M, Gill MJ, Cox J, Cooper C, Klein MB. Canadian Co-Infection Cohort Study. How generalizable are the results from trials of direct antiviral agents to people coinfecting with HIV/HCV in the real world? *Clin Infect Dis.* 2016;62:919–926.
- Simmons B, Saleem J, Heath K, Cooke GS, Hill A. Long-term treatment outcomes of patients infected with hepatitis C virus: a systematic review and meta-analysis of the survival benefit of achieving a sustained virological response. *Clin Infect Dis.* 2015;61:730–740.

How to cite this article: Grandal M, Pernas B, Mariño A, et al. Characterization of chronic HCV infection in Northwest Spain: Impact of the treatment strategic plan of the Spanish National Health Service on HCV cure. *J Med Virol.* 2017;89:1304–1308. <https://doi.org/10.1002/jmv.24766>

Anexo C. Hoja de recogida de datos del paciente del Estudio 2.

Variables sociodemográficas y epidemiológicas			
Año de nacimiento			
Nacionalidad			
Género	<input type="checkbox"/> Varón	<input type="checkbox"/> Mujer	<input type="checkbox"/> Transexual
Etnia			
Fumador	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Ex-fumador
En caso afirmativo especificar nº cigarrillos/día			
Consumo alcohol >30gr/día	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Ex-bebedor
Consumo activo de drogas (especificar)			
Comorbilidad	<input type="checkbox"/> Ósea	<input type="checkbox"/> Toxicidad renal	
En caso afirmativo indicar tipo de comorbilidad			
	<input type="checkbox"/> Cardiovascular	<input type="checkbox"/> Neuropsiquiátrica	
	<input type="checkbox"/> Diabetes	<input type="checkbox"/> Digestiva	
Parámetros clínicos			
AST/ALT/GGT (UI/mL)			
Parámetros virológicos infección por VHC			
Fecha de diagnóstico VHC			
Vía de transmisión VHC			
Genotipo/subtipo VHC			
ARN-VHC basal (log ₁₀ UI/mL)			
ARN-VHC actual (log ₁₀ UI/mL)			
ARN-VHC > 800.000 UI/mL			
Fibroscan actual (kPa) y grado de fibrosis			
Cirrosis hepática (>12,5 kPa)	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	
Polimorfismo IL-28B	<input type="checkbox"/> CC	<input type="checkbox"/> CT	<input type="checkbox"/> TT
Descompensación hepática	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	
En caso afirmativo indicar que tipo			
Exposición previa a tto	<input type="checkbox"/> Naive	<input type="checkbox"/> Pretratado	
En caso afirmativo describir pauta y tipo de respuesta			
Inicio tratamiento activo VHC	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	
En caso afirmativo describir pauta y duración			
RVS	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	
En caso negativo describir si el paciente se retrató y con que			
Co-infección con VIH	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	

Anexo D. Publicación científica derivada del Estudio 2.

Received: 18 September 2017 | Accepted: 18 December 2017
DOI: 10.1002/jmv.25048

RESEARCH ARTICLE

WILEY JOURNAL OF
MEDICAL VIROLOGY

Prevalence of NS5A resistance associated substitutions in patients with hepatitis C virus genotypes 1a and 3: Impact on current therapeutic strategies

Marta Grandal¹ | Berta Pernas¹ | Andrés Tabernilla¹ | Ana Mariño² |
Hortensia Álvarez² | Nieves Valcarce² | Alvaro Mena¹ |
Angeles Castro-Iglesias¹ | Ana B. Pérez³ | Manuel Delgado¹ | Eva Poveda¹ 

¹Grupo de Virología Clínica, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC)-Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), Sergas, Universidade da Coruña (UDC), A Coruña, Spain

²Unidad de Enfermedades Infecciosas, Servicio de Medicina Interna, Complejo Hospitalario Universitario de Ferrol (CHUF), Sergas, Ferrol, Spain

³Servicio de Microbiología Clínica, Instituto de Investigación IBS, Granada, Spain

Correspondence

Eva Poveda, Grupo de Virología Clínica, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), As Xubias s/n, A Coruña 15006, Spain.
Email: eva.poveda.lopez@sergas.es

Funding information

Fundación Progreso y Salud, Junta de Andalucía; Fondo de Investigación Sanitaria, Grant numbers: CM15/00233, CPII14/00014, FI14/00557, PI10/02166, PI13/02266, PI15/00713, PI16/02159; GEHEP-SEIMC, Grant number: GEHEP-004; Fundación Profesor Novoa Santos, A Coruña; the Spanish AIDS Research Network RD16/0025/0026, Plan Nacional de I+D+I and Fondo Europeo de Desarrollo Regional-FEDER, Grant number: RD12/0017/006; Xunta de Galicia and the European Union, Grant number: European Social Fund - ESF, IN606A-2016/023

The presence of resistance-associated substitutions (RASs) at NS5A region might compromise the efficacy of Direct Acting Antiviral agents (DAAs). HCV resistance at NS5A region is mainly focused on patients with hepatitis C virus (HCV) genotypes 1a (G1a) and 3 (G3) with other factors of poor treatment response (ie cirrhosis, prior treatment-exposure, or HCV-RNA >800 000 IU/mL). Herein, we evaluated in a cohort of HCV G1a and G3 infected patients the prevalence of RASs at domain I NS5A using population-based sequencing and the impact of RASs on the optimization of current therapeutic strategies. The 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 naïve to NS5A inhibitors were included (166 G1a, 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, at least, one factor of poor response (78.9% for G1a, and 75.8% for G3). 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. In conclusion, testing NS5A RASs in specific HCV-infected populations (ie 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.

KEYWORDS

genotype 1a, genotype 3, HCV-infection, NS5A, RASs

1 | INTRODUCTION

Since the approval of Direct Acting Antiviral agents (DAAs), the face of hepatitis C infection (HCV) has dramatically changed. The combination

regimens of DAAs are the new standard of treatment for HCV infection with high-sustained viral response (SVR) rates at 12 weeks for the majority of patients (90%) and almost without adverse events. However, some of these combination regimens require prolonging

treatment duration (16 or 24 weeks) and/or the addition of ribavirin if some factors related with a poor treatment response are present. This is the case of HCV-infected patients with genotypes 1a (G1a) and 3 (G3) with cirrhosis, prior exposure to interferon-based regimens, high baseline HCV-RNA, and/or presence of resistance-associated substitutions (RASs) with a poorer response for NS5A inhibitors-based therapies.¹⁻³

In the current treatment scenario, the relevance of HCV resistance is mainly focused on the NS5A region for G1a and G3. Several studies have shown that the presence of RASs at NS5A might compromise the virological response for HCV G1a and G3 patients.⁴⁻¹³ The impact of these RASs on treatment efficacy varies according to the presence of other factors and can be countered by prolonging the duration of treatment or adding ribavirin for some DAA combinations.

In this context, current HCV treatment guidelines highlight that the presence of NS5A RASs before treatment initiation in combination with other factors of poor response previously cited might compromise the efficacy of specific DAA combinations. Therefore, testing NS5A resistance might help to select the optimal DAA combination among patients harboring predictors of poor response and avoid unnecessarily prolong treatment duration or the addition of ribavirin in those patients in whom RASs are not present. Therefore, this strategy might avoid the toxicity related to the use of ribavirin, allow optimize treatment duration, and afford costs to the Health systems. Moreover, it is known that NS5A RAS may persist for years, which could have implications for retreatment in case of failure.

This study analyzes, the prevalence of NS5A RASs for G1a and G3 patient's naïve to NS5A inhibitors and evaluates the benefits of performing a resistance test to optimize current therapeutic strategies.

2 | MATERIALS AND METHODS

This is an observational study in patients with chronic hepatitis C (CHC) in clinical follow-up at two hospitals in Northwest Spain (Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña and Complejo Hospitalario Universitario de Ferrol) between June-2014 and June-2016. All patients enrolled in the study had HCV G1a and G3 and were naïve to regimens containing NS5A inhibitors. This study was approved by the regional Ethics Committee (register code C.0003724). Only patients who had signed the informed consent and had HCV-RNA >1000 IU/mL were included. Liver stiffness was measured by transient elastography (FibroScan, EchoSense, Paris, France) and results expressed in kilopascals (kPa) were converted into the METAVIR scale as follows: F0-F1 <7.5; F2 ≥7.5, and <9.5 kPa; F3 ≥9.5 and <12.5 kPa and F4 12.5 kPa (cirrhosis). Demographic and baseline characteristics were retrospectively recorded.

The HCV NS5A region was sequenced from plasma samples regularly stored at -80°C in the Biobank of A Coruña. NS5A Domain I (codons 1-213) was amplified with HCV genotype-specific primers through reverse transcription PCR (RT-PCR) and nested-PCR. NS5A amplification for HCV G1a was performed as previously described.¹⁴ For HCV G3 NS5A amplification RT-PCR was performed using

RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The nested-PCR reaction was carried out using Hotstart Master Mix Kit (Qiagen, Hilden, Germany) with the following primers: NS5A-3a_F 5'CyGCATTGCTGAGTTCTCTA3' and NS5A-3a_R 5'GYAGTCTCACYCCATCCACTTC3'.¹⁵ Direct sequencing of all PCR products was performed using an automatic sequencer (ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer [Applied Biosystems, Foster City, CA]) and BigDye Ready Reaction Kit V3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Nucleotide sequences were assembled using the Variant Reporter version 1.0 software (Thermo Fisher Scientific) and aligned with reference sequences (GeneBank accession numbers AF009606 for HCV G1a and D17763 for HCV G3). NS5A sequences were analyzed using geno2pheno (HCV) algorithm for the identification of NS5A RASs¹⁶ considering the clinically relevant RASs for the analysis: 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 accordingly to the last updated guidelines of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) and the European Association for the Study of the Liver (EASL).^{1,2}

The statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS 19.0, Chicago, IL). Categorical variables are presented as number of cases or percentage. Continuous variables are expressed as mean ± standard deviation.

3 | RESULTS

The study enrolled 232 CHC patients: 166 HCV G1a and 66 HCV G3. Clinical characteristics and prevalence of baseline NS5A RASs are detailed in Table 1. NS5A population sequencing was successfully performed for 162 of 166 patients G1a and for all G3 patients. The prevalence of clinically relevant RASs was 5.5% (9/162) in HCV G1a. The most frequent substitution recognized was Q30H/R (5/162, 3.1%). The remaining RASs were found with a prevalence below 1%: M28T (1/162, 0.6%), L31M (1/162, 0.6%), H58D (1/162, 0.6%), and Y93H (1/162, 0.6%). NS5A RASs were not detected among HCV G3 infected patients.

The presence of factors associated with poor response to treatment (liver cirrhosis, prior exposure to treatment and HCV-RNA >800 000 IU/mL) was evaluated in both genotypes. Regarding the fibrosis stage, 21.1% (35/166) of G1a and 25.8% (17/66) of G3 had liver cirrhosis. The proportion of patients with prior exposure to treatment was 28.3% (47/166) for G1a and 19.7% (13/166) for G3. According to the prior treatment status, all G3 patients were previously exposed to pegylated-interferon (peg-IFN) with ribavirin. Nevertheless for G1a patients, 83% (39/47) were previously exposed to peg-IFN with ribavirin, and 17% (8/47) were previously exposed to triple therapy with peg-IFN, ribavirin, and the first generation of protease inhibitors regimens (boceprevir or telaprevir). Furthermore, a high prevalence of patients with baseline HCV-RNA levels >800 000 IU/mL was observed for both genotypes (72.7% [120/166] G1a and 64.6% [42/166] G3).

Moreover, we evaluated in this cohort the impact of NS5A RASs on current therapeutic strategies to define the utility of resistance

TABLE 1 Clinical characteristics and prevalence of baseline NS5A RASs of CHC patients infected with G1a and G3

	G1a (N = 166)	G3 (N = 66)
Male	132 (79.5)	50 (75.8)
Age, years	48.7 ± 8.3	49.4 ± 6.7
Time since HCV diagnosis, years	17 ± 6.9	16.1 ± 6.9
HIV/HCV co-infection	98 (61.3)	46 (69.7)
Factors of poor response		
HCV-RNA >800 000 IU/mL	120 (72.7)	42 (64.6)
Prior exposure to IFN-based therapies	47 (28.3)	13 (19.7)
Liver cirrhosis	35 (21.1)	17 (25.8)
Prevalence of baseline RASs ^a		
M28T	1 (0.6)	-
Q30H/R	5 (3.1)	-
L31M	1 (0.6)	-
H58D	1 (0.6)	-
Y93H	1 (0.6)	0 (0)

Data are expressed as n (%) or mean ± standard deviation. Abbreviations: HIV: Human Immunodeficiency Virus; HCV: Hepatitis C Virus; HCV-RNA: HCV viral load; IU/mL: International Units per milliliter; IFN: Interferon; RASs: Resistance-associated substitutions.

^aRates of baseline RASs in G1a were calculated with N = 162.

testing in patients with predictors associated with poor response to specific DAA therapies (Table 2). In this population, 71.6% (116/162) of G1a patients had HCV-RNA values >800 000 IU/mL. Considering current HCV treatment guidelines, treatment duration must be prolonged to 16 weeks with ribavirin for grazoprevir/elbasvir combination in case that testing RASs was not available. However, after performing NS5A RASs resistance testing in this population only 5.2% (6/116) of them had RASs and therefore would require prolonging treatment duration and the addition of ribavirin. The rest of patients could benefit of an optimized treatment for 12 weeks

without ribavirin. Among G1a patients, 29% (47/162) were treatment-experienced with or without cirrhosis. Therapeutic guidelines recommend prolonging treatment duration to 24 weeks or adding ribavirin for 12 weeks for sofosbuvir/ledipasvir or sofosbuvir/daclatasvir regimens, in this subset of patients if baseline RASs conferring resistance to NS5A are present. In this population, only 4.3% (2/47) of patients harbored RASs and therefore would require reinforcing treatment. Finally, for G3 patients, 39.4% (26/66) were treatment-experienced (with or without cirrhosis) or naïve with cirrhosis for which prolonging treatment duration to 24 weeks or adding ribavirin for 12 weeks for sofosbuvir/velpatasvir combination if NS5A RAS Y93H is present. None of these patients with G3 had this mutation, hence, all of them could benefit from the standard sofosbuvir/velpatasvir treatment for 12 weeks without ribavirin.

Treatment outcome was retrospectively evaluated in the group of patients with baseline NS5A RASs (N = 8). Of them, 2 (2/8, 25%) are still naïve to HCV therapy; 2 (2/8, 25%) were treated without NS5A inhibitors; and 4 (4/8, 50%) were treated with NS5A inhibitors-based therapies (4/4, 100%, sofosbuvir/ledipasvir). Only one of these patients, presented factors of poor response associated with lower SVR rates (to be treatment-experienced). This patient had L31M mutation, which confers >100-fold change for ledipasvir. This patient was treated according to the guidelines recommendations in case of presence of RASs. Therefore, for this patient the treatment was reinforced by adding ribavirin during 12 weeks, so the effect of baseline RASs could be unmasked. All patients who presented baseline RASs (6/6, 100%) achieved SVR.

4 | DISCUSSION

The present study evaluated the prevalence of RASs related with a poor response to NS5A inhibitors in 232 CHC infected patients with G1a and G3 (naïve to NS5A inhibitors), and the clinical implication of NS5A RASs testing on current HCV therapies.⁴⁻¹¹ A total of 166 patients with G1a (21.1% with cirrhosis, 28.3% treatment-experienced, 72.7% HCV-RNA >800 000 IU/mL) and 66 G3 (25.8% with

TABLE 2 Rate of patients in whom baseline RASs might impact on treatment outcomes to specific DAA combinations affected by NS5A RASs

HCV genotype	Scenario for NS5A RASs testing		Rate of patients n/N (%)		
	DAA-combinations	Factors of poor response (FPR)	With FPR	With RASs ^a	Without RASs ^b
1a	GZR/EBV	Naïve or treatment-experienced with HCV-RNA >800 000 IU/mL	116/162 (71.6)	6/116 (5.2)	110/116 (94.8)
	SOF/LDV or SOF-DCV	Treatment-experienced with or without cirrhosis	47/162 (29.0)	2/47 (4.3)	45/47 (95.7)
3	SOF/VEL	Treatment-experienced (with or without cirrhosis) and naïve with cirrhosis	26/66 (39.4)	0/26(0)	26/26 (100.0)

Data are expressed as n/N (%). Abbreviations: HCV: Hepatitis C Virus; DAA: direct acting antiviral agents; RASs: resistance-associated substitutions; HCV-RNA: HCV viral load; GZR/EBV: grazoprevir/elbasvir; SOF/LDV: sofosbuvir/ledipasvir; SOF-DCV: sofosbuvir-daclatasvir; SOF/VEL: sofosbuvir/velpatasvir; FPR: factors of poor response.

^aPatients with RASs should reinforce treatment adding ribavirin and/or prolonging treatment duration.

^bPatients without RASs should be treated with standard regimens of DAA.

cirrhosis, 19.7% treatment-experienced, 64.6% HCV-RNA >800 000 IU/mL) were included. The prevalence of baseline RASs to NS5A-inhibitors was 5.5% for G1a, being Q30H/R the most prevalent mutation identified (3.1%). The NS5A RAS Y93H was not recognized for any of G3 patients.

The prevalence of baseline NS5A RASs could vary according to the geographical region. In the United States, it has been described a prevalence ranging 9–12% for G1a.^{5,11,17,18} In Europe, recent studies have reported rates of prevalence ranging from 1.6% in Sweden to 12.5% in Italy.^{19,20} In Spain, Calleja et al²¹ and Palladino et al²² described rates of prevalence around 6%. These figures are similar to that observed in the present study. For G3, the scarce data available, show a rate of NS5A RASs ranging 3.8–8.8%.^{6,15} Nevertheless, the information available regard the prevalence of NS5A RASs should be carefully analyzed due to the lack of a standardized method for RASs detection, the selection of NS5A RASs considered for the analysis, and the number and clinical characteristics of the patient population included among the different studies.

Otherwise, the phenotypic resistance data generated from clinical trials indicate that only those RASs that confer medium- to high-level resistance might affect to the treatment response to DAAs. In this context, the most prevalent RAS identified in this study, Q30H/R, confers a high-level resistance (>100-fold change) to NS5A inhibitors.^{1,17}

In the current treatment scenario, the presence of clinically relevant NS5A RASs among G1a and G3 patients in combination with cirrhosis, prior treatment exposure, or high HCV-RNA >800 000 IU/mL would make necessary the use of ribavirin or extending treatment duration (16 or 24 weeks) for some regimens including NS5A inhibitors. This is the case of grazoprevir/elbasvir, sofosbuvir/ledipasvir, sofosbuvir/daclatasvir for G1a, and sofosbuvir/velpatasvir for G3.²

Herein, we analyzed the impact of the results obtained in this cohort of HCV G1a and G3 infected patients in the current clinical setting. In this cohort, many patients had, at least, one factor associated with lower SVR rates (78.9% in G1a, and 75.8% in G1b). However, since the proportion of HCV G1a and G3 patients harboring NS5A RASs is low (5.5% and 0.0%, respectively), the vast majority of them (>94%) could cure the HCV infection with 12 weeks of treatment without ribavirin when a NS5A RASs test was available.

The SVR was retrospectively analyzed in those patients with RASs, of them, half (4/8) had received a NS5A inhibitors-based therapy. Of note, only one of them had factors of poor response and therefore standard treatment was reinforced by adding ribavirin and the effect of baseline RASs was unmasked.

These figures indicate that the implementation of NS5A RASs resistance testing before the initiation of treatments including NS5A inhibitors seems to be helpful to optimize therapies and to avoid ribavirin-related toxicities, reduce treatment duration, and costs. However, NS5A RASs testing will be mainly focused on G1a and G3 patient's populations with characteristics associated with suboptimal SVR at 12 weeks.

There are scarce data regarding the prevalence of NS5A RASs in G1a and G3 CHC population outside clinical trials and none evaluating the impact of the presence of clinically relevant mutations for the current treatment options.^{14,15,17,18,23,24} Indeed, in the absence of a standard globally available methodology for testing HCV RASs, the latest AASLD and EASL recommendations highlight the usefulness of HCV resistance to NS5A inhibitors to guide physician's decisions in case of access to reliable resistance tests.^{1,2} Although deep sequencing might provide additional information, recent studies have shown that RASs present in low proportion (1–15%) do not significantly influence the response to DAAs therapies.^{5,11} Therefore, data obtained by population-based sequencing would be the appropriate to take clinical decisions.^{1,2} In this context and even in the absence of a standardized methodology for NS5A RASs testing, more data about the prevalence of NS5A RASs among HCV G1a and G3 patients and to evaluate their impact in the virologic response might be helpful for the design of optimized treatment strategies.

In summary, the prevalence of NS5A RASs in this cohort of patients with HCV G1a and G3 infection was low (5.5%) or null, respectively. However, there is a high proportion of patients harboring other factors associated with poor rates of virological response in combination with RASs, such as cirrhosis, prior exposure to treatment, and high HCV-RNA levels. For these patients, current guidelines recommended reinforcing treatment by adding ribavirin and/or prolonging treatment duration when these mutations are present. Therefore, testing NS5A RASs in these specific populations might be useful to optimize current NS5A-based therapies avoiding ribavirin-related toxicities and shortening treatment duration in the majority of patients.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (CPII14/00014, PI10/02166, FI14/00557, PI13/02266, CM15/00233, PI15/00713, PI16/02159), the Spanish AIDS Research Network RD16/0025/0026, Plan Nacional de I+D+I and Fondo Europeo de Desarrollo Regional-FEDER (RD12/0017/006), Fundación Progreso y Salud, Junta de Andalucía, Fundación Profesor Novoa Santos, A Coruña, GEHEP-SEIMC (GEHEP-004), and Xunta de Galicia and the European Union (European Social Fund—ESF, IN606A-2016/023). We would like to thank Biobank of A Coruña (SERGAS) for providing us the technical, ethical, and legal advice necessary for the development of our research. We also thank the collaboration of Fina Balañas (HIV and Viral Hepatitis Unit, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña).

CONFLICTS OF INTEREST

All authors declare no conflicts of interest.

ORCID

Eva Poveda  <http://orcid.org/0000-0003-4835-9875>

REFERENCES

1. AASLD-IDS Guidance Panel. 2017. HCV guidance: recommendations for testing, managing, and treating hepatitis C. <http://www.hcvguidelines.org> (accessed 21.09.17).
2. European Association for the Study of the Liver. 2017. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. *J Hepatol.* 66, 153–194.
3. AEEH/SEIMC. 2017. Guías de manejo de la hepatitis C. <http://aeeh.es/wp-content/uploads/2017/03/documento-consenso.pdf>. (accessed 20.05.17).
4. Foster GR, Afdhal N, Roberts SK, et al. ASTRAL-2 investigators. sofosbuvir and velpatasvir for HCV genotype 2 and 3 infection. *N Eng J Med.* 2015;373:2608–2617.
5. Sarrazin C, Dvory-Sobol H, Svarovskaia ES, et al. Prevalence of resistance-associated substitutions in HCV NS5A, NS5B, or NS3 and outcomes of treatment with ledipasvir and sofosbuvir. *Gastroenterology.* 2016;151:501–512.
6. Nelson DR, Cooper JN, Lalezari JP, et al. ALLY-3 Study Team. All-oral 12-week treatment with daclatasvir plus sofosbuvir in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection: ALLY-3 phase III study. *Hepatology.* 2015;61:1127–1135.
7. Black S, Pack I, Ingravalleo P, et al. P0891: Resistance analysis of virologic failures in hepatitis C genotype 1 infected patients treated with grazoprevir/elbasvir +/- ribavirin: the C-WORTHY study. *J Hepatol.* 2015;62:S677–S678.
8. Wyles D, Dvory-Sobol H, Svarovskaia ES, et al. Post-treatment resistance analysis of hepatitis C virus from phase II and III clinical trials of ledipasvir/sofosbuvir. *J Hepatol.* 2017;66:703–710.
9. Zeuzem S, Mizokami M, Pianko S, et al. 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.* 2015;62:254A.
10. Zeuzem S, Rockstroh J, Kwo PY, et al. Predictors response to grazoprevir/elbasvir among HCV genotype 1 (GT1)-infected patients: integrated analysis of Phase 2-3 trials. *Hepatology.* 2015;62:554A–555A.
11. Zeuzem S, Mizokami M, Pianko S, et al. NS5A resistance-associated substitutions in patients with genotype 1 hepatitis C virus: prevalence and effect on treatment outcome. *J Hepatol.* 2017;66:910–918.
12. Poveda E, Puoti M, García-Deltoro M, et al. News on viral hepatitis in HIV: update from the 2016 GEHEP conference. *AIDS Rev.* 2017;19:47–53.
13. Poveda E, Wyles DL, Mena Á, Pedreira JD, Castro-Iglesias Á, Cachay E. Update on hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral agents. *Antivir Res.* 2014;108:181–191.
14. Plaza Z, Soriano V, Vispo E, et al. Prevalence of natural polymorphisms at the HCV NS5A gene associated with resistance to daclatasvir, an NS5A inhibitor. *Antivir Ther.* 2012;17:921–926.
15. Pérez AB, Chueca N, Álvarez M, et al. 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. *Enferm Infecc y Microbiol Clin.* 2016;3:6.
16. Kalaghatgi P, Sikorski AM, Knops E, et al. Geno2pheno[HCV] – a web-based interpretation system to support hepatitis C treatment decisions in the era of direct-acting antiviral agents. *PLoS ONE.* 2016;11:0155869.
17. Pawlotsky JM. Hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral drugs in interferon-free regimens. *Gastroenterology.* 2016;151:70–86.
18. Dietz J, Susser S, Berkowski C, Perner D, Zeuzem S, Sarrazin C. Consideration of viral resistance for optimization of direct antiviral therapy of hepatitis C virus genotype 1-infected patients. *PLoS ONE.* 2015;10:e0134395.
19. Lindström I, Kjellin M, Palanisamy N, et al. Prevalence of polymorphisms with significant resistance to NS5A inhibitors in treatment-naïve patients with hepatitis C virus genotypes 1a and 3a in Sweden. *Infect Dis (Lond).* 2015;8:555–562.
20. Paolucci S, Fiorina L, Mariani B, et al. Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naïve patients. *Viral J.* 2013;10:355.
21. Calleja JL, Llerena S, Perelló C, Crespo J. NS5A resistance: clinical implications and treatment possibilities. *AIDS Rev.* 2016;18:15–22.
22. Palladino C, Esteban-Cartelle B, Mate-Cano I, Sánchez-Carrillo M, Resino S, Briz B. [Prevalence of relevant NS5A resistance-Associated substitutions to elbasvir in genotype 1a hepatitis C virus patients in Spain]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017; pii: S0213-005X 30126--3012X. [Epub ahead of print]. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.03.008>
23. Bagaglio S, Andolina A, Merli M, Uberti-Foppa C, Morsica G. 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.* 2016;8:91.
24. Chen ZW, Li H, Ren H, Hu P. Global prevalence of pre-existing HCV variants resistant to direct-acting antiviral agents (DAAs): mining the GenBank HCV genome data. *Sci Rep.* 2016;6: pii=20310.

How to cite this article: Grandal M, Pernas B, Tabernilla A, et al. Prevalence of NS5A resistance associated substitutions in patients with hepatitis C virus genotypes 1a and 3: Impact on current therapeutic strategies. *J Med Virol.* 2018;90:1094–1098. <https://doi.org/10.1002/jmv.25048>

Anexo E: Otras publicaciones científicas realizadas durante la tesis doctoral

- Pernas B, Rego-Pérez I, Tabernilla A, Balboa V, Relaño S, **Grandal M**, Crespo M, Mena Á, Castro-Iglesias Á, Blanco FJ, Poveda E. Plasma mitochondrial DNA levels are inversely associated with HIV-RNA levels and directly with CD4 counts: potential role as a biomarker of HIV replication. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Nov 1;72(11):3159-3162. **Factor de Impacto (JCR 2017): 5,217.** Q1 Infectious Diseases.
- Tabernilla A, **Grandal M**, Pernas B, Castro-Iglesias A, Rodríguez-Osorio I, Mena A, Delgado M, Cid P, Pedreira JD, Poveda E. Viral dynamics among hepatitis C virus chronic infected patients during direct-acting antiviral agents therapy: impact for monitoring and optimizing treatment duration. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2017 Jul;29(7):781-785. **Factor de Impacto (JCR 2017): 2,014.** Q4 Gastroenterology and Hepatology.
- Tabernilla A, Rego-Pérez I, **Grandal M**, Pernas B, Pértega S, Delgado M, Mariño A, Álvarez H, Mena A, Rodríguez-Osorio I, Pedreira JD, Blanco FJ, Poveda E. European Mitochondrial Haplogroups Impact on Liver Fibrosis Progression Among HCV and HIV/HCV-Coinfected Patients From Northwest Spain. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2016 Oct 1;73(2):149-53. **Factor de Impacto (JCR 2017): 4,116.** Q1 Infectious Diseases.
- Pernas B, **Grandal M**, Tabernilla A, Cid P, Pértega S, Castro-Iglesias Á, Mena Á, Margusino L, Pedreira JD, Poveda E. Long-term clinical experience with darunavir (2007-2015) in a large cohort of HIV-infected patients in Spain. *J Med Virol.* 2016 Dec;88(12):2125-2131. **Factor de Impacto (JCR 2017): 1,988.** Q2 Infectious Diseases.
- Pernas B, **Grandal M**, Pertega S, Cañizares A, Castro-Iglesias Á, Mena Á, Rodríguez-Osorio I, Tabernilla A, Pedreira JD, Poveda E. Any impact of blips and low-level viraemia episodes among HIV-infected patients with sustained virological suppression on ART? *J Antimicrob Chemother.* 2016 Apr;71(4):1051-5. **Factor de Impacto (JCR 2017): 5,217.** Q1 Infectious Diseases. **Factor de Impacto (JCR 2017): 5,217.** Q1 Infectious Diseases.

- Pernas B, Mena A, Cañizares A, **Grandal M**, Castro-Iglesias A, Pértega S, Pedreira JD, Poveda E. Trends on epidemiological, virological, and clinical features among newly diagnosed HIV-1 persons in Northwest Spain over the last 10 years. *J Med Virol*. 2015 Aug;87(8):1319-26. **Factor de Impacto (JCR 2017): 1,988**. Q2 Infectious Diseases.
- Paraskevis D, Kostaki E, Beloukas A, Cañizares A, Aguilera A, Rodríguez J, **Grandal M**, Pernas B, Castro-Iglesias A, Mena Á, Pedreira JD, Poveda E. Molecular characterization of HIV-1 infection in Northwest Spain (2009-2013): Investigation of the subtype F outbreak. *Infect Genet Evol*. 2015 Mar;30:96-101. **Factor de Impacto (JCR 2017): 2,25**. Q1 Ecology, Evolution Behavior and Systematics
- Pernas B, **Grandal M**, Mena A, Castro-Iglesias A, Cañizares A, Wyles DL, López-Calvo S, Pértega S, Rodríguez-Osorio I, Pedreira JD, Poveda E. High prevalence of subtype F in newly diagnosed HIV-1 persons in northwest Spain and evidence for impaired treatment response. *AIDS*. 2014 Jul 31;28(12):1837-40. **Factor de Impacto (JCR 2017): 4,914**. Q1 Infectious Diseases.

ANEXO G.- Comunicaciones a congresos y premios recibidos durante la tesis doctoral.

Congresos Nacionales:

- V Congreso Nacional de GeSIDA. Sitges, 19-23 Noviembre de 2013. Presentación Póster. Características clínicas, virológicas, inmunológicas de los nuevos diagnósticos de infección por VIH en el área sanitaria de A Coruña entre los años 2004 y 2012: Evolución clínica y respuesta al tratamiento antirretroviral. B Pernas, A Mena, JD Pedreira, A Castro-Iglesias, S López, P Vázquez, I Rodríguez-Osorio, **M Grandal** y E Poveda.
- Reunión "Una visión multidisciplinar en el tratamiento y la calidad de vida del paciente con VIH". Madrid, 26 de Junio de 2014. Presentación Póster. Elevada prevalencia del subtipo F entre los nuevos diagnósticos de VIH en Galicia: menores tasas de respuesta virológica al tratamiento antirretroviral entre los pacientes con subtipo F frente al subtipo B. Pernas B, **Grandal M**, Castro-Iglesias A, Cañizares A, Pértega S, Mena A, Vázquez-Rodríguez P, López-Calvo S, Rodríguez-Osorio I, Pedreira JD, Poveda E.
- VI Congreso Nacional de GeSIDA. Málaga, 25-28 Noviembre de 2014. Presentación Póster. Cambios en la hospitalización de pacientes con infección por VIH. Estudio descriptivo en el período 1993-2013. H Mejjide, A Mena, I Rodríguez-Osorio, A Castro, S López, P Vázquez, B Pernas, **M Grandal**, E Poveda, y JD Pedreira.
- VI Congreso Nacional de GeSIDA. Málaga, 25-28 Noviembre de 2014. Presentación Póster. Frecuencia y predictores de la presencia de episodios de baja viremia ("blips") en los nuevos diagnósticos de infección por VIH en el área sanitaria de A Coruña en los últimos 10 años. B Pernas, **M Grandal**, A Cañizares, A Castro-Iglesias, S Pértega, I Rodríguez-Osorio, A Mena, P Vázquez, S López-Calvo, JD Pedreira, y E Poveda.
- VI Congreso Nacional de GeSIDA. Málaga, 25-28 Noviembre de 2014. Presentación Póster. Factores predictores de mortalidad por neumonía por *Pneumocystis jiroveci* en pacientes con infección por VIH. I Rodríguez-Osorio, A

Mena de Cea, H Meijide, A Castro, S López, P Vázquez, B Pernas, MJ Isorna, AB Porto, T Domínguez, **M Grandal**, E Poveda, y JD Pedreira.

- II Jornadas de Biointegración. A Coruña, 4 de Junio de 2014. Comunicación Póster. Elevada prevalencia del subtipo F entre los nuevos diagnósticos de VIH en Galicia: menores tasas de respuesta virológica al tratamiento antirretroviral entre los pacientes con subtipo F frente a los subtipo B. **M Grandal**, B Pernas, A Castro-Iglesias, A Cañizares, A Mena, S López-Calvo, P Vázquez-Rodríguez, S Pértega, I Rodríguez-Osorio, J D. Pedreira and E Poveda.
- I Congreso Nacional del Grupo de Estudio de Hepatitis Víricas (GEHEP). Vigo, 25-26 de Septiembre de 2015. Comunicación Oral. European mitochondrial DNA haplogroups impact on liver fibrosis progression among HCV and HIV/HCV co-infected patients from Northwest Spain. Poveda E, Tabernilla A, Rego-Pérez I, **Grandal M**, Pernas B, Pértega, Mena A, Rodríguez-Osorio I, Mariño A, Álvarez H, Pedreira JD, Blanco FJ.
- VII Congreso Nacional del Grupo de Estudio del SIDA (GeSIDA). Madrid, 1- 4 de Diciembre de 2015. Presentación Póster. Haplogroups Impact of European Mitochondrial DNA on Liver Fibrosis Progression among HCV and HIV/HCV coinfecting patients from Northwest Spain. Tabernilla A, Rego-Pérez I, **Grandal M**, Pernas B, Pértega S, Mena A, Rodríguez-Osorio I, Mariño A, Álvarez H, Pedreira JD, Blanco FJ, Poveda E.
- VII Congreso Nacional del Grupo de Estudio del SIDA (GeSIDA). Madrid, 1- 4 de Diciembre de 2015. Presentación Póster. Evaluación de la experiencia clínica con Darunavir a largo plazo (2007-2015) en pacientes VIH+: Eficacia, Seguridad y Tolerancia. Pernas B, **Grandal M**, Tabernilla A, Cid P, Rodríguez-Osorio I, Meijide H, Mena A, Castro-Iglesias A, Margusino L, Pedreira JD, Poveda E.
- VII Congreso Nacional del Grupo de Estudio del SIDA (GeSIDA). Madrid, 1- 4 de Diciembre de 2015. Presentación Póster. Perfil actual de la Infección Crónica por VHC en el Norte de España: Impacto en el contexto de las nuevas recomendaciones terapéuticas. **Grandal M**, Pernas B, Tabernilla A, Mena A, Rodríguez-Osorio I, Castro-Iglesias A, Delgado M, Mariño A, Álvarez H, Pedreira JD, Poveda E.

- III Jornadas de Biointegrasaúde. Vigo, 16 de Junio de 2015. Presentación Póster. Impacto de los blips y la baja viremia plasmática en pacientes con infección por VIH con tratamiento antirretroviral supresor. B Pernas, **M Grandal**, A tabernilla, S Pértega, A Cañizares, I Rodríguez-Osorio, H Meijide, A Mena, A Castro-Iglesias, JD Pedreira y E Poveda.
- III Jornadas de Biointegrasaúde. Vigo, 16 de Junio de 2015. Presentación Póster. Impact of HCV infection in a HIV cohort followed over 18 years: past and present. Mena A, Rodríguez-Osorio I, Meijide H, Castro MA, Pernas B, **Grandal M**, Tabernilla A, Pedreira JD, Poveda E.
- III Jornadas de Biointegrasaúde. Vigo, 16 de Junio de 2015. European mitochondrial DNA haplogroups impact on liver fibrosis progression among HCV and HIV/HCV coinfecting patients from Northwest Spain. A Tabernilla, I Rego-Pérez, **M Grandal**, B Pernas, S Pértega, A Mena, I Rodríguez-Osorio, A Mariño, H Álvarez, JD Pedreira, FJ Blanco and E Poveda.
- II Congreso Nacional del Grupo de Estudio de Hepatitis Víricas (GEHEP). Valencia, 29 de Septiembre- 1 de Octubre de 2016. Presentación Póster. Dinámica de la cinética viral en pacientes con infección crónica por VHC en Tratamiento con Antivirales de Acción Directa. Tabernilla A, Castro-Iglesias A, Rodríguez-Osorio I, **Grandal M**, Pernas B, Mena A, Delgado M, Cid P, Margusino L, Poveda E.
- II Congreso Nacional del Grupo de Estudio de Hepatitis Víricas (GEHEP). Valencia, 29 de Septiembre- 1 de Octubre de 2016. Presentación Póster. Perfil de la Infección Crónica por VHC en el Área Sanitaria de A Coruña: Impacto de las actuales recomendaciones de tratamiento. **Grandal M**, Pernas B, Tabernilla A, Mariño A, Álvarez H, Castro-Iglesias A, Mena A, Rodríguez Osorio I, Delgado M, Pedreira JD, Poveda E.
- II Congreso Nacional del Grupo de Estudio de Hepatitis Víricas (GEHEP). Valencia, 29 de Septiembre- 1 de Octubre de 2016. Comunicación Oral. Cribado de la Infección por VHC en Personas Nacidas entre 1960 y 1969 en el Área Sanitaria de A Coruña: Seroprevalencia y Recomendaciones Sanitarias. Poveda

- E, Pernas B, Tabernilla A, Cid P, Rodríguez-Orsorio I, **Grandal M**, Meijide H, Mena A, Pérttega S, Taboada JA, Malvar A, Hervada H, A. Castro- Iglesias A.
- VIII Congreso Nacional del Grupo de Estudio del SIDA (GeSIDA). San Sebastian, 29 de Noviembre - 2 de Diciembre de 2016. Presentación Póster. Plasma mitochondrial DNA levels are associated with lower HIV-RNA levels and higher CD4 Counts: Potencial role as a surrogate marker of HIV Replicacion Beyond HIV-RNA levels. Pernas B, Tabernilla A, Rego-Pérez I, Relaño S, Balboa V, **Grandal M**, Borrajo A, Ortún S, Castro-Iglesias A, Blanco FJ, Poveda E.
 - XX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, (SEIMC). Barcelona, 26-28 de Mayo de 2016. Presentación Póster. Dinámica de la cinética viral en pacientes con infección crónica por VHC en Tratamiento con Antivirales de Acción Directa. Tabernilla A, Castro-Iglesias A, Rodríguez-Orsorio I, **Grandal M**, Pernas B, Mena A, Delgado M, Cid P, Margusino L, Poveda E.
 - XX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, (SEIMC). Barcelona, 26-28 de Mayo de 2016. Presentación Póster. Impacto de las actuales recomendaciones de tratamiento de la Infección Crónica por VHC en el Área Sanitaria de A Coruña. Pernas B, Tabernilla A, **Grandal M**, Mariño A, Álvarez H, Castro-Iglesias A Mena A, Rodríguez Osorio I, Delgado M, Pedreira JD, Poveda E.
 - IV Jornadas de Biointegrasaúde. Santiago, 13 de Mayo de 2016. Comunicación Póster. Impacto de las Actuales Recomendaciones de Tratamiento de la Infección Crónica por VHC en el Área Sanitaria de A Coruña. B Pernas, A Tabernilla, A Mariño, H Álvarez, **M Grandal**, A Castro-Iglesias, A Mena, I Rodríguez-Orsorio, M Delgado, E Poveda.
 - XXI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, (SEIMC). Málaga, 11-13 de Mayo de 2017. Presentación Póster. Prevalencia de las mutaciones de Resistencia transmitidas en los nuevos diagnósticos de infección por VIH (2014-2015) en el area sanitaria de A Coruña. Pernas B, Tabernilla A, **Grandal M**, Cañizares A, Ortún S, Castro-Iglesias A, Mena A, Rodríguez-Orsorio I, Meijide H, Poveda E.

- XXI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, (SEIMC). Málaga, 11-13 de Mayo de 2017. Presentación Oral. Prevalencia de variantes del VHC asociadas con Resistencia a inhibidores de NS5A en pacientes infectados por los genotipos 1a y 3: Impacto en las estrategias terapéuticas actuales. **Grandal M**, Pernas B, Tabernilla A, Mariño A, Álvarez H, Mena A, Castro-Iglesias, Delgado M, Poveda E.
- 2nd Spanish HIV Clinical Forum: Integrase Inhibitors. Málaga, 10-11 de Mayo de 2017. Comunicación Oral. Prevalence of Transmitted Drug Resistance Mutations among Naive HIV-infected patients (2014-2016) in Northwest Spain. Pernas B, Tabernilla A, **Grandal M**, Cañizares A, Ortún S, Castro-Iglesias, Mena A, Rodríguez-Osorio I, Meijide H, Poveda E.
- IX Congreso Nacional del Grupo de Estudio del SIDA (GeSIDA). Vigo, 28 de Noviembre- 1 de Diciembre de 2017. Presentación Póster. Retraso significativo en alcanzar la supresión virológica en pacientes con infección por VIH-1 Subtipo F versus subtipo B: Impacto potencial en el riesgo de transmisión. Pernas B, Tabernilla A, Balboa V, **Grandal M**, Cid P, Castro- Iglesias A, Mena A, Rodríguez- Osorio I, Poveda E.
- V Jornadas de Biointegración. A Coruña, 30 de Mayo de 2017. Comunicación Póster. Prevalencia de variantes asociadas a resistencia basales a inhibidores de NS5A en pacientes infectados por el Virus de la Hepatitis C con genotipos 1a y 3: Impacto en las estrategias terapéuticas actuales. **M Grandal**, B Pernas, A Tabernilla, A Mariño, H Álvarez, N Valcarce, A Mena, A Castro-Iglesias, M Delgado and E Poveda.
- V Jornadas de Biointegración. A Coruña, 30 de Mayo de 2017. Comunicación Póster. HCV Screening in Persons born during 1960-1969 in A Coruña: Seroprevalence and Impact on Screening Recommendations. B Pernas, A Tabernilla, P Cid, I Rodríguez-Osorio, **M Grandal**, H Meijide, A Mena, JA Taboada, A Malvar, X Hervada, A Castro-Iglesias, E Poveda.
- V Jornadas de Biointegración. A Coruña, 30 de Mayo de 2017. Comunicación Póster. Plasma mitochondrial DNA levels are inversely associated with HIV-RNA levels and directly with CD4 counts: potential role as a biomarker of HIV

replication. Tabernilla A, Pernas B, Rego-Pérez-I, Balboa V, Relaño S, **Grandal M**, Crespo M, Mena A, Castro-Iglesias A Blanco FJ, Poveda E.

- X Congreso Nacional del Grupo de Estudio del SIDA (GeSIDA). Madrid, 6-9 de Noviembre de 2018. Presentación Póster. Higher mtDNA levels among Elite Controllers and Viremic Controllers compared to HIV- infected naïve and virologically suppressed patients: a role in the pathogenesis of the HIVinfection? Tabernilla A, **Grandal M**, Patiño L, Pérez A, Tarancón-Diez L, Mariño A, Álvarez H, Valcarce N, González J, Gutiérrez F, Crespo M, Ruiz-Mateos E, Poveda E.

Congresos Internacionales:

- 21st Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). Boston, 3-6 Marzo de 2014. Presentación Póster. Clinical, virological and immunological characteristics of newly HIV diagnosed patients in a medical reference area of Spain over the last 10 years: Still high, still late. Pernas B, Mena A, **Grandal M**, Cañizares A, Moldes L, Pedreira JD, Castro-Iglesias A, López-Calvo S, Vázquez-Rodríguez P, Rodríguez-Osorio I, and Poveda E.
- 12th European Workshop on HIV & Hepatitis - Treatment Strategies & Antiviral Drug Resistance. Barcelona, 26-28 Marzo 2014. Presentación Póster. High Prevalence of Subtype F among Newly HIV diagnosed Patients in the Northwest of Spain: Lower Rates of Virological Response to Antiretroviral Therapy among Subtype F versus Subtype B patients. **M Grandal**, B Pernas, A Castro-Iglesias, A Cañizares, A Mena, S López-Calvo, P Vázquez-Rodríguez, S Pértega, I Rodríguez- Osorio, J D. Pedreira and E Poveda.
- 12th European Workshop on HIV & Hepatitis - Treatment Strategies & Antiviral Drug Resistance. Barcelona, 26-28 Marzo 2014. Presentación Póster. Molecular Epidemiology Analysis of HIV-1 Epidemic in the Northwest of Spain: Evidence for Local Transmission of Subtype F. E Poveda, E Kostaki, A Cañizares, A Aguilera, J Rodríguez, **M Grandal**, B Pernas, A Castro-Iglesias, A Mena, JD Pedreira and D Paraskevis.

- 22nd Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). Seattle, 23-26 de Febrero de 2015. Presentación póster. Impact of viral blips on the impaired treatment response in HIV subtype F patients. CROI (Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections). Pernas B, **Grandal M**, Mena A, Cañizares A, Pértega S, Rodríguez-Osorio I, Castro-Iglesias A, Pedreira JD, Poveda E.
- 11th International Workshop on Co-infection-HIV & Hepatitis. Londres, 11- 12 de Junio de 2015. Comunicación Oral. European mitochondrial DNA haplogroups impact on liver fibrosis progression among HCV and HIV/HCV coinfecting patients from Northwest Spain. **Grandal M**, Rego-Pérez I, Pernas B, Tabernilla A, Pértega S, Mena A, Rodríguez-Osorio I, Mariño A, Álvarez H, Pedreira JD, Blanco FJ, Poveda E.
- 13th European Meeting on HIV & Hepatitis - Treatment Strategies & Antiviral Drug Resistance. Barcelona, 3-5 de Junio de 2015. Presentación Póster. European mitochondrial DNA haplogroups impact on liver fibrosis progression among HCV and HIV/HCV coinfecting patients from Northwest Spain. **Grandal M**, Rego-Pérez I, Pernas B, Tabernilla A, Pértega S, Mena A, Rodríguez-Osorio I, Mariño A, Álvarez H, Pedreira JD, Blanco FJ, Poveda E.
- 13th European Meeting on HIV & Hepatitis - Treatment Strategies & Antiviral Drug Resistance. Barcelona, 3-5 de Junio de 2015. Presentación Póster. Impact of European mitochondrial DNA haplogroups in the outcome of HIV infection at a reference medical care area in Northwest Spain. **Grandal M**, Rego-Pérez I, Pernas B, Tabernilla A, Pértega S, Mena A, Rodríguez-Osorio I, Mariño A, Álvarez H, Pedreira JD, Blanco FJ, Poveda E.
- 5th International Conference on Viral Hepatitis 2016 (ICVH 2016). San Francisco, Estados Unidos, 14-15 de Marzo de 2016. Comunicación Oral. Profile in Northwest Spain: Therapeutics Needs based on Current HCV Treatment Guidelines. Pernas B, Tabernilla A, **Grandal M**, Mariño A, Alvarez H, Castro-Iglesias A, Mena A, Rodríguez-Osorio I, Delgado M, Pedreira JD, Poveda E.
- The International Liver Congress, European Association for the Study of the Liver (EASL). Barcelona, 13-17 de Abril de 2016. Presentación Póster. European

mitochondrial DNA haplogroups impact on liver fibrosis progression among HCV and HIV/HCV coinfecting patients from Northwest Spain. Tabernilla A, Rego-Pérez I, **Grandal M**, Pernas B, Pértega S, Mena A, Rodríguez-Osorio I, Mariño A, Álvarez H, Pedreira JD, Blanco FJ, Poveda E.

- 14th European Meeting on HIV & Hepatitis - Treatment Strategies & Antiviral Drug Resistance. Roma, Italia, 7-9 de Junio de 2017. Presentación Póster. Prevalence of Transmitted Drug Resistance Mutations among Naïve HIV-infected patients (2014-2016) in Northwest Spain. Pernas B, Tabernilla A, **Grandal M**, Cañizares A, Castro-Iglesias A, Mena A, Borrajo A, Poveda E.
- 26th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). Seattle, 4-7 Marzo de 2019. Presentación Póster. Massive release of platelet-derived extracellular vesicles during HIV infection. E Poveda, A Tabernilla, **M Grandal**, A Pérez, A Salgado, A Marió, H Álvarez, N Valcarce, J González, F Gutiérrez, M Crespo, E Ruiz-Mateos, M Lederman, M Freeman.

Premios y Menciones:

- Primer premio en 2015 a la mejor comunicación tipo póster otorgado por las III Jornadas de Biointegración a la comunicación que lleva por título: Impact of HCV infection in a HIV cohort followed over 18 years: past and present.
- Primer premio en 2017 a la mejor Investigación en VIH y otras enfermedades de transmisión sexual, otorgado por la Agencia de Conocimiento en Salud (ACIS) por la investigación llevada a cabo en el artículo científico: European Haplogroups Impact on Liver Fibrosis Progression Among HCV and HIV/HCV-Coinfected Patients From Northwest Spain.