



Universidad Autónoma de Madrid

Programa de Doctorado en Medicina y Cirugía

**REPERCUSIÓN DEL TRATAMIENTO
CON ANTIVIRALES DE ACCIÓN
DIRECTA SOBRE LA EVOLUCIÓN
CLÍNICA Y CALIDAD DE VIDA DE
PACIENTES CON HEPATITIS CRÓNICA
C TRATADOS EN UN HOSPITAL
TERCIARIO.**

Raul Honrubia López

Madrid, 2020

Departamento de Medicina

Facultad de Medicina



Universidad Autónoma de Madrid



**REPERCUSIÓN DEL TRATAMIENTO CON ANTIVIRALES DE ACCIÓN
DIRECTA SOBRE LA EVOLUCIÓN CLÍNICA Y CALIDAD DE VIDA DE
PACIENTES CON HEPATITIS CRÓNICA C TRATADOS EN UN HOSPITAL
TERCIARIO.**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por:

Raul Honrubia López

Madrid, 2020

Licenciado en Medicina, para optar al grado de Doctor por la Universidad
Autónoma de Madrid

Dirigida por:

Dr. Javier García-Samaniego Rey

Dr. Antonio Madejón Seiz

Realizada en:

Sección de Hepatología del Hospital Universitario La Paz

Fundación para la Investigación Biomédica Hospital Universitario La Paz



El **Dr. Javier García-Samaniego Rey** y el **Dr. Antonio Madejón Seiz** certifican que **Raul Honrubia López**, licenciado en Medicina por la Universidad de Alcalá (UAH), ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado: **“Repercusión del tratamiento con antivirales de acción directa sobre la evolución clínica y calidad de vida de pacientes con hepatitis crónica C tratados en un hospital terciario”** en el Hospital Universitario la Paz y en la Fundación para la Investigación Biomédica Hospital Universitario la Paz, para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Revisado el presente trabajo, expresan su conformidad para la presentación del mismo considerando que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente.

Firmado, para que conste a todos los efectos, en Madrid, a 13 de diciembre de 2019.

Fdo. Dr. Javier García-Samaniego Rey

Director de Tesis

Jefe de Sección de Hepatología.

Servicio de Aparato Digestivo

Hospital Universitario La Paz

Fdo. Dr. Antonio Madejón Seiz

Codirector de Tesis

Centro de Investigación

Biomédica en Red (CIBERehd)

VºBº Tutora

Dra. María Consuelo Froilán Torres

Profesora Asociada de la

Facultad de Medicina de UAM

A los pacientes....

Sin lugar a dudas una Tesis Doctoral es la culminación de una trayectoria académica que requiere de mucho tiempo, esfuerzo y sacrificio. Este camino, afortunadamente, no se recorre en soledad, sino que desde el principio nos acompañan personas que hacen posible alcanzar nuestras metas y éxitos pero que también nos ayudan en nuestras derrotas y fracasos. Es por ello, que en estos momentos, a punto de alcanzar el grado de Doctor uno debe mirar atrás, para poner de relevancia y agradecer a esas personas que han hecho posible que me encuentre en este punto.

En primer lugar agradecer a Javier García-Samaniego y Antonio Madejón el haber sido mis directores de tesis. No solo me han aportado ideas y trabajo para el desarrollo y consecución de la misma, sino que también me han permitido conocer a dos grandes profesionales en su campo, sin duda dos personas de referencia con los que he tenido la suerte de trabajar.

A mis compañeros del Hospital Universitario La Paz porque con ellos empecé a desarrollarme como médico, especialmente como especialista en Aparato Digestivo, y aunque los comienzos siempre son duros, creo que me encontré en el mejor sitio para formarme como profesional.

Especial agradecimiento a mis compañeros del Hospital Universitario Infanta Sofía, tanto a médicos y enfermeras como auxiliares, porque actualmente son mi segunda familia y con ellos he seguido aprendiendo y manteniendo la ilusión y la motivación por esta especialidad tan bonita y apasionante.

A mis padres, piedras angulares de mi vida, son el claro ejemplo de humildad, trabajo y superación. Son los que me han enseñado todo aquello que no viene en los libros, a ser como soy. Sin lugar a dudas sin la presencia de ellos en mi vida y sus sacrificios por mí, yo hoy no podría haber alcanzado muchas de mis metas logradas.

A mis hermanos, porque junto a mis padres también han sido guías de mi camino, me han apoyado y ayudado en los buenos y, sobre todo, malos momentos, me han enseñado a compartir, y con ellos he aprendido el valor de estudiar y esforzarse. No me quería olvidar de mi primo Pepe, que para mí ha sido mi tercer hermano y con el que he tenido la suerte de ir creciendo y aprendiendo.

A mis amigos, especialmente a mis amigos de Albacete, porque a pesar de la distancia y el tiempo sin vernos siempre sé que son un refugio seguro en mis peores momentos. Personas, todas ellas, a las que quiero y admiro.

Y por último, a la persona más importante de mi vida, a mi esposa, Felisa. Mil gracias por acompañarme y estar a mi lado durante estos trece años, contigo di mis primeros pasos como estudiante de medicina y los continúo dando como especialista. Para mí eres un referente como persona y como médico, siempre lo has sido, ya lo sabes. En todo momento has estado a mi lado en todo este camino, ayudándome a levantar en los peores momentos y disfrutando conmigo nuestros éxitos. Esta tesis, como tantas otras cosas en la vida, te la debo en gran parte a ti, aunque a veces las palabras se quedan cortas. Solo espero poder seguir caminando juntos durante muchos más años. Gracias.

ABREVIATURAS

AAD	Antiviral de acción directa
AFP	Alfa-fetoproteína
ARN	Ácido ribonucleico
ARN-VHC	Genoma del virus C
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer
B-NHL	Linfoma no Hodgkin de células B
CHC	Carcinoma hepatocelular
CLDQ-HCV	Chronic Liver Disease Questionnaire-HCV Version
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
Cold-PCR	Amplificación en frío
DAS	Dasabuvir
DCV	Daclatasvir
DE	Desviación estándar
EMA	Agencia Europea del medicamento
EVA	Escala visual analógica
FDA	U.S. Food and Drug Administration
HCC	Hepatitis crónica C
HDA	Hemorragia digestiva alta
HSH	Hombres que tienen sexo con hombres
IBP	Inhibidor de la bomba de protones
IFN	Interferon
IP	Inhibidor de la proteasa del virus C
kPa	Kilopascal
LDV	Ledipasvir
NASH	Esteato-hepatitis no alcohólica
ND	Sin datos
OBV	Ombitasvir

OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco de lectura abierto
PAAF	Punción aspiración con aguja fina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG-INF	Interferón pegilado
PTV	Paritaprevir
RAVs	Variantes asociadas a resistencia
RBV	Ribavirina
RF	Radiofrecuencia
RTV	Ritonavir
RMN	Resonancia magnética nuclear
RVS	Respuesta viral sostenida
SMV	Simeprevir
SOF	Sofosbuvir
TAC	Tomografía axial computarizada
TACE	Quimioembolización transarterial
TVR	Telaprevir
TM	Temperatura de desnaturalización
Tto	Tratamiento
UTR	Regiones no codificantes
VEL	Velpatasvir
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VOX	Voxilaprevir
WHO	Organización Mundial de la Salud

ÍNDICE

Tabla de contenido

ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN/ABSTRACT.....	13
INTRODUCCIÓN.....	20
1.1- EPIDEMIOLOGÍA.....	21
1.2.- RUTAS DE TRANSMISIÓN	22
1.3.- TAXONOMÍA, ESTRUCTURA Y GENOTIPOS DEL VHC.....	23
1.4.- HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR VHC	25
1.4.1.- Hepatitis aguda.	26
1.4.2.- Hepatitis crónica.	27
1.4.3.- Carcinoma hepatocelular.....	28
1.5.- TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS C.....	32
1.5.1.- Historia del tratamiento.....	32
1.5.2.- Tratamiento de poblaciones especiales.....	38
1.5.3.- Fracaso al tratamiento y resistencias a los AAD	38
1.5.4.- Reservorios potenciales de infección	43
1.5.5.- Antivirales de acción directa y hepatocarcinoma.	45
1.5.6.- Calidad de vida percibida relacionada con la infección por VHC.....	47
OBJETIVOS.....	50
MATERIAL Y MÉTODOS	52
3.1.- DISEÑO GLOBAL DEL ESTUDIO.....	53
3. 2.- ESTUDIO DE EFICACIA EL TRATAMIENTO CON AADs DE SEGUNDA GENERACIÓN.....	54
3.2.1. Variables demográficas y epidemiológicas	54
3.2.2.- Variables asociadas a tratamientos antivirales previos al estudio	55
3.2.3.- tratamiento con AADs de segunda generación	55
3.2.4.- Variables clínicas asociadas a tratamiento con AADs.	57
3.2.5.- Variables relacionadas con la evolución clínica post-tratamiento.....	61
3.3.- SUB-ESTUDIO DE ANÁLISIS DE CINÉTICA DE ACLARAMIENTO DEL ARN-VHC EN CMSPs.	
.....	64
3.3.1.- Extracción de ARN de plasma y CMSPs.....	64
3.3.2.-Diseño de cebadores para la amplificación.....	64
3.3.3.- RT-PCR.....	65

3.3.4.- Análisis de secuencia de los productos amplificados.....	66
3.3.5.- Análisis filogenético de secuencias.....	66
3.4.- SUB-ESTUDIO DE ANÁLISIS DE PERCEPCIÓN DE CALIDAD DE VIDA EN PACIENTES CON RVS	66
3.4.1.- Variables analizadas.....	67
RESULTADOS	69
4.1.- CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES TRATADOS CON ANTIVIRALES DE ACCIÓN DIRECTA.....	70
4.2.- PAUTAS DE TRATAMIENTO CON AADs DE SEGUNDA GENERACIÓN.....	71
4.3.- ANÁLISIS DE RESPUESTA A TRATAMIENTO ANTIVIRAL	74
4.3.1.- Identificación de variantes virales asociadas a resistencia al tratamiento (RAVs). 80	
4.4.- ANÁLISIS DE LA CINÉTICA DE ACLARAMIENTO DEL ARN-VHC EN PLASMA Y CMSPS.....	90
4.4.1.- Cinética de aclaramiento en pacientes tratados con PEG-IFN+RBV.	90
4.4.2.- Cinética de aclaramiento en pacientes tratados con telaprevir.	90
4.4.3.- Cinética de aclaramiento en pacientes tratados con AADs de segunda generación.	93
4.4.4.- Análisis filogenético de las cepas de VHC aisladas de plasma y CMSPs.....	93
4.4.5.- Análisis de la evolución de secuencias virales en CMSPs.....	94
4.5 ANÁLISIS DE DESCOMPENSACIONES PRE Y POST-TRATAMIENTO.....	97
4.5.1.- Descompensación hepática.	97
4.5.2.- Análisis de la fibrosis y función hepática en pacientes F4	98
4.5.3.- Análisis del desarrollo de hepatocarcinoma y tumores extrahepáticos.	99
4.6.- RESULTADOS CALIDAD DE VIDA VHC.....	101
4.6.1.- Características basales de los pacientes tratados.....	101
4.6.2.- Características basales de los pacientes incluidos en el estudio	101
4.6.3.- Análisis SF-36	102
4.6.4.- Análisis EQ-5D-5L	103
4.6.5.- Análisis estratificado calidad de vida	104
DISCUSIÓN	106
5.1.- ANÁLISIS DE EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON AADS. IMPLICACIONES CLÍNICAS Y PERCEPCIÓN DE CALIDAD DE VIDA.....	107
5.2.- UTILIDAD DE LAS TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES DE RESISTENCIA... 113	
5.3.- ANÁLISIS DE PERSISTENCIA DEL ARN-VHC EN LOCALIZACIONES EXTRAHEPÁTICAS DE PACIENTES RESPONDEDORES.....	113
5.4.- MARCADORES DE PROGRESIÓN DE CHC.....	118

CONCLUSIONES	119
BIBLIOGRAFÍA.....	121
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	138
ANEXO 1	143
ANEXO 2	145

RESUMEN/ABSTRACT

Introducción. La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) ha sido durante muchos años un problema de salud pública de extraordinaria magnitud. Esta situación está cambiando rápidamente gracias a la generalización del tratamiento con antivirales de acción directa (AADs), que presentan tasas de eficacia cercanas al 98% en práctica clínica real, abriéndose la posibilidad de que la infección por VHC sea la primera enfermedad viral crónica susceptible de ser eliminada en ausencia de vacuna. Sin embargo, no se ha estudiado de forma exhaustiva la eliminación del VHC en reservorios extrahepáticos como los linfocitos. Si bien la significación clínica de la presencia del genoma viral en este tipo celular es motivo de controversia, la confirmación de su eliminación en pacientes respondedores es importante a la hora de consolidar el concepto de erradicación viral en los pacientes curados. Otra controversia clínicamente relevante en los últimos años es la de que pacientes con carcinoma hepatocelular (CHC) relacionado con el VHC y con respuesta al tratamiento con AADs puedan sufrir una recurrencia grave del cáncer hepático tras la curación de la infección.

El análisis en cohortes amplias de pacientes con hepatitis crónica C (HCC) de la evolución clínica durante el tratamiento y seguimiento posterior es también importante para conocer el efecto que la eliminación del virus tiene sobre la calidad de vida de los pacientes curados.

Objetivos. Con el fin de evaluar el impacto del tratamiento de la HCC con AADs sobre la respuesta virológica, la evolución clínica y la percepción de calidad de vida de los pacientes, se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.- Estudio de la eficacia del tratamiento con AADs en una cohorte de pacientes con HCC, analizando la respuesta al tratamiento, emergencia de mutaciones de resistencia, y la cinética de eliminación del VHC en la fracción de células monocucleares de sangre periférica (CMSPs).
- 2.- Estudio de la evolución clínica de la enfermedad hepática tras la eliminación del VHC, centrada especialmente en los pacientes con fibrosis avanzada (F4).
- 3.- Análisis de la recurrencia y/o desarrollo *de novo* de CHC o tumores extrahepáticos después de la curación de la infección por VHC, y estudio de composición alélica de la actividad Aurora Quinasa B (AURKB) celular.
- 4.- Evaluación de la mejoría de la calidad de vida en los pacientes con respuesta al tratamiento.

Pacientes y métodos: El trabajo se diseñó como un estudio descriptivo, unicéntrico, observacional, longitudinal y prospectivo, en el que se incluyeron 423 pacientes con HCC tratados con AADs de última generación. El estudio se completó con una cohorte secundaria de 17 pacientes previamente tratados con telaprevir (TVR) y 13 tratados con interferón (IFN), con o sin y ribavirina (RBV), para los ensayos comparativos de la cinética de eliminación del VHC en linfocitos y el estudio de emergencia de mutaciones de resistencia.

La evolución clínica de los pacientes tratados se analizó mediante la determinación de la carga viral del VHC, del grado de rigidez hepática mediante Fibroscan y el cálculo tanto de los índices de fibrosis FIB-4 y APRI como el valor de MELD al principio y al final del tratamiento. En los pacientes cirróticos se analizó la aparición de descompensaciones, la recurrencia del CHC y el desarrollo *de novo* de cualquier tipo de tumor después de 24 meses de seguimiento. La selección de mutaciones de resistencia al tratamiento se determinó mediante reacción de amplificación en cadena (PCR) estándar, secuenciación masiva y una técnica de amplificación en frío (Cold-PCR) optimizada durante el curso de esta tesis doctoral. La cinética de eliminación del VHC en CMSPs se analizó por determinación de la presencia del genoma viral por PCR estándar.

El análisis de cambios en la percepción de calidad de vida se realizó mediante encuestas realizadas al inicio y fin de tratamiento, y tras 12 semanas de seguimiento, utilizando los cuestionarios SF-36 y EQ-5D-5L, a una subpoblación de 86 pacientes respondedores al tratamiento tomados de la cohorte principal de este estudio y a 12 pacientes control no tratados de una cohorte secundaria.

Resultados. La combinación de AADs más utilizada fue la de sofosbuvir/ledipasvir (SOF/LDV). Respecto a los resultados de eficacia un 95.2% de los pacientes presentó respuesta viral sostenida (RVS), 12 pacientes (2.85%) recayeron tras finalizar el tratamiento y 8 (1.9%) incumplieron el tratamiento o se perdieron del seguimiento. Todos los pacientes que recidivaron recibieron tratamiento de rescate. El más utilizado fue la combinación sofosbuvir/velpatasvir/voxilaprevir (SOF/VEL/VOX) que se administró a 6 pacientes (50%). Solo un paciente recayó tras el segundo tratamiento, lo que representa una tasa de eficacia del 91.7%. El análisis de las mutaciones de resistencia mediante Cold-PCR permitió su identificación temprana en muestras basales, si bien requirió la realización de un número elevado de PCRs por muestra (n=30). El análisis del genoma viral (ARN-VHC) en linfocitos confirmó que el virus se eliminaba de forma más efectiva en este tipo celular utilizando AADs de última generación que TVR, un inhibidor de proteasa (IP) de primera generación.

Con respecto a la evolución de la enfermedad hepática durante y después del tratamiento, en 25/124 (20%) pacientes con cirrosis se confirmaron episodios de descompensación: en 14 antes del inicio del tratamiento y en 11 tras su finalización. Ninguno de los pacientes (n=3) con CHC antes del tratamiento sufrió recurrencia del tumor tras la curación de la infección. El porcentaje de pacientes con cirrosis hepática que desarrollaron CHC *de novo* tras el tratamiento (10/121: 8%) no fue superior al esperado en una población cirrótica en el tiempo de seguimiento del estudio. Aunque el análisis de la composición alélica de la posición rs1059476 de la actividad AURKB reflejó que la prevalencia del alelo T, asociado a desarrollo de fibrosis en estudios previos, era mayor en los pacientes con CHC que en la población de pacientes con fibrosis

avanzada (F4) o que en los pacientes con cirrosis que no desarrollaron CHC, las diferencias obtenidas no fueron en ningún caso estadísticamente significativas. Tampoco el porcentaje de desarrollo de tumores extrahepáticos en los 423 pacientes tratados fue superior al esperado en la población general, independientemente de su origen: hematológico (4/423: 0,9%), digestivo (4:0,9%), urológico (1:0,2%) o respiratorio (1:0,2%).

En el sub-estudio de calidad los cuestionarios SF-36 y EQ-5D-5L realizados en 86 pacientes tratados y 12 pacientes control demostraron mejoría de varios parámetros (función física, dolor corporal, salud general, vitalidad y función social) sobre todo cuando se comparó la percepción antes del tratamiento y tras 12 meses de seguimiento después de la curación.

Conclusiones. El tratamiento con AADs alcanza tasas de RVS del 95% en la cohorte de estudio, incrementándose hasta el 99,7% al aplicar la terapia de rescate en los fallos virológicos. La respuesta se extiende a la eliminación del genoma viral en los linfocitos. Además, la eliminación del VHC proporciona una mejoría clínica de la enfermedad, particularmente en los pacientes con fibrosis avanzada. Respecto a la calidad de vida percibida, se observó una mejoría significativa tras la curación, reforzando la idea de que el VHC, sin necesidad de causar enfermedad hepática avanzada, deteriora la calidad de vida de los pacientes, aunque no pueda descartarse que otros factores, como el ambiente, o la perspectiva de curación puedan tener un papel en el efecto observado.

Background. Hepatitis C virus (HCV) infection has been a major health problem for years. The development of direct-acting antivirals (DAAs) with effectiveness rates close to 98% in real clinical practice is changing this situation. Therefore, it is possible that HCV infection could be the first infectious disease which can be eliminated in the absence of a vaccine. However, the elimination of HCV-ARN in extrahepatic reservoirs, such as lymphocytes, has not been thoroughly studied. The clinical significance of detectable HCV-ARN in this cell type is a matter of controversy; however, confirmation of its elimination may be important in consolidating the concept of viral elimination/eradication in responder patients. Another polemical issue that has been raised in recent years is that patients with HCV-related hepatocellular carcinoma (HCC) may suffer severe recurrence of liver cancer after virus elimination by DAAs treatment. The analysis, of the clinical evolution during antiviral treatment and during post-therapy follow-up in large cohorts of patients with chronic hepatitis C (CHC), is important to clarify controversies surrounding the treatment, and to identify the effects that HCV elimination has on the quality of life of cured patients

Aims. In order to evaluate the overall impact of the treatment of HCC patients with the latest-generation DAAs on the virological response, clinical evolution and the effect on the perception of patient quality of life, the following specific objectives were proposed:

1. Study of the effectiveness of antiviral treatment with DAAs in a cohort of patients with CHC, analyzing the response to treatment, emergence of resistance mutations, and the kinetics of HCV elimination in the fraction of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).
2. Study of the clinical evolution of liver disease after HCV elimination, especially focused on patients with advanced liver disease (F4).
3. Analysis of HCC recurrence and /or *de novo* development of liver or extrahepatic cancers after the cure of HCV infection and study of allelic composition of the cellular Aurora Kinase B (AURKB) activity.
4. Evaluation of the perception of improvement of quality of life in asymptomatic patients responding to antiviral therapy.

Patients and methods. The work has been designed as a descriptive, single-center, observational, longitudinal, prospective study, in which 423 patients with CHC treated with DAAs were included. This study was completed with a secondary cohort of 17 patients previously treated with telaprevir (TVR) and 13 treated with interferon (IFN), with or without ribavirin (RBV), for comparative trials of HCV clearance kinetics in lymphocytes and the analysis of resistance mutations emergence during the treatment.

The clinical evolution of treated patients was analyzed by determining the HCV viral load, the degree of liver stiffness using Fibroscan and by calculation of fibrosis scores FIB-4, APRI and MELD, in the baseline and final treatment samples. We also analyzed in patients with advanced fibrosis (F4) the appearance of hepatic decompensations, the recurrence of HCC or *de novo* development of any type of cancer after 24 months post-treatment. The selection of treatment resistance mutations was analyzed by standard Polymerase Chain Reaction (PCR), Next Generation and a Cold-PCR technique developed during the development of this work. The kinetic of HCV elimination in lymphocytes was analyzed by determining the presence of the viral genome by standard PCR in this cell type.

The analysis of changes in the perception of quality of life was carried out through surveys conducted at the beginning and end of treatment, and after 12 weeks of follow-up, using the SF-36 and EQ-5D-5L questionnaires. In this study was analyzed a subpopulation of 86 patients taken from the main cohort of this study who achieved SVR, and a control group of 12 untreated patients from a secondary cohort.

Results. The most commonly used combination of DAAs was Sofosbuvir/Ledipasvir (SOF/LDV). Regarding the effectiveness of treatments, 95.24% of the patients showed a sustained viral response (SVR), 12 patients (2.85%) presented recurrence after completing the treatment and 8 (1.9%) failed to comply with the prescribed treatment. All patients who relapsed received rescue therapy being the most commonly treatment used the combination of Sofosbuvir/Velpatasvir/Voxilaprevir (SOF/VEL/VOX) in 6 patients (50%). Only 1 patient relapsed again after receiving rescue treatment, which finally presented an efficacy of 91.7%. The analysis of resistance mutations by Cold-PCR allowed its early identification in baseline samples, although it requires the analysis of a large number of PCRs per sample (n=30). The analysis of the viral genome (HCV-RNA) in lymphocytes confirmed that HCV was eliminated more effectively in this cell type using last generation DAAs than telaprevir/boceprevir protease inhibitors. In 25/124 (20%) patients with cirrhosis, decompensation processes were confirmed; in 14 of them before the start of treatment and in 11 after the end of it.

None of the patients with HCC before treatment (n=3) suffered recurrence of the tumor after cure of the infection. The percentage of patients with liver cirrhosis who developed *de novo* CHC after treatment (10/121: 8%) was not higher than expected in a cirrhotic population at the time of study follow-up. The analysis of the allelic composition of the rs1059476 position of the AURKB activity showed that the prevalence of the T allele, associated with the development of fibrosis in previous studies, was higher in patients with HCC than in the population of patients with advanced fibrosis (F4) or that in patients with cirrhosis who did not develop CHC.

However, these differences do not reach statistical significance. The incidence of extrahepatic tumors in the 423 treated patients was not higher than that expected in the general population, regardless of their origin: hematological (4/423: 0.9%), digestive (4: 0.9%), urological (1: 0.2%) or respiratory (1: 0.2%).

In the quality sub-study, the SF-36 and EQ-5D-5L questionnaires carried out on 86 treated patients and 12 control patients demonstrated improvement of several parameters (physical function, body pain, general health, vitality and social function), especially when the perception is compared before treatment and after 12 months of follow-up after healing.

Conclusions. The treatment with last generation DAAs reaches RSV rates of 95% in the cohort studied, increasing to 99.7% when applying rescue therapy. This response is extended to the elimination of the viral genome in lymphocytes. In addition, the elimination of HCV is a clinical improvement especially in patients with more advanced fibrosis. Regarding the perceived quality of life, a significant improvement was confirmed after the cure, supporting the idea that HCV can cause the same deterioration in the quality of life of patients, although it cannot be ruled out that the environment, and the perspective of healing of treated patients also have some effect.

INTRODUCCIÓN

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) puede causar tanto hepatitis aguda como crónica. El daño hepático presenta un espectro muy amplio y varía desde cambios mínimos hasta fibrosis avanzada y cirrosis. El VHC también se ha relacionado con la aparición de carcinoma hepatocelular (CHC). El riesgo de desarrollo de cirrosis oscila entre un 15-30% después de 20 años de la infección (Thein, 2008). Otro tipo de variables como la coinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el virus de la hepatitis B pueden aumentar el riesgo de desarrollo de cirrosis (Sarin, 2012). A su vez pueden aparecer manifestaciones extrahepáticas y afectación de la calidad de vida percibida por los pacientes infectados.

Desde el año 2015 se dispone de nuevos fármacos para el tratamiento de la hepatitis C denominados antivirales de acción directa (AADs) que consiguen tasas de curación superiores al 95%. Hasta mayo de 2018 la *Food and Drug Administration* (FDA) y la *European Medicines Agency* (EMA) han aprobado hasta 13 AADs de 4 tipos distintos. En España, según datos del Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social se han tratado más de 130.000 pacientes desde 2015 consiguiendo la respuesta viral sostenida (RVS) en la mayoría de ellos (Calleja, 2018).

1.1- EPIDEMIOLOGÍA

La infección por el VHC es un problema sanitario de primer orden a nivel global. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del año 2015 la prevalencia estimada de la infección a nivel mundial está en torno al 1%, lo que equivale a aproximadamente 71 millones de personas infectadas. Aunque la distribución de la enfermedad es global, la prevalencia por países presenta notables diferencias: Asia central presentaría la mayor prevalencia a nivel mundial (3,6%) seguido de Europa del Este (3,3%) y África sub-sahariana central (2,1%) (Blach, 2017). Por países, China presentaría el mayor número de personas con VHC, con casi 10 millones, seguido de Pakistán con 7 millones e India con 6 millones (Blach, 2017). En el caso concreto de España datos recientes estiman una prevalencia de infección activa del 0,22% y una prevalencia de anticuerpos frente al VHC del 0,85% (Estirado, 2018) con un número total de infectados de 386.000 personas en 2015 siendo uno de los 30 países en los que se localiza el 80% de infectados a nivel mundial (Blach, 2017).

La incidencia global de la infección por el VHC en 2015 se estimó en 23,7 por 100.000 habitantes lo que correspondería a 1,75 millones de nuevas infecciones (*World Health Organization.*, 2017). Las áreas con una tasa de infección más elevada se encuentran en las regiones del mediterráneo oriental (62,5/100000), Egipto y África subsahariana y el continente europeo (61,8/100000).

No obstante, la incidencia global ha disminuido en la segunda mitad del siglo XX. Muchos países recogen desde hace varios años los datos de prevalencia sobre infectados por VHC sugiriendo una disminución en la incidencia en los últimos años (Saraswat, 2015). También ha contribuido a la disminución de la incidencia la implementación de medidas higiénicas y de mayor seguridad en el uso de jeringuillas (Pépin, 2014). Por otro lado, y especialmente importante, la introducción a partir del año 2015 de los nuevos tratamientos antivirales de acción directa que han conseguido tasas de curación superiores al 95% están produciendo cambios significativos en los perfiles de prevalencia de infección activa e incidencia de nuevas infecciones.

1.2.- RUTAS DE TRANSMISIÓN.

Las principales rutas de transmisión del VHC son actualmente dos (*World Health Organization.*, 2018):

1) Asociadas a procedimientos médicos: En los países en los que no existen medidas de control sanitarias suficientes la transmisión del VHC está relacionada con la utilización de materiales de venopunción no desechables o mal esterilizados y con procedimientos tales como la diálisis, cirugía menor, procedimientos dentales y utilización de hemoderivados en los que no se ha realizado detección de VHC (Prati, 2006). Globalmente en 2010 un 5% de las inyecciones en el contexto de procedimientos médicos se realizaron con material reutilizable que no se esterilizaba (Pepin, 2013). Se estima que cada año 315.000 infecciones por el VHC se relacionan con la realización de inyecciones que se consideran poco seguras (Pepin, 2014).

En España, un estudio retrospectivo en el que analizaron 109 casos documentados de hepatitis C aguda entre 1998 y 2005 confirmó que el factor de riesgo más importante que habían presentado los pacientes los seis meses previos al diagnóstico era haberse encontrado dentro del ámbito hospitalario [73 casos (67%)], habiéndose realizado en la mayoría de ellos cirugía o alguna prueba invasiva o procedimiento terapéutico (Martínez-Bausser E, 2008).

2) Asociadas a consumo de drogas intravenosas: La utilización de drogas por vía intravenosa supone hasta el 23% de nuevos casos de infección por VHC de forma global. Hasta el 8% de las infecciones actuales por VHC se encuentran entre personas que consumen drogas inyectables (*World Health Organization.*, 2017). En España este grupo constituye un 20% del total de las infecciones agudas por VHC (Perez-Alvarez, 2012).

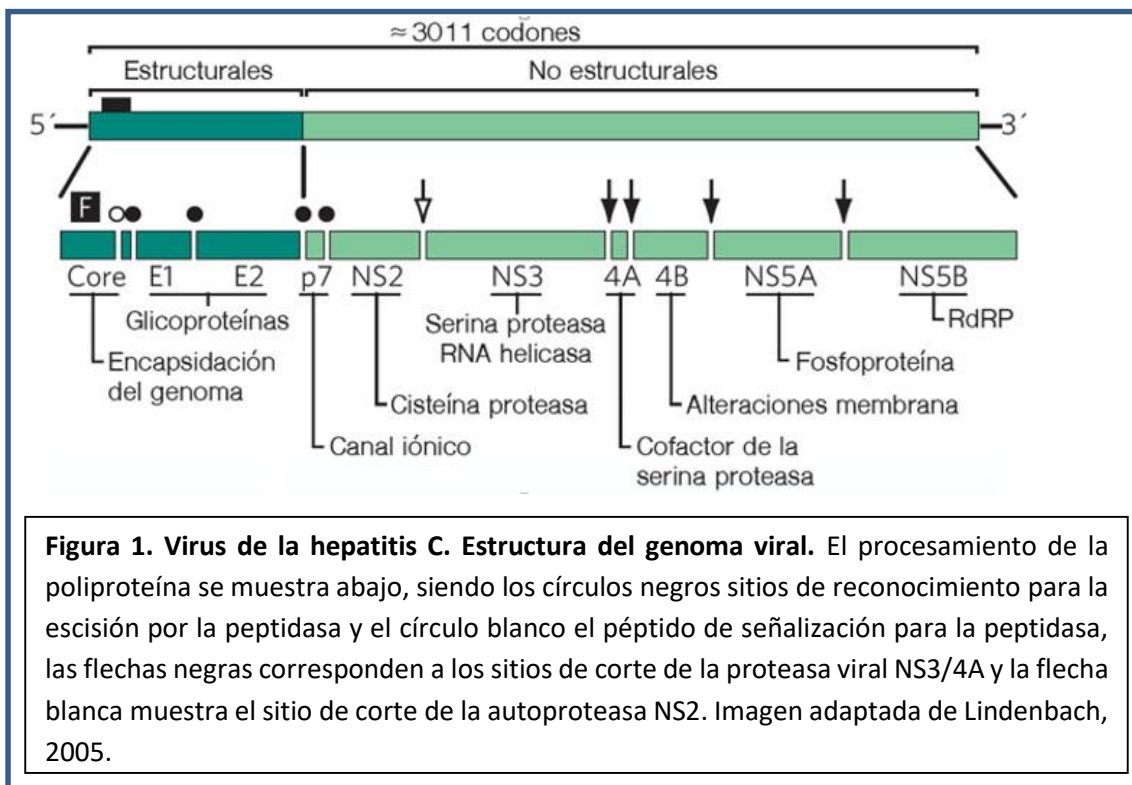
Otras rutas de transmisión menos frecuentes son la transmisión vertical, que supone un riesgo de entre el 4,2%-7,8% (7,6%-15,2% en madres coinfectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Benova, 2014), otros procedimientos percutáneos como los tatuajes y *piercings*,

los accidentes laborales en el medio sanitario y la transmisión sexual. En este último caso, la transmisión es poco frecuente en parejas heterosexuales monógamas, en las que el riesgo se estima entre 0,01%-0,13% al año (Terrault, 2013). El riesgo aumenta significativamente en personas coinfectadas por el VIH sobre todo en hombres que tienen sexo como hombres (HSH) (Danta, 2007).

1.3.- TAXONOMÍA, ESTRUCTURA Y GENOTIPOS DEL VHC.

EL VHC pertenece al género *Hepacivirus* de la familia *Flaviviridae*. Es un virus con cubierta lipídica de unos 40-80 nm de diámetro, que infecta fundamentalmente los hepatocitos. Su genoma está formado por ácido ribonucleico (ARN) de polaridad positiva y 9,6 kb de longitud, que presenta un único marco de lectura abierto (ORF) de unos 9 kb de longitud. Flanqueando la ORF en los extremos 3' y 5' se localizan dos regiones no codificantes (UTR) que son necesarias para los procesos de regulación de la replicación viral (Gottwein et al, 2008).

La traducción del genoma viral (ARN-VHC) produce una única poliproteína de unos 3000 aminoácidos que es escindida mediante proteasas del virus y del huésped en tres proteínas estructurales (proteína Core, glicoproteína E1 y E2) y en siete proteínas no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (Gottwein, 2008) (Figura 1).



Dentro de las proteínas estructurales, la del core posee 191 aminoácidos y está asociada al ARN del virus formando la nucleocápside, que tiene 30 nm de diámetro. Esta nucleocápside posee una cubierta lipídica, en parte derivada de las membranas del retículo endoplásmico del huésped, donde se encuentran las proteínas E1 y E2 que facilitan la entrada del virus en el hepatocito a través de receptores celulares (Douam, 2015).

Las proteínas no estructurales juegan un papel fundamental en la replicación y maduración del virus. Algunas de las más importantes son:

NS3: El extremo N-terminal tiene actividad serín-proteasa y el extremo C-terminal actividad helicasa/NTPasa. El extremo N-terminal está relacionado con la escisión entre NS3-4A, 4A-4B, 4B-5A y 5A-5B (Bartenschlager, 1993).

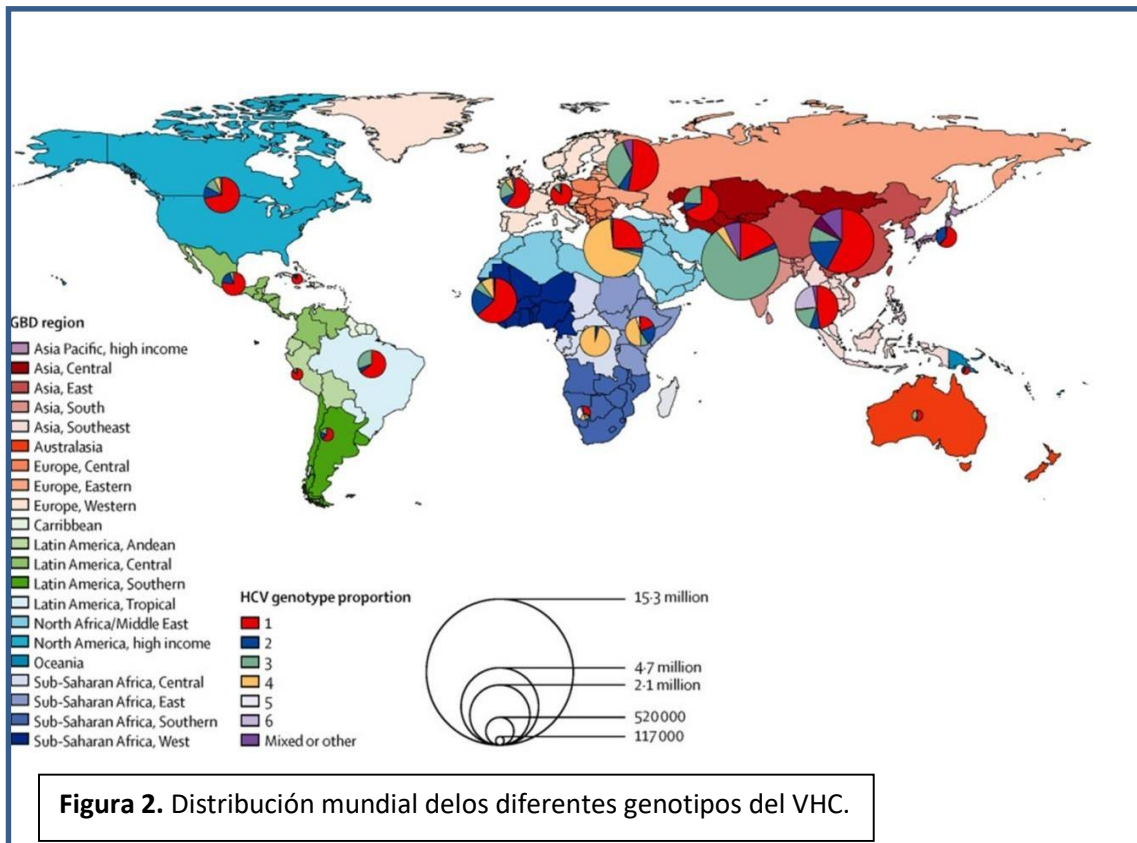
NS4A/NS4B: La primera actúa como cofactor de la proteína NS3 y la segunda interviene en el reclutamiento de otras proteínas virales.

NS5A: No posee aparente actividad enzimática e interviene en la replicación viral modulando distintas señales celulares y se relaciona con la respuesta al interferón (Macdonald, 2004).

NS5B: Actúa como una ARN-polimerasa ARN-dependiente y es la actividad enzimática responsable de la replicación viral (Behrens, 1996).

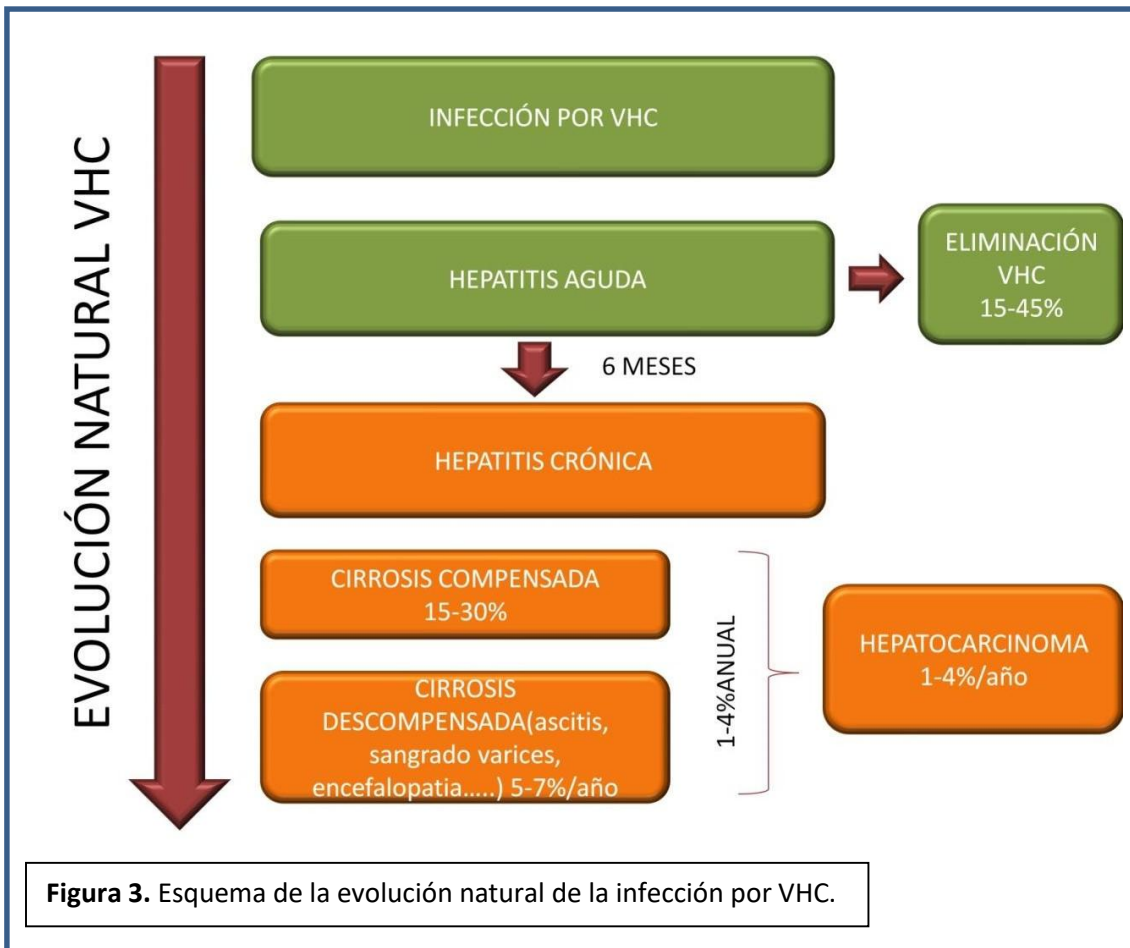
Debido a que la actividad polimerasa ARN dirigida no presenta actividad 3' exonucleasa correctora de errores, el VHC presenta tasas de mutación muy altas durante el proceso de replicación viral. Por este motivo, el virus presenta una gran heterogeneidad genética. En 1993 se comunicó la existencia de hasta 6 genotipos distintos (Simmonds, 1993), y en 2014 se confirmó la existencia de un séptimo genotipo (Smith, 2014). A su vez los genotipos se dividen en subtipos, entre los que destacan como mejor estudiados los subtipos 1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 3a, 4a, 4d, 5a y 6a. La distribución de los genotipos del VHC varía en función de los países, si bien a nivel global el genotipo 1 es el más prevalente (44%) seguido del genotipo 3 (25%) y genotipo 4 (15%) (Blach, 2017). No obstante, en algunos países la distribución de genotipos se desconoce todavía (Niebel, 2017). En España el estudio GEHEP 005 demostró que entre los años 2000-2015 el genotipo más frecuente era el 1 (66,9%) seguido del 3 (17,3%), el 4 (11,4%), el 2 (2,8%) y finalmente los genotipos 5 y 6 con 0,1% y 0,02% respectivamente, así como una prevalencia de coinfección con más de un genotipo del 1,48% (Aguilera, 2017).

La importancia en la diferenciación de los genotipos no radica tanto en la evolución clínica de la enfermedad -aunque la infección por el genotipo 3 se ha relacionado con un mayor riesgo de cirrosis y enfermedad hepática terminal, así como con una mayor tendencia al desarrollo de esteatosis (Negro, 2006)- sino en la diferente respuesta al tratamiento antiviral, particularmente con el basado en interferón (IFN).



1.4.- HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR VHC.

La infección por VHC produce una hepatitis aguda (en la mayoría de los casos de escasa expresividad clínica) que tiende a persistir en el organismo infectado (alrededor del 70% de las personas que se exponen al virus desarrollarán una infección crónica) y evoluciona a una hepatitis crónica de intensidad variable con el consiguiente riesgo de progresión de la fibrosis hepática, cirrosis y CHC.



1.4.1.- Hepatitis aguda.

Como ya se ha mencionado, la infección aguda por el VHC suele presentarse de forma oligosintomática, y por ello no es frecuente su diagnóstico temprano. Los síntomas son inespecíficos y recuerdan a un cuadro gripal. En algunas ocasiones los pacientes sí presentan síntomas más específicos de hepatitis aguda, como la ictericia, coluria o el dolor abdominal. Si el ARN del VHC persiste más de seis meses después de la infección aguda la infección se puede considerar crónica (Westbrook, 2014).

Entre un 15-45% de pacientes consiguen aclarar el VHC espontáneamente -sin tratamiento- antes de los seis meses (World Health Organization, 2018). Se han descrito factores individuales que favorecen el aclaramiento del ARN viral como la presencia de ictericia, el sexo femenino, y determinados factores genéticos que incluyen el polimorfismo CC del gen de la IL28B y el alelo DQB1*0301 del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (Urbani, 2005; Alric, 1997). Por otro lado, hay también factores que favorecen una mayor persistencia de la infección como la coinfección con el VIH (Thomas, 2000).

El diagnóstico se realiza principalmente con la detección de anticuerpos anti-VHC, aunque el desarrollo de los anticuerpos puede demorarse hasta en un 30% de los pacientes al comienzo de los síntomas sobre todo en pacientes inmunocomprometidos (Farci, 1991). Una vez que se ha demostrado la presencia de anti-VHC se debe de confirmar la presencia del virus realizando una determinación de ARN viral en suero o plasma, puesto que la presencia de anti-VHC se encuentra tanto en los pacientes que han aclarado el virus como en los que desarrollan una hepatitis crónica.

Dado que actualmente hay tratamientos extraordinariamente eficaces que curan la hepatitis C, el diagnóstico precoz de la infección y el cribado en población de riesgo debería ser un objetivo de todos los sistemas sanitarios.

A pesar del aclaramiento viral (espontáneo o como consecuencia del tratamiento) el riesgo de reinfección existe si hay una nueva exposición al virus -sobre todo en poblaciones de riesgo como los usuarios de drogas y los HSH-, debido al escaso poder neutralizante de los anticuerpos anti-VHC.

1.4.2.- Hepatitis crónica.

La hepatitis crónica C (HCC) se define por la persistencia del ARN-VHC en suero 6 meses después de la infección aguda (Westbrook, 2014). El VHC progresivamente origina inflamación y fibrosis hepática, que puede evolucionar a cirrosis. El riesgo de desarrollo de cirrosis varía del 15% al 30% tras 20 años después de la infección (Thein, 2008). Se han sugerido diversos factores del huésped que pueden favorecer la progresión de la fibrosis como el sexo masculino, el consumo de alcohol, la obesidad, la diabetes tipo 2, la infección por VIH o terapias inmunosupresoras (Westbrook, 2014).

Inicialmente la cirrosis se considera compensada cuando el paciente no presenta las manifestaciones clínicas que definen la descompensación. Posteriormente aparecen las complicaciones derivadas de la hipertensión portal y de la pérdida de la función hepática como ascitis, hemorragia por varices esófago-gástricas o encefalopatía hepática (D' Amico, 2006). Entre un 5-7% de cirróticos compensados por año pueden presentar algún tipo de descompensación (D' Amico, 2006). Por otro lado, dentro de las complicaciones que puede presentar un paciente con cirrosis se encuentra el desarrollo de CHC (riesgo entre 1-4% por año) (El-Serag, 2012).

Aunque como se ha dicho previamente la sintomatología derivada de la enfermedad hepática crónica aparece fundamentalmente en pacientes cirróticos descompensados, existen estudios

que relacionan la infección por el VHC con una peor percepción de calidad de vida cuando se compara con la población general (Spiegel, 2005).

A su vez, la infección por el VHC puede presentar otras manifestaciones como el desarrollo de crioglobulinemia o vasculitis entre otras, son las denominadas manifestaciones extrahepáticas. Estas manifestaciones aparecen, en parte, por la actividad linfotrópica que tiene el VHC interaccionando con las células linfoides. El VHC, además, presenta actividad oncogénica y está implicado en el desarrollo de algunos tumores como el Linfoma no-Hodgkin de células B (B-NHL) y el carcinoma papilar de tiroides (Ferri, 2015).

Dado que el desarrollo de fibrosis que últimamente conduce a la cirrosis es un proceso progresivo que tarda años en desarrollarse, la eliminación del VHC puede frenar esta progresión. Es por ello que el desarrollo durante los últimos años de fármacos con una alta efectividad para la curación de la infección frena la progresión de la fibrosis y en pacientes cirróticos disminuye el riesgo de descompensaciones. Ello conlleva una significativa disminución de la morbimortalidad por hepatitis C.

1.4.3.- Carcinoma hepatocelular.

El CHC es el tumor hepático maligno más frecuente y se da prioritariamente en pacientes con cirrosis. Entre las principales causas se encuentran aquellas que conducen al paciente a desarrollar una enfermedad hepática crónica o cirrosis, como son las hepatitis virales, el consumo excesivo de alcohol o las esteatohepatitis no alcohólicas (NASH).

El VHC se relaciona con la aparición de CHC en pacientes con cirrosis hepática y es rara su aparición en pacientes sin enfermedad hepática avanzada. El riesgo de progresión de cirrosis a CHC varía entre 1-4% anual (El-Serag, 2012). No obstante, el desarrollo de CHC también está relacionado con factores individuales como el consumo de alcohol, la coinfección por otros virus como el de la hepatitis B (VHB) o VIH y la presencia de obesidad y esteatosis entre otros (*World Health Organization*, 2017). Respecto a los factores virales, uno de los que presenta en algunos estudios cierta asociación con el aumento del riesgo de desarrollo de CHC es la infección por el genotipo 1b (Raimondi, 2009).

1.4.3.1.- Detección precoz.

Dado que el desarrollo de cirrosis predispone claramente al desarrollo de CHC, la realización de programas de detección precoz en esta población mejora la supervivencia por esta causa (Van Meer, 2015).

Los programas de detección precoz se basan fundamentalmente en:

-Radiodiagnóstico: La ecografía abdominal ha sido clásicamente la técnica utilizada para el diagnóstico precoz de lesiones sugestivas de CHC. La ecografía presenta una sensibilidad que varía entre 35-84% (en función del equipo y del operador) y una especificidad del 90% (Peterson, 2001). La tomografía axial computarizada (TAC) y la resonancia magnética nuclear (RMN) también son útiles para el diagnóstico precoz, aunque, por regla general, no se utilizan como método inicial de cribado porque la ecografía es una técnica inocua, con mayor disponibilidad y más sencilla y de menor coste.

-Marcadores tumorales: La alfa-fetoproteína (AFP) se ha utilizado clásicamente para la detección precoz del CHC. La sensibilidad y especificidad varía entre 21-64% y 82-93% respectivamente (Colli, 2006). No obstante, es un marcador que puede elevarse en otras situaciones como las hepatitis agudas o en tumores germinales. También en la infección por el VHC la AFP puede encontrarse elevada sin presencia de CHC hasta en un 16% de los pacientes (Di Bisceglie, 2005). Los datos sobre el coste-efectividad de su uso de forma rutinaria son controvertidos.

Los intervalos para el seguimiento y la detección precoz del CHC se han establecido en seis meses. Intervalos más cortos como de tres meses no han demostrado un beneficio clínico adicional (Trinchet, 2011) e intervalos más largos se relacionan con una supervivencia menor (Santi, 2010).

1.4.3.2.- Diagnóstico.

Es fundamental distinguir dos grupos de pacientes para la elección de una correcta técnica diagnóstica. Aquellos que presentan un alto riesgo de desarrollar CHC entre los que se incluirían los pacientes cirróticos, en los que las pruebas de imagen podrían ser suficientes para el diagnóstico, y aquellos sin hepatopatía conocida en la que se va a requerir una muestra de tejido tumoral para su confirmación (Galle, 2018).

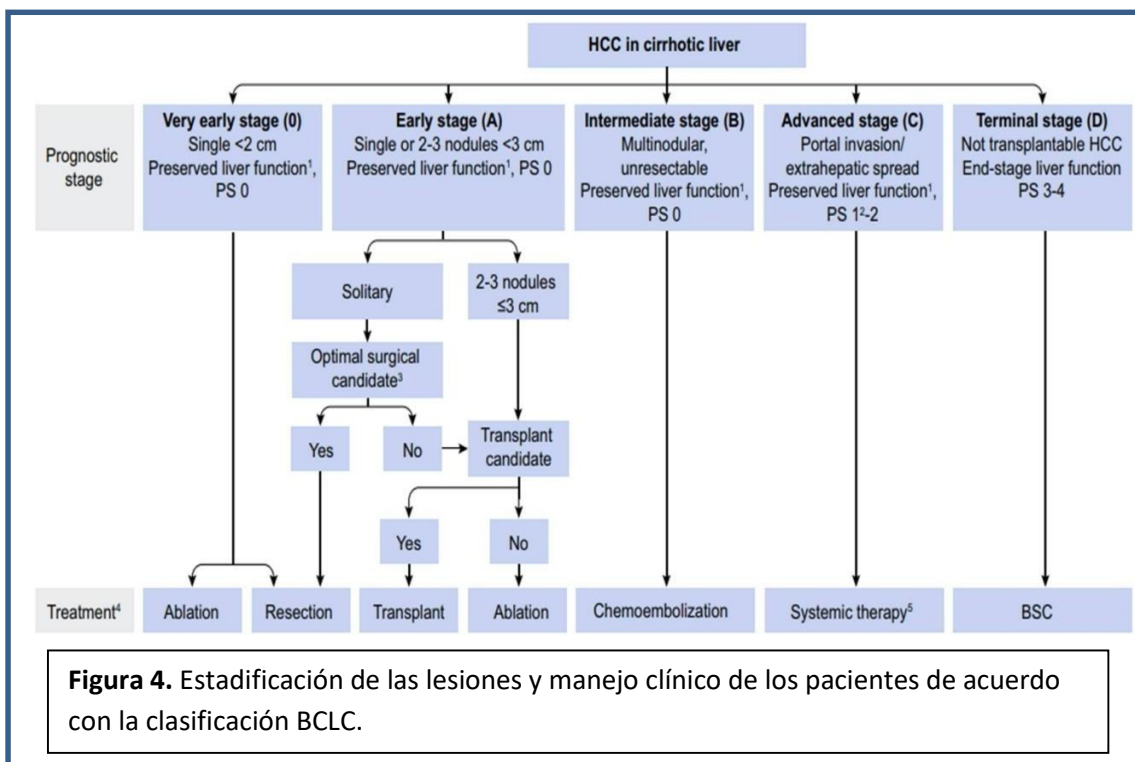
Dentro de las pruebas de imagen que se utilizan para el diagnóstico tenemos la TAC y la RMN con contraste multifásico, que se basan fundamentalmente en distinguir mediante contraste los trastornos vasculares que se producen en la lesión durante el proceso de carcinogénesis. El patrón radiológico característico de estas lesiones es la presencia de una hipercaptación de contraste en la fase arterial tardía y en lavado en la fase portal y/o tardía (Matsui, 2011). Estos criterios son aplicables a lesiones mayores de 1 cm. Para las lesiones menores de 1 cm se recomienda seguimiento mediante ecografía cada 4 meses y si la lesión aumenta de tamaño

durante ese periodo de seguimiento se recomendaría en ese momento realizar TAC o RMN (Galle, 2018).

Para el segundo grupo de pacientes, uno de los métodos fundamentales para el diagnóstico es la obtención de una punción/biopsia de la lesión hepática. No obstante, hay que considerar que este método es invasivo y puede presentar complicaciones, aunque el porcentaje de las mismas es bajo. La biopsia se recomienda fundamentalmente en pacientes con sospecha de CHC que no presentan hepatopatía crónica y en los pacientes cirróticos en los que las pruebas de imagen no se consideran diagnósticas por no cumplir todos los criterios (Galle, 2018).

1.4.3.3.- Tratamiento.

Una vez diagnosticado el CHC y previo al tratamiento se debe definir el estadio del tumor. Para la estadificación de las lesiones se han desarrollado varias clasificaciones. Estas clasificaciones fundamentalmente recogen el tamaño y número de lesiones y también el estado general del paciente y la reserva funcional hepática. La más utilizada y aceptada es la denominada “*Barcelona Clinic Liver Cancer*” (BCLC). Esta clasificación incluye distintas variables pronósticas como las previamente mencionadas y de acuerdo con ellas establece una modalidad de tratamiento y la supervivencia media (Bruix, 2015).



Los tratamientos que recoge la clasificación BCLC son los siguientes:

- **Resección quirúrgica:** se indica en los pacientes que presentan estadio 0 o A y en aquellos que desarrollan CHC sobre un hígado no cirrótico. La resección está indicada por tanto en lesiones nodulares únicas y en pacientes con buena función hepática y estado general.

- **Trasplante hepático:** indicado en pacientes en estadio A con 2-3 nódulos iguales o menores de 3 cm y que cumplen los criterios de Milán para el trasplante junto con una buena función hepática y estado general.

- **Técnicas ablativas:** se pueden utilizar en estadios precoces (0 o A) que no son candidatos a resecciones quirúrgicas ni a trasplante hepático. Existen dos procedimientos fundamentales de ablación:

- **Radiofrecuencia (RF):** es la técnica más utilizada y se basa en producir una necrosis coagulativa del tumor con un anillo peritumoral de seguridad (Galle, 2018). La RF no se puede realizar si la lesión se encuentra próxima a la cápsula hepática, órganos vecinos o vasos sanguíneos. Tampoco se debe realizar en presencia de ascitis abundante.

- **Etanolización:** consigue la necrosis tumoral del 90% de la lesión en tumores menores de 2 cm (Livraghu, 1995); sin embargo, no se considera un tratamiento óptimo para lesiones mayores de 2 cm debido a su capacidad limitada de necrosar el tumor, lo que puede incrementar la tasa de recurrencia.

- **Quimioembolización transarterial (TACE):** la TACE se considera un tratamiento de elección para pacientes en estadios intermedios (B), que presenten lesiones multinodulares o irresecables y con buena función hepática y estado general. Consiste en la canalización de la arteria que irriga al tumor y la inyección de sustancias que provocan una isquemia y toxicidad tumoral. La invasión macrovascular de la porta por el tumor es una contraindicación (Lo, 2002). La trombosis portal también se considera una contraindicación absoluta; no obstante en algunos pacientes con trombosis parciales o subsegmentarias se puede plantear un tratamiento selectivo (Silva, 2017).

- **Tratamientos quimioterápicos:** en la actualidad disponemos de dos tratamientos aprobados en primera línea para pacientes con estadio avanzado. Se utilizan en los casos de invasión portal o diseminación extrahepática con buena función hepática.

Sorafenib: inhibidor de multiquinasa que se encuentran expresadas en el CHC. En un estudio de fase III se demostró un aumento significativo de la supervivencia en los

pacientes tratados con sorafenib, con una disminución del 31% en el riesgo relativo de muerte (Llovet, 2008).

Lenvatinib: inhibidor multiquinasa cuya diana son los receptores del factor de crecimiento endotelial (VEGFR1-3), receptores de crecimiento fibroblástico (FGFR1-4), receptores α del factor de crecimiento plaquetario (PDFGR α), RET y KIT (Matsui, 2008). En términos de supervivencia no se considera inferior al sorafenib, aunque sí mejora la supervivencia libre de progresión (Kudo, 2018).

1.5.- TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS C.

El tratamiento de la infección por el VHC ha experimentado una gran transformación en los últimos años. Tras varias décadas de tratamiento basado en el interferón y con tasas de respuesta viral sostenida (RVS) no superiores al 50%, en los últimos 5 años se ha producido un cambio de paradigma con la aparición de los antivirales directos (AADs), que consiguen tasas de RVS de más del 95% . Ello ha abierto la puerta a la eliminación de la infección por VHC desde una perspectiva de salud pública y ha cambiado el futuro de miles de pacientes.

1.5.1.- Historia del tratamiento.

El primer tratamiento que se comenzó a utilizar hace más de 20 años tras el descubrimiento del VHC fue el interferón alfa en monoterapia. Posteriormente se introdujo el tratamiento combinado con ribavirina, empleándose finalmente el interferón pegilado (PEG-IFN)- una forma de interferón con una vida media más prolongada- junto con la ribavirina (RBV). Estos tratamientos eran prolongados (entre seis meses y un año de duración) y en pacientes con genotipo 1 conseguían tasas de RVS entre el 40-50%, mientras que en los genotipos 2 y 3 los porcentajes de respuesta eran mejores y alcanzaban el 75-80% de los pacientes.

A su vez, el tratamiento con interferón presentaba importantes efectos secundarios. El más frecuente de ellos es el síndrome pseudogripal, caracterizado por malestar general, artralgias y mialgias que aparece tras varias horas después de la administración del fármaco, y se puede prolongar varias semanas. Otros efectos secundarios frecuentes son las alteraciones neuropsiquiátricas y las alteraciones hematológicas como la leucotrombopenia. La ribavirina produce hemólisis, lo que unido a la acción de mielosupresión que produce el interferón puede ocasionar anemia (Negro, 2010). Las alteraciones dermatológicas también se veían favorecidas por la combinación de estos dos fármacos. La ribavirina a su vez tiene efectos teratogénicos por lo que se recomienda utilizar métodos anticonceptivos durante la toma del fármaco y al menos 6 meses después de su supresión (Ghancy, 2009).

1.5.1.1.- Primeros antivirales de acción directa.

A principios de esta década se aprobaron para su comercialización los primeros antivirales de acción directa denominados telaprevir (TVR) y boceprevir (BOC). Ambos fármacos son inhibidores de la proteasa NS3/NS4A (IPs). Los dos medicamentos se comercializaron para ser administrados junto con PEG-IFN y RBV, debido a que no eran eficaces en monoterapia y solo eran activos para pacientes con genotipo 1. En estos pacientes la RVS se incrementó hasta tasas del 75%.

Telaprevir: la duración del tratamiento era de 12 semanas en combinación PEG-IFN + RBV para posteriormente completar el tratamiento solo con PEG-IFN + RBV durante 12 o 36 semanas más. El telaprevir se administraba a dosis de 750 mg cada 8 horas. En algunos estudios de población nunca tratada se vio un aumento de la RVS en un 30% (Jacobson, 2011). También se comprobó la mejoría en la RVS en aquellos pacientes que previamente habían sido tratados con PEG-IFN + RBV y habían recidivado después del tratamiento (Zeuzem, 2011).

Boceprevir: la pauta de administración difiere de la utilizada para el telaprevir. Se recomendaba iniciar el tratamiento con PEG-IFN + RBV al menos 4 semanas previas a introducir el boceprevir, lo que se conoce como “fase de *lead-in*”. De esta forma se conseguía aumentar la tasa de RVS en un 10% y además se podía predecir la posible respuesta favorable a la introducción del boceprevir en función de la disminución de la carga viral. La dosis era de 800 mg cada 8 horas durante 44 semanas (Kwo, 2010).

Dentro de los efectos secundarios más frecuentes del TVR destaca el rash maculopapular y el prurito, que puede llegar a afectar hasta al 50% de los pacientes tratados, apareciendo generalmente durante las primeras semanas. El rash suponía la suspensión del tratamiento hasta en un 7% de los pacientes (Negro, 2010). La anemia era otro también otro efecto adverso frecuente de aparición hasta en un 30% de los pacientes. El principal efecto secundario del BOC es la anemia hasta en un 49% de los tratados seguido de la disgeusia en un 44% (Ghany, 2011). No hay que olvidar que estos efectos adversos se añadían a los que ya presentaban la biterapia con PEG-IFN + RBV lo que podía suponer una mala adherencia al tratamiento que además presentaba duraciones muy prolongadas.

1.5.1.2.- Antivirales de acción directa de última generación.

Sofosbuvir (SOF): es un inhibidor de la polimerasa NS5B y constituye uno de los fármacos “clave” para el tratamiento de la hepatitis C. Sofosbuvir tiene actividad pangenotípica y se administra por vía oral (en la actualidad en combinación con otros antivirales) en pautas que van desde las

8 a las 24 semanas. La excreción es fundamentalmente renal y en menor medida por las heces (EASL., 2018). No obstante, la utilización del fármaco en pacientes con insuficiencia renal leve (FG > 30 ml/min) se considera segura (Desnoye, 2016). Hay que tener especial precaución con las interacciones medicamentosas y en consecuencia con la toma concomitante de fármacos que inducen el transportador glicoproteína-P (P-gp) ya que este hecho puede disminuir la concentración de sofosbuvir (EASL., 2018). En este sentido, se debe ser particularmente cauto con la administración de amiodarona ya que se ha demostrado un aumento del riesgo de arritmias (EASL., 2018).

Sofosbuvir/Ledipasvir (SOF/LDV): ledipasvir es un inhibidor de la proteína NS5A y se administra junto con sofosbuvir en una forma farmacéutica (400mg/90mg) una vez al día por vía oral. La función hepática no altera los niveles de ledipasvir en plasma (EASL., 2018) y la insuficiencia renal leve o moderada no precisa tampoco ajuste de dosis. No obstante, no se ha establecido con claridad la necesidad de ajuste de dosis en insuficiencia renal grave (EASL., 2018). Este tratamiento está indicado para los genotipos 1, 4, 5 y 6 y en algunos casos en genotipo 3. Ledipasvir también utiliza el transportador P-gp, por lo que todos aquellos fármacos que pueden disminuir la concentración plasmática de sofosbuvir también lo harán con ledipasvir (EASL., 2018). Por otro lado, LDV puede además disminuir su solubilidad y por tanto su concentración plasmática en medios con pH más alcalino. En este sentido, existen estudios que demuestran una menor tasa de RVS en pacientes que han recibido dosis elevadas de inhibidores de la bomba de protones (IBP) (Terrault, 2016). Para los subtipos 1a y 1b la tasa de RVS en datos de vida real en España se encuentra entre el 95,8-97% (Calleja, 2017). La combinación de estos medicamentos se puede indicar tanto en pacientes sin cirrosis como en pacientes cirróticos compensados y descompensados en duraciones que van desde las 8 a las 24 semanas (Calleja, 2018).

Sofosbuvir/velpatasvir (SOF/VEL): velpatasvir es un inhibidor de NS5A de segunda generación. La dosis recomendada es la administración de un comprimido al día que contiene 400mg de sofosbuvir y 100mg de velpatasvir (EASL., 2018). La excreción biliar es la vía fundamental de eliminación de velpatasvir y la función hepática no influye en la concentración plasmática del fármaco. En los pacientes con insuficiencia renal grave puede aumentar la concentración plasmática sin que se observen alteraciones clínicas reseñables (EASL., 2018). Las precauciones para el uso de otros medicamentos de forma concomitante son similares a las de la combinación sofosbuvir/ledipasvir e incluyen el uso de inhibidores de la bomba de protones (IBPs). Para los subtipos 1a y 1b en el estudio ASTRAL 1 se obtuvieron tasas de RVS del 98% y del 99% respectivamente (Feld, 2015). Por otro lado, sofosbuvir/velpatasvir es una de las combinaciones

de fármacos más efectiva para el genotipo 2, con una tasa de RVS del 99% en el estudio ASTRAL-2. Para el genotipo 3, el más difícil de tratar, el estudio ASTRAL 3 demostró una tasa de RVS en pacientes no cirróticos del 98% y del 91% en cirróticos sin la utilización de RBV (Foster, 2015). La duración del tratamiento para todos los genotipos y en pacientes con o sin cirrosis es de 12 semanas (Calleja, 2018).

Sofosbuvir/velpatasvir/voxilaprevir (SOF/VEL/VOX): voxilaprevir es un inhibidor pangenotípico de la proteasa NS3/NS4A. La combinación de los tres fármacos se comercializa en un solo comprimido que contiene 400 mg de sofosbuvir, 100 mg de velpatasvir y 100 mg de voxilaprevir y se administra una vez al día con alimentos (EASL., 2018). La excreción biliar es la principal vía de eliminación de VOX (EASL., 2018). Se ha demostrado una mayor concentración plasmática en pacientes cirróticos en comparación con aquellos sin cirrosis. Además, la concentración aumenta entre 3 y 5 veces en los pacientes cirróticos con deterioro moderado-grave de la función hepática y su uso no se recomienda en este contexto clínico (EASL., 2018). Esta limitación es común a todos los inhibidores de la proteasa (tanto de primera como de segunda generación), como ha puesto de manifiesto una alerta reciente de la FDA. También se produce un aumento de la concentración plasmática en pacientes con deterioro grave de la función renal, aunque sin ser clínicamente relevante (EASL., 2018). En el estudio POLARIS-2 se evaluó la tasa de RVS en pacientes no tratados previamente, con genotipos 1, 2, 4, 5 y 6, con y sin cirrosis, obteniendo tasas de RVS 12 del 95% (Ira, 2017). En el estudio POLARIS-3 se incluyeron pacientes no tratados previamente con genotipo 3 y se administró sofosbuvir, velpatasvir y voxilaprevir durante 8 semanas con una tasa de RVS 12 del 96% (Ira, 2017). Esta nueva combinación de fármacos reduce a 8 semanas el tratamiento en la mayoría de los pacientes con hepatitis C no tratados previamente con excelentes tasas de RVS. En nuestro país esta combinación está autorizada únicamente para pacientes con fracaso a un tratamiento previo con AADs. El registro se basa en los resultados de los estudios POLARIS-1 y POLARIS-4 en los que se incluyeron pacientes tratados previamente con AADs con regímenes que incluían o no inhibidores de NS5A. Las tasas de RVS después de la administración de esta combinación durante 12 semanas fueron del 96% y del 98% respectivamente (Bourliere, 2017).

Ritonavir-paritaprevir/ombitasvir/dasabuvir: paritaprevir (PTV) es un inhibidor de la proteasa NS3/NS4A que se administra con dosis bajas de ritonavir (RTV). PTV se metaboliza por la vía del citocromo CYP3A4 y RTV tiene cierta inhibición sobre este citocromo (EASL., 2018). Ombitasvir (OBV) es un inhibidor de NS5A, mientras que dasabuvir (DAS) es un inhibidor débil, no nucleósido, de la polimerasa NS5B. Estos fármacos se administran en dos comprimidos por separado: uno contiene ritonavir (50 mg)/paritaprevir (75 mg) y ombitasvir (12.5 mg), y el otro

dasabuvir (250 mg). El primero se administra en dos comprimidos tomados una vez al día con alimentos, mientras que DAS se administra cada 12 horas. Esta combinación se utiliza para el tratamiento de los pacientes con genotipos 1 y 4. Paritaprevir y ombitasvir se eliminan por las heces al igual que dasabuvir. La administración de los tres antivirales es segura en pacientes con una función hepática preservada, pero no así en pacientes con deterioro moderado-grave (EASL., 2018). Por otro lado, se puede prescribir en pacientes con insuficiencia renal, independientemente de la gravedad del fallo renal (EASL., 2018). Como se ha comentado previamente, ritonavir es un inhibidor muy potente del CYP3A4 por lo que presenta numerosas interacciones con otros fármacos que se metabolizan por esta vía (EASL., 2018). Como ya se ha mencionado, es una combinación de fármacos eficaz frente a los genotipos 1 y 4, pero la aparición de nuevos AAD más potentes y pangénóticos ha supuesto que ya no se utilice ni se incluya en la guías de utilización de AADs (Calleja, 2018).

Grazoprevir/elbasvir: grazoprevir es un inhibidor de la proteasa NS3/NS4A y elbasvir es un inhibidor de NS5A. Ambos se administran en un solo comprimido al día que contiene ambos fármacos (100 mg de grazoprevir y 50 mg de elbasvir) (EASL., 2018). Al igual que la anterior combinación se desaconseja su uso en pacientes cirróticos con deterioro moderado/grave de la función hepática, pero no en pacientes con insuficiencia renal grave (EASL., 2018). Grazoprevir/elbasvir está indicado para el tratamiento de los pacientes con subtipos 1a y 1b que han recibido o no tratamiento previo con IFN, con tasas de RVS del 99% y 97% respectivamente (EASL., 2018; Zeuzem, 2018). No obstante, en el subtipo 1a solo se recomienda su uso en pacientes con cifras de ARN-VHC inferiores a 800.000 UI/ml (Desnoye, 2016; EASL., 2018). En genotipo 4 consigue tasas de RVS del 96% en pacientes no tratados previamente, pero su eficacia es menor en los que sí habían recibido tratamiento, por lo que no está recomendado en este último grupo (Kwo, 2017; Calleja et al., 2018). La duración del tratamiento es de 12 semanas.

Glecaprevir/pibrentasvir (G/P): glecaprevir es un inhibidor de NS3/NS4A y pibrentasvir es un inhibidor de NS5A, ambos de segunda generación. Se administran en combinación en un comprimido que contiene 100 mg de glecaprevir y 40 mg de pibrentasvir. La posología es de 3 comprimidos tomados una vez al día con alimentos. Como el resto de las combinaciones que contienen IPs, no se recomienda su uso en pacientes cirróticos con deterioro moderado/grave de la función hepática, pero se puede administrar en insuficiencia renal (EASL., 2018). La solubilidad de glecaprevir disminuye en pH alcalino y puede disminuir hasta un 64% cuando se administra junto con omeprazol 40 mg (EASL., 2018). G/P es una combinación pangénótica y se puede utilizar tanto en pacientes tratados previamente con IFN como en no tratados. Las pautas varían de 8 a 16 semanas (Calleja et al., 2018). En subtipos 1a y 1b las tasas de RVS fueron

del 98% y 100% respectivamente en pacientes no cirróticos en los estudios de registro (Zeuzem, Foster, 2018). En pacientes cirróticos compensados las tasas de RVS en estos genotipos fueron del 98% y 100% respectivamente (Forns, 2017). También se han demostrado tasas de RVS en genotipo 2 y 3 del 98% y 95% respectivamente en pacientes no cirróticos con pautas de tratamiento de 8 semanas (Saxena, 2016; Foster, 2017).

Pacientes no cirróticos					
Pacientes	Experiencia tratamiento previo	SOF/VEL	GLE/PIB	LDV/SOF	EBR/GZR
Gen 1a	naives	12 sem	8 sem	8-12 sem *	12 sem (RNA-VHC < 800.000 IU/ml)
	Experimentados a IFN	12 sem	8 sem	No	12 sem (RNA-VHC < 800.000 IU/ml)
Gen 1b	naives	12 sem	8 sem	8-12 sem *	12 sem
	Experimentados a IFN	12 sem	8 sem	12 sem	12 sem
Gen 2	naives	12 sem	8 sem	No	No
	Experimentados a IFN	12 sem	8 sem	No	No
Gen 3	naives	12 sem	8-12 sem **	No	No
	Experimentados a IFN	12 sem	8-12 sem **	No	No
Gen 4	naives	12 sem	8 sem	12 sem	12 sem
	Experimentados a IFN	12 sem	8 sem	12 sem	No
Gen 5	naives	12 sem	8 sem	12 sem	No
	experimentados a IFN	12 sem	8 sem	12 sem	No
Gen 6	naives	12 sem	8 sem	12 sem	No
	Experimentados a IFN	12 sem	8 sem	12 sem	No

Pacientes con cirrosis compensada					
Pacientes	Experiencia tratamiento previo	SOF/VEL	GLE/PIB	LDV/SOF	EBR/RZR
Gen 1a	naives	12 sem	12 sem	12 sem	12 sem (RNA-VHC < 800.000 IU/ml)
	Experimentados a IFN	12 sem	12 sem	No	12 sem (RNA-VHC < 800.000 IU/ml)
Gen 1b	naives	12 sem	12 sem	12 sem	12w
	experimentados a IFN	12 sem	12 sem	12 sem	12w
Gen 2	naives	12 sem	12 sem	No	No
	Experimentados a IFN	12 sem	12 sem	No	No
Gen 3	naives	12 sem	12 sem	No	No
	Experimentados a IFN	12 sem	16 sem	No	No
Gen 4	naives	12 sem	12 sem	12 sem	12 sem
	Experimentados a IFN	12 sem	12 sem	12 sem	No
Gen 5	naives	12 sem	12 sem	12 sem	No
	Experimentados a IFN	12 sem	12 sem	12 sem	No
Gen 6	naives	12 sem	12 sem	12 sem	No
	Experimentados a IFN	12 sem	12 sem	12 sem	No

Tabla 1. Pautas de tratamiento con los diferentes AADs de última generación en base al genotipo viral infectante, la experiencia previa de tratamientos basados en IFN, y el grado de daño hepático.

1.5.2.- Tratamiento de poblaciones especiales.

Como ya se ha mencionado, la mayoría de pacientes infectados por el VHC pueden ser tratados con algunas de las combinaciones de AADs descritas previamente, con tasas de RVS próximas al 100%. No obstante, existen algunos supuestos en los que tendremos que tener especial precaución a la hora de elegir correctamente la pauta de tratamiento: no todos los AADs presentan el mismo metabolismo hepático o renal, y ello supone que en situaciones de insuficiencia hepática o renal grave se debe elegir la combinación más adecuada.

Insuficiencia renal grave: En los pacientes con un aclaramiento de creatinina menor de 30/ml/min/1.73m² se recomienda el uso de elbasvir/grazoprevir para los genotipos 1 y 4, y glecaprevir/pibrentasvir para todos los genotipos (Calleja, 2018). Se deben de evitar por tanto regímenes de tratamientos basados en sofosbuvir, porque este fármaco se elimina por vía renal (Saxena , 2016). En pacientes con aclaramientos de creatinina y/o filtrado glomerular por encima de esa cifra no será necesario restringir fármacos (Calleja, 2018).

Cirrosis descompensada: en estos pacientes los regímenes terapéuticos se basan en la utilización de sofosbuvir con un inhibidor de NS5A y se debe evitar el uso de inhibidores de la proteasa. Se pueden utilizar por tanto sofosbuvir/ledipasvir y sofosbuvir/velpatasvir. Se recomienda no obstante la combinación con velpatasvir durante 12 semanas asociado a ribavirina porque presenta tasas de RVS mayores que los de la combinación sofosbuvir/ledipasvir. Si no es posible la asociación con ribavirina se deberá prolongar el tratamiento hasta las 24 semanas (Calleja, 2018).

Trasplante hepático: Las pautas de tratamiento recomendadas incluyen sofosbuvir/velpatasvir, sofosbuvir/ledipasvir y/o glecaprevir/pibrentasvir. Se recomienda administrar los tratamientos durante 12 semanas y se deben monitorizar los niveles de los fármacos inmunosupresores en los tratamientos basados en G/P (Calleja et al., 2018).

1.5.3.- Fracaso al tratamiento y resistencias a los AAD.

Aunque con los tratamientos actuales se consiguen tasas de curación cercanas al 100%, queda un pequeño porcentaje de pacientes que presenta recaída tras suspender el tratamiento. Estos pacientes, aunque pocos, suponen un reto terapéutico y ya las guías incluyen terapias de rescate para ellos.

El VHC presenta una alta tasa de replicación y ello, unido a la escasa capacidad de corrección de errores por la ARN polimerasa en la codificación de nuevos viriones, lleva a la generación de un elevado número de variantes del VHC (Bartenschlager, 2000). La mayoría de estas variantes del VHC se encuentran de forma minoritaria en el huésped, pues o bien no consiguen replicarse de forma óptima o son eliminadas (Gregori, 2013). Esto supone que un mismo paciente tenga una población muy diversa de cuasiespecies del virus, si bien siempre va a predominar una variante mayoritaria (secuencia máster) y el resto son minoritarias (Ahmed, 2015).

La presencia de esta diversidad de cuasiespecies hace que el VHC se pueda “adaptar” al huésped, pudiendo predominar en cada momento la variante que se adapte mejor al entorno (Ahmed, 2015). Este fenómeno favorece que cuando se administra un tratamiento se elimine una variedad de cuasiespecie, pero se favorezca el crecimiento de las resistentes (Kieffer, 2010).

Una de las hipótesis que se postulan para explicar la resistencia de estas variantes es la presencia de sustituciones de aminoácidos que pueden provocar cambios conformacionales en los lugares de unión de los fármacos, impidiendo su acción (Halfon, 2011). Estas cuasiespecies que presentan resistencia a los antivirales son diferentes en función del genotipo. A continuación se analizarán las mutaciones más frecuentes en función del fármaco empleado como antiviral.

1.5.3.1.- Inhibidores de la proteasa NS3/NS4A.

Los primeros fármacos aprobados de esta clase fueron, como se ha mencionado previamente, boceprevir y telaprevir. En distintos estudios se comprobó la presencia de variantes asociadas a resistencia en un 8.6% de pacientes no tratados con genotipo 1a y en un 1.4% de pacientes con genotipo 1b (Kuntzen, 2008). Algunas de las variantes que se identificaron con resistencias a telaprevir fueron: T54A/S, V36A/M, R155K/T y A156S/T (Kieffer et al, 2012).

La segunda generación de fármacos de esta clase incluye el simeprevir, paritaprevir y asunaprevir. Dentro de las mutaciones más frecuentes que se pueden encontrar de forma natural en el genotipo 1 y que confieren resistencia a estos tratamientos es la Q80K (Sarrazin, 2016). Dentro del genotipo 1 esta mutación se encuentra casi en exclusiva en el genotipo 1a con importante variación geográfica: la mutación Q80K está presente hasta en un 48% de pacientes infectados con el genotipo 1a en Norte América y un 19% de pacientes en Europa (Sarrazin, 2015; Sarrazin, 2016).

En algunos estudios se ha demostrado una pérdida de susceptibilidad a la acción del simeprevir en relación con la mutación Q80K de hasta 10 veces inferior (Bae, 2010). Aunque

mayoritariamente esta mutación se encuentra en el genotipo 1, también se ha descrito en el genotipo 5 (Sarrazin, 2016).

Otras variantes asociadas a la resistencia a simprevir en genotipo 2 y 3 son la S122R y D168Q respectivamente, sin embargo en los genotipos 4 y 6 no se han detectado variantes asociadas a resistencias relevantes (Vallet, 2011; Lenz, 2013; Sarrazin, 2016).

Todos los inhibidores de la proteasa NS3 se unen al sitio activo, pero presentan diferentes tipos de afinidad en función del genotipo, del subtipo y de las variantes asociadas a resistencias. Este hecho puede explicar la diferente eficacia que presentan estos fármacos (mayor en genotipo 1 y menor en genotipo 3). Por otro lado, la mayoría de los inhibidores de la proteasa presentan una barrera genética baja y ello es una característica de clase, que se relaciona con la aparición temprana de variantes asociadas a resistencia que pueden hacer fracasar el tratamiento (Sarrazin, 2016).

1.5.3.2.- Inhibidores de NS5A

Las resistencias descritas para estos fármacos aparecen entre un 0.3%-2.8%. No obstante, se han descrito algunas variantes más frecuentes como la L31M y la Y93H, con unas prevalencias de 2,1-6,3% y de 3.8-14.1% respectivamente en genotipo 1b. En algunos estudios en los que se ha utilizado secuenciación masiva se han observado variantes asociadas a resistencia con una frecuencia de aproximadamente el 16% (Sarrazin, 2014; Sarrazin, 2016). La mayoría de las variantes asociadas a resistencia se han descrito para el genotipo 1. Además al contrario que en las mutaciones de NS3/proteasa, las variantes resistentes de los inhibidores de NS5A permanecen más tiempo detectables (Sarrazin, 2016).

Otra particularidad que demuestra la región NS5A diferente de la NS3 es que presenta una zona de unión a los inhibidores más conservada, lo que confiere una actividad mayor frente a distintos genotipos (Bartenschlager, 2013). Aunque la mayoría de estudios se han realizado en genotipo 1, en el caso de ledipasvir se necesita una concentración muy elevada de fármaco “in vitro” para la inhibición de la replicación de los genotipos 2 y 3 (Sarrazin, 2016).

Los inhibidores de NS5A de primera generación presentan una barrera de resistencia baja en monoterapia, seleccionando rápidamente variantes asociadas a resistencia. Los inhibidores de NS5A de segunda generación como velpatasvir, pibrentasvir y elbasvir tienen una barrera genética más elevada (Yeh, 2013; Sarrazin, 2016)

1.5.3.3. Inhibidores de NS5B.

Dentro de los inhibidores de la polimerasa NS5B tenemos que distinguir los no-nucleósidos como el dasabuvir y los análogos de nucleótidos como el sofosbuvir. Por definición, los primeros tienen una barrera genética baja, mientras que los nucleótidos tienen un umbral de aparición de resistencias mucho mayor.

Dentro del primer grupo se observan algunas variantes asociadas a resistencia que pueden ocurrir hasta en un 35% como la mutación C316N en genotipo 1b. Como en anteriores fármacos, se dispone de datos sobre todo de genotipo 1; no obstante, en genotipos del 2 al 5 la variante S556G tiene una prevalencia de entre un 97-100%. No se conoce de forma exacta la duración que pueden presentar estas variantes resistentes, pero hay algunos datos que indican que pueden presentarse durante un periodo largo de tiempo (Sarrazin, 2016).

Dasabuvir presenta en algunos estudios actividad antiviral reducida cuando se administra en monoterapia (Gaultier, 2011). Además, hay algunas evidencias que indican que dasabuvir es inactivo frente a la polimerasa de los genotipos 2,3 y 4 (Kati, 2015).

Entre los análogos de los nucleótidos el sofosbuvir es el fármaco principal y del que se dispone de más información. Dentro las variantes asociadas a resistencia, S282T es la más conocida para este fármaco. Aunque muchos estudios demuestran la resistencia *in vitro*, en estudios de vida real se ha visto que la implicación de esta variante en fracasos a tratamiento no ha sido tan relevante (Gane, 2013). Otras variantes que también se han asociado a resistencia son L159F y V321A (Gontcharova, 2014). *In vitro* también se ha descrito la mutación L320F, aunque la relevancia es mayor cuando se encuentran L159F y L320F juntas en la misma variante (Svarovskaia, 2016). La mutación C316 se encuentra muy cerca de la triada catalítica de NS5B polimerasa y dificulta la unión de sofosbuvir (Donaldson, 2015).

En pacientes con fallo al tratamiento con sofosbuvir en los que se detecta la variante S282T, la persistencia de estas variantes de forma dominante en el huésped es solo de semanas, y posteriormente vuelven a presentar las variantes nativas previas (Hedskog, 2015). El sitio de unión de sofosbuvir a la NS5B polimerasa se encuentra muy conservado en todos los genotipos y de ahí su potente acción pangnotípica (Gane, 2013; Sarrazin, 2016).

1.5.3.4. Sistemas de identificación de mutaciones de resistencia.

Como se ha expuesto previamente, la aparición de variantes asociadas a resistencia es muy variable en función de la diana antiviral que utilicemos y la barrera de resistencia del fármaco antiviral. Por otro lado, los hallazgos *in vitro* no se corresponden posteriormente con los datos

que se obtienen en vida real en algunos casos. Dadas estas múltiples variables, cuando un paciente presenta un fracaso al tratamiento debemos analizar qué tipo de fármacos hemos utilizado, para o bien utilizar otras dianas virales, o bien utilizar fármacos con una barrera de resistencia mayor. También es conveniente saber si el paciente ha cumplido correctamente con la toma de los fármacos y si han podido existir interacciones con otros medicamentos que hicieran perder efectividad a los antivirales.

Los estudios de resistencias previos al inicio del tratamiento no están indicados ni son coste-efectivos, desde el momento en que la mayoría de los pacientes (más del 95%) van a alcanzar RVS. En los pacientes que presentan fracaso al tratamiento (en los que se da por hecho la existencia de resistencias) existen alternativas eficaces como la mencionada combinación SOF/VEL/VOX (95% de RVS en este grupo), pero en determinados casos puede ser interesante determinar esas variantes.

La identificación, en consecuencia, de variantes de resistencia al tratamiento con AADs es un factor a considerar en la monitorización de la respuesta antiviral en los pacientes con fracaso virológico (Halfon, 2012). Sin embargo, y desde un punto de vista técnico, no es un problema sencillo de abordar. Dado que no se dispone de sistemas comerciales de identificación de mutantes de resistencia al VHC similares a los disponibles para el caso del VHB o del VIH, estos estudios se realizan con técnicas de secuenciación masiva, que son costosas y requieren bastante tiempo para su realización. Por otro lado, y especialmente importante, está la dificultad de interpretación de los datos generados (Capobianchi, 2013; Chen, 2019). El nivel de profundización del análisis depende del experimentador, permitiendo el análisis de entre cientos a miles de secuencias de una misma muestra. El procesamiento de la información obtenida es muy complejo y requiere en la mayoría de los casos la intervención de personal especializado en análisis bioestadístico y bioinformático. Por otro lado, la significación clínica de los resultados no es siempre fácil de trasladar; así, diversos estudios de pirosecuenciación han confirmado la presencia de mutaciones de resistencia al tratamiento con IPs en un alto porcentaje de muestras basales de pacientes *naïve*. Estos resultados se deben a que prácticamente todas las variantes puntuales de cada posición del genoma existirían en la cuasiespecie antes del inicio de cualquier tratamiento.

Por los motivos anteriormente descritos, es interesante la utilización de técnicas con niveles de sensibilidad intermedios entre las técnicas de análisis poblacional de productos amplificados (detección de variantes con una riqueza de aproximadamente el 25% del total) y las técnicas de secuenciación masiva. Entre las estrategias más interesantes cabe destacar la técnica de Cold-

PCR, recientemente desarrollada, que permite incrementar la sensibilidad de detección de especies minoritarias de ácidos nucleicos entre 100-1000 veces con respecto a las técnicas de amplificación estándar (Li, 2008). En estas condiciones se consigue la detección de secuencias en una riqueza relativa de entre el 1- 0,01%. La técnica de Cold-PCR ha sido ensayada con éxito para la identificación de secuencias de células tumorales y para la identificación de secuencias virales (Li, 2008). Se basa en la realización de una reacción de PCR utilizando temperaturas de desnaturalización bajas. En una mezcla de ácido nucleicos, una cadena de ADN minoritaria hibridará con más probabilidad con una cadena de la especie mayoritaria que con su complementaria perfecta. Se forman así *heteroduplex* con una temperatura de desnaturalización (T_m) inferior a los homoduplex, que permite realizar la desnaturalización a baja temperatura. Durante la repetición del proceso se consigue un enriquecimiento progresivo de las cepas minoritarias de la población y un empobrecimiento de las cepas mayoritarias (Figura 5). El análisis de los productos amplificados puede hacerse mediante secuenciación poblacional o mediante análisis de las curvas de desnaturalización de los productos generados, que permiten un análisis muy rápido y económico de la complejidad del producto amplificado.

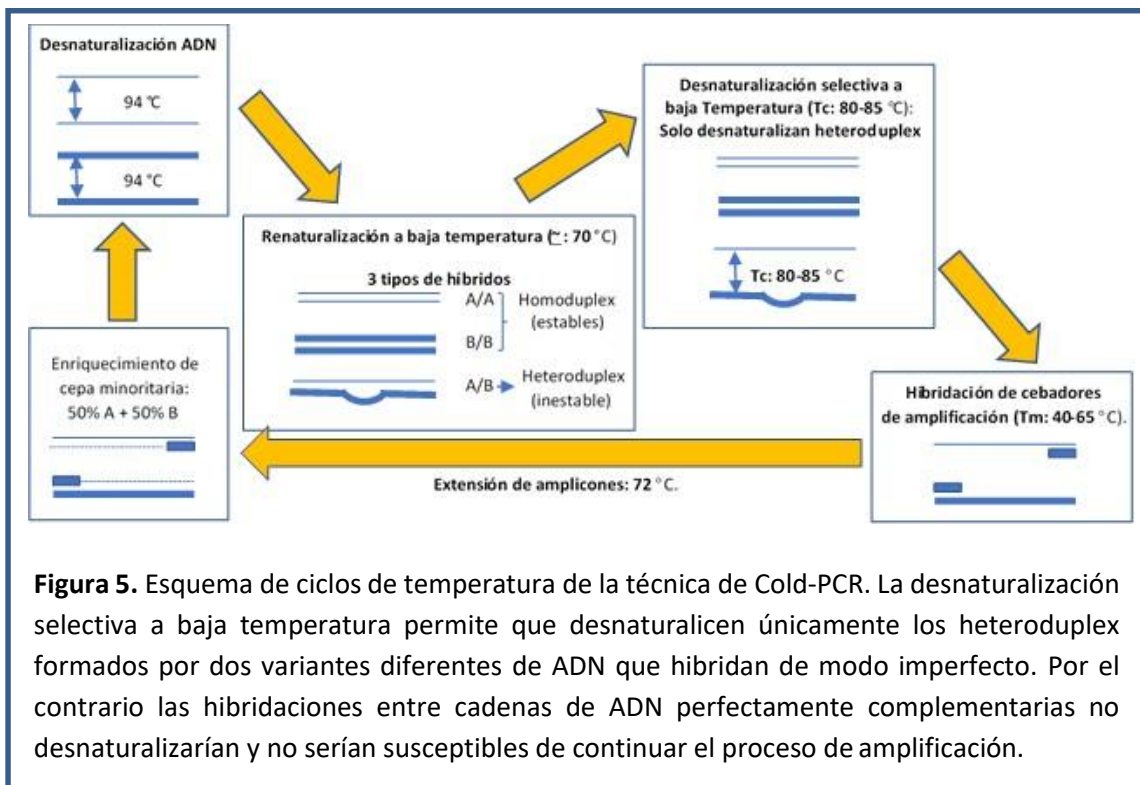


Figura 5. Esquema de ciclos de temperatura de la técnica de Cold-PCR. La desnaturalización selectiva a baja temperatura permite que desnaturalicen únicamente los heteroduplex formados por dos variantes diferentes de ADN que hibridan de modo imperfecto. Por el contrario las hibridaciones entre cadenas de ADN perfectamente complementarias no desnaturalizarían y no serían susceptibles de continuar el proceso de amplificación.

1.5.4.- Reservorios potenciales de infección.

El concepto de curación de la infección en los pacientes tratados es de gran importancia clínica porque garantiza la erradicación de la infección del organismo infectado y la imposibilidad de

reactivación incluso en las condiciones más desfavorables como las situaciones de inmunosupresión (Lin, 2008). Por este motivo, cada vez más trabajos analizan la correlación entre RVS y erradicación (Seef, 2013). Los datos históricos de seguimiento de los pacientes respondedores al tratamiento con PEG/RBV apoyan la idea de la erradicación. En este sentido, una revisión exhaustiva de 4288 pacientes respondedores, procedentes de 44 estudios clínicos, demostró que el 97% de los pacientes mantenían la respuesta virológica durante periodos de seguimiento que oscilaban entre 1-10 años, al tiempo que se verificaba una mejoría de la enfermedad hepática, disminuyendo asimismo la incidencia de hepatocarcinoma y de mortalidad asociada a cirrosis y hepatopatía terminal. Si bien estos resultados confirman la curación en la mayoría de los pacientes tratados, un pequeño porcentaje (3%) sufrió reaparición de la infección por VHC (Welker, 2005). Aunque no se puede descartar que la reinfección *de novo* en pacientes que mantienen prácticas de riesgo esté en la base de algunas de estas reapariciones (Aitken, 20087), el análisis comparativo de secuencias virales entre las muestras basales y las de la recaída, confirma que en la mayoría de los casos se trata de procesos reales de reactivación de la infección. Estos resultados confirmarían la posible existencia de reservorios de infección del VHC en un pequeño porcentaje de pacientes respondedores al tratamiento con IFN, bien a nivel hepático (Radkowski, 2005), bien a nivel extrahepático. La posibilidad de la existencia de reservorios extrahepáticos es especialmente importante, porque la consecución de RVS y la mejoría de los marcadores clínicos hepáticos únicamente aportan información acerca de la presencia del virus a nivel hepático, pero no a nivel de otros tejidos, por lo que su incidencia podría estar subestimada. Con los AADs las cosas pueden ser diferentes, porque la rápida y potente supresión de la replicación viral podría permitir también la eliminación de los reservorios extrahepáticos.

Uno de los tipos celulares potencialmente candidato a actuar como reservorio de la infección por el VHC son los linfocitos, en base a evidencias clínicas indirectas y a datos de identificación de secuencias de VHC en células linfoides. En cualquier caso, el posible linfotropismo del VHC es un aspecto muy controvertido y no ha sido esclarecido. Una de las evidencias clínicas indirectas a su favor es la relación causal entre la hepatitis crónica C y el desarrollo de trastornos linfoproliferativos, como el linfoma no Hodgkin de células B (Zuckerman, 1997). Entre los mecanismos patogénicos de desarrollo de B-NHL se han propuesto mecanismos directos relacionados con la infección del VHC de linfocitos-B, como la sobre-expresión de Bcl-2, y la inhibición de la apoptosis inducida por p53 y c-myc. Apoyando la idea del linfotropismo del VHC, el genoma viral se ha identificado en monocitos/macrófagos, linfocitos B (Bare, 2005) y en células dendríticas (Goutagny, 2003) de pacientes con hepatitis crónica C sin evidencias de

trastornos linfoproliferativos. Sin embargo, muchos autores sostienen que la identificación de secuencias virales en diferentes tipos celulares no implican necesariamente un papel en el proceso de reinfección después de la respuesta (Veerapu, 2011), e incluso en algunos casos se sugiere que las partículas virales identificadas no reflejan una infección real, sino una mera adsorción de partículas virales circulantes a la superficie de las células B (Fujiwara, 2013), poniendo así en duda el posible linfotropismo del virus. Apoyando la idea de replicación efectiva del VHC a nivel linfocitario, el análisis de secuencias en hígado y CMSPs ha confirmado la presencia de poblaciones diferenciales de virus entre ambos compartimentos, sugiriendo así la replicación y evolución independiente del virus en ambos compartimentos (Maggi, 1999).

1.5.5.- Antivirales de acción directa y hepatocarcinoma.

La aparición de los AADs ha supuesto una revolución en el abordaje de la infección por VHC. La curación de la infección interrumpe la progresión de la lesión hepática, reduce la incidencia de descompensaciones y la morbimortalidad por enfermedad hepática, y disminuye los requerimientos de trasplante. Sin embargo, en los últimos años algunos autores han llamado la atención sobre el riesgo de un incremento de la incidencia de hepatocarcinoma en los pacientes tratados con AADs, especialmente en el caso de las recurrencias tumorales.

El grupo español encabezado por *María Reig, et al.* realizó un estudio para comprobar la recurrencia de CHC en 58 pacientes tratados con AADs. Después de un tiempo de seguimiento de 5,7 meses se observó un 27,6% (n=16) de recurrencia radiológica en estos pacientes (Reig, 2016). Para intentar explicar este fenómeno se ha sugerido la pérdida de la regulación inmune, puesto que los pacientes infectados por el VHC presentan un estado proinflamatorio y al ser tratados con AADs se produce una rápida negativización de la viremia C con una resolución abrupta de la respuesta inmune, lo que puede favorecer un crecimiento de lesiones tumorales. En contraste, este hecho no se produciría en pacientes tratados con pautas de IFN, en los que la supresión de la viremia es progresiva y además el IFN presenta un efecto estimulante sobre el sistema inmune del paciente (Reig, 2016). Por otra parte, se ha sugerido un papel del microARN 122, que presenta una regulación negativa con los AADs y sería responsable de la regulación negativa de la angiogénesis, tumorigénesis y metástasis intrahepáticas (Tsai, 2009; Waring, 2016).

Muchos de estos estudios, como el mencionado previamente, hablan sobre todo del riesgo de recurrencia de los pacientes que ya habían sido diagnosticados de CHC, pero también es interesante conocer la incidencia de hepatocarcinoma *de novo* en pacientes tratados con AADs.

En 2018 *Nahon P, et al* publicaron un estudio en el que se incluyeron 1270 pacientes con cirrosis por VHC y los clasificaron en tres grupos: pacientes tratados con AADs, pacientes tratados con regímenes de IFN con RVS y pacientes sin tratamiento con AADs ni RVS con IFN. A todos ellos se les realizó un programa de detección precoz de CHC con ecografía cada 6 meses. A los tres años de seguimiento el grupo de pacientes tratados con AADs presentó una incidencia de CHC del 5.9%, los de IFN un 3.1% y los no tratados del 12.7%. El estudio concluyó que si bien la incidencia a priori parece mayor en los tratados con AADs, las características de los pacientes de este grupo (mayor edad, peor función hepática y comorbilidades) comparados con los tratados con IFN pueden explicar este hecho (Nahon, 2018).

En otro estudio retrospectivo publicado en 2017 por *Kanwal F, et al* en el que se estudiaron 22500 pacientes tratados con AADs, 19518 presentaron RVS y 2982 no la consiguieron alcanzar. Observaron la presencia de 271 casos de CHC, objetivando que los pacientes con RVS tenían menos riesgo que los no respondedores (0.90 vs 3.45 CHC/100 personas año). Los pacientes con cirrosis presentaban la incidencia más alta. Los autores concluyeron que la terapia con AAD reduce el riesgo de desarrollo de CHC (Kanwal, 2012).

En 2017 *Waziry R. et al.* realizaron un meta-análisis recopilando un total de 41 estudios con una n de 13.875 pacientes. En este estudio se analizaron tanto los casos de hepatocarcinoma recurrentes como los incidentes e incluyeron también a los pacientes tratados con interferón. Cuando se compararon ambos grupos y se ajustaron por tiempo de seguimiento y edad se comprobó que el riesgo de CHC, tanto recurrente como incidente, no era mayor en los tratados con AADs que en los que recibieron IFN (Waziry, 2012).

Las teorías que se han postulado a favor de un mecanismo pro-oncogénico de los AADs incluyen como se ha comentado previamente una desregulación inmune o alteraciones en el microARN 122. Otros estudios sugieren que los AADs pueden producir una alteración en las células natural *killer* (NK) (Seri, 2016), o un aumento del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) incrementando el riesgo de recurrencia de CHC (Zhu, 2011). Respecto a este último punto en 2016 *Villani R, et al* realizaron un estudio en 103 pacientes monitorizando los niveles de VEGF y otras interleucinas durante y después del tratamiento con AADs. Estos autores observaron el aumento de VEGF hasta 4 veces tras cuatro semanas de tratamiento, volviendo a sus niveles basales tras finalizarlo. A su vez observaron una disminución de la interleucina 10 y del factor de necrosis tumoral alfa durante el tratamiento (Villani, 2016), así como desregulación en la actividad aurora quinasa B implicada en citocinesis (Madejon, 2015).

1.5.6.- Calidad de vida percibida relacionada con la infección por VHC.

1.5.6.1.- Concepto de calidad de vida.

La OMS definió el concepto de salud inicialmente como *“estado de bienestar físico, mental y social y no únicamente la ausencia de enfermedad”* (World Health Organization, 1946). No obstante, con el paso del tiempo este concepto ha necesitado ampliarse estableciendo el concepto de calidad de vida. Este se define a su vez por la OMS como *“la percepción individual de nuestra posición en la vida en el contexto de la cultura y los sistemas de valores en los que vivimos y en relación con sus objetivos, expectativas, estándares y preocupaciones”* (World Health Organization, 1996).

Como vemos, este concepto ahonda en la percepción subjetiva del entorno por parte del individuo y de su propia posición dentro de ese entorno. Por lo tanto, la calidad de vida no puede medirse únicamente mediante criterios médicos de salud o enfermedad, dolor o ausencia del mismo. La percepción de la calidad de la vida debe evaluarse en múltiples esferas de la vida y en cómo cada suceso puede afectarlas. La OMS propone la evaluación de las siguientes esferas: física, psicológica, grado de independencia, relaciones sociales y entorno y espiritual. A su vez, cada esfera la subdivide en varias facetas. El intento de realizar una medición de la calidad de vida es importante pues como refiere la OMS *“La evaluación de la calidad de vida puede servir de medida de los resultados en la investigación relativa a los beneficios comparativos de los diferentes métodos terapéuticos”* (World Health Organization, 1996).

Durante los últimos años se han desarrollado numerosos estudios en los que se relaciona la calidad de vida percibida por los sujetos durante distintos procesos patológicos, así como tras la realización del tratamiento o tratamientos que pueden mejorar o empeorar esa percepción. Estas herramientas nos permiten no solo evaluar la percepción de la calidad de vida de los sujetos de forma individual en distintos procesos y situaciones, sino que también podemos evaluar la calidad de vida a nivel poblacional y realizar estudios comparativos entre distintas áreas.

1.5.6.2.- Instrumentos de medida de la calidad de vida

Como hemos visto, la calidad de vida es un concepto muy amplio y con un alto componente subjetivo para el sujeto. Por ello, el desarrollo de instrumentos para poder cuantificar esta percepción es complejo. Generalmente la evaluación se realiza mediante cuestionarios en los que se formulan varias preguntas con distintas respuestas. Estas preguntas se relacionan con distintas dimensiones que miden distintos aspectos de la calidad de vida.

Los instrumentos que miden la calidad de vida persiguen tres propósitos (Badia, 2004):

- Discriminar entre los pacientes que perciben una mejor y una peor calidad de vida.
- Evaluar la variación en la percepción de calidad de vida de un individuo en dos momentos distintos (por ejemplo tras un determinado acto terapéutico)
- Predictivo, pues intenta conocer la futura calidad de vida con datos actuales.

Además, estos instrumentos deben tener las siguientes características para que los datos que se obtienen de ellos sean adecuados para uso en la práctica clínica: A) viabilidad; B) fiabilidad a tres niveles (fiabilidad *test-retest*, intra e interobservador y fiabilidad interna); C) validez a nivel de contenido, constructo y criterio; D) sensibilidad al cambio; y E) significación clínica.

Los instrumentos más ampliamente utilizados son los genéricos, pues se pueden aplicar a la mayoría de individuos, teniendo en cuenta múltiples dimensiones (Badia, 2004:107). Algunos de los más conocidos son: Euro QoL-5D-5F, SF-36, WHOQOL-100 y WHOQOL-BREF (desarrollado por la OMS), Perfil de Salud de Nottingham y Perfil de las Consecuencias de la Enfermedad. Por otra parte, en ciertas patologías o situaciones podemos encontrar cuestionarios específicos, centrados únicamente en algunas dimensiones (Badía, 2004).

1.5.6.3.- Calidad de vida en pacientes con hepatitis C.

Los pacientes con hepatitis C aparte de presentar manifestaciones tanto hepáticas como extrahepáticas pueden presentar una percepción alterada sobre su calidad de vida. La mejoría en la percepción de la calidad de vida debería ser uno de los objetivos a conseguir con la curación de la infección por VHC. Para medir la calidad de vida percibida por estos pacientes puede utilizarse alguno de los instrumentos de medición genéricos antes expuestos.

En el año 2005 Spiegel et al. realizaron una revisión sistemática de los estudios que evaluaban la calidad de vida en pacientes con hepatitis C y observaron que en el cuestionario genérico SF-36 los pacientes que conseguían RVS tras tratamiento obtenían una mejor puntuación y por tanto una mejor percepción en la calidad de vida que los pacientes no respondedores. Los autores concluyeron que la infección crónica por el VHC tiene efectos negativos en los aspectos físicos, sociales y salud mental, y todos ellos mejoran con la RVS (Spiegel, 2005).

Hay que recordar que este estudio se realizó cuando el tratamiento de la enfermedad consistía en terapias basadas en IFN-PEG y ribavirina. Estos fármacos se caracterizaban por su larga duración y la mala tolerancia relacionada con los efectos adversos y ello influía en la calidad de vida percibida.

En el 2018 Huang R. et al. realizaron un estudio observacional en China con 997 pacientes con hepatitis crónica C a los que se les entregó el cuestionario genérico EQ-5D y la escala visual EuroQOL. Tras el análisis de los resultados los investigadores concluyeron que hay una asociación negativa entre la calidad de vida percibida y los síntomas de disconfort y depresión que presentaban los pacientes (Huang, 2018).

En la revisión de la literatura existen múltiples estudios realizados con distintos cuestionarios genéricos y específicos en distintos grupos poblacionales. La mayoría de estos estudios concluyen que la infección crónica por VHC produce un empeoramiento en la percepción de calidad de vida de estos pacientes. Las dimensiones más afectadas son variables en función del tipo de cuestionario utilizado. Hay que indicar que muchos de estos estudios incluyen pacientes con cirrosis hepática establecida y son las complicaciones y descompensaciones de la enfermedad una clara causa de empeoramiento en la percepción de calidad de vida, pero a su vez son pocos los estudios en los que únicamente se incluyen pacientes sin cirrosis hepática.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es evaluar el impacto global del tratamiento de la hepatitis crónica C con antivirales de acción directa de última generación, sobre la respuesta virológica, la evolución clínica y el efecto sobre la percepción de calidad de vida de los pacientes.

Para ello se desarrollaron los siguientes objetivos:

1. Estudio de la efectividad del tratamiento antiviral con AADs de última generación en una cohorte de pacientes con hepatitis crónica C, monoinfectados, atendidos en un hospital universitario de tercer nivel.

Objetivo secundario 1: con el objeto de determinar si la identificación temprana de variantes virales de resistencia tiene un potencial uso clínico, se desarrolló/optimizó una técnica de amplificación fría (Cold-PCR) para la identificación de variantes virales minoritarias portadoras de mutaciones de resistencia a tratamiento.

Objetivo secundario 2: con el objeto de determinar si la consecución de RVS supone la eliminación del VHC en potenciales reservorios extrahepáticos, se analizó la cinética de eliminación y potencial persistencia del VHC en CMSPs en una subpoblación de pacientes tratados con AADs

2. Estudio de la evolución clínica de la enfermedad hepática tras la eliminación del VHC, centrada especialmente en los pacientes con enfermedad hepática avanzada (F4).
3. Análisis de la recurrencia de hepatocarcinoma y/o desarrollo *de novo* de cánceres hepáticos o extrahepáticos tras la curación de la infección por VHC.

Objetivo secundario 3: con el objeto de identificar potenciales marcadores de riesgo de progresión del CHC tras el tratamiento, se analizaron factores moleculares potencialmente implicados en el desarrollo de CHC, como la composición alélica de la actividad AURKB celular.

4. Evaluación de la percepción de mejora de calidad de vida en los pacientes asintomáticos respondedores a terapia antiviral.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- DISEÑO GLOBAL DEL ESTUDIO.

El trabajo ha sido diseñado como un estudio descriptivo, unicéntrico, observacional, prospectivo, longitudinal en el que se analizó la eficacia del tratamiento con AADs de segunda generación y la evolución clínica post-terapia en una cohorte de 423 pacientes monoinfectados con el VHC.

Asimismo, se realizaron dos estudios, uno prospectivo y otro retrospectivo con subpoblaciones de pacientes tomados de la cohorte principal para completar el desarrollo de los objetivos secundarios 2 y 3 (Figura 6):

A.- Estudio longitudinal sobre 28 pacientes de la cohorte principal en el que se analizó la cinética de aclaramiento del ARN-VHC en plasma y CMSPs. Con el objeto de comparar dichas cinéticas con las obtenidas por el tratamiento con otros fármacos, se incluyeron dos subpoblaciones adicionales, diferentes a la de la cohorte principal, de 17 pacientes tratados con un AAD de primera generación (TVR) y un grupo 13 de pacientes tratados con IFN + RBV.

B.- Estudio longitudinal sobre 86 pacientes asintomáticos respondedores a tratamiento, tomados de la cohorte principal, en los que se analizó la percepción de cambios en la calidad de vida en diferentes momentos tras la finalización del tratamiento.

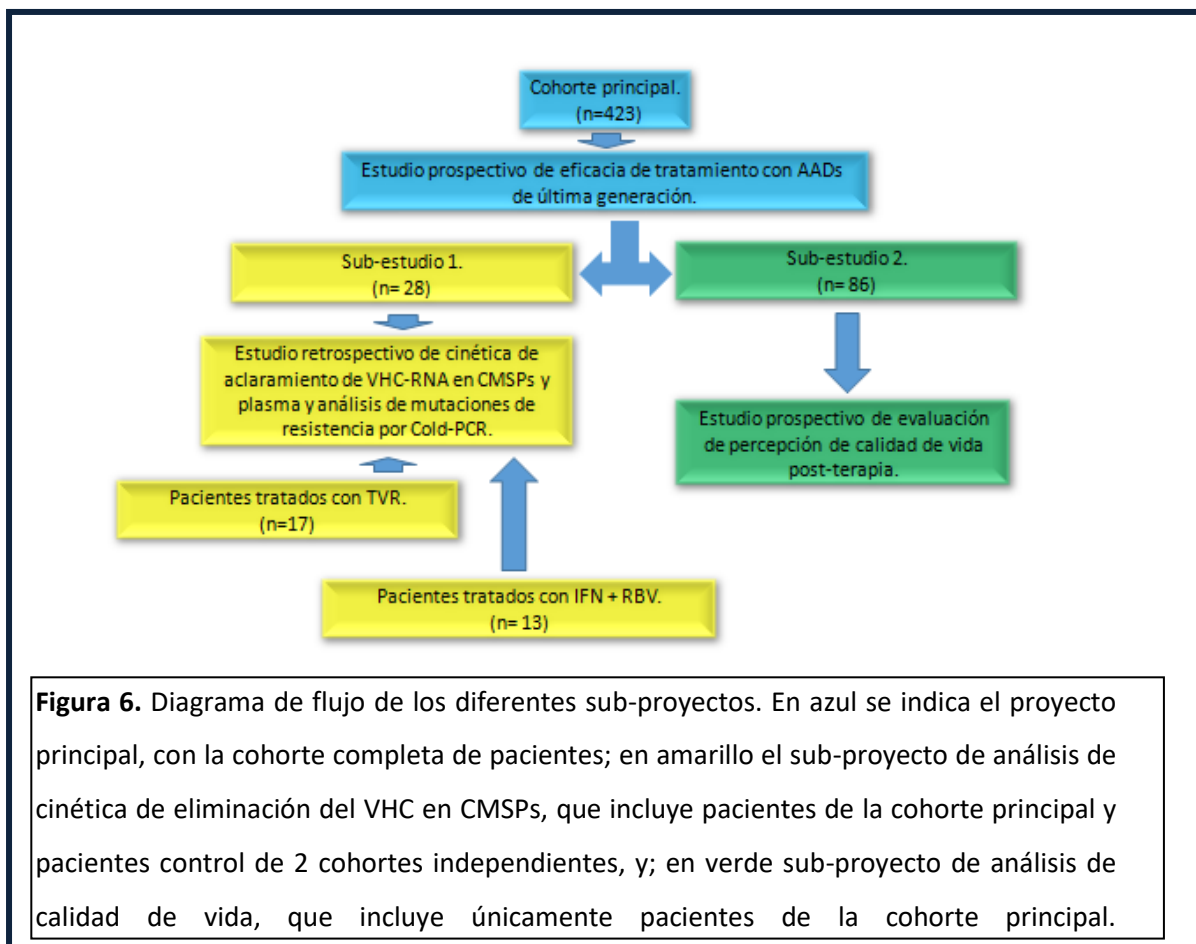


Figura 6. Diagrama de flujo de los diferentes sub-proyectos. En azul se indica el proyecto principal, con la cohorte completa de pacientes; en amarillo el sub-proyecto de análisis de cinética de eliminación del VHC en CMSPs, que incluye pacientes de la cohorte principal y pacientes control de 2 cohortes independientes, y; en verde sub-proyecto de análisis de calidad de vida, que incluye únicamente pacientes de la cohorte principal.

3. 2.- ESTUDIO DE EFICACIA EL TRATAMIENTO CON AADs DE SEGUNDA GENERACIÓN.

Se incluyeron pacientes con hepatitis crónica C atendidos en la Sección de Hepatología del Hospital Universitario La Paz que cumplieran los siguientes criterios:

Criterios de inclusión:

- Ser mayor de edad.
- Pacientes que iniciaran tratamiento antiviral con AADs de segunda generación entre noviembre de 2014 y enero de 2017, cumpliendo los criterios de tratamiento acorde con lo dispuesto por la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid en el momento de inclusión.
- Firma del consentimiento informado por parte de los pacientes

Criterios de exclusión.

- No cumplir alguno de los criterios de inclusión.
- Pacientes con coinfección con VHB o VIH.
- Pacientes que presenten alguna contraindicación para recibir tratamiento.

Se incluyeron finalmente 423 pacientes, seleccionándose tanto pacientes que habían sido tratados previamente con otras terapias (IFN + RBV y/o AADs de primera generación), como pacientes *naïve* al tratamiento antiviral. Al tratarse de un estudio observacional, se utilizaron los criterios de práctica clínica habitual para el manejo de los pacientes, y los datos clínicos y virológicos se recogieron de la historia clínica.

3.2.1. Variables demográficas y epidemiológicas

Las variables sociodemográficas analizadas fueron el sexo de los pacientes, y la edad de los mismos al inicio del tratamiento. Como variables epidemiológicas se tuvo en cuenta el genotipo viral infectante; además en los pacientes F4 se determinó la carga viral. Todos los ensayos epidemiológicos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario La Paz, de acuerdo a los protocolos diagnósticos establecidos.

Genotipo del VHC. El genotipo se determinó en las muestras basales de tratamiento utilizando el sistema REALTIME HCV GENOTYPE II en el sistema m2000 System (Abbott Laboratories, S.A.). Se identificó en todos los casos el genotipo del VHC infectante (genotipos 1-6), y siempre que fue posible se determinó en los pacientes infectados por el genotipo 1 el subtipo infectante (1a ó 1b).

3.2.2.- Variables asociadas a tratamientos antivirales previos al estudio.

En todos los pacientes incluidos en el estudio que presentaban historial previo de tratamiento antiviral se analizó si el tipo de terapia y los patrones de respuesta obtenidos presentaban alguna relación con los índices de respuesta al tratamiento con AADs. Para ello, se recogieron los parámetros concernientes al tipo de tratamiento y patrones de respuesta antiviral.

3.2.2.1.- Tipos de tratamiento.

Las diferentes pautas de tratamiento administradas previamente al inicio de este proyecto se agruparon en dos grandes categorías:

A.- Biterapia: Tratamiento combinado de IFN + RBV.

B.- Triterapia: Tratamiento combinado de IFN + RBV mas un inhibidor de proteasa (IP) de primera generación (TVR).

3.2.2.2. Patrones de respuesta antiviral.

Respuesta nula: Pacientes que no consiguieron disminuir la carga viral por debajo de 2 logaritmos, o por debajo del 99% de la carga viral basal al finalizar el tratamiento.

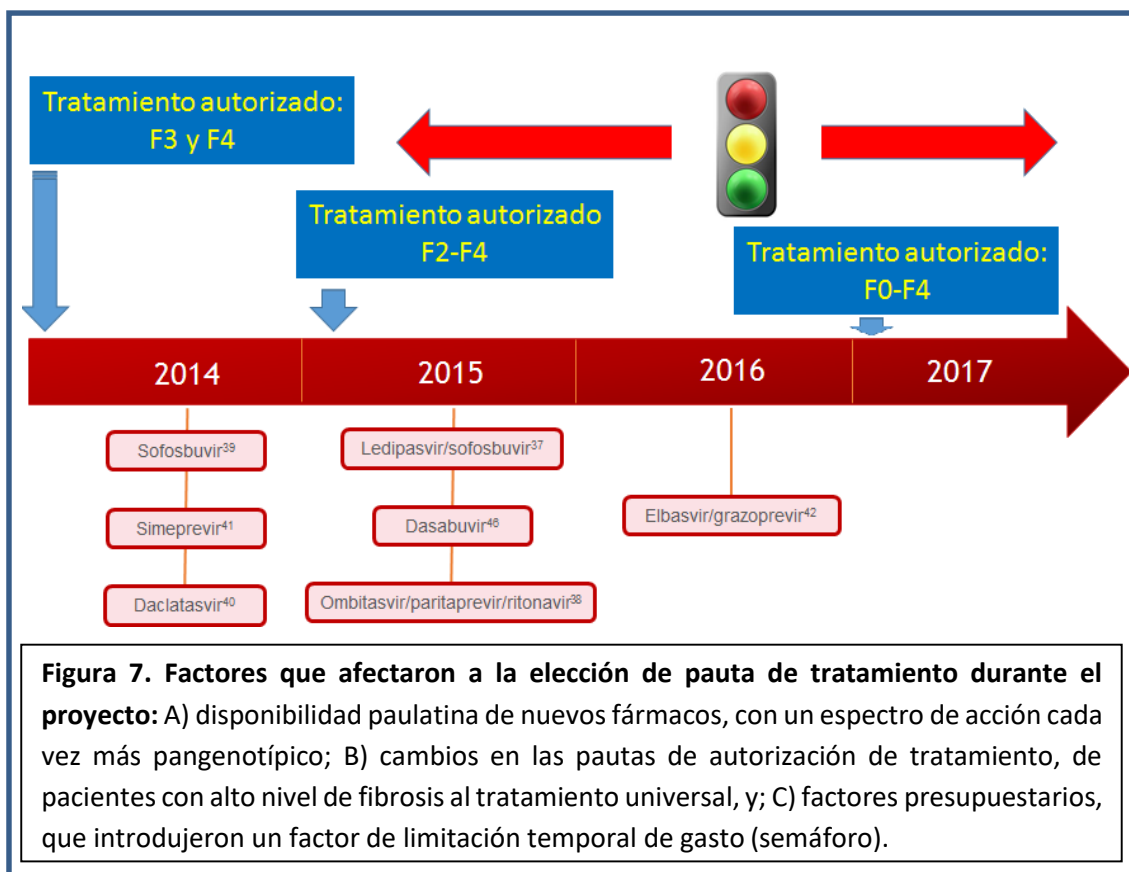
Respuesta parcial: Pacientes que persistieron positivos al genoma viral al finalizar el tratamiento, pero consiguen disminuir la carga viral más de 2 logaritmos o más del 99% de los valores basales de carga viral

Recidiva: Pacientes que negativizaron el ARN-VHC al finalizar el tratamiento, pero que presentan una reactivación virológica durante el seguimiento post-terapia, normalmente entre 12 y 24 semanas después de finalizar el tratamiento.

Selección de mutaciones de resistencia: En el caso de los pacientes previamente tratados con inhibidores de proteasa, se tuvieron en cuenta los datos de selección de mutaciones de resistencia en las muestras de recidiva. En caso de no disponer de estos datos, se procedió a analizar las muestras basales de tratamiento con AADs de segunda generación.

3.2.3.- tratamiento con AADs de segunda generación.

Todos los pacientes se trataron con AADs de segunda generación utilizando pautas de tratamiento libres de IFN, aunque en ocasiones se incorporó el uso de RBV. La indicación de las pautas se realizó según el criterio del facultativo prescriptor para cada paciente y siempre considerando las diferentes recomendaciones de la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid. Las pautas de tratamiento utilizadas en cada momento se vieron afectadas por diversos factores (Figura 7).



Los regímenes y pautas de tratamiento utilizados se han basado en las diferentes combinaciones de fármacos autorizados, siguiendo las indicaciones de las guías autorizadas de tratamiento. Básicamente, los fármacos utilizados en esta tesis han sido:

A.- Inhibidores de la región NS5B: Sofosbuvir (SOF) (Sovaldi, Gilead Sciences); Dasabuvir (DSV) (Exviera, AbbVie Inc, North Chicago, IL, USA).

B.- Inhibidores de la región NS5A: Daclatasvir (DCV) (Daklinza, Bristol-Myers Squibb); Ombitasvir (OBV) (Ver combinación comercial); Ledipasvir (LDV) (Ver combinación comercial); Velpatasvir (VEL) (Ver combinación comercial)

C.- Inhibidores de la actividad NS3-serin proteasa: Simeprevir (SIM) (Olysio, Janssen); Paritaprevir (PTV) (Ver combinación comercial)

D.- Inhibidor de la actividad CYP3A4 intrahepática: Ritonavir (rtv) (ver combinación comercial).

Combinaciones comerciales: El LDV se administró en combinación con SOF (SOF/LDV) (Harvoni, Gilead Sciences), al igual que el VEL (SOF/VEL) (Epclusa, Gileas Scientific); la combinación OBV/PTV/RTV se administró siempre de forma combinada (Viekirax, AbbVie Inc).

Las pautas utilizadas en este trabajo fueron fundamentalmente de dos tipos: combinaciones de fármacos basadas en sofosbuvir y en la combinación Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir, con o sin administración simultánea de ribavirina (Ver tabla 2).

Pauta de tratamiento	Genotipo viral					
	1a	1b	2	3	4	5
Sofosbuvir/Ledipasvir	V	V			V	V
Sofosbuvir/Ledipasvir/Ribavirina	V	V			V	
Sofosbuvir/Daclatasvir	V	V		V		
Sofosbuvir/Daclatasvir/Ribavirina	V	V		V	V	
Sofosbuvir/Simeprevir/Ribavirina		V				
Sofosbuvir/Ribavirina		V	V			
Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir/Dasabuvir	V	V			V	
Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir/Dasabuvir/RBV	V	V			V	
Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir					V	

Tabla 2. Listado de pautas de tratamiento utilizadas en el proyecto, y los criterios de administración conforme al genotipo infectante. En azul, las pautas basadas en sofosbuvir y en verde las basadas en la combinación Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir. No se incluyeron en este estudio pacientes infectados con genotipo 6.

3.2.4.- Variables clínicas asociadas a tratamiento con AADs.

3.2.4.1.- Determinación del grado de fibrosis hepática.

El grado de fibrosis hepática, expresado como medida de la rigidez hepática se determinó basalmente en todos los pacientes mediante elastografía de transición (FibroScan®), en el Servicio de Digestivo del HULP siguiendo los protocolos establecidos. En todos los casos se realizaron al menos 10 mediciones seguidas en el mismo punto. Los resultados se expresaron como la mediana en kilopascales (kPa). Los pacientes se clasificaron en 4 grandes categorías en base al valor de kPa obtenido:

- Grado F0-F1: <7.1 KPa
- Grado F2: 7.2-9.5 KPa
- Grado F3: 9.6-12.5 kPa
- Grado F4: > 12.5 kpa

3.2.4.2. Patrones de respuesta antiviral.

Los patrones de respuesta a los tratamientos con AADs de segunda generación ensayados en este estudio fueron las siguientes:

A.- Respuesta virológica sostenida (RVS): Mantenimiento de la negatividad al ARN-VHC plasmático 12 semanas después de finalizar el tratamiento. Se considera el marcador de curación de la infección.

B.- Recidiva: Positivización del ARN-VHC entre el final de tratamiento y las 12 semanas de seguimiento.

En base a estos parámetros, se determinó la **eficacia del tratamiento**, definido como el porcentaje de pacientes tratados que consiguen RVS. Se analizó la eficacia del tratamiento, tanto a nivel global, como estratificando la población en base al tratamiento utilizado.

3.2.4.3- Variables relacionadas con la recidiva.

Se analizaron en todos los pacientes que experimentaron recidiva virológica tras el tratamiento los factores que podrían estar implicados en dicho evento. Los dos más importantes fueron:

A.- Adherencia al tratamiento, comprobado de acuerdo al testimonio de los pacientes, así como en las pautas de recogida de medicación.

B.- Emergencia/selección de mutaciones de resistencia: En aquellos pacientes que recidivaron durante el seguimiento se analizó, siempre que fue posible, la emergencia de mutaciones de resistencia. Para ello, se analizaron las muestras de plasma obtenidas en el momento de la recidiva mediante técnica de secuenciación poblacional, o mediante técnica de secuenciación masiva, utilizando en este caso el sistema GS Junior Plus 454 Sequencer (Roche), de acuerdo al protocolo desarrollado en el Hospital Vall d'Hebron (Quer, 2016).

3.2.4.4.- Análisis de secuencias mediante técnica de PCR "fría" (Cold-PCR)

Con el objeto de determinar la posible emergencia temprana de especies minoritarias de VHC con mutaciones de resistencia a tratamiento se procedió a analizar las secuencias con la técnica de Cold-PCR, que permite enriquecer de forma selectiva los productos de amplificación con las variantes minoritarias presentes en la mezcla, evitando así la utilización de técnicas más costosas como la secuenciación masiva.

Para el desarrollo/optimización de esta técnica, se siguieron los siguientes pasos:

A.1.- Optimización analítica de la técnica de Cold-PCR: En esta fase del trabajo se desarrolló una batería de reacciones de amplificación que cubría las regiones codificantes de las actividades NS3, NS5A y NS5B de los diferentes genotipos del VHC, en las que se localizan las mutaciones de resistencia al tratamiento con AADs descritas en la literatura.

Para el proceso de desarrollo analítico se utilizó una batería de muestras de ARN sintético de 200 bp de longitud en las que se incluían las diferentes mutaciones a analizar, mezcladas en diferentes proporciones con las secuencias equivalentes del ARN carentes de dichas mutaciones (secuencias salvajes). Para la validación con muestras clínicas, se analizaron 10 muestras de suero previamente caracterizadas; cinco con diferentes mutaciones de resistencia a tratamiento con Ledipasvir o Daclatasvir (2 con la mutación L31M, 2 con Y93H y 1 con Y93C) previamente confirmada en la muestra de recidiva por PCR y secuenciación poblacional, cinco muestras basales de pacientes con mutaciones de resistencia a telaprevir (obtenidos de la subpoblación de 20 pacientes descrita en el apartado 3.1.A), y 5 pacientes *naïve* respondedores a terapia antiviral. Todas las muestras de plasma utilizadas en el proceso de optimización tenían cargas virales medias/altas ($>10^2$ IU/ml). La proporción relativa en que aparecen las mutaciones de resistencia en las cinco muestras de suero positivas se determinó por PCR standard y secuenciación de colonias. Estos datos se utilizaron para determinar las proporciones relativas en que aparecía cada una de las mutaciones en los ensayos de sensibilidad en que se analizaban mezclas en distintas proporciones de plasma conteniendo secuencias ARN mutantes y salvajes.

Durante el proceso de optimización se analizaron las siguientes variables:

A.2.- Especificidad analítica: Se confirmó mediante secuenciación poblacional que los productos amplificados en cada reacción de Cold-PCR se corresponden con las secuencias frente a las que se había diseñado. Asimismo, se confirmó en mezclas complejas de diferentes sueros de VHC, que la reacción de Cold-PCR permite la amplificación selectiva de las especies minoritarias, y evita o reduce significativamente la amplificación de las especies mayoritarias.

A.2.- Sensibilidad analítica: Se entiende por sensibilidad relativa de la técnica de Cold-PCR la riqueza relativa mínima que tiene que presentar una especie de ARN minoritaria en una mezcla compleja de ácidos nucleicos para ser amplificada de forma eficiente. Para ello se realizaron mezclas en distintas proporciones de los ARNs sintéticos y de los sueros con y sin mutaciones de resistencia a AADs (razón especie minoritaria/mayoritaria: 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000). Dado que

la sensibilidad relativa depende de la concentración de ARN-VHC total que se analice, se repetirán los ensayos de sensibilidad relativa en mezclas con diferentes cantidades de ARN viral total (10^2 - 10^7 IU/ml).

A.3.- Eficacia de discriminación de especies minoritarias de ARN-VHC. Se comparó la capacidad de identificación de especies minoritarias por Cold-PCR con la técnica de amplificación estándar. Para ello se analizaron todas las mezclas utilizadas en la fase de determinación de la sensibilidad de la técnica con reacciones de PCR estándar, seguida de secuenciación poblacional de los productos obtenidos.

A4.- Análisis de utilidad de la técnica para estimación de la variabilidad de la cuasiespecie de VHC. Para ello, se analizaron las 15 muestras de suero por Cold-PCR y los productos amplificados se analizarán mediante secuenciación poblacional. Se comparó la capacidad de identificar diferentes variantes por análisis de secuencia con otras técnicas más rápidas, como el análisis de curva de desnaturalización en presencia de fluoróforos intercalantes de ADN. Para ello, se amplificaron las diferentes mezclas de ARNs sintéticos y de las muestras de plasma con los mismos cebadores de amplificación en presencia de SYBR Green, realizándose posteriormente una curva de desnaturalización (T_m) para discriminar las diferentes variantes de ARN presentes en la muestra.

A.5.- Fase clínica. En esta fase del trabajo se procedió a analizar la variabilidad genética basal y la detección temprana de variantes de resistencia al tratamiento en los pacientes incluidos en el presente sub-estudio analizando las muestras de plasma de seguimiento positivas al genoma viral. Para ello se utilizaron los ARNs extraídos en las fases previas del estudio tal como se describe en los apartados 3.3.1 a 3.3.3.

A.6.- Análisis de resultados: Se determinó el nivel de complejidad de la cuasiespecie del VHC en las muestras de plasma analizadas, que se define como el porcentaje total de variaciones de nucleótidos entre los clones analizados por cada paciente. Asimismo, se analizó la capacidad de la técnica de Cold-PCR de identificar secuencias de ARN-VHC de forma temprana durante el tratamiento con AADs de diferente tipo.

3.2.4.4.- Pautas de tratamiento de rescate.

La indicación de las pautas de tratamiento de rescate se realizó según el criterio del facultativo prescriptor para cada paciente y siempre considerando las recomendaciones aportadas por la

Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid El destalle de las pautas de tratamiento de rescate utilizadas se muestra en la tabla 3.

Tratamiento fallido de 1ª línea	Tratamiento de rescate
Sofosbuvir/Ledipasvir	Sofosbuvir + Simeprevir + Ribavirina
	Sofosbuvir/Velpatasvir + Voxilaprevir
Sofosbuvir + Daclatasvir	Sofosbuvir/Velpatasvir + Ribavirina
	Sofosbuvir + Simeprevir + Daclatasvir + Ribavirina
Sofosbuvir/Ledipasvir + Ribavirina	Sofosbuvir + Daclatasvir + Ribavirina

Tabla 3. Listado de pautas de tratamiento de rescate utilizadas en este trabajo para los pacientes que presentaron reactivación virológica tras finalizar el tratamiento. Todas estuvieron basadas en tratamientos con SOF.

3.2.5.- Variables relacionadas con la evolución clínica post-tratamiento.

Una vez finalizado el periodo de tratamiento, se realizó un seguimiento a los pacientes durante un periodo mínimo de 3 años, en el que se comprobó la persistencia de la negatividad del genoma viral en plasma, así como la evolución de la enfermedad hepática.

3.2.5.1.- Análisis de descompensaciones hepáticas.

Se analizó en todos los pacientes la pre-existencia basal, o la aparición durante o después del tratamiento, de episodios de descompensación hepática, confirmados por el diagnóstico de complicaciones como ascitis, encefalopatía hepática, sangrado por varices esófago-gástricas, trombosis portal, empeoramiento de la función hepática que precise trasplante hepático, o desarrollo/recurrencia de hepatocarcinoma.

3.2.5.2.- Análisis de la evolución de la fibrosis y la función hepática.

Se analizaron todos los pacientes con fibrosis F-4 y se calculó antes y después del tratamiento dos métodos de determinación de fibrosis hepática no invasivos, el APRI y el FIB-4. Para ello se recogieron algunos datos analíticos como GOT y GPT medido en U/L y las plaquetas (10x3/mL). Se tomó como referencia temporal la analítica previa a iniciar tratamiento y al menos un año posterior a finalizarlo. También se calculó el MELD previo y posterior al tratamiento para ello se recogieron datos como la bilirrubina total (mg/dL), INR y creatinina (mg/dL). Para el cálculo de FIB-4 se utilizó la fórmula de $(\text{Edad} \times \text{GOT}) / (\text{Plaquetas} \times \sqrt{\text{GPT}})$ y la fórmula APRI $(\text{GOT}/35)(\text{limite}$

alto de la normalida)) / plaquetas x 100. Para el cálculo de la fórmula MELD se utilizó la siguiente fórmula: $0,378(\text{limite normal bilirrubina (mg/dL)} + 1,12 (\text{limite normal INR}) + 0,957 (\text{limite normal creatinina (mg/dL)} + 0,643$. Si el paciente se encontraba en hemodiálisis el paciente asumía automáticamente creatinina de 4 mg/dL.

3.2.5.3.- Recurrencia/desarrollo *de novo* de hepatocarcinoma y/o cánceres extrahepáticos.

Los pacientes con diagnóstico previo de hepatocarcinoma fueron tratados con técnicas ablativas o resección quirúrgica sin datos de enfermedad activa en el momento de recibir tratamiento. Una vez finalizado el tratamiento antiviral se vigiló durante el seguimiento el desarrollo de recidivas en estos pacientes. Asimismo, en todos los pacientes respondedores a tratamiento, especialmente en aquellos que presentaban un grado de fibrosis F4, se realizó una vigilancia activa para descartar la posible aparición de hepatocarcinoma *de novo*, así como de posibles cánceres extrahepáticos. Para ello se utilizaron técnicas radiológicas (TAC, RMN, ecografía con contraste) e histológicas (punción aspiración con aguja fina (PAAF), biopsia).

3.2.5.4.- Análisis de factores genéticos potencialmente implicados en recurrencia/desarrollo *de novo* de hepatocarcinoma en pacientes respondedores.

Con el objeto de identificar marcadores moleculares que permitan identificar riesgo de desarrollo de HCC en los pacientes respondedores a tratamiento con AADs, se procedió analizar la composición alélica del gen codificante de la actividad aurora quinasa B en la posición rs1059476, en la que se han identificado previamente SNPs no sinónimos que se han relacionado en estudios previos con el riesgo de progresión de fibrosis hepática en pacientes con hepatitis crónica C, y que se asocia con desregulación de citocinesis celular.

A.- Extracción de ADN a partir de sangre total. La extracción de ADN se realizó sobre muestras de CMSPs o de sangre total previamente congeladas, utilizando dos sistemas alternativos de extracción: A) kit comercial QIAmp DNA Blood (Qiagen, Venlo, Netherlands), siguiendo las instrucciones del fabricante, para la extracción de ADN total a partir de CMSPs y; B) en el caso de la sangre total congelada, mediante digestión directa de volúmenes pequeños de sangre, mediante dilución en H₂O en una proporción 1:13.33 en H₂O, incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación mediante vortex cada 5 minutos.

Una vez extraído el ADN con cualquiera de las dos formas previamente descritas, este se almacenó a -20°C hasta su uso.

B.- RT-PCR con sondas específicas FRET. Se diseñaron cebadores de amplificación y sondas específicas fluorescentes de hibridación de tipo FRET para determinar la composición alélica de

los pacientes en la posición s1059476 mediante amplificación cuantitativa en tiempo real RT-QPCR empleando el kit LightCycler Multiplex ADN Master Mix (Roche) y el termociclador Lightcycler 2.0. Las condiciones de la PCR fueron 95°C durante 10 minutos, 35 ciclos de 5 segundos a 95°C, 15 segundos a 57°C y 20 segundos a 72°C; y finalmente un ciclo de desnaturalización donde la muestra se desnaturaliza durante 1 segundo a 99°C, luego se baja la temperatura a 37°C 1 segundo para que el ADN se religue y seguidamente se aumenta la temperatura 0.05°C/segundo. Las sondas FRET específicas utilizadas se marcaron con los fluoróforos FAM y Cy5 respectivamente; la adquisición de fluorescencia se realizó mediante excitación en el canal de FAM (495nm) y lectura de fluorescencia en el canal de Cy5 (670 nm). (Tabla 3 – Sondas).

C.- Confirmación de resultados por PCR cualitativa y secuenciación Sanger: Las reacciones de amplificación génica se realizaron utilizando PCR Master Mix (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante con los cebadores de AURKB para ADN genómico. A continuación, se analizaron los productos de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñida con Gel Red Nucleic Acid (Biotium, EEUU) y se visualizaron con luz ultravioleta en un transiluminador Bio-rad Chemidoc 73s UV Transiluminador w/lens usando un control negativo con la mezcla de reacción y una muestra de extracción negativa para descartar posibles contaminaciones. La secuencia y posición de los primer utilizados en las reacciones de PCR se muestra en Tabla 4.

La secuenciación Sanger se llevó a cabo en el servicio del Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM) del Hospital Universitario La Paz. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el software DNASTAR Lasergene SeqMan Pro, versión 7.1.0 (DNASTAR, EEUU).

Gen	Tipo	Secuencia	Tamaño amplicón	Posición nucleótidos
AURKB	Primer directo	5'-GGTGGACCTAAAGTTCCCCGCTTC-3'	95 pb	5732/5826
	Primer reverso	5'-CCAGGGGCAGCCGTTCCG-3'		
	FAM	5'-CCCACGGGAGCCCAGGA-3'-FAM		5760-5776
	Cy5	Cy5-5'-TCATCTCCAAACTGCTCAGGCATAACCC-3'		5779-5806

Tabla 4. Listado de cebadores y sondas de hibridación para la identificación/secuenciación del gen de la AURKB.

3.3.- SUB-ESTUDIO DE ANÁLISIS DE CINÉTICA DE ACLARAMIENTO DEL ARN-VHC EN CMSPs.

El objetivo de esta fase del estudio es determinar si el tratamiento con AADs consigue eliminar de forma eficiente el ARN-VHC no solo en plasma, el tejido de elección para definir la respuesta antiviral, sino también a nivel de CMSPs, que ha sido descrito por muchos autores como un potencial reservorio extrahepático viral, verificándose así una eliminación real del virus del organismo.

Se incluyeron 10 pacientes de la cohorte principal de los que se disponía de muestras basal y final de tratamiento de plasma y CMSPs y que habían conseguido RVS. Con el objeto de comparar si el tratamiento con AADs era más eficiente que los tratamientos con IP de primera generación o de IFN + RBV en la eliminación del genoma viral en CMSPs, se incluyeron dos grupos independientes de la cohorte principal de este trabajo (Tabla 5):

A.- Grupo Control 1: 12 pacientes respondedores a terapia triple basada en TVR.

B.- Grupo Control 2: 10 pacientes respondedores a tratamiento con IFN + RBV.

3.3.1.- Extracción de ARN de plasma y CMSPs.

Se recogieron muestras de sangre total con EDTA y se separaron en el mismo día las fracciones de plasma y PBMC por centrifugación en un gradiente de Ficoll (Ficoll-Histopaque-1077, Sigma Chemicals) a 2000 rpm, durante 30 minutos. El plasma se conservó a -20°C y las PBMC en nitrógeno líquido.

Las muestras congeladas de plasma y PBMC se procesaron para la extracción de ARN total utilizando los kits de extracción QIAamp Viral RNA MiniKit (Qiagen, Hamburgo, Alemania) y AllPrep DNA/RNA/Protein MiniKit (Qiagen), respectivamente. Se empleó en todos los casos un mínimo de 5×10^6 células y 140 µl de plasma. El ARN obtenido se conservó a -80°C hasta su uso posterior en ensayos de amplificación.

3.3.2.-Diseño de cebadores para la amplificación.

Las secuencias de las regiones codificantes NS3, NS5a y NS5b de los diferentes genotipos a analizar se descargaron de la base de datos de VHC del Laboratorio Nacional de Los Álamos (<http://hcv.lanl.gov>). Se seleccionaron las regiones de los genes que contienen las mutaciones de resistencia más características, con el objeto de poder determinar su presencia en ensayos de secuenciación.

3.3.3.- RT-PCR.

Las reacciones de transcripción en reverso acoplada a PCR se realizaron con el kit ACCESS RT-PCR SYSTEM (Promega Biotech,), utilizando *random primers* en la reacción de RT con el siguiente programa de incubación: 25°C, 10 min + 40°C, 30 min + 48°C, 30 min + 80°C, 2 min. Para amplificar el ADNc generado en la etapa de RT, se realizaron PCR estándar con PCR Master Mix (Promega Biotech), utilizando diferentes combinaciones de los cebadores previamente diseñados en este trabajo. Los productos de amplificación se analizarán en todos los casos mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5%, teñida con GelRed (Biotium, Fremont, CA, USA) y en presencia de un marcador de pesos moleculares. Solo se interpretará como positiva aquella reacción que genera una banda del tamaño esperado.

Caso	Edad	Sexo	II28	Fibrosis	Tratamiento previo		Terapia triple con TVR			
					Tratamiento	Respuesta	CV Basal (IU/ml)	RVR	Descenso de CV (>1log)	ERVR
1	42	H	TT	F3	PegIFNa2a/RBV	Recidiva	354149	Si	Si	Si
2	55	H	CC	F2	PegIFNa2a/RBV	Recidiva	2215578	Si	Si	Si
3	58	H	CT	F3	PegIFNa2a /RBV	Recidiva	138399	Si	Si	Si
4	36	H	CT	F3	IFN alpha 2b	Recidiva	704525	Si	Si	Si
5	52	H	CT	F4	Naïve	Recidiva	829985	Si	Si	Si
6	42	H	CC	F2	PegIFNa2a/RBV	Recidiva	1741348	Si	Si	Si
7	53	H	ND	F3	PegIFNa2a /RBV	Recidiva	115879	Si	Si	Si
8	58	M	CT	F3	PegIFNa2a /RBV	Recidiva	2416835	Si	Si	Si
9	63	M	TT	F3	PegIFNa2a /RBV	No respondedor	107385	Si	Si	Si
10	45	M	CC	F3	PegIFNa2a /RBV	Recidiva	4730000	No	Si (CV W4:25)	No
11	64	M	CT	F4	PegIFNa2a	No respondedor	1669198	No	No (CV W4:413804)	No
12	60	M	CT	F2	IFN alpha 2b	Recidiva	969787	No	Si (CV W5: 573)	No
13	45	H	CT	F3	PegIFNa2a /RBV	Respondedor	No tratados con triple terapia			
14	52	M	CC	F3	PegIFNa2a /RBV	Respondedor				
14	40	M	CT	F2	PegIFNa2a /RBV	Respondedor				
16	35	M	CT	F3	PegIFNa2a /RBV	Respondedor				
17	39	H	CT	F2	PegIFNa2a /RBV	Respondedor				
18	44	H	CC	F2	PegIFNa2a /RBV	Respondedor				
19	59	M	CT	F3	IFN alpha 2b	Respondedor				
20	45	H	CT	F2	PegIFNa2a /RBV	Respondedor				
21	62	M	CC	F2	PegIFNa2a /RBV	Respondedor				
22	39	H	TT	F2	PegIFNa2a /RBV	Respondedor				

Tabla 5. Características de las subpoblaciones de pacientes previamente tratados con IFN+RBV (marcados en azul) o con terapia triple basada en TVR (amarillo), incluida en este estudio para comparar la cinética de aclaramiento en plasma y CMSPs de pacientes tratados con TVR y de los pacientes tratados con AADs de última generación correspondientes a la cohorte principal del estudio. RVR: Respuesta virológica rápida; CV: carga viral (concentración de ARN-VHC); H: Hombre; M: Mujer.

3.3.4.- Análisis de secuencia de los productos amplificados.

Con el objeto de determinar si las cepas de VHC amplificadas en plasma y CMSPs de un mismo paciente son iguales (indicando una fuente común) o si se diferencian significativamente (fuentes independientes), se analizará la secuencia de los productos amplificados. Para ello, se realizará una secuenciación Sanger poblacional del producto amplificados utilizando el kit de secuenciación de ADN dRhodamin Terminator Cycle Sequencing (Waltham, MA, USA).

3.3.5.- Análisis filogenético de secuencias.

Las secuencias de los productos amplificados se analizaron utilizando el programa SeqMan del paquete de análisis Lasergene, versión 7.1.0 (DNASTAR). El análisis filogenético de las secuencias se realizó mediante alineación BLAST y método estadístico de máxima verosimilitud del software Mega5.

3.4.- SUB-ESTUDIO DE ANÁLISIS DE PERCEPCIÓN DE CALIDAD DE VIDA EN PACIENTES CON RVS.

Se incluyeron un total de 86 pacientes asintomáticos de la cohorte principal, que habían sido tratados entre los años 2014-2015 y que habían conseguido RVS. Además de las variables demográficas (sexo y edad) y clínicas (tratamiento y nivel de fibrosis) se recogieron datos socioeconómicos, como nivel de estudios y situación laboral. Los cuestionarios se entregaron antes de recibir tratamiento, al finalizar el mismo y 12 semanas posteriores.

Criterios de inclusión:

- Pacientes de ambos sexos con infección crónica por virus de la hepatitis C que cumplan criterios de tratamiento acorde con lo dispuesto por la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid en el momento de inclusión.
- Ser mayor de edad.
- Pacientes que no hayan presentado sintomatología por su patología hepática y que entiendan y firmen el consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- Pacientes coinfectados por el VIH.
- Pacientes que presenten alguna contraindicación para recibir tratamiento.
- Pacientes que presenten cirrosis descompensada, coinfección por el VHB o alguna patología grave que limite su calidad de vida.
- No firmar el consentimiento informado.

3.4.1.- Variables analizadas.

3.4.1.1.- Variables demográficas y epidemiológicas

Se recogieron variables demográficas, como sexo y edad al inicio del estudio; variables clínicas, como experiencia previa con tratamientos antivirales, tratamiento con AADs de segunda generación y nivel de fibrosis determinado por biopsia y/o Fibroscan y; variables socioeconómicas, nacionalidad, estado civil, el nivel de estudios (primarios, secundarios o superiores) y su situación laboral actual (empleo vs desempleo) (ver encuesta en Anexo 1)

3.4.1.2.- Variables relacionadas con el estudio de calidad de vida.

Para el estudio de calidad de vida se administraron dos cuestionarios genéricos. El cuestionario EQ-5D-5L desarrollado por el grupo EuroQol siendo un instrumento genérico y estandarizado para medir describir y valorar la calidad de vida. Es un cuestionario auto administrado y consta de dos partes: El sistema descriptivo EQ-5D y la escala visual analógica (EVA). El sistema EQ-5D comprende cinco dimensiones:

- Movilidad
- Autocuidado
- Actividades cotidianas.
- Dolor/Malestar
- Ansiedad/Depresión

En el cuestionario los pacientes pueden responder dentro de cada dimensión si no tienen problema en esa dimensión, si tienen ligeros problemas, moderados problemas, graves problemas o son incapaces de realizar ninguna actividad sobre esa dimensión, excepto para el dolor y la ansiedad que el último apartado indica extrema sensación de dolor y de ansiedad. Para la escala visual EVA se utiliza una escala reglada en la que se pide que se marque y además que se escriba numéricamente en otro recuadro.

El cuestionario SF-36 que contiene un total de 36 preguntas que se agrupan y miden en 8 apartados que se valoran independientemente y dan lugar a 8 dimensiones que mide el cuestionario:

- Funcionamiento físico
- Limitación por problemas físicos
- Dolor corporal
- Funcionamiento o rol social
- Salud mental
- Limitación por problemas emocionales

- Vitalidad, energía o fatiga
- Percepción general de salud

3.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete informático IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versión 23 (IBM Corporation, Somers, NY, USA). Todos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de significación del 0.05.

3.5.1.- Análisis descriptivo.

La presentación de los valores de las diferentes variables del estudio se realizó utilizando los análisis estadísticos apropiados a su naturaleza:

- Variables continuas: se expresan como media y desviación estándar ($m \pm SD$).
- Variables categóricas: se expresan en porcentaje con respecto al tamaño muestral total de cada categoría.

3.5.2.- Análisis inferencial

Se han aplicado diferentes pruebas de hipótesis según la naturaleza de la variable. Para variables categóricas se utilizó la **prueba exacta de Fisher**, para las variables continuas la **t de studenty** para las variables ordinales la **prueba U de Mann-Whitney**. Los p-valores fueron resultado de una prueba bilateral, considerándose estadísticamente significativo $p < 0.05$.

En el caso concreto del análisis de diferencias en las se evaluaron mediante la prueba de **chi-cuadrado**, con un intervalo de confianza del 95%. Las diferencias en la distribución de género y edad en las categorías de pacientes fueron determinadas empleando la prueba **chi-cuadrado** o la prueba de **U Mann-Whitney**.

RESULTADOS

4.1.- CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES TRATADOS CON ANTIVIRALES DE ACCIÓN DIRECTA.

Desde noviembre de 2014 hasta marzo de 2017 se incluyeron un total de 423 pacientes tratados con antivirales de acción directa. Uno de ellos se excluyó dado que se había utilizado interferón junto con Simeprevir y Ribavirina, otro también se excluyó dado que se perdió el seguimiento.

Sexo (Hombre/Mujer): n (%)	213 (50.6%)/208 (49.4%)
Edad (años): M (DE)	60,19 (12.52)
VARIABLES CLÍNICAS	
Genotipo viral: n (%)	
1a	96 (22,8%)
1b	263 (62,5%)
1 No subtipado	5 (1,2%)
2	1 (0,2%)
3	32 (7,6%)
4	20 (4,8%)
5	3 (0,7%)
1a + 3	1 (0,2%)
Fibrosis: n (%)	
F0-F1	30 (7,1%)
F2	198 (47%)
F3	59 (14%)
F4	124 (29,5%)
No determinado	10 (2,4%)
Historia de tratamiento previo: n (%)	
Biterapia	85 (20,2%)
Triterapia	27 (6,4%)
Naïve	308 (73,2%)
Respuesta a tratamiento previo: n (%)	
No respondedor	42 (9,9%)
Respondedor parcial	19 (4,5%)
Recidiva	52 (12,4%)

Tabla 6. Características basales de los pacientes tratados con antivirales de acción directa.

La distribución por edad era la esperada para la población de estudio así como el genotipo más frecuente que fue el 1b. Únicamente se confirmó coinfección (genotipos 1a+3) en uno de los pacientes incluidos. Respecto a la distribución por nivel de fibrosis el F2 fue el más frecuente seguido por el F4. El hecho de ser los F4 el segundo grupo más frecuente se debe fundamentalmente a que en las primeras fases del estudio, las recomendaciones de la Consejería de Sanidad centraban el tratamiento preferentemente en los pacientes que presentaban fibrosis avanzada.

4.2.- PAUTAS DE TRATAMIENTO CON AADS DE SEGUNDA GENERACIÓN.

Los tratamientos administrados fueron fundamentalmente de dos tipos: tratamientos basados en Sofosbuvir combinados con Ledipasvir, Daclatasvir o Simeprevir, que se utilizó en la mayoría de los pacientes [332/421(79%)], seguido de la combinación Ombitasvir+Paritavir+Ritonavir que solo o en combinación con Dasabuvir se administró a 88/421 (21%) de los pacientes. Únicamente a un paciente se le administro una pauta terapéutica diferente basada en la combinación Daclatasvir+Simeprevir. Respecto a las pautas más utilizadas la de 12 semanas es la más frecuente seguida de la de 24 semanas.

PAUTAS DE TRATAMIENTO CON AADS DE SEGUNDA GENERACIÓN	
Tratamientos basados en Sofosbuvir (n= 332)	
Sofosbuvir+Ledipasvir	264 (62,7%)
Sofosbuvir+Ledipasvir+Ribavirina	27 (6,4%)
Sofosbuvir+Daclatasvir	24 (5,7%)
Sofosbuvir+Daclatasvir+Ribavirina	13 (3,1%)
Sofosbuvir+Ribavirina	2 (0,5%)
Sofosbuvir+Simeprevir+Ribavirina	2 (0,5%)
Tratamientos basados en la combinación Ombitasvir+Paritavir+Ritonavir (n= 88)	
Ombitasvir+Paritavir+Ritonavir	1 (0,2%)
Ombitasvir+Paritavir+Ritonavir+Ribavirina	1 (0,2%)
Ombitasvir+Paritavir+Ritonavir+Dasabuvir	76 (18,1%)
Ombitasvir+Paritavir+Ritonavir+Dasabuvir+Ribavirina	10 (2,4%)
Otros tratamientos (n=1)	
Daclatasvir+Simeprevir	1 (0,2%)
PAUTAS	
8 Semanas	49 (11,6%)
12 semanas	288 (68,4%)
16 semanas	1 (0,2%)
24 semanas	83 (19,7%)
Tabla 7. Descripción de los tratamientos y pautas utilizados.	

PACIENTES NO CIRRÓTICOS											
		SFV	SFV+LDV		SFV+DCV		SFV+SMV	OBV+PTV+RTV		OBV+PTV+RTV+DSV	
		RBV		RBV		RBV	RBV		RBV		RBV
1a	Naïve		44	1						1	3
	Pretratado		23	1							
1b	Naïve		84	1						49	1
	Pretratado		24	1	1					18	
2	Naïve	1									
	Pretratado										
3	Naïve				17	1					
	Pretratado				4						
4	Naïve		11						1		
	Pretratado		4								
5	Naïve		2								
	Pretratado		1								
PACIENTES CIRRÓTICOS											
1a	Naïve		12	4		2				1	
	Pretratado		1	2							1
1b	Naïve	1	38	9			2			6	2
	Pretratado		14	4	1	2				1	3
3	Naïve		2			4					
	Pretratado					4					
4	Naïve		1	1				1			
	Pretratado		1								
<p>Tabla 8. Distribución de los tratamientos estratificado según genotipo, estado fibrosis y experiencia previa en tratamiento. En todos los genotipos se utilizó preferentemente el tratamiento con la combinación SFV+LDV, excepto en los pacientes de genotipo 3 que fueron siempre tratados con la combinación SFV+DCV, y los infectados con subtipo 1b que combinaron el uso de Harvoni con la combinación OBV+PTV+RTV+DSV, especialmente en los pacientes no cirróticos.</p>											

	SOFOSBUVIR (n=332)	NO-SOFOSBUVIR (n=89)	P
VARIABLES DEMOGRÁFICAS			
Sexo: n (%)			
Hombre	174 (52,4%)	39 (43,8%)	0,150
Mujer	158 (47,6%)	50 (56,2%)	
Edad (años): M (DE)	59.93 (12.78)	61.16 (11.52)	0,410
VARIABLES CLÍNICAS			
Genotipo viral: n (%)			
1a	90 (27,1%)	6 (6,7%)	<0,001
1b	182 (54,8%)	81 (91%)	
1 No subtipado	5 (1,5%)	0	
2	1 (0,3%)	0	
3	32 (9,6%)	0	
4	18 (5,4%)	2 (2,2%)	
5	3 (0,9%)	0	
1a + 3	1 (0,3%)	0	
Fibrosis: n (%)			
F0-F1	25 (7,5%)	5 (5,6%)	0,02
F2	150 (45,2%)	48 (53,9%)	
F3	40 (12%)	19 (21,3%)	
F4	108 (32,5%)	16 (18%)	
No determinado	9 (2,7%)	1 (1,1%)	
Historia de tratamiento previo: n (%)			
Biterapia	61 (18,4%)	24 (27%)	0,018
Triterapia	27 (8,1%)	0	
Naïve	243 (73,2%)	65 (73%)	
Respuesta a tratamiento previo: n (%)			
No respondedor	31 (9,3%)	11 (12,3%)	0,26
Respondedor parcial	17 (5,1%)	2 (2,2%)	
Recidiva	41 (12,3%)	11 (12,3%)	
PAUTAS DE TRATAMIENTO			
8 semanas	49 (14,8%)	0	<0,001
12 semanas	202 (60,8%)	86 (96,6%)	
16 semanas	1 (0,3%)	0	
24 semanas	80 (24,1%)	3 (3,4%)	

Tabla 9. Diferencias entre los pacientes tratados o no con regímenes basado en sofosbuvir.

Es de destacar el uso en este estudio de ribavirina en un porcentaje significativo de los pacientes [55/421 (13%)], con similar frecuencia en los pacientes con tratamiento basado en sofosbuvir [44/332 (13%)] que en los pacientes no tratados con sofosbuvir [(11/88 (12,5%))].

El uso tan significativo de ribavirina se puede explicar dado que los primeros pacientes que se empezaron a tratar eran cirróticos y se recomendaba añadir este tratamiento para mejorar la tasa de RVS (Tabla 10).

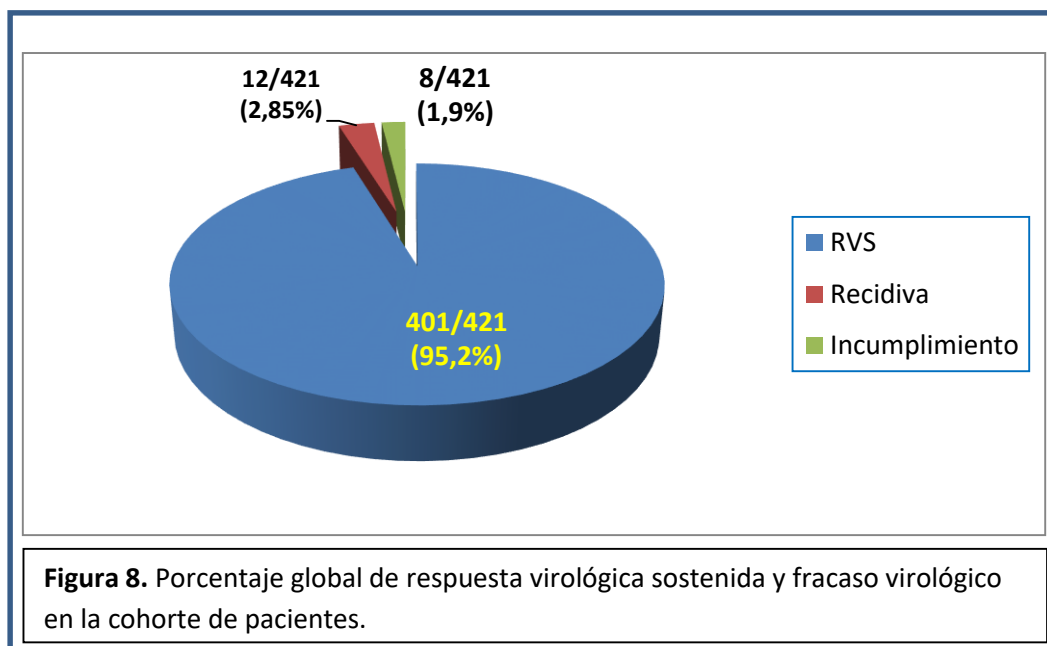
	RIBAVIRINA (n=55)	No ribavirina (n=366)	P
VARIABLES DEMOGRÁFICAS			
Sexo: n (%)			
Hombre	36 (65,5%)	177 (48,4%)	0,018
Mujer	19 (34,5%)	189 (51,6%)	
Edad (años): M (DE)	56,97 (10.03)	60.67 (12.80)	0,041
VARIABLES CLÍNICAS			
Genotipo viral: n (%)			
1a	14 (22,5%)	82 (22,4%)	0,002
1b	26 (47,3%)	237 (64,8%)	
1 No subtipado	1 (1,8%)	4 (1,1%)	
2	0	0	
3	11 (20%)	21 (5,7%)	
4	2 (3,6%)	18 (4,9%)	
5	0	3 (0,8%)	
1a + 3	0	1 (0,3%)	
Fibrosis: n (%)			
F0-F1	1 (1,8%)	29 (7,9%)	<0,001
F2	4 (7,3%)	194 (53%)	
F3	6 (10,9%)	53 (14,5%)	
F4	44 (80%)	80 (21,9%)	
No determinado	0	10 (2,7%)	
Historia de tratamiento previo: n (%)			
Biterapia	14 (25,5%)	71 (19,4%)	0,524
Triterapia	5 (9,1%)	22 (6%)	
Naïve	36 (65,5%)	272 (74,3%)	
Respuesta a tratamiento previo: n (%)			
No respondedor	6 (10,9%)	36 (9,9%)	0,415
Respondedor parcial	5 (9,1%)	14 (3,8%)	
Recidiva	8 (14,5%)	44 (12%)	
PAUTAS DE TRATAMIENTO			
8 semanas	0	49 (13,4%)	0,023
12 semanas	40 (72,7%)	248 (67,8%)	
16 semanas	0	1 (0,3%)	
24 semanas	15 (27,3%)	68 (18,6%)	

Tabla 10. Diferencias entre pacientes tratados con y sin Ribavirina.

4.3.- ANÁLISIS DE RESPUESTA A TRATAMIENTO ANTIVIRAL.

En 401/421 (95,2%) pacientes se alcanzó respuesta virológica sostenida, demostrada por la negativización del ARN-VHC tras 12 semanas post-tratamiento. Únicamente 20 pacientes (4,8%) no alcanzaron la RVS (Figura). Del resto de pacientes, 12 (2.85%) presentaron recidiva tras finalizar el tratamiento y 8 (1,90%) pacientes no respondieron; 6 de ellos por incumplimiento y 2 por desarrollo de efectos adversos (Figura 8).

De los 20 pacientes que no alcanzan RVS, 12 son pacientes que completaron el tratamiento pero recidivaron durante el seguimiento, mientras que en los 8 pacientes restantes el fracaso no se debe a un fallo en el tratamiento, sino al incumplimiento de las pautas terapéuticas. Todos los pacientes que no tuvieron buena adherencia al tratamiento fracasaron en la obtención de respuesta virológica.



No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de eficacia al tratamiento entre las diferentes estrategias terapéuticas ensayadas, si bien el porcentaje de pacientes que alcanzó RVS fue algo menor en el grupo tratado con terapia basada en sofosbuvir que en el grupo tratado con terapia basada en la combinación OBV+PTV+RTV. Sin embargo hay que tener en cuenta que dentro del grupo de pacientes tratados con sofosbuvir se encuentran los pacientes de genotipo 3, el genotipo más difícil de tratar con AADs de acuerdo a la mayoría de estudios publicados, que fueron tratados en todos los casos con la combinación sofosbuvir+daclatasvir, con o sin RBV, y que presentaron en esta serie de pacientes los índices de respuesta más bajos.

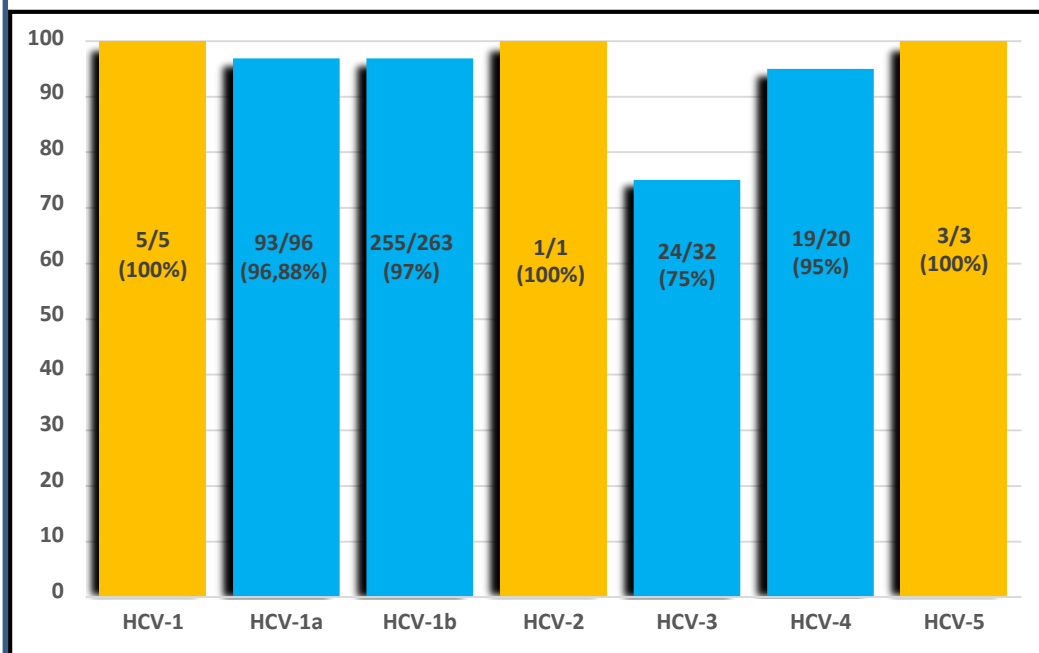
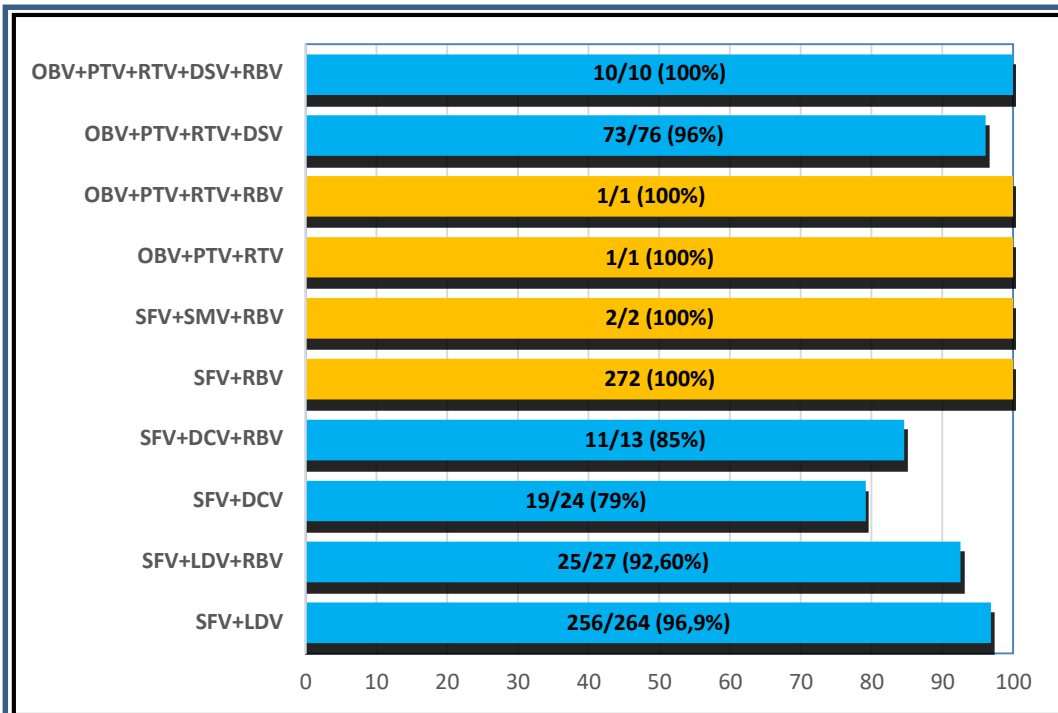
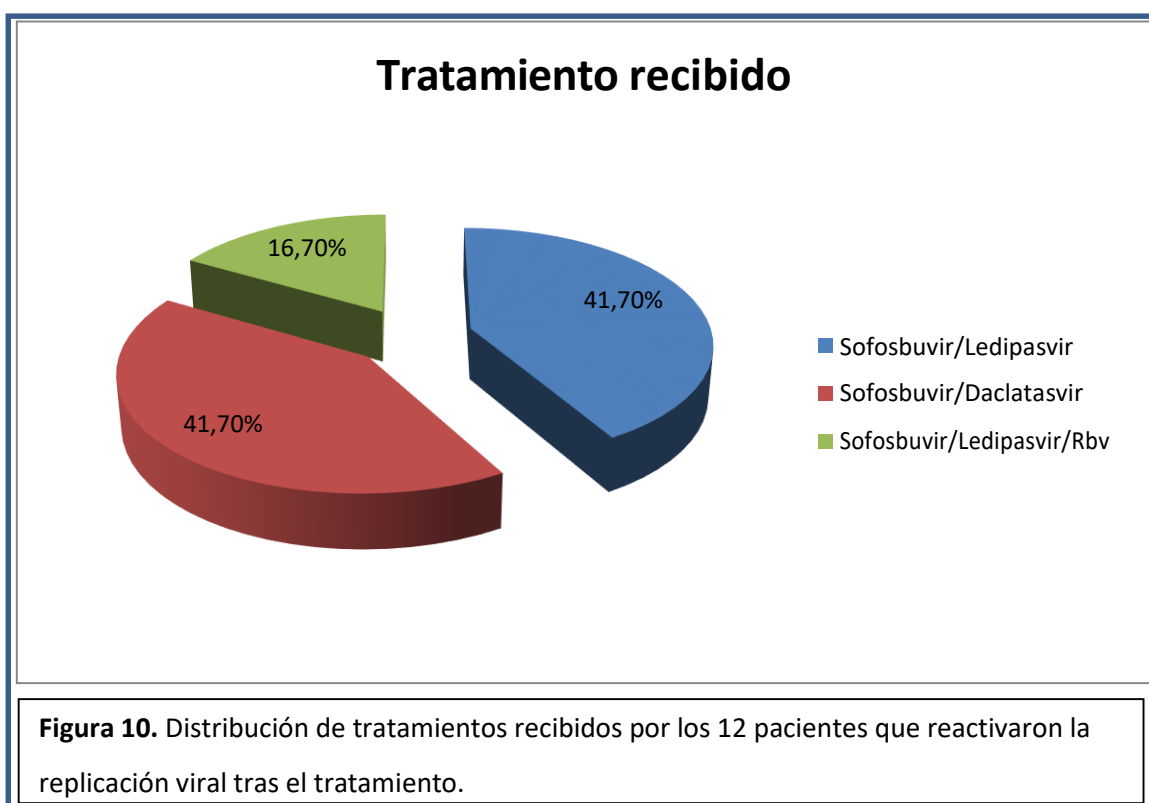


Figura 9. Tasas de respuesta virológica sostenida obtenida con: A) los diferentes tratamientos ensayados, y B) en los diferentes genotipos tratados. Los menores porcentajes de respuesta se encontraron en los pacientes de genotipo 3 tratados, todos ellos tratados con la combinación sofosbuvir+daclatasvir. En naranja se muestran los grupos en los que el número de pacientes incluido fue muy bajo, por lo que no se pueden extraer conclusiones estadísticas.

De los 8 pacientes que no obtuvieron respuesta virológica por incumplimiento de las pautas terapéuticas, todos presentaban niveles de fibrosis elevada (4 pacientes con F3 y 3 con F4), únicamente 1 tenía experiencia previa en tratamiento, y habían sido tratados tanto con pautas basadas en SFV (3 con SFV+LDV y 2 con SFV+DCV+RBV), como con la combinación OBV+PTV+RTV+DSV que fue utilizada en 3 casos.

Con respecto a los pacientes que recidivaron, todos habían sido tratados con terapias basadas en sofosbuvir. La mayoría de ello, tratados con la combinación SFV+LDV con o sin RBV, así como un alto porcentaje de los pacientes con genotipo 3 tratados con SFV+DCV (Figura 10).



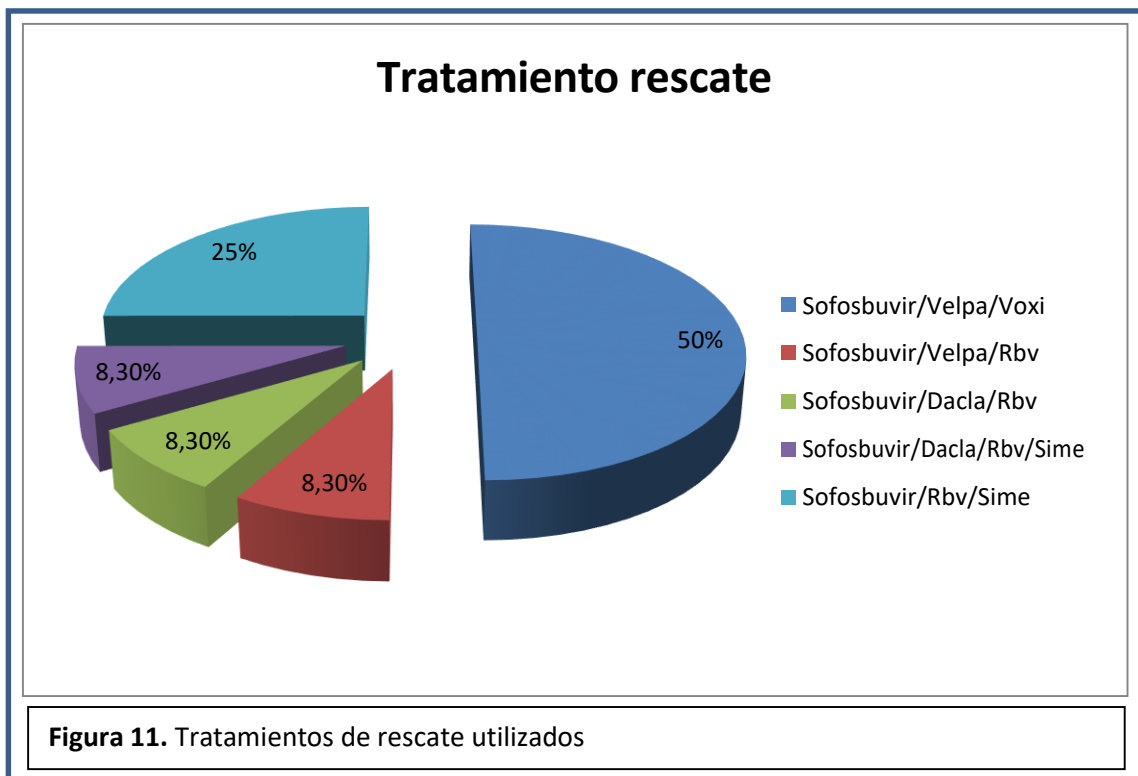
La mayoría de los pacientes que recidivaron eran hombres, infectados con genotipo 3, y sin experiencia previa en tratamiento (Ver características en tabla 11).

Todos recibieron tratamiento de rescate y todos basados en terapias con sofosbuvir. La terapia de rescate más utilizada fue Sofosbuvir/Velpatasvir y Voxilaprevir en 6 pacientes (50%) seguida de la combinación Sofosbuvir/Ribavirina y Simeprevir en 3 (25%). Del total de pacientes rescatados 11 (91.67%) presentaron RVS y uno recidivó. Se utilizaron dos pautas de tratamiento de 12 y 24 semanas en 6 pacientes respectivamente (50%). Las pautas de tratamiento de rescate utilizadas en los 12 pacientes se muestran en la figura 9 y en la tabla 12.

VARIABLES DEMOGRÁFICAS	
Sexo (Hombre/Mujer): n (%)	9 (75%)/3 (25%)
Edad (años): M (DE)	62,21 (10,12)
VARIABLES CLÍNICAS	
Genotipo viral: n (%)	
1a	1 (8,3%)
1b	4 (33,3%)
3	6 (50%)
4	1 (8,3%)
Fibrosis: n (%)	
F0-F1	0
F2	6 (50%)
F3	1 (8,3%)
F4	5 (41,7%)
Historia de tratamiento previo: n (%)	
Biterapia	2 (16,7%)
Triterapia	1 (8,3%)
Naïve	9 (75%)
Respuesta a tratamiento previo: n (%)	
Respondedor parcial	1 (8,3%)
Recidiva	2 (16,7%)
Tratamiento con AADs de 2ª generación	
SFV+LDV	5 (41,7%)
SFV+LDV+RBV	2 (16,7%)
SFV+DCV	5 (41,7%)
Pautas	
12 semanas	10 (83,3%)
24 semanas	2 (16,7%)
Tabla 11. Características basales de los pacientes que presentaron recidiva.	

Todos excepto uno (91,7%) de los pacientes rescatados respondieron al tratamiento. El único paciente del estudio que no consiguió respuesta virológica sostenida tras dos series de tratamiento con AADs de segunda generación era un paciente cirrótico infectado con el

genotipo 1b, con alto nivel de rigidez hepática, que falleció por un hepatocarcinoma multifocal desarrollado año y medio después de finalizar la terapia.



Genotipo	Fibrosis (KPa)	AADs fracaso	Pauta (semanas)	AAD rescate	Pauta (semanas)	Respuesta
1a	F2 (8,6)	SFV+LDV	12	SFV+SMV+RBV	24	RVS
1b	F4 (41,3)	SFV+LDV	24	SFV+SMV+RBV	24	RVS
1b	F4 (75)	SFV+LDV	24	SFV+SMV+RBV	24	Fracaso
1b	F4 (14,3)	SFV+LDV	12	SFV+VELP+VOXI	12	RVS
4	F2 (8,7)	SFV+LDV	12	SFV+VELP+VOXI	12	RVS
1b	F4 (23)	SFV+LDV+RBV	12	SFV+DCV+SMV+RBV	24	RVS
3	F4 (17,1)	SFV+LDV+RBV	12	SFV+DCV+RBV	24	RVS
3	F3 (11,4)	SFV+DCV	12	SFV+VELP+VOXI	12	RVS
3	F2 (7,9)	SFV+DCV	12	SFV+VELP+VOXI	12	RVS
3	F2 (9,1)	SFV+DCV	12	SFV+VELP+VOXI	12	RVS
3	F2 (7,6)	SFV+DCV	12	SFV+VELP+VOXI	12	RVS
3	F2 (8,1)	SFV+DCV	12	SFV+VELP+RBV	24	RVS

Tabla 12. Descripción detallada de las pautas de tratamiento que fracasaron y los tratamientos de rescate utilizados en cada caso.

4.3.1.- Identificación de variantes virales asociadas a resistencia al tratamiento (RAVs).

No se disponía de información de las mutaciones de resistencia a telaprevir y/o boceprevir en ninguno de los 27 pacientes que se trataron con triple terapia. En todos los casos se optó por utilizar AADs dirigidos frente a las actividades NS5A y NS5B, evitando el uso de inhibidores de la proteasa.

Con respecto a los 12 pacientes que recidivaron tras el tratamiento con AADs de segunda generación, se pudo analizar de forma prospectiva en 5 (42%) la selección de mutaciones de resistencia antes del inicio del tratamiento de rescate, utilizando para ello técnicas de secuencian masiva en cuatro casos y secuenciación poblacional de productos de PCR en todos (Tabla 13). En los cuatro pacientes en los que se analizaron las muestras por secuenciación masiva y poblacional se obtuvieron los mismos datos de mutaciones de resistencia, confirmando la fiabilidad de los resultados de la secuenciación poblacional sobre las muestras de fallo virológico. En el resto, el tratamiento de rescate se inició sin disponer de este dato y las mutaciones de resistencia se analizaron de forma retrospectiva sobre la muestra basal del segundo tratamiento, utilizando en todos los casos la técnica de secuenciación poblacional.

Genotipo	Fibrosis (KPa)	Tratamiento primera línea		Tratamiento de rescate		
		AADs	RAVs	AADs	Respuesta	RAVs
1a	F2 (8,6)	SFV+LDV	L31M	SFV+SMV+RBV	RVS	NT
1b	F4 (41,3)	SFV+LDV	Y93H	SFV+SMV+RBV	RVS	NT
1b	F4 (75)	SFV+LDV	Y93H	SFV+SMV+RBV	Fracaso	R155K
1b	F4 (14,3)	SFV+LDV	Y93H	SFV+VELP+VOXI	RVS	NT
4	F2 (8,7)	SFV+LDV	ND	SFV+VELP+VOXI	RVS	NT
1b	F4 (23)	SFV+LDV+RBV	Y93H	SFV+DCV+SMV+RBV	RVS	NT
3	F4 (17,1)	SFV+LDV+RBV	ND	SFV+DCV+RBV	RVS	NT
3	F3 (11,4)	SFV+DCV	Y93H	SFV+VELP+VOXI	RVS	NT
3	F2 (7,9)	SFV+DCV	L31M	SFV+VELP+VOXI	RVS	NT
3	F2 (9,1)	SFV+DCV	Y93H+L31M	SFV+VELP+VOXI	RVS	NT
3	F2 (7,6)	SFV+DCV	Y93H	SFV+VELP+VOXI	RVS	NT
3	F2 (8,1)	SFV+DCV	L31M	SFV+VELP+RBV	RVS	NT

Tabla 13. Distribución de mutaciones de resistencia en los pacientes sin respuesta al tratamiento. En amarillo se reseñan los pacientes en los que se dispuso de la información de RAVS antes del inicio de la terapia de rescate. En azul se muestra un paciente que había sido tratado con telaprevir+IFN+RBV previamente a su inclusión en la cohorte de estudio, y en el que se observaron mutaciones de resistencia a telaprevir. En azul se muestran los datos de RAVs disponibles en el momento de inicio de la terapia de rescate

El análisis de las mutaciones de resistencia reflejó que en la mayoría (11/12; 92%) de los pacientes que recidivaron se observaron mutaciones de resistencia al tratamiento. El único paciente no respondedor sin RAVs detectables correspondía a un caso de mal cumplimiento del tratamiento. De los pacientes tratados con terapia de rescate, 11/12 (92%) consiguieron respuesta virológica sostenida, y únicamente un paciente cirrótico (fibroscan: 75 KPa) no respondió y presentaba en la muestra final mutaciones de resistencia. Este paciente falleció durante el seguimiento por desarrollo de hepatocarcinoma.

4.3.1.1 - Diseño de cebadores específicos para la amplificación de las regiones NS3-proteasa, NS5A y NS5B del VHC.

Con el fin de analizar la identificación temprana de mutaciones de resistencia, se procedió a desarrollar una técnica de PCR en frío para la identificación de las variantes minoritarias portadoras de dichas mutaciones en muestras complejas de ácidos nucleicos.

Los criterios principales para la selección de secuencias de cebadores específicos de las diferentes regiones enzimáticas de interés fueron los siguientes:

A) Selección de las regiones que contienen las mutaciones de resistencia más representativas en regiones esenciales para la actividad enzimática. En base a los resultados de prevalencia de las mutaciones de resistencia en las muestras de recidiva analizadas (ver tabla 13), el análisis se centró en el desarrollo de reacciones de amplificación que permitieran detectar las variantes Y93H y L31M de la región codificante NS5A y la variante R155K de la actividad NS3.

Para determinar si la aparición de mutaciones de resistencia seguía una cinética diferente a la observada en pacientes tratados con antivirales de 1ª generación, se incluyó un grupo de pacientes tratados previamente con telaprevir sin respuesta y se analizó la cinética de aparición de mutaciones en la región NS3. De este modo, además de la variante R155K anteriormente citada, se incluyeron las variantes V36A/M, T54A y A156V/T/S.

B) Selección de las zonas de las secuencias codificantes de cada una de las actividades analizadas que presentaban una mayor homología entre los diferentes genotipos del VHC, especialmente en las regiones de hibridación con los cebadores de la reacción de PCR. Para el análisis de las secuencias de amplificación de la región NS5A se analizaron las homologías de secuencia de los subtipos 1a, 1b y de los genotipos 3 y 4, correspondientes a los genotipos infectantes en los pacientes que recidivaron. En el caso de la región NS3 únicamente se tuvo en cuenta la homología de secuencias de los subtipos 1a y 1b, ya que estos fueron los genotipos tratados con

telaprevir/boceprevir, o con la combinación SFV+SMV+RBV en el paciente que no obtuvo respuesta al finalizar la terapia de rescate.

C) Selección de regiones que tienen baja homología con secuencias de ADN humano. Para ello, se realizó un estudio de homología de secuencia de la región de interés de la NS3 en la base de datos de secuencia no redundante del NCBI.

De acuerdo con los criterios anteriormente mencionados, la secuencia y posición en las regiones codificantes de cada una de las actividades se muestran en la tabla 14.

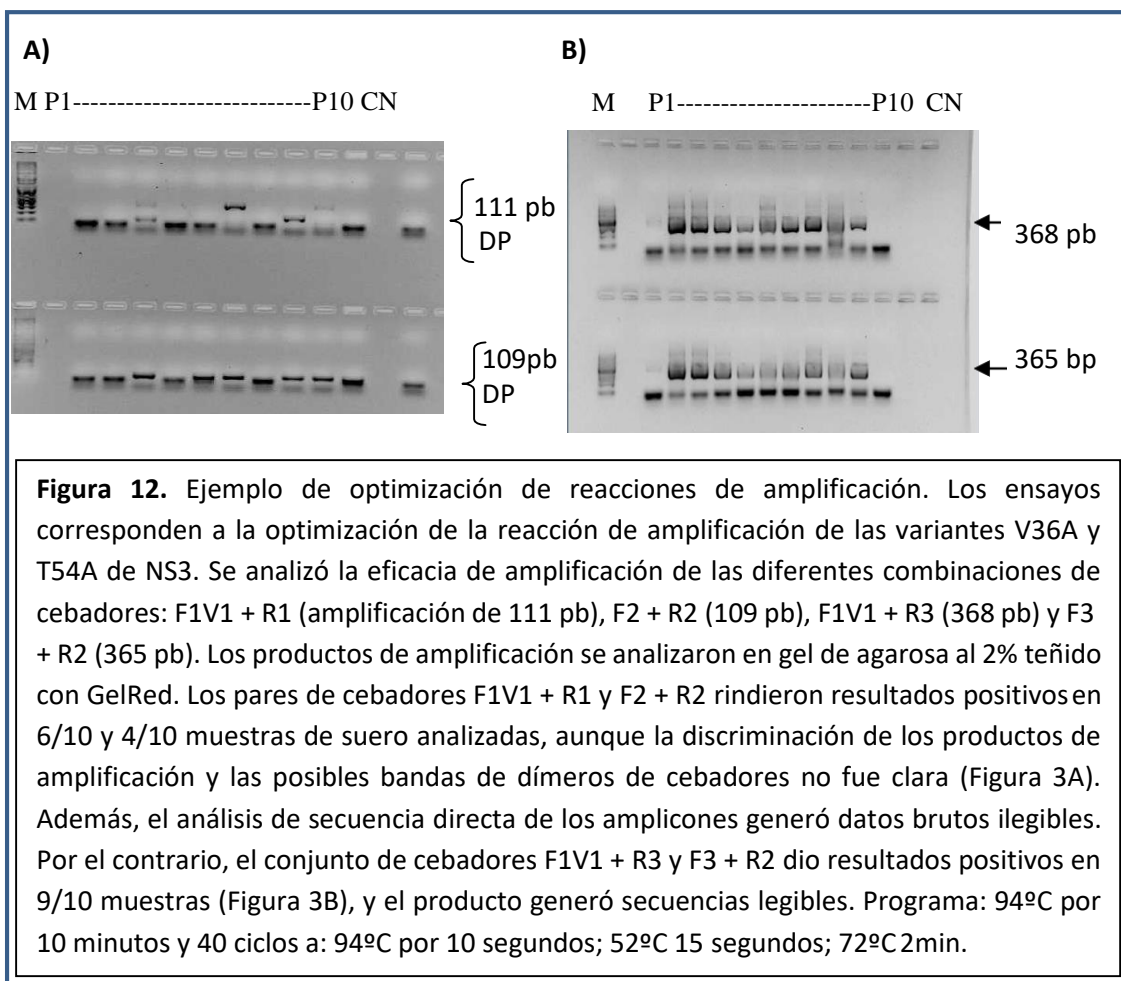
OLIGONUCLEÓTIDOS PARA DETECCIÓN DE VARIANTES L31M DE NS5a				
Primer	Secuencia (5'- 3')	Genotipo	Posición	
G1a FW1	RGTGYTGAGCGAYTTYAA	1a	44-61	1ª PCR
G1a REV1	CGCCAKACCCCYTRTACCCG	1a	143-124	1ª PCR
G1a FW2	AAGACCTGGCTRAARGCCAGC	1a	58-79	Nested
G1a REV2	TACCCGCGYTGCCAGGA	1a	129-112	1ª PCR
G3 FW1	CCGACTTCAARDCATGGCTC	3	50-70	1ª PCR Y Nested
G3 REV1	CCACACGCCCTTGTATCCC	3	141-123	Nested
G3 FW2	GCTCTCYGCTAAGATYATGC	3	66-85	
G3 REV2	ACAGGAAATRAAGGGCAGCCC	3	118-97	
OLIGONUCLEÓTIDOS PARA DETECCIÓN DE VARIANTES Y93H DE NS5a				
G1b FW1	CCTGYAGCAACAYGTGGC	1b	237-254	1ª PCR
G1b REV1	CARCGCCCTRGAATAGTT	1b	331-316	1ª PCR
G1b FW2	CCCYATCAAYGCAYACACC	1b	265-283	Nested
G1b REV2	GGCGCYGGRGAGGGCGTGC	1b	311-294	Nested
G3 FW1	TGTGCWAACATGTGGYACGG	3	239-256	1ª PCR
G3 REV1	GYGCGGAGTGTAGTTGGG	3	329-311	1ª PCR
G3 FW2	TTCCCATCAAYGAGTACAC	3	263-280	Nested
G3 REV 2	RTGGRCAAGGTGTRCTGGGTCC	3	308-287	Nested
OLIGONUCLEÓTIDOS PARA DETECCIÓN DE VARIANTES R155K y A156V/T/S DE NS3				
G1b FW1	GYGCGGAGTGTAGTTGGG	1b	13-33	1ª PCR
G1b REV1	CCGACTTCAARDCATGGCTC	1b	124-144	1ª PCR
G1b FW2	ACAGGAAATRAAGGGCAGCCC	1b	36-57	Nested
G1b REV2	GGCGCYGGRGAGGGCGTGC	1b	101-131	Nested
OLIGONUCLEÓTIDOS PARA DETECCIÓN DE VARIANTES V36A y T54A DE NS3				
G1b FW1	TTCCTCGTGCAAGCGTGGA	1b	10-30	1ª PCR
G1b REV1	ACACCATGTAGTGCTGAGGAGG	1b	105-125	1ª PCR
G1b FW2	CGGAGCGTACCTGTGCARC	1b	8-28	Nested
G1b REV2	TTCCTCGTGCAAGCGTGGA	1b	80-60	Nested

Tabla 14. Secuencia y posición de los cebadores utilizados en las reacciones de cold-PCR. R:A/G), M:A/C, V: No T, W:A/T, S:C/G, K:G/T, Y:C/T, H: no G, B: No A, D: No C.

4.3.1.2. - Optimización de las reacciones de PCR estándar en plasma.

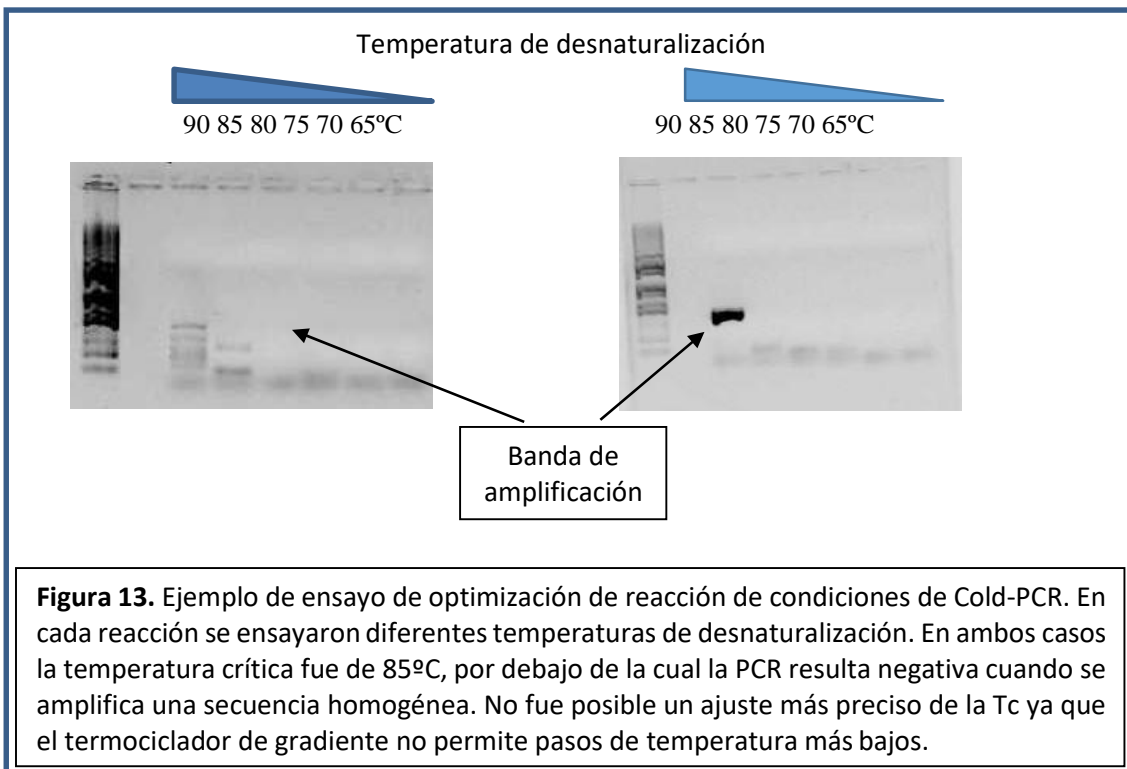
Con el fin de determinar cuál de las combinaciones de *primers* de amplificación rendía mejores resultados para su posterior uso en las reacciones de Cold-PCR, se ensayaron diferentes

combinaciones de cada uno de los diseños. Para la identificación de cada variante en los diferentes genotipos se ensayaron diferentes combinaciones de oligonucleótidos. Para la optimización se utilizaron muestras basales de plasma (Figura 12).



4.3.1.3. - Optimización de las reacciones de Cold-PCR.

Una vez identificadas las reacciones de amplificación más eficientes, se analizaron las temperaturas críticas de desnaturalización (T_c). Para ello se utilizaron como sustrato de amplificación plásmidos que contenían las regiones codificantes completas de los genes NS5A y NS3 de los diferentes genotipos del VHC. Estos plásmidos se amplificaron con las combinaciones de cebadores determinadas previamente en un termociclador de gradiente en el que se ensayaron diferentes temperaturas de desnaturalización (de 90 a 65°C, en saltos de 5°C). Se consideró como temperatura crítica de desnaturalización la más alta en la que se obtenían resultados negativos en la PCR (Figura 13).

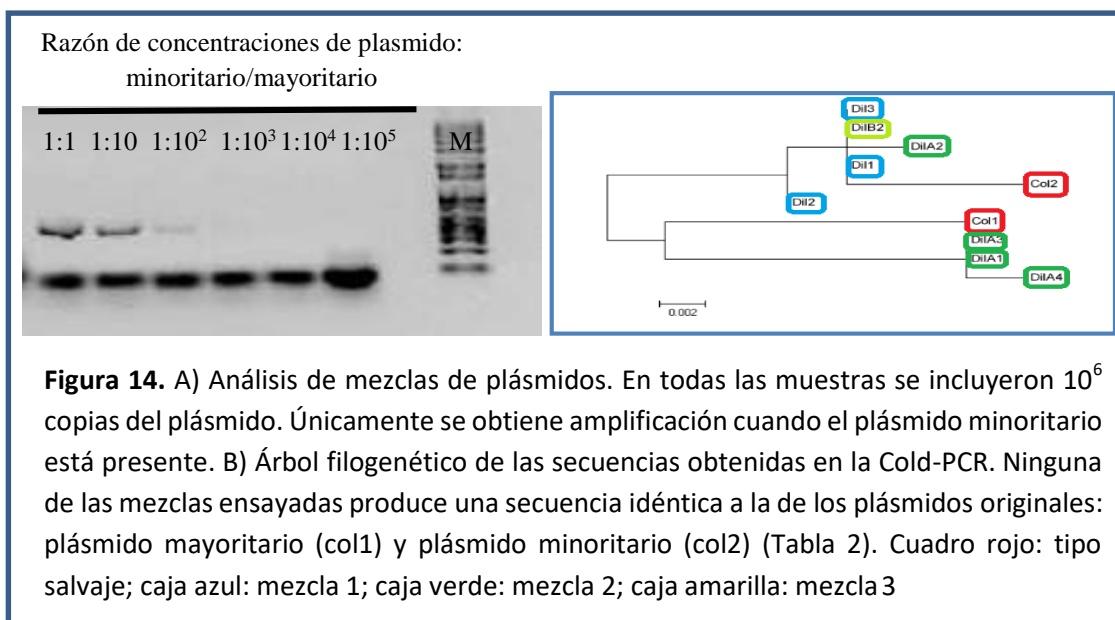


4.3.1.4.- Análisis de la capacidad de amplificación selectiva de secuencias minoritarias de VHC.

Para determinar si la técnica Cold-PCR puede amplificar selectivamente cepas minoritarias de VHC en mezclas complejas de ácido nucleico con la T_c determinada previamente, se realizó un ensayo específico utilizando diferentes mezclas de dos plásmidos que contenían el fragmento NS3 de 458 nucleótidos, que difiere en solo 5 nucleótidos (1,1%). En estos experimentos de amplificación uno de los plásmidos (mayoritario) está siempre a una concentración más alta que el otro (minoritario). Las diferentes mezclas de plásmidos se sometieron a Cold-PCR utilizando las siguientes condiciones: 95°C durante 10 minutos, (94°C durante 30 segundos, 70°C durante 4 minutos, 85°C durante 5 segundos, 52°C durante 2 segundos, 72°C durante 20 segundos) repetidos 40 ciclos. Los amplicones se probaron mediante secuenciación directa para evaluar la capacidad de la PCR en frío para recuperar las cepas minoritarias. El análisis en gel de agarosa del ensayo Cold-PCR mostró que esta técnica requiere la presencia de cantidades adecuadas de las cepas minoritarias para dar resultados positivos. Así, cuando se ensayaron mezclas de plásmidos que contienen altos niveles de la cepa mayoritaria del VHC pero bajos de la cepa minoritaria, no se obtuvieron resultados positivos.

Después de las reacciones de Cold-PCR se realizó una secuenciación directa de los productos y se construyó el árbol filogenético. Como se observa en la figura 14, las secuencias estrechamente

relacionadas con los plásmidos originales incluidos en la mezcla se amplificaron predominantemente, pero en ningún caso fueron exactamente iguales a los plásmidos originales. Esto se explica porque las dos colonias se amplificaron en las mezclas y, dependiendo de la proporción de una base determinada en las secuencias amplificadas, en las secuencias de consenso han aparecido las más frecuentes (Figura 14).



El análisis global de los ensayos Cold-PCR demostró que la técnica permite la recuperación de cepas minoritarias del VHC en una proporción de 1: 100 respectivamente de la concentración de virus presente en la mezcla. Esta capacidad de recuperación puede aumentar a tasas de dilución más altas (1: 1000 y 1: 10000) aunque de una manera no típica (Tabla 15).

Razones de concentración (cepa minoritarian: cepa mayoritaria)					
1:1	1:10	1:100	1:1000	1:10000	< 1:10000
$10^6:10^6$	$10^6:10^5$	$10^6:10^4$	$10^6:10^3$	$10^6:10^2$	$10^6:10$
	$10^5:10^4$	$10^5:10^3$	$10^5:10^2$	$10^5:10$	$10^5:<10$
		$10^4:10^3$	$10^4:10^2$	$10^4:10$	$10^6:<10$

Tabla 15. Resultados de amplificación de especies minoritarias de plásmido. Los números indican las copias de cada plásmido que se incluyen en los viales de reacción. Gris: alta homología de los productos amplificados con la cepa minoritaria; naranja: alta homología con la cepa mayoritaria; negro: resultados negativos de amplificación.

4.3.1.5.- Análisis de prevalencia de mutaciones de resistencia en muestras clínicas.

Una vez optimizadas las diferentes reacciones de Cold-PCR para la identificación de especies minoritarias de las regiones codificantes de NS5a y NS3 se procedió a estudiar las muestras clínicas:

A) Pacientes tratados con AADs de segunda generación incluidos en la cohorte de estudio. Se analizaron las muestras basales y finales de tratamiento de 8 pacientes que recidivaron y de 10 que obtuvieron RVS. En todos los casos se analizaron las muestras por PCR estándar y por Cold-PCR. Además, algunas de las muestras finales de tratamiento se analizaron también por secuenciación masiva.

B) Pacientes tratados con terapia triple basada en TVR pertenecientes a una cohorte independiente. Se incluyeron muestras basales y del tratamiento (de las semanas 4 y 12) de 5 pacientes no respondedores al tratamiento con TVR.

Debido a que la prevalencia de mutaciones de resistencia en muestras basales sin presión selectiva previa por los antivirales es muy baja, todas las muestras se analizaron en 40 reacciones independientes de Cold-PCR. Las reacciones de amplificación se realizaron en presencia de SYBRGreen y los productos amplificados se analizaron mediante curva de desnaturalización. Únicamente las reacciones de amplificación que presentaran desdoblamiento de la curva de desnaturalización -un indicador de la coexistencia de diferentes secuencias de VHC- se analizaron por secuenciación poblacional. En el análisis de resultados, únicamente se contemplaron los cambios correspondientes a las mutaciones de resistencia descritas, y no se tuvieron en cuenta cambios adicionales en otras posiciones.

Los resultados demostraron que el análisis de las muestras finales de recidiva presentaba buenos resultados, con identificación de mutaciones de resistencia en todas las muestras analizadas por secuenciación masiva y por PCR estándar y secuenciación poblacional. Asimismo, 10/13 (77%) de las muestras de recidiva analizadas por Cold-PCR dieron resultados positivos.

Con respecto a las muestras basales, solo la técnica de Cold-PCR permitió identificar mutaciones de resistencia en 8/13 (61%) de los pacientes recidivantes [5/8 (62%) de los pacientes tratados con AADs de 2ª generación y 3/5 (60%) de los tratados con triple terapia] y en 1/10 (10%) de los pacientes con respuesta virológica sostenida. Las muestras basales no se analizaron por secuenciación masiva (Tabla 16).

Pacientes	Genotipo	Tto	Técnica	Muestra basal		Muestra final		
				%	Secuenciación	%	Secuenciación	
					Poblacional		Poblacional	Masiva
Recidiva	1a	SOD/LDV	PCR-Std	100%	No MR	97%	L31M	L31M
			Cold-PCR	88%	L31M	98%	L31M	
	1b	SOD/LDV	PCR-Std	96%	No MR	100%	Y93H	ND
			Cold-PCR	72%	Y93H	78%	Y93H	
	1b	SOD/LDV	PCR-Std	99%	No MR	100%	Y93H	ND
			Cold-PCR	100%	Y93H	100%	Y93H	
	1b	SOD/LDV+RBV	PCR-Std	100%	No MR	100%	Y93H	Y93H
			Cold-PCR	30%	No MR	45%	ND	
	1b	SOF/SMV+RBV	PCR-Std	100%	No MR	98%	R155K	ND
			Cold-PCR	66%	R155K	100%	R155K	
	3	SOF+DCV	PCR-Std	100%	No MR	100%	L31M	ND
			Cold-PCR	88%	L31M	95%	L31M	
	3	SOF+DCV	PCR-Std	100%	No MR	100%	Y93H	Y93H
			Cold-PCR	55%	No MR	100%	Y93H	
3	SOF+DCV	PCR-Std	100%	No MR	100%	L31M+Y93H	ND	
		Cold-PCR	45%	No MR	50%	ND		
RVS	1a (2pacientes)	SOD/LDV	PCR-Std	100%	No MR	ND	ND	ND
			Cold-PCR	75%	No MR			
	1b (5pacientes)	SOD/LDV	PCR-Std	100%	No MR			
			Cold-PCR	88%	L31M			
	3 (3pacientes)	SOF+DCV	PCR-Std	98%	No MR			
			Cold-PCR	97%	No MR			
PACIENTES TRATADOS CON TRIPLE TERAPIA NO RESPONDADORES								
Recidiva	1b	triple terapia	PCR-Std	100%	No MR	100%	V36A	ND
			Cold-PCR	87%	V36A	89%	V36A	
	1b	triple terapia	PCR-Std	99%	No MR	100%	T54A	
			Cold-PCR	88%	T54A	85%	T54A	
	1b	triple terapia	PCR-Std	100%	No MR	100%	V36A	
			Cold-PCR	80%	V36A	78%	V36A	
	1b	triple terapia	PCR-Std	100%	No MR	100%	T54A	
			Cold-PCR	55%	No MR	86%	T54A	
	1b	triple terapia	PCR-Std	94%	No MR	96%	T54A	
			Cold-PCR	50%	No MR	45%	No MR	

Tabla 16. Detalle de los análisis comparativos de las mutaciones de resistencia utilizando diferentes métodos de análisis en muestras basales y finales de tratamiento. En azul se señalan las muestras analizadas con Col-PCR. En amarillo las muestras que resultaron positivas para la presencia de mutaciones de resistencia. No MR: mutaciones de resistencia no detectables; ND: no determinado. El análisis de las muestras basales de los pacientes que obtuvieron RVS se muestra agrupado. Únicamente en 1 de los 10 pacientes de este grupo se detectó mutaciones de resistencia.

El análisis secuencial de mutaciones en las muestras de seguimiento de los pacientes tratados con triple terapia demostró un incremento paulatino del porcentaje de variantes resistentes: 3/5 (60%) de las muestras analizadas por Cold-PCR fueron positivas en la muestra basal, descendiendo el porcentaje a 2/5 (40%) a las 4 semanas de tratamiento, simultáneamente a un descenso en el rendimiento de las reacciones de amplificación, e incrementando finalmente a 4/5 (80%) en las muestras de semana 12 y 24 de tratamiento. De forma similar, las muestras analizadas por PCR convencional fueron negativas para mutaciones de resistencia en las muestras basal y de 4 semanas, comenzando a obtener resultados positivos 2n 2/5 (40%) en las muestras de la semana 12 para ser finalmente positiva en todas las muestras de la semana 24 (Tabla 17).

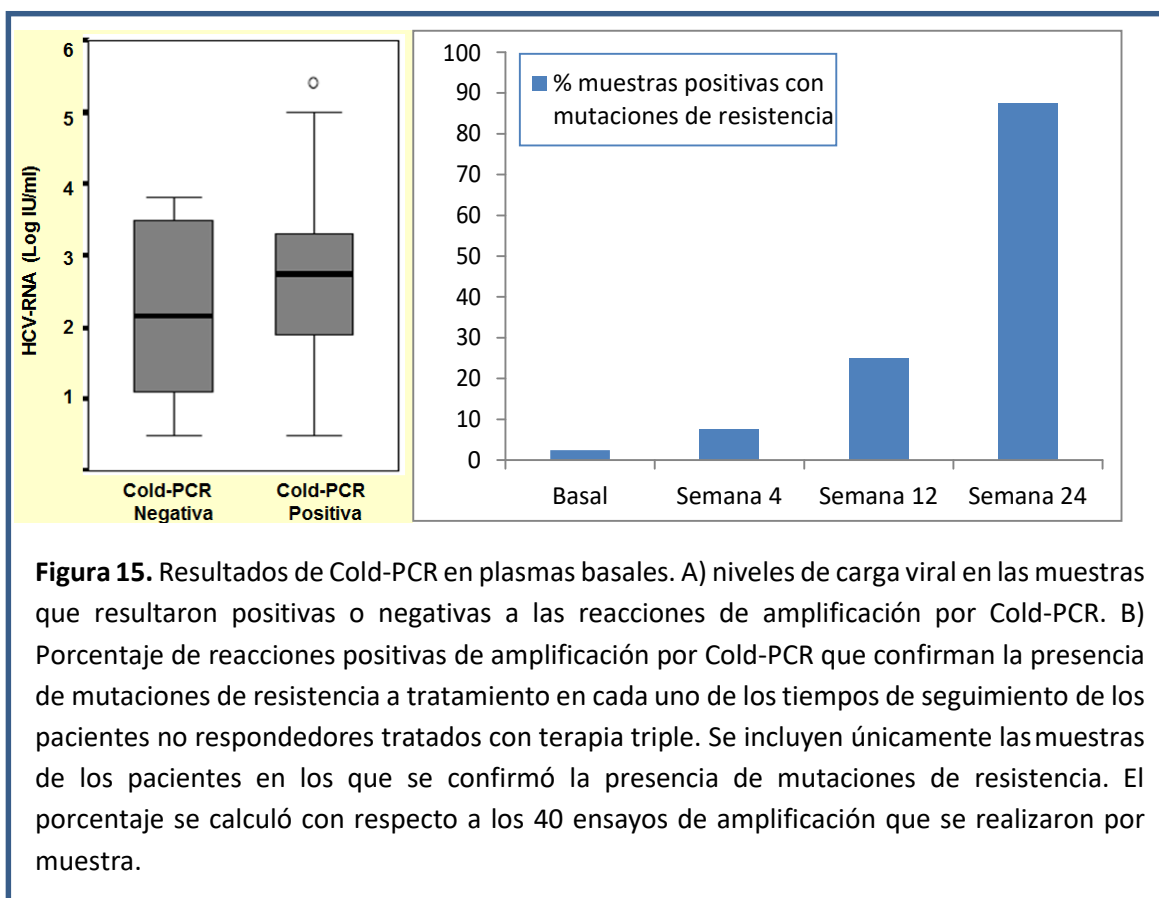
Paciente	Análisis	Muestra basal		Semana 4		Semana 12		Semana 24	
		Positivos	RAVs	Positivos	RAVs	Positivos	RAVs	Positivos	RAVs
1	PCR-Std	100%	No MR	76%	No MR	86%	No MR	100%	V36A
	Cold-PCR	87%	V36A	70%	V36A	75%	V36A	89%	V36A
2	PCR-Std	99%	No MR	80%	No MR	92%	T54A	100%	T54A
	Cold-PCR	88%	T54A	67%	T54A	70%	T54A	85%	T54A
3	PCR-Std	100%	No MR	75%	No MR	85%	No MR	100%	V36A
	Cold-PCR	80%	V36A	60%	No MR	75%	V36A	78%	V36A
4	PCR-Std	100%	No MR	86%	No MR	86%	No MR	100%	T54A
	Cold-PCR	55%	No MR	50%	No MR	50%	T54A	86%	T54A
5	PCR-Std	94%	No MR	90%	No MR	90%	T54A	96%	T54A
	Cold-PCR	50%	No MR	45%	No MR	45%	No MR	45%	No MR

Tabla 17. Resultado del análisis secuencial de muestras de los pacientes no respondedores a terapia triple tomadas a diferentes tiempos del tratamiento. En azul se señalan las muestras analizadas con Cold PCR. En amarillo las muestras positivas para la presencia de mutaciones de resistencia. No MR: mutaciones de resistencia no detectables; ND: no determinado.

Uno de los factores que más influyeron en el rendimiento de las reacciones de Cold-PCR es el nivel de la carga viral. Se observó como el rendimiento de dicha estrategia disminuyó en la semana 4 de tratamiento, momento en el que la cifra de ARN-VHC está en un nivel más bajo.

Finalmente, el aspecto más significativo del análisis seriado de las muestras de seguimiento de los pacientes tratados con triple terapia fue el de que el rendimiento relativo de las reacciones de Cold-PCR fue paulatinamente mayor: en las muestras basales -sin presión selectiva por tratamiento y con variantes minoritarias predeciblemente en baja proporción- el número de reacciones de Cold-PCR con resultado positivo en los 40 ensayos realizados fue muy bajo (Figura

15). Esta proporción se fue incrementando en las muestras de seguimiento en las que la carga viral desciende y se seleccionan las variantes de resistencia hasta ser prácticamente del 100% en las muestras finales en las que se verifica el fracaso al tratamiento antiviral.



En definitiva, las reacciones de Cold-PCR permiten identificar mutaciones de resistencia en muestras basales de tratamiento, aunque con unos valores predictivos moderados y requiriendo el análisis de un número de reacciones de amplificación muy elevado (al menos 40 reacciones) por muestra. La potencial utilidad de la técnica se sitúa en el análisis de emergencia de mutaciones durante el tratamiento, cuando el número de reacciones por muestra desciende notablemente. Finalmente, la técnica de Cold-PCR pierde su función al analizar las muestras de recidiva en las que la alta prevalencia de secuencias mutantes seleccionadas durante el tratamiento hace que las reacciones de PCR estándar sean suficientes para su detección.

4.4.- ANÁLISIS DE LA CINÉTICA DE ACLARAMIENTO DEL ARN-VHC EN PLASMA Y CMSPs.

Para analizar la cinética de aclaramiento del genoma viral en plasma y CMSPs se incluyeron 32 pacientes (12 tratados con telaprevir y 10 tratados con PEG-IFN + RBV y 10 pacientes de la cohorte principal de este estudio tratados con AADs de última generación). En 22 casos (9 tratados con TVR, 3 tratados con PEG-IFN+RBV y los 10 tratados con AADs se consiguió RVS; los restantes 10 pacientes fueron no respondedores. En todos los casos se disponía de al menos dos muestras de plasma y CMSPs. Con el fin de analizar las relaciones filogenéticas de las secuencias virales detectadas en plasma y en CMSPs se procedió a amplificar regiones más amplias que las analizadas en el caso del análisis de mutaciones de resistencia, correspondientes a diferentes regiones codificantes del virus. Para ello se diseñaron nuevos cebadores para las reacciones de amplificación (tabla 18).

4.4.1.- Cinética de aclaramiento en pacientes tratados con PEG-IFN+RBV.

En las muestras basales, todos los pacientes fueron positivos al genoma viral en plasma y 9 (90%) en CMSPs. Al finalizar el tratamiento, todos los pacientes habían negativizado el genoma viral en plasma y en 3 (30%) persistía positivo en CMSPs. Finalmente, tras el seguimiento de 24 semanas post-tratamiento, el ARN-VHC permanecía aun detectable en las muestras de linfocitos de 2 (20%) pacientes.

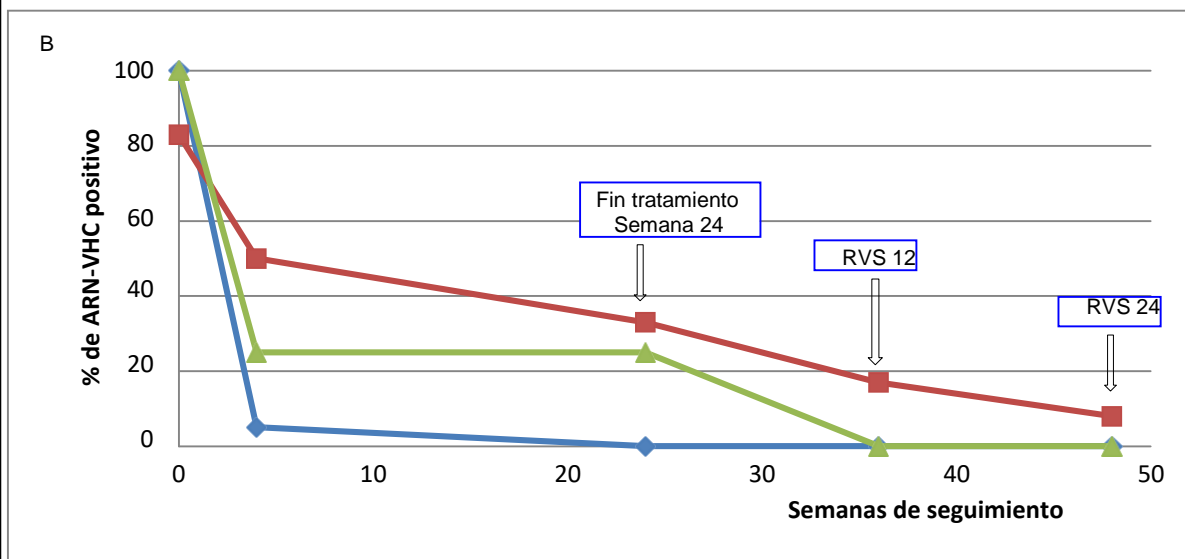
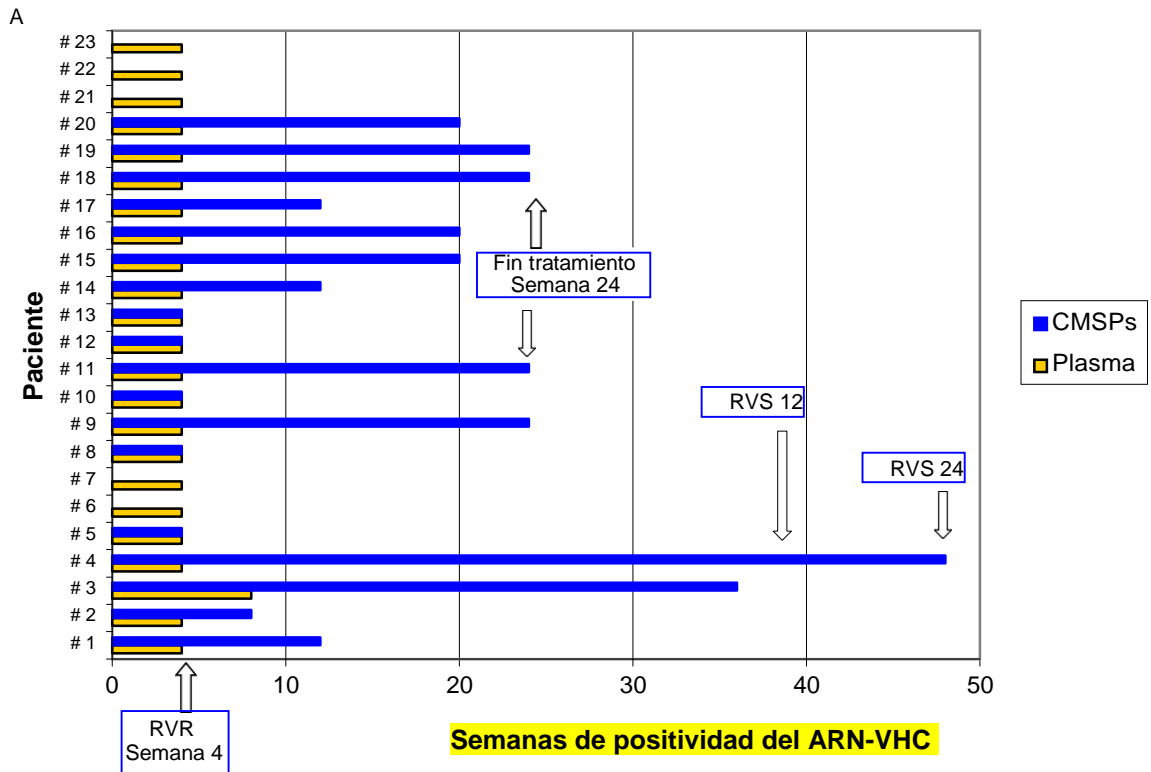
4.4.2.- Cinética de aclaramiento en pacientes tratados con telaprevir.

En todas las muestras basales de plasma se detectó el ARN-VHC frente a únicamente 9/10 (75%) de las muestras de CMSPs. Sin embargo, durante el seguimiento se produjo una negativización temprana del genoma viral en todos los pacientes analizados. Por el contrario, el ARN-VHC en CMSPs persistió en algunos de los pacientes en ausencia de viremia en plasma. En 4 (33%) de estos pacientes el ARN-VHC en las CMSPs se mantuvo durante un largo periodo de tiempo, hasta finalizar el tratamiento, como único compartimento con genoma viral detectable (en 1 paciente durante 16 semanas, en 2 durante 24 semanas y durante 48 semanas, el paciente restante). Especialmente importante es el hecho de que en 3 de los pacientes con mayor tiempo de detección del ARN vírico en CMSPs, este marcador fue detectable en la semana en que se verificaba la RVS (Figura 16).

OLIGONUCLEÓTIDOS DE AMPLIFICACIÓN PARA LA REGIÓN NS5A			
Nombre	Secuencia (5'- 3')	Genotipo	Reacción
1-NS5A G1A FW	CAGCCTCACYGTRACCCAGCTCC	1a	1ª PCR
5-NS5A G1A REV	GGACCTGGCACGGGCATTT	1a	1ª PCR Y Nested
3-NS5A G1A FW	TRCACCAGTGGATAAGCTCGGA	1a	Nested
1-NS5A G1B FW	TCCTCTCCAGCCTTACCATCACTC	1b	1ª PCR
5-NS5A G1B REV	CGGAGCGTACCTGTGCARC	1b	1ª PCR Y Nested
3-NS5A G1B FW	CTGYTGAAGAGGCTCCACCAGTG	1b	Nested
1-NS5A G3A FW	CTAACTGTCACAAGYCTGCTCC	3a	1ª PCR
2-NS5A G3A REV	CCTCYCTTAACAGGGGCTTRCA	3a	1ª PCR
3-NS5A G3A FW	GGCGYTTRCACCAGTGGA	3a	Nested
4-NS5A G3A REV	TGGAGGGGCGTAACGGTG	3a	Nested
OLIGONUCLEÓTIDOS DE AMPLIFICACIÓN PARA LA REGIÓN NS5B			
Nombre	Secuencia (5'- 3')	Genotipo	Reacción de amplificación
1-NS5B G1A FW	TACTCACCAGGACAGCGGGTTG	1a	1ª PCR
2-NS5B G1A REV	GGTTGTAGGGTCACGGGTRAGG	1a	1ª PCR
3-NS5B G1A FW	TTCCTCGTGCAAGCGTGGA	1a	Nested
4-NS5B G1A REV	GTAGACCCTYTTTCCAGCRCC	1a	Nested
1-NS5B G1B FW	GTCTCCACCCTYCCTCAGGC	1b	1ª PCR
2-NS5B G1B REV	CATAGCCTCCGTGAAGACTCGTAG	1b	1ª PCR
3-NS5B G1B FW	CGTGATGGGCTCCTCATACGG	1b	Nested
4-NS5B G1B REV	GCTTGCCGCGTCTCYTG	1b	Nested
1-NS5B G3A FW	TTGACCGGCGCCYTGATA	3a	1ª PCR
2-NS5B G3A REV	GTAGGAGTAGGCAAAGCAGCAAAA	3a	1ª PCR
3-NS5B G3A FW	ACACCATGTAGTGCTGAGGAGG	3a	Nested
4-NS5B G3A REV	GGTTCCGGGCACGYGACAC	3a	Nested

Tabla 18. Oligonucleótidos utilizados en la amplificación de los genes NS5A/NS5B. Se indica el tipo de reacción de amplificación, su secuencia nucleotídica, y el

Figura 16. Perfil de aclaramiento de ARN-VHC en plasma y CMSPs. A) Diagrama individualizado de la persistencia del ARN-VHC en plasma y CMSPs de los pacientes tratados con telaprevir e IFN+RBV. B) Datos globales de la cinética de aclaramiento del ARN-VHC en ambos compartimentos, expresados como el porcentaje de muestras positivas en cada fase del seguimiento. La caída de la positividad en plasma es muy acusada y ocurre en la semana 4, mientras que en linfocitos la disminución en los porcentajes de positividad es mucho más suave.



4.4.3.- Cinética de aclaramiento en pacientes tratados con AADs de segunda generación.

El ARN-VHC se detectó en todas las muestras de plasma y en 7/10 (70%) de las muestras basales de CMSPs, porcentajes similares a los encontrados en los pacientes tratados con telaprevir. Si bien en este grupo de pacientes no se pudo analizar la cinética de aclaramiento del VHC durante el tratamiento (por no disponer de muestras de ese periodo), sí se pudo analizar la prevalencia del ARN-VHC en las muestras finales del tratamiento y en las de seguimiento. Al contrario de lo que se observó en los pacientes tratados con TVR, el ARN viral fue detectable en únicamente 1/10 (10%) de las muestras del final del tratamiento.

4.4.4.- Análisis filogenético de las cepas de VHC aisladas de plasma y CMSPs.

Con el objeto de determinar si las cepas de VHC detectadas en plasma y CMSPs son idénticas entre sí en cada paciente, y en consecuencia la positividad en linfocitos puede ser interpretadas como una contaminación de virus plasmático circulante o se trata de cepas filogenéticamente diferentes, se procedió a realizar secuenciación poblacional de los productos amplificados de ARN-VHC de muestras pareadas de plasma y CMSPs. Se analizó la secuencia codificante de la región NS3 de en 6 muestras basales de pacientes que posteriormente fueron tratados con telaprevir y la región NS5A de 3 pacientes tratados con Harvoni. El análisis filogenético de ambas regiones rindió resultados diferentes.

Las secuencias de la región NS53 demostraron una gran dispersión entre cepas de VHC de plasma y CMSPs (Figura 17). Así, en ningún paciente se observó que las secuencias de ambos compartimentos se agruparan en la misma rama del árbol filogenético. Por el contrario, lo que se pudo verificar fue la segregación de las secuencias de plasma y CMSPs en dos ramas diferentes, con una probabilidad del 100% en el análisis *bootstrap* de 500 replicaciones. Así, en una de las ramas, que se ha denominado “rama linfotrópica”, 5/7 (71%) de las secuencias procedían de muestras de CMSPs. Por el contrario, en la rama plasmática la mayoría de las secuencias [4/5 (80%)] eran de origen plasmático. Estos resultados sugieren que efectivamente, las cepas aisladas en ambos compartimentos son claramente diferentes y no indican que su detección en muestras de CMSPs proceda de contaminación de partículas circulantes en plasma.

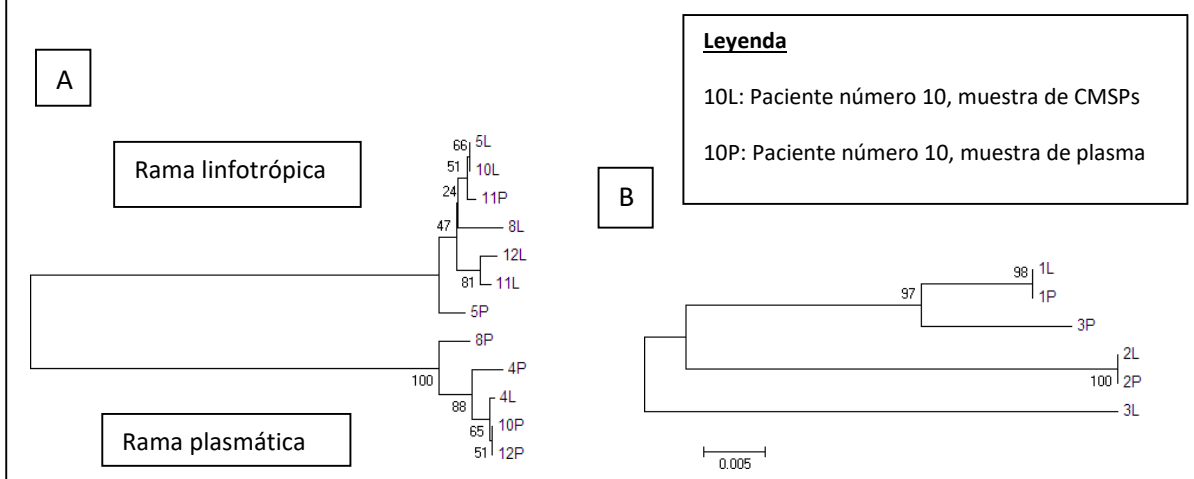
El análisis de los 3 pacientes en los que se estudió la región codificante NS5B fue diferente (Figura 6B). En este caso, en 2 de los pacientes las secuencias de linfocitos y plasma eran idénticas y se agrupaban juntas. Por el contrario, en el tercer paciente, se confirmaba una segregación clara de las secuencias de plasma y CMSPs. Una posible explicación de las diferencias encontradas entre ambos análisis de secuencias estaría en el nivel de conservación de dichas secuencias. Así,

el porcentaje de homología de la región NS5B correspondiente a la actividad polimerasa viral es mayor que la de la región NS3-proteasa.

4.4.5.- Análisis de la evolución de secuencias virales en CMSPs.

Los resultados del análisis comparativo de secuencias de ARN-VHC extraídas de plasma y CMSPs sugieren que las cepas identificadas en CMSPs no proceden de una contaminación de partículas virales circulantes. Sin embargo, no se puede descartar que dichas secuencias correspondan a partículas virales adheridas a la membrana plasmática del linfocito con anterioridad a la toma de la muestra. Con el fin de determinar si las cepas linfotrópicas de ARN-VHC tienen realmente funcionalidad se procedió a realizar un estudio longitudinal dinámico para estudiar la evolución de las secuencias de VHC de las CMSPs en cada paciente (Figura 17).

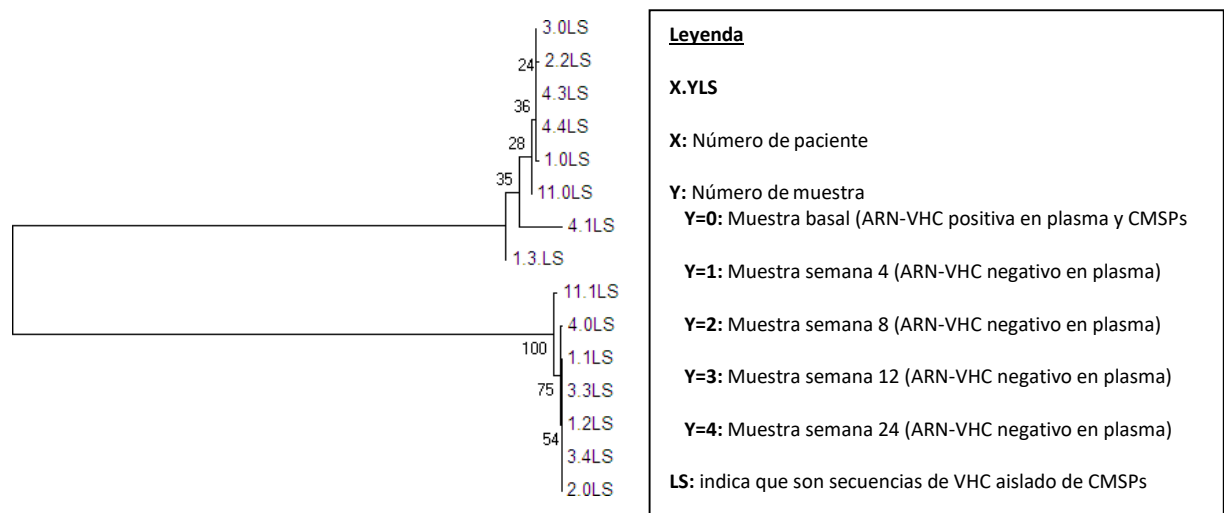
Figura 17. Análisis filogenético de, A) región codificante de la actividad NS3-proteasa viral y B) de la región NS5B de muestras pareadas de plasma y CMSPs tomadas antes del inicio de tratamiento antiviral. En el caso de la región NS3 se comprobó la segregación de secuencias de plasma y CMSPs en dos brazos independientes. Por el contrario, la región NS5B -más conservada que la NS3- muestra segregación de ambas poblaciones en únicamente un paciente (#3). Método estadístico: Neighbor-Joining. Método *bootstrap* (500 replicaciones). Los números en las ramas indican el porcentaje de árboles en que dicha rama aparece.



Se analizaron 15 muestras de CMSPs de 5 pacientes. En todos los casos se incluyó una muestra basal tomada en el momento en que el ARN viral era detectable en plasma, y muestras adicionales de CMSPs tomadas en diferentes tiempos.

El análisis de las secuencias de CMSPs demostró que hay cambios importantes en las secuencias virales en el tiempo (Figura 17). Así, en ningún caso todas las secuencias de un mismo paciente se agruparon en una misma rama. Sin embargo, el nivel de cambio del VHC detectable en CMSPs es diferente entre las muestras basales (cuando el VHC era positivo en plasma) y las respectivas muestras de seguimiento (negativas al VHC plasmático) (distancia genética (media + DE): 0,88 + 0,30), que entre las muestras de seguimiento de cada paciente (distancia genética (media + DE): 0,28 + 0,45) (Figura 18). Estos datos indican una ralentización de la diversificación de secuencias de VHC durante el periodo de tiempo en que el ARN-VHC permanece indetectable en plasma, aunque no significa que dicha evolución desaparezca completamente: si bien solo en 2/5 (20%) pacientes (#1 y #4) se produjo una evolución de secuencias virales durante el seguimiento de negatividad del genoma en plasma, los valores alcanzados de distancia genética son de los más altos observados en el análisis filogenético, y tienen lugar entre 4 y 12 semanas después de la indetectabilidad del ARN-VHC en plasma.

Figura 18. Análisis filogenético de la región codificante de la actividad NS3-proteasa durante el tratamiento con telaprevir en cinco pacientes. Se incluyeron muestras basales y muestras de seguimiento. En dos pacientes (#1 y #4) se observó diferenciación de las secuencias durante el seguimiento. Método estadístico: Neighbor-Joining. Método *bootstrap* (500 replicaciones). Los números en las ramas indican el porcentaje de árboles en que dicha rama aparece.



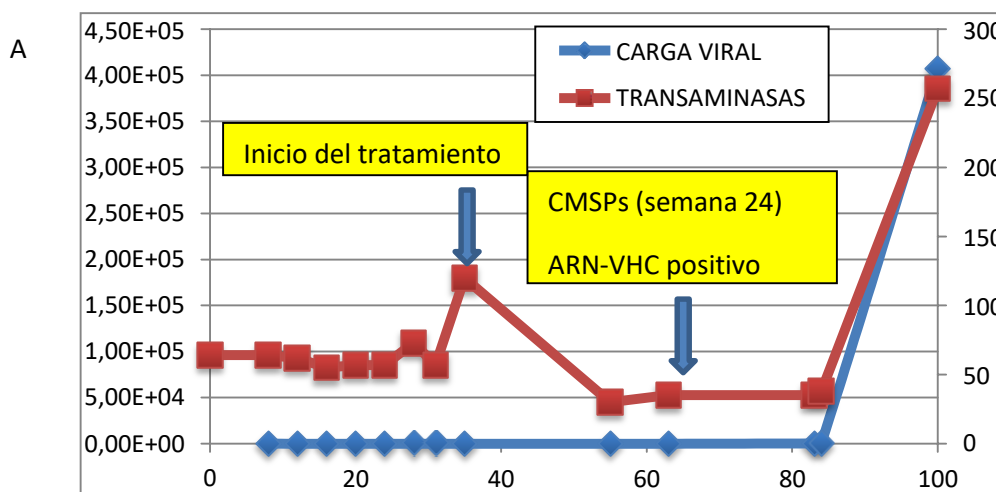
4.4.6.- Análisis de pacientes respondedores tardíos.

Para determinar si la persistencia de secuencias del VHC en CMSPs juega algún papel en la reactivación tardía de la infección en pacientes curados, se estudiaron tres pacientes tratados

con telaprevir con recaída de la infección. En la Figura 19A se muestran las características clínicas y epidemiológicas de los 3 pacientes.

La reactivación virológica ocurrió entre 6 y 15 meses después de verificarse la RVS24 (ver figura 19B). En dos pacientes se disponía de muestras de linfocitos tomadas en la semana 24 post-tratamiento, en el momento en que se dio de alta a los pacientes. El análisis filogenético del ARN de las muestras basales y de la primera muestra tras la recaída demostró que ambas secuencias eran idénticas, lo que permitió concluir que se trataba de recaídas en los tres casos y no de reinfecciones. Por último, el análisis del ARN-VHC en CMSPs confirmó también la positividad.

Figura 19. A) Características clínicas y tratamientos administrados a los tres pacientes que sufrieron recaída tardía de la infección. B) Esquema de evolución de la viremia de uno de los pacientes con recidiva. Se observó una reactivación en la semana 82, acompañada de una exacerbación de los niveles de transaminasas.



B

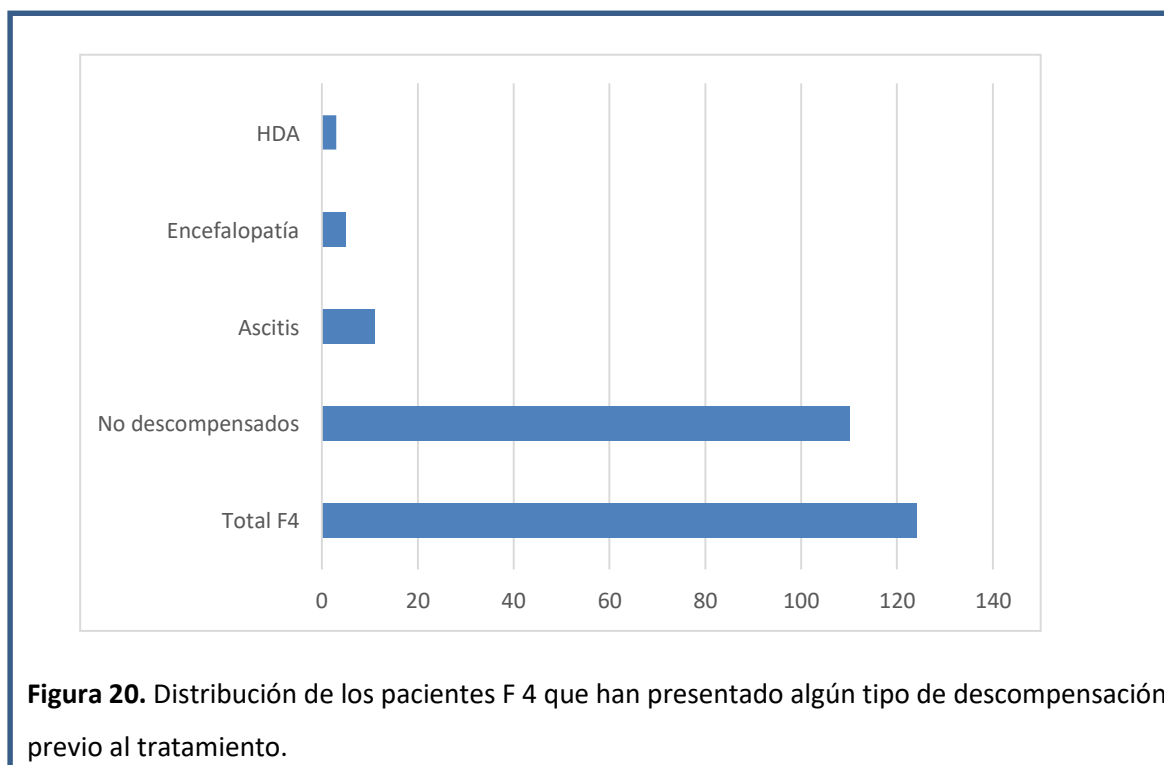
Genotipo viral	Fibrosis	Pauta de tratamiento
1a	F4	4 semanas BOC+PegIFN+RBV y 4 semanas PegIFN+RBV
1b	F3	12 semanas TVR+PegIFN+RBV y 24 semanas PegIFN+RBV
1b	F2	12 semanas TVR+PegIFN+RBV y 12 semanas PegIFN+RBV

4.5 ANÁLISIS DE DESCOMPENSACIONES PRE Y POST-TRATAMIENTO.

4.5.1.- Descompensación hepática.

Del total de pacientes estudiados se analizaron las descompensaciones que habían presentado los pacientes con F4 tanto previo al inicio de tratamiento como posterior al mismo.

De los 124 pacientes 110 (88.70%) no presentaron ningún tipo de descompensación previamente. De los pacientes que si presentaron algún episodio de descompensación 11 (8.87%) presentaron ascitis, 5 (4.03%) encefalopatía hepática y 3 (2.41%) hemorragia digestiva por varices esófago-gástricas. Alguno de los pacientes presentó más de un tipo de descompensación.



Tras recibir tratamiento de los 14 pacientes que habían presentado algún tipo de descompensación únicamente 2 (14,29%) presentaron un nuevo episodio de descompensación, uno de ellos en forma de encefalopatía hepática y otro como ascitis. Otro paciente recibió posteriormente al tratamiento un trasplante hepático.

De los 124 pacientes 11 (8.87%) presentaron descompensación posterior al tratamiento sin haber presentado previamente ningún tipo de descompensación. De los pacientes que si presentaron descompensación 4 (3.22%) presentaron ascitis, 6 (4.84%) episodio de hemorragia digestiva secundaria a varices esófago gástricas, 2 (1.61%) algún episodio de encefalopatía

hepática, 3 (2.43%) trombosis portal. Alguno de los pacientes presentó más de un tipo de descompensación.

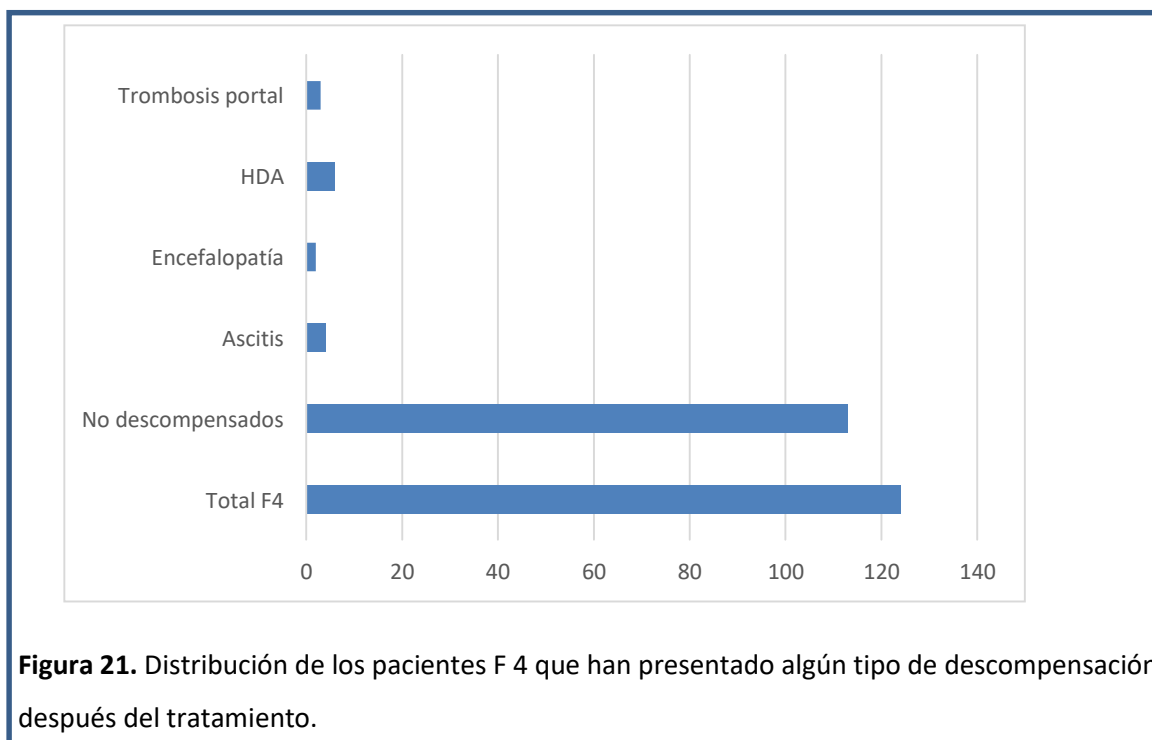


Figura 21. Distribución de los pacientes F 4 que han presentado algún tipo de descompensación después del tratamiento.

4.5.2.- Análisis de la fibrosis y función hepática en pacientes F4

Del total de pacientes estudiado se revisaron los pacientes F4 para comprobar la evolución que había presentado la fibrosis hepática, se recogieron un total de 124 pacientes y se analizó tanto el APRI, FIB-4 y Fibroscan de todos ellos al menos un año tras finalizar el tratamiento. También se analizó el MELD previo al tratamiento y posterior. Para el cálculo tanto del APRI como del FIB-4 se recogieron datos analíticos como GOT, GPT y plaquetas. Para el cálculo del MELD se recogieron datos como bilirrubina total, creatinina e INR. A continuación se exponen los datos previos al tratamiento en la tabla 19.

Variables M (DE)	Previo al tto.	Posterior al tto.	P
GOT	88,42 (55,53)	30,92 (19,85)	<0.01
GPT	88,10 (60,36)	25,50 (20,31)	<0.01
Plaquetas	138,81 (74,85)	147, 20 (70,66)	0.365
APRI	2,35 (1,88)	0,70 (0,91)	<0.01
FIB-4	5,65 (4,00)	3,46 (2,59)	<0.01

Tabla 19. Datos analíticos y marcadores de fibrosis APRI y FIB-4 de los pacientes F 4 previo y posterior al tratamiento.

Variables M (DE)	Previo al tto.	Posterior al tto.	P
Bilirrubina Total	1,02 (0,61)	0,91 (0,62)	0.035
Creatinina	1,14 (0,90)	1,14 (0,62)	0.675
INR	1,06 (0,33)	1,09 (0,31)	0.724
MELD	8,88 (3,40)	8,66 (3,57)	0.623

Tabla 20. Datos analíticos y escala MELD en pacientes F4 previo al tratamiento y posterior al tratamiento.

Respecto a la evolución de la fibrosis hepática medida por FibroScan se recogieron datos de 59 pacientes F 4 (47,60 %). Se objetivó tras al menos un año después de haber finalizado el tratamiento que la media de Kpa 16,80 (DE 13,92) siendo la distribución de la fibrosis de la siguiente forma: F0-F1: 8 (13,56%), F2: 14 (23,73%), F3: 8 (13,56%) y F4: 29 (23,4%). La media de Kpa en la población F4 previo al tratamiento era de 24 (DE 14,39), si lo comparamos con los datos de fibrosis tras tratamiento presenta una disminución de fibrosis estadísticamente significativa ($p < 0.01$)

4.5.3.- Análisis del desarrollo de hepatocarcinoma y tumores extrahepáticos.

Se recogieron la aparición de hepatocarcinomas en los pacientes F4. Se tuvieron en cuenta aquellos pacientes que lo presentaban previamente y los que lo presentaron posterior al tratamiento. Del total de 124 pacientes F4 el 16.12 % (13) presentaron o bien previo o posterior al tratamiento hepatocarcinoma (Tabla 21).

Hepatocarcinoma	N=13
Hombre	10 (76,9%)
Mujer	3 (23,1%)
Edad media MEDIA (DE)	66,53 (9,31)
Aparición:	
Previo tratamiento	3(23.1%)
Posterior tratamiento	10 (76.9%)
Genotipo:	
1b	10 (76,9%)
1a	1 (7.7%)
3	2 (15,4%)
Tratamiento VHC	
Sofosbuvir+Ledipasvir	7 (53,8%)
Sofosbuvir+Ledipasvir+RBV	2 (15.4%)
Sofosbuvir+Daclatasvir	1 (7.7%)
Sofosbuvir+Daclatasvir+RBV	1 (7.7%)
Sofosbuvir+Simeprevir+RBV	1 (7.7%)
Ombitasvir+Paritavir+Ritonavir+Dasabuvir	1 (7.7%)

Tabla 21. Características de los pacientes que desarrollaron CHC.

Un total de 10 pacientes desarrollaron tumores extrahepáticos durante el seguimiento.

Tumores extrahepáticos	N=10
Sexo:	
Hombre	5 (50%)
Mujer	5 (50%)
Edad media MEDIA (DE)	66,40 (12,50)
Tipo tumores	
Hematológicos	
Linfoma	2 (20%)
Mieloma múltiple	1 (10%)
Mielofibrosis	1(10%)
Digestivos:	
Ca. Colon	2 (20%)
Ca. Gastrico	2 (20%)
Urológicos:	
Ca Vesical	1 (10%)
Respiratorio:	
Ca Pulmon	1 (10%)
Genotipo:	
1b	9 (90%)
1a	1 (10%)
Tratamiento VHC	
Sofosbuvir+Ledipasvir	4 (40%)
Sofosbuvir+Ledipasvir+RBV	3 (30%%)
Ombitasvir+Paritavir+Ritonavir+Dasabuvir	2 (20%%)
Ombitasvir/Paritavir+Ritonavir+Dasabuvir+RBV	1 (7.7%)

Tabla 22. Características de los pacientes que desarrollaron tumores extrahepáticos.

4.5.4.- Análisis de polimorfismos de la posición rs1059476 de la actividad AurKB celular. Se analizó la composición alélica de 12 pacientes (3 que presentaban hepatocarcinoma antes del tratamiento antiviral, 3 que lo desarrollaron *de novo* tras la curación de la infección y 6 pacientes cirróticos que no desarrollaron hepatocarcinoma). Ninguno de los pacientes a los que se diagnosticó el CHC antes del tratamiento recidivaron tras su finalización.

Composición alélica	Población F3-F4 general	Pacientes CHC	Pacientes F4
TT	3,7 %	16% (1/6)	0
TC	30,4%	33% (2/6)	33% (2/6)
CC	65,9%	50% (3/6)	67% (4/6)

Tabla 23. Comparación de la composición alélica de la posición rs1059476 de la actividad AurKB entre población F3-F4 general y las obtenidas en pacientes con HCC.

4.6.- RESULTADOS CALIDAD DE VIDA VHC

4.6.1.- Características basales de los pacientes tratados.

Del total de pacientes que se incluyeron dentro del grupo de tratamiento 44 (51.2%) eran mujeres y 42 (48.8%) eran hombres. La edad media era de 57.24 años con una desviación típica de 11,52. Respecto al resto de variable sociodemográficas, predominaban los casados con un 58.1% (50) de, un 34.9% (30) tenían estudios superiores y un 53.5% (46) tenían empleo.

El tratamiento que recibieron los pacientes en su mayoría fue la combinación de sofosbuvir y ledipasvir en un 66.3% (57). El 47.7% (41) tenían un estadio de fibrosis F2 seguido del estadio F4 con un 25.6 % (22). De todos los pacientes que iban a recibir tratamiento con los AAD el 52.3% (45) nunca habían recibido tratamiento previamente.

4.6.2.- Características basales de los pacientes incluidos en el estudio.

Las características basales de los pacientes control se exponen en la tabla 23.

Variables	Tratados (n= 86)	No tratados (n=12)	P-valor
Edad (años): Media (DE)	57,24 (11,52)	55.67 (8,88)	0,629
Sexo			
Varón	42 (48,8%)	6 (50%)	0,940
Mujer	44 (51,2%)	6 (50%)	
Estado civil			
Casado	50 (58,1%)	4 (33,3%)	0,18
Divorciado	11 (12,8%)	1 (8,3%)	
Soltero	16 (18,6%)	6 (50%)	
Viudo	7 (8,1%)	1 (8,3%)	
ND	2 (2,3%)		
Estudios			
Primarios	24 (27,9%)	2 (16,7%)	0,635
Secundarios	29(33,7%)	6 (50%)	
Superiores	30 (34,9%)	4 (33,3%)	
ND	3 (3,5%)		

Trabajo	36 (41,9%)	4 (33,3%)	0,583
Desempleado	46 (53,5%)	8 (66,7%)	
Empleado	4 (4,7%)		
ND			
Tratamiento			
SOF+LDV	57 (66,3%)		
OBV/PTV/Ritonavir +Dasabuvir	14 (16,3%)		
Combinación Ribavirina	9 (10,8%)		
Otros	3 (3,5%)		
ND	3 (3,5%)		
Estadio Fibrosis			
F0-F1	3 (3,5%)	12 (100%)	≤0,01
F2	41 (47,7%)		
F3	20 (23,3%)		
F4	22 (25,6%)		
Tratamiento previo			
Sí	39 (45,4%)	2 (16,7%)	0,02
No	45(52,3%)	7 (58,3%)	
ND	2 (2,3%)	3 (25%)	

Tabla 24. Estudio de calidad de vida. Características basales de los pacientes. DE: Desviación estándar; ND: Sin datos; SOF: Sofosbuvir; LDV: Ledipasvir; OBV: Ombitasvir; PTV: Paritaprevir. Otros: Sofosbuvir + Simeprevir; Sofosbuvir + Daclatasvir; Ombitasvir /Paritaprevir/ Ritonavir. P-valor significativo: $p < 0.05$.

4.6.3.- Análisis SF-36

Los resultados basales del cuestionario SF-36 tanto al inicio de tratamiento como al finalizarlo y tras 12 semanas se exponen en la tabla 24. Cuando se analizan los subgrupos de pacientes no se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo de pacientes que van a iniciar tratamiento. Cuando se comparan los grupos de pacientes que van a iniciar tratamiento con los que lo acaban de finalizar se observa una mejoría general en todas las dimensiones aunque de forma significativa solo en la percepción de la salud en general ($p=0.004$). Sin embargo cuando se compara el grupo de pacientes que iniciar tratamiento con el

grupo valorado 12 semanas tras finalizar el tratamiento se encuentran mejorías significativas en las dimensiones función física ($p=0.023$), dolor corporal ($p=0.004$), salud general ($p=0.003$), vitalidad ($p=0.007$), función social ($p=0.041$) (Tabla 7). Cuando se comparan los grupos de pacientes que han finalizado el tratamiento con los que acuden 12 semanas tras finalizar el tratamiento no se encuentran mejoras significativas. Respecto al grupo control no se observan diferencias estadísticamente significativas respecto a la segunda visita salvo en la dimensión salud general ($p=0.038$).

4.6.4.- Análisis EQ-5D-5L

Respecto al cuestionario EQ-5D-5L tanto al inicio de tratamiento como al finalizarlo y tras 12 semanas se exponen en la Tabla 25. En todos los apartados se observa un aumento del porcentaje de pacientes que no presentan ninguna limitación en la dimensión analizada comparando el tratamiento basal respecto a las 12 semanas postratamiento. Cuando se comparan grupos mediante la utilidad global del cuestionario se observa una mejoría global significativa ($p=0.035$) entre los pacientes que inician tratamiento respecto a los pacientes tras 12 semanas de finalizarlo y una mejora significativa ($p=0.012$) en su EVA. Sin embargo, no se observan cambios significativos entre los pacientes que finalizan el tratamiento y 12 semanas posteriores. Respecto al grupo control no se observan diferencias significativas entre este grupo y el de pacientes que van a iniciar tratamiento. El grupo control tampoco presenta diferencias estadísticamente significativas respecto a la segunda visita.

Dimensión	Inicio de tratamiento (n=86)	Final de tratamiento (n=42)	12 semanas de seguimiento (n=38)	Valor P (Inicio vs seguimiento)
Función física	90 (25)	95 (10)	95 (16,3)	0,023
Problemas físicos	25 (100)	50 (100)	75 (100)	0,175
Dolor corporal	72 (41)	84 (38,3)	84 (19)	0,004
Salud general	57 (37)	72 (25)	72 (25)	0,003
Vitalidad	55 (21,3)	60 (21,3)	62,5 (25)	0,007
Rol social	87,5 (40,6)	87,5 (37,5)	93,8 (25)	0,041
Rol emocional	66,7 (100)	66,7 (100)	83,3 (75)	0,165
Salud mental	68 (28)	72 (17)	72 (21)	0,052

Tabla 25. Resultados descriptivos del cuestionario SF-36 en pacientes tratados. Todos los datos están expresados como mediana (rango intercuartílico). P-valor significativo: $p <$

Variables cuestionario EQ-5D-5L	Tto. (n=86)	FinTto. (n=41)	Seguimiento (n=38)	Valor P
Movilidad				
No tengo problemas para caminar	77,4	80,0	86,1	0,045
Tengo problemas leves para caminar	10,7	15,0	5,6	
Tengo problemas moderados para caminar	7,1	5,0	8,3	
Tengo problemas graves para caminar	4,8	0,0	0,0	
Cuidado-Personal				
No tengo problemas para lavarme o vestirme	94,0	92,5	94,4	0,61
Tengo problemas leves para lavarme o vestirme	3,6	7,5	5,6	
Tengo problemas moderados para lavarme o vestirme	2,4	0,0	0,0	
Actividades de Todos los Días				
No tengo problemas para realizar mis actividades cotidianas	73,8	79,5	83,3	0,66
Tengo problemas leves para realizar mis actividades cotidianas	13,1	15,4	8,3	
Tengo problemas moderados para realizar mis actividades cotidianas	7,1	5,1	8,3	
Tengo problemas graves para realizar mis actividades cotidianas	3,6	0,0	0,0	
No puedo realizar mis actividades cotidianas	2,4	0,0	0,0	
Dolor/Malestar				
No tengo dolor ni malestar	56,0	71,8	80,6	0,19
Tengo dolor o malestar leve	25,0	20,5	11,1	
Tengo dolor o malestar moderado	14,3	5,1	5,6	
Tengo dolor o malestar fuerte	4,8	2,6	2,8	
Ansiedad/Depresión				
No estoy ansioso ni deprimido	58,3	67,5	77,1	0,35
Estoy levemente ansioso o deprimido	17,9	25,0	14,3	
Estoy moderadamente ansioso o deprimido	15,5	5,0	5,7	
Estoy muy ansioso o deprimido	7,1	2,5	2,9	
Estoy extremadamente ansioso o deprimido	1,2	0,0	0,0	
Estado de salud (0-100)	72,4	78,1	82,7	0,012

Tabla 26: Resultados descriptivos del cuestionario EQ-5D-5L en el grupo de pacientes tratados. Tto: Tratamiento. P-valor significativo: $p < 0.05$. Estado de salud (0-100) corresponde a encuesta EVA.

4.6.5.- Análisis estratificado calidad de vida

No se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados cuando se estratificó el análisis entre pacientes con (n=15) o sin (n=22) estudios superiores, o el grado basal de fibrosis moderada (F0-F2; n=23) o avanzada (F3-F4; n=15). En el caso de pacientes en

situación de empleo (n=26) o desempleo (n=12), se encontraron diferencias significativas en la percepción general de salud y vitalidad (Tabla 26).

Dimensión	Inicio Tto. vs. seguimiento	P-valor	Inicio vs. fin Tto.	Valor P
Salud general	-10,00 (23,75)		-5,00 (16,25)	
Empleados (n=23)	-15,00 (25,00)	0,070	-10,00 (19,00)	0,006
Desempleados (n=12)	-2,00 (25,06)		0,00 (25,63)	
Vitalidad	-5,00 (20,00)		-5,00 (21,25)	
Empleados (n=23)	-10,00 (15,00)	0,080	-2,50 (25,00)	0,971
Desempleados (n=12)	0,00 (21,25)		-5,00 (22,50)	

Tabla 27. Análisis estratificado de parámetros de salud general y vitalidad de acuerdo a situación laboral. Tto: Tratamiento. Todos los datos están expresados como mediana (rango intercuartílico) P-valor significativo: $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

5.1.- ANÁLISIS DE EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON AADS. IMPLICACIONES CLÍNICAS Y PERCEPCIÓN DE CALIDAD DE VIDA.

Desde la aparición de los AADs y de las sucesivas generaciones de estos fármacos para el tratamiento de la hepatitis C se ha estudiado exhaustivamente la tasa de RVS en cohortes de pacientes de “vida real”. No obstante, estos fármacos no han tenido únicamente implicación en la curación de la infección en estos pacientes, sino que además se han relacionado con efectos beneficiosos sobre la historia natural de la enfermedad (riesgo de desarrollo de descompensaciones, ingresos hospitalarios, aparición de CHC, requerimientos de trasplante hepático, etc) y la calidad de vida percibida. Esta visión global sobre las cohortes de pacientes de “vida real”, como la que es objeto de estudio esta tesis doctoral, puede mejorar el conocimiento de las implicaciones que la curación del VHC tiene en la sociedad, en un contexto de eliminación de la infección por VHC como problema de salud pública

Nuestro estudio se ha llevado a cabo en una cohorte de 423 pacientes atendidos en la sección de Hepatología del HULP, de los cuales 421 fueron tratados con AADs de última generación. La cohorte –similar a otras en los aspectos epidemiológicos- presentaba una distribución prácticamente homogénea por sexos y el genotipo viral más frecuente fue el 1, siendo el subtipo más frecuente el 1b. Esto coincide con otros estudios realizados en España en los que el genotipo 1 suponía un 67% de los infectados y el subtipo 1b el 38% (Aguilera, 2017). En nuestro estudio, el segundo genotipo más frecuente fue el 3 y a continuación el 4, siguiendo la misma distribución que la publicada en la literatura respecto de nuestro país (Aguilera, 2017). Por otro lado, un paciente presentó una infección mixta por dos genotipos (1a y 3). La infección por genotipos mixtos no es frecuente desde que se dispone de métodos de biología molecular que permiten una buena caracterización de las distintas variantes, y en cualquier caso la incidencia en la mayoría de los estudios se sitúa por debajo del 2%. (McNaughton, 2018)

Respecto al estadio evolutivo de la enfermedad, un 47% de los pacientes correspondían al grado de fibrosis F2, seguido de un 29.5% que eran F4. El hecho de que casi un tercio de los pacientes tuviera el diagnóstico de cirrosis hepática se explica por el periodo de realización del estudio, cuando por razones de priorización de los casos más graves, se prescribía el tratamiento en primer lugar a aquellos con enfermedad hepática avanzada. De hecho, entre las primeras directrices del PEAHC estaba la prescripción y dispensación de los AADs para todos los pacientes con fibrosis por encima de F2 y estas recomendaciones fueron igualmente seguidas por las Comunidades Autónomas de nuestro país.

Este estudio se ha llevado a cabo a lo largo de cuatro años, motivo por el que se han utilizado distintas combinaciones de AADs. Ello se explica por la progresiva incorporación de sucesivas combinaciones de fármacos y a la vez es útil para analizar la evolución del tratamiento (por ejemplo, de medicamentos eficaces solo para algunos genotipos a las potentes terapias pangnotípicas de última generación).

En lo que se refiere a la duración de las pautas utilizadas, predominan las de 12 semanas, con o sin ribavirina, porque la mayoría de los pacientes tenían fibrosis avanzada. La pauta de 8 semanas con SOF/LDV (indicada en pacientes *naïve* sin cirrosis con genotipos 1a y 1b) se utilizó únicamente en el 11,6% de los pacientes. Dos años después, sin embargo, es frecuente en la práctica clínica la utilización de combinaciones pangnotípicas de 8 semanas de duración y existen en la literatura numerosas evidencias de la utilidad de estos esquemas tanto en los ensayos clínicos como en las cohortes de “vida real” (Puigvehí, 2019).

Dado que se han utilizado distintas pautas de tratamiento, hemos subdividido los esquemas terapéuticos en aquellos basados en sofosbuvir y los que no incluían este medicamento. Es de destacar el hecho de que en nuestra serie, de 421 pacientes 332 (79%) recibieron tratamientos basados en sofosbuvir y 89 (21%) pautas sin este fármaco. Esta diferencia se explica no solo por la potencia antiviral y la actividad frente todos los genotipos de sofosbuvir, sino porque las formulaciones con inhibidores de NS5A (ledipasvir, velpatasvir), es decir, en ausencia de inhibidores de la proteasa, resultan más seguras en la práctica clínica especialmente en pacientes cirróticos y además tienen un perfil de interacciones farmacológicas más favorable, lo que facilita su prescripción en pacientes polimedicados con otras comorbilidades. Por todas estas razones, en nuestro estudio las combinaciones no basadas en sofosbuvir fueron minoritarias. En este sentido, en nuestra cohorte existían diferencias significativas entre los dos grupos de tratamiento respecto de la gravedad de la enfermedad (grado de fibrosis), con un mayor número de pacientes cirróticos tratados con regímenes basados en sofosbuvir. La razón de ello está en que las combinaciones basadas en IPs no deben utilizarse en pacientes con enfermedad hepática descompensada.

La administración concomitante de ribavirina con los AADs se utilizó en algunos pacientes para intentar mejorar la tasa de RVS y acortar la duración del tratamiento, pero debe subrayarse que en la actualidad la ribavirina no es necesaria con las nuevas combinaciones de AADs de última generación. Si analizamos nuestra cohorte, solo 55 (13%) pacientes recibieron ribavirina y la mayor parte de ellos tenían un estadio de fibrosis 4 (cirrosis), porque con la evidencia científica disponible en ese momento eran el grupo que más podía beneficiarse de su administración.

También en este sentido, ninguno de los pacientes tratados con pautas cortas (8 semanas) recibió ribavirina, puesto que como se ha mencionado anteriormente estas pautas únicamente están destinadas a pacientes con fibrosis leve y ausencia de tratamientos previos.

Es cierto que, a pesar de la controversia sobre la utilización de la ribavirina, en la literatura hay bastantes estudios que refuerzan su papel sobre todo en subgrupos de pacientes “difíciles de tratar”, subrayando la implicación de la ribavirina en retrasar o prevenir la aparición de mutaciones de resistencia (Feld, 2017). En nuestro estudio la ribavirina se utilizó de acuerdo con las recomendaciones de las guías clínicas nacionales e internacionales, que apoyaban su uso en pacientes con fibrosis avanzada para acortar la duración del tratamiento de 24 a 12 semanas en el caso de las pautas basadas en sofosbuvir y para determinados subtipos (por ejemplo el 1a) en regímenes de ombistavir/paritaprevir con dasabuvir.

Respecto a la tasa de RVS, en nuestro estudio alcanzó el 95.24% de los pacientes. Este dato es muy similar al de la mayoría de los estudios publicados en los que la RVS está en torno al 95% en la práctica clínica real (Puigvehí, 2019). No obstante, hay que tener en cuenta que en nuestra cohorte se utilizaron algunos regímenes que dos-tres años después ya se consideran subóptimos cuando no obsoletos, especialmente desde la aprobación a finales de 2017 de las nuevas combinaciones pangénóticas de última generación (sofosbuvir/velpatasvir y glecaprevir/pibrentasvir).

Del resto de los pacientes que no consiguieron alcanzar la RVS, el 2.85% presentaron recidiva tras finalizar el tratamiento y el 1,90% fueron malos cumplidores. Todos los pacientes que recidivaron habían recibido tratamiento basado en sofosbuvir, pero debe recordarse que estos fueron la mayoría e incluyeron a todos aquellos con enfermedad hepática avanzada/descompensada. Analizando las características virológicas de los pacientes que recidivaron, el 50% presentaba genotipo 3 -el más difícil de tratar-, en el que diversos estudios han comunicado tasas de RVS en torno o inferiores al 90% (Nelson, 2015). En nuestra serie, si tenemos en cuenta el total de pacientes infectados por el genotipo 3, se consiguió una tasa de RVS del 81.25%, cifra que se asemeja a la de alguno de los estudios antes mencionados. Por otro lado, el 50% de los pacientes que recayeron presentaban un estadio de fibrosis 2 y el resto eran cirróticos (F4), que presentan peores tasas de RVS (Afdhal, 2014).

Como ya se ha mencionado, todos los pacientes que recidivaron recibieron tratamiento de rescate: más del 50% fueron tratados con la combinación sofosbuvir/velpatasvir/voxilaprevir. Dicha combinación se aprobó en el último trimestre de 2017 en España para el tratamiento de la hepatitis C en pacientes con genotipos del 1 al 6 y fallo a un tratamiento anterior con AADs

(European Medicines Agency , 2019), y de hecho se trata de la primera combinación de fármacos aprobada para el tratamiento de pacientes que previamente habían recibido algún tipo de terapia basada en inhibidores de NS5A. Las características de esta combinación, que incluye un inhibidor de la polimerasa NS5B (sofosbuvir), un inhibidor de NS5A (velpatasvir) y un inhibidor de la NS3 proteasa (voxilaprevir) la hacen particularmente útil para el tratamiento de rescate de los pacientes previamente tratados con otros antivirales. Su utilización en nuestros pacientes no produjo efectos adversos remarcables y proporcionó una tasa de RVS del 100%. El resto de los pacientes fueron tratados con otras pautas (sofosbuvir/simeprevir/ribavirina, entre otras), especialmente antes de que la nueva combinación estuviera disponible. En cualquier caso, se debe insistir en el hecho de que, salvo uno, todos los pacientes alcanzaron RVS.

Si analizamos la subpoblación de pacientes con fibrosis cirrótica (F4) observamos que el genotipo más frecuente fue el 1b (67.7%) y el tratamiento más utilizado la combinación sofosbuvir/ledipasvir (54.8%). En este subgrupo la RVS fue del 93.5% y hubo un 4% de recidivas. Estos datos son muy similares a los de otros estudios publicados en la literatura, que ponen de manifiesto la mayor dificultad de los pacientes cirróticos para alcanzar la RVS (Afdhal, 2014).

En cualquier caso, la curación de la infección por VHC puede evitar en pacientes que no presentan enfermedad hepática avanzada la evolución a cirrosis y todas sus complicaciones. También en los pacientes con cirrosis establecida la curación de la infección por VHC puede mejorar la función hepática en la mayoría de ellos, con una significativa disminución de la tasa de descompensaciones, requerimientos de trasplante hepático e incidencia de CHC. Es cierto que existe un subgrupo de pacientes, con un marcado deterioro de la función hepática (habitualmente con un *score* de MELD mayor de 20) en los que la eliminación del virus proporciona un escaso beneficio clínico (Bunchorntavakul, 2016; Belli, 2016).

Otro de los objetivos clínicos del estudio fue analizar la evolución de los pacientes, con especial atención en aquellos con estadios más avanzados de fibrosis (F4, cirrosis), en los que se analizaron las descompensaciones de la enfermedad antes y después del tratamiento. En todos los casos se revisaron las historias clínicas, registrando los episodios de ascitis, encefalopatía hepática, hemorragia digestiva alta secundaria a la hipertensión portal, y otras complicaciones como la trombosis portal.

Del total de los pacientes cirróticos analizados, el 11% había presentado algún tipo de descompensación previa. Después del tratamiento con AADs presentaron descompensación de la hepatopatía el 8.8%. El número de pacientes incluido en este sub-análisis no permite

establecer diferencias significativas, pero la tendencia -coincidiendo con lo comunicado en la literatura- es a una disminución en la incidencia de descompensaciones.

En la línea de lo ya mencionado, algunos estudios han intentan buscar factores predictores de mala evolución en los pacientes con cirrosis hepática descompensada y deterioro grave de la función hepática tratados con AADs. En uno de ellos se analizó el *score* BE3A, que identifica 5 factores que pueden predecir una mejor o peor evolución de estos pacientes: índice de masa corporal, presencia de encefalopatía, ascitis y niveles de alanino aminotransferasa (El-Sherif, 2018).

Respecto a la evolución de la fibrosis en los pacientes F4 se comprobó una mejoría significativa tanto en los índices serológicos APRI y FIB-4 como en los Fibroscan realizados al menos un año después de finalizar el tratamiento. No obstante, la mejoría de la función hepática evaluada por el índice MELD no presentó una mejoría significativa. Este hecho indica que la disminución de la fibrosis se produce antes y de una manera más acusada que la mejoría de la función hepática, que parece requerir más tiempo.

En este estudio también se ha evaluado el cambio en la percepción de la calidad de vida en los pacientes sin manifestaciones clínicas de la enfermedad hepática o extrahepáticas, con el objeto de determinar si la infección por VHC puede ser “per se” una causa de empeoramiento de la calidad de vida percibida como se ha sugerido en algunos estudios (Strauss, 2014).

Para ello se utilizaron dos cuestionarios previamente validados siguiendo la estrategia de uso simultáneo de cuestionarios específicos y genéricos (Younossi, 2015). Dentro de los cuestionarios específicos, uno de los más utilizados en el estudio de pacientes con hepatitis C es el ChronicLiverDiseaseQuestionnaire-HCV Version (CLDQ-HCV) (Younossi, 2016). En el cuestionario EQ-5D se optó por utilizar el modelo 5L que ha demostrado superioridad respecto al modelo 3L (Janssen, 2013; Agborsangaya 2014).

Estudios previos a la introducción de los AADs confirmaron, utilizando el cuestionario SF-36, que los pacientes con RVS presentaban una mejor percepción en la calidad de vida en los aspectos físicos, sociales y de salud. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos estudios incluían pacientes sintomáticos, además de los efectos secundarios asociados al tratamiento basado en Peg-IFN y ribavirina (Negro, 2010),

En un estudio sobre 997 pacientes tratados con AADs (Geddaway, 2017) se demostró, utilizando los cuestionarios EQ-5D y la escala EuroQOL, una asociación negativa entre la calidad de vida percibida y los síntomas de malestar y depresión (Huang, 2018). Sin embargo, en este estudio -

al contrario que en nuestra serie de pacientes- se analizaba la calidad de vida en un momento único sin tener en cuenta la mejoría presentada por los pacientes tras alcanzar la RVS.

En nuestros pacientes tratados encontramos una mejoría significativa de numerosos parámetros después del tratamiento, y ello indica que la infección por sí misma puede causar un empeoramiento en la percepción de la calidad de vida. Apoyando esta idea, los pacientes controles no tratados no variaron su percepción de la calidad de vida exceptuando un único parámetro. Estos resultados confirman los obtenidos en un estudio similar realizado con 56 pacientes analizados antes, durante y después del tratamiento con AADs, y en el que se constató una mejoría en la calidad de vida percibida a nivel de la función física, problemas físicos, dolor, salud general, vitalidad y salud mental después del tratamiento (Sigueira, 2018). En nuestra serie de pacientes se observaron mejorías significativas en el rol social pero no a nivel de los problemas físicos o salud mental, probablemente debido a la diferencia en el número de pacientes tratados, así como el momento de realización de la encuesta. No obstante, se ha descrito también que los pacientes con estadios iniciales de fibrosis pueden presentar fatiga o depresión (Gutteling, 2006), alteraciones neurocognitivas (Lowry) o en la neurotransmisión monoaminérgica (Weissenborn, 2006).

Por lo tanto, los pacientes asintomáticos infectados por el VHC presentan una mejoría en la percepción de la calidad de vida después de recibir tratamiento con AADs y presentar RVS. Estos datos apoyan la hipótesis de que el VHC causa por sí mismo un empeoramiento en la calidad de vida de los pacientes, aunque no se puede descartar que el entorno y la perspectiva de curación de los pacientes tratados tenga algún efecto (Helbling, 2008).

Respecto al análisis de las mutaciones de resistencia se observó que la mayor parte de los pacientes con recaída presentaban variantes resistentes a los AADs. La presencia de estas mutaciones de resistencia se ha descrito ampliamente en la literatura (Sagnelli, 2018). No obstante, aunque la presencia de mutaciones basales confiere resistencia a los antivirales, en nuestro estudio se obtuvieron excelentes tasas de RVS, por encima del 95%. Por otro lado, de los 12 pacientes que recidivaron, 11 (92%) alcanzaron RVS con el tratamiento de rescate. La extraordinaria eficacia de los AADs, con tasas de curación cercanas al 100%, desaconseja la realización de análisis basales de resistencias (recomendación ya recogida en las guías de tratamiento) y probablemente tampoco se precisen en los escasos fallos virológicos observados en la actualidad, dada la excelente eficacia de la combinación sofosbuvir/velpatasvir/voxilaprevir.

5.2.- UTILIDAD DE LAS TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES DE RESISTENCIA.

La aplicación de la técnica de Cold-PCR, desarrollada en esta tesis para la detección de variantes minoritarias de ARN-VHC en presencia de mezclas complejas de ácidos nucleicos (Milbury, 2011), ha demostrado su potencial para la identificación temprana, en muestras basales, de mutaciones de resistencia al tratamiento en un porcentaje significativo de pacientes. Estas variantes fueron detectables tanto en pacientes que posteriormente recidivaron como en los que respondieron al tratamiento, debido a que las mutaciones son pre-existentes al tratamiento en la cuasiespecie viral. Más representativa que la mera presencia de mutaciones de resistencia en las muestras basales fue la frecuencia con que estas mutaciones fueron detectadas en ambos grupos. Así, en 8/13 (66%) de las muestras basales de pacientes que recidivaron y en 1/3 (33%) de los que alcanzaron RVS fue posible detectar mutantes de resistencia.

Como cabe esperar en este tipo de muestras, la proporción de cepas con mutaciones basales de resistencia en ausencia de presión selectiva farmacológica es *a priori* muy baja. Si bien la técnica de Cold-PCR se optimizó para permitir la identificación en sistemas experimentales in vitro de especies minoritarias presentes en una proporción del 0.01%, la riqueza de secuencia diana se encuentra presumiblemente muy por encima de las proporciones reales en las que aparece en las muestras basales. Por este motivo fue necesario ampliar el análisis ensayando en todos los casos 40 reacciones de PCR por muestra. El porcentaje de PCRs positivas en las muestras basales osciló entre el 1%-5%. Esta situación fue cambiando según se fueron analizando las muestras obtenidas durante el tratamiento antiviral. Así, el porcentaje de PCRs positivas se incrementó hasta el 8% y el 25% en muestras de pacientes no respondedores tratados con triple terapia en las semanas 4 y 12, respectivamente. Este incremento responde al enriquecimiento progresivo de las variantes resistentes en presencia de presión farmacológica.

Sin embargo, y debido tanto a la eficacia de los AADs -para los que no se requiere el análisis de resistencias- como a la necesidad de reproducir hasta 40 reacciones por muestra para identificar las variantes, el uso de la Cold-PCR en muestras basales no es eficiente. Su papel se limitaría, en combinación con técnicas de secuenciación masiva, a la identificación de mutantes en los escasísimos pacientes con fracaso virológico después de tratamientos de rescate.

5.3.- ANÁLISIS DE PERSISTENCIA DEL ARN-VHC EN LOCALIZACIONES EXTRAHEPÁTICAS DE PACIENTES RESPONDEDORES.

Como se ha señalado anteriormente, el desarrollo de los nuevos y potentes AADs plantea por primera vez la posibilidad de eliminar la infección por el VHC del organismo de los pacientes respondedores y permite hablar también de eliminación a medio plazo en términos de salud

pública. Sin embargo, y desde un punto de vista estrictamente biológico, la eliminación *definitiva* del VHC requeriría confirmar su desaparición no solo del plasma y tejido hepático sino también de cualquier reservorio extrahepático en el que el virus pudiera persistir. El concepto de curación de la infección en los pacientes tratados es de una gran importancia clínica, porque cierra la posibilidad de reactivación/recaída tardía o futura incluso en las condiciones más desfavorables como las situaciones de inmunosupresión, tan frecuentes hoy en día en la práctica clínica con la generalización de medicamentos biológicos en múltiples indicaciones (Lin, 2014). El marcador universalmente utilizado para el diagnóstico de la curación de la hepatitis C es la RVS, que se define como la negativización del ARN-VHC plasmático -analizado con técnicas de máxima sensibilidad de RT-PCR- 12 semanas después de la finalización del tratamiento (RVS-12). Sin embargo, ni en la mayoría de los estudios publicados ni por supuesto en la práctica clínica, se complementa la detección del genoma viral en plasma con el análisis de otros potenciales reservorios virales.

Por este motivo en esta tesis se planteó un sub-estudio en el que se realizó un análisis comparativo de la cinética de aclaramiento del ARN-VHC en plasma y CMSPs de los pacientes tratados con distintos fármacos antivirales: A) pacientes tratados con IFN+RBV; B) con terapia triple basada en telaprevir, y; C) con AADs. La selección de la fracción analizada de CMSPs se basó en que ha sido este tipo celular el considerado clásicamente como el candidato a actuar como reservorio de la infección por VHC en base a evidencias clínicas indirectas y a datos de identificación de secuencias de VHC en células linfoides.

Los resultados confirman que la cinética de aclaramiento del ARN-VHC es diferente en plasma y en CMSPs en un porcentaje importante de los pacientes. Así, el genoma viral se elimina más rápidamente en plasma que en linfocitos. Especialmente importante fue la observación de la persistencia del ARN-VHC en CMSPs en muestras del final del tratamiento de los pacientes respondedores e incluso su detección 24 semanas después de finalizarlo, cuando ya se había alcanzado la RVS. Pero debe subrayarse que se observaron diferencias en la cinética de aclaramiento en función de la potencia antiviral de los distintos tratamientos, entendiendo esta como la capacidad de un fármaco de inhibir la replicación viral de la forma más rápida, profunda y sostenida. De acuerdo con esto, el porcentaje de pacientes respondedores en los que el ARN-VHC persistía positivo en CMSP al finalizar el tratamiento fue mayor en los pacientes tratados con IFN+RBV (30%) -la combinación terapéutica con menor potencia antiviral de las tres ensayadas- que en los tratados con terapia triple (25%), y especialmente en los tratados con AADs (10%). De forma similar, la persistencia del genoma viral en CMSPs después de la RVS 24

se asoció también con el tipo de tratamiento: 20% de positividad en los pacientes tratados con IFN+RBV-terapia, 8% en los tratados con TVR y 0% en los que recibieron AADs.

El significado clínico de la persistencia del ARN-VHC en localizaciones extrahepáticas es incierto y no bien conocido, y se relaciona con el potencial linfotropismo del VHC. Una de las evidencias clínicas indirectas a favor del linfotropismo del VHC es la relación causal entre la hepatitis C y el desarrollo de trastornos linfoproliferativos, como el B-NHL (Zuckerman, 1997). Entre los mecanismos patogénicos del desarrollo de LNH-B se han propuesto mecanismos directos relacionados con la infección por el VHC de linfocitos-B, como la sobre-expresión de Bcl-2, y la inhibición de la apoptosis inducida por p53 y c-myc. Apoyando también la idea del linfotropismo del VHC, el ARN viral se ha identificado en monocitos/macrófagos, linfocitos B (Bare, 2005) y en células dendríticas (Goutagny, 2003) de pacientes con hepatitis C sin evidencia de trastornos linfoproliferativos. Sin embargo, muchos autores sostienen que la identificación de secuencias virales en los diferentes tipos celulares no implica necesariamente un papel de los mismos en el proceso de reactivación (Veerapu, 2001), e incluso en algunos casos se sugiere que las partículas virales identificadas no reflejan una infección real, sino una mera adsorción de esas partículas circulantes a la superficie de las células B (Fujiwara, 2013), poniendo así en duda el posible linfotropismo del virus.

Las discrepancias en la literatura sobre si el VHC puede o no replicarse en los linfocitos, y en consecuencia si es o no un virus linfotrópico, se encuentra en la sensibilidad y especificidad de las técnicas de identificación de los intermediarios replicativos (cadena negativa del ARN-VHC), que confirman la funcionalidad de las partículas virales detectadas (Blackard, 2006). En este sentido, se han desarrollado en los últimos años diversas técnicas que permiten la amplificación selectiva de cada una de las cadenas de ARN del genoma (amplificación específica de cadena), entre las que destacan sistemas de amplificación basados en la actividad Tth ADN polimerasa, que presenta una capacidad de discriminación de cadenas 10.000 veces mayor que las actividades taq polimerasa convencionales (Blackard, 2005). Incluso con niveles de especificidad tan altos, no es posible descartar amplificaciones inespecíficas de la cadena positiva en todas las condiciones experimentales ensayadas. En este sentido, los ensayos realizados con la técnica de Tth han proporcionado resultados contradictorios, aunque algunos de ellos reflejan la presencia de la cadena negativa de ARN viral en una pequeña proporción de pacientes con hepatitis C, especialmente en los coinfectados por VIH (Laskus, 1998) y trasplantados (Radkowski, 1998).

Como los estudios basados en técnicas de amplificación génica específica de cadena producen resultados contradictorios, es necesario un abordaje técnico diferente para analizar un

problema clínico de gran importancia. En este sentido, se han ensayado cultivos de CMSPs de pacientes infectados (Bare, 2005), así como la infección *in vitro* de CMSPs de pacientes sanos con plasma ARN-VHC positivo (Radkowski, 2004), el desarrollo de sistemas de expresión de proteínas virales en vectores eucariotas (Hiasa, 2006), líneas linfocitarias estables que expresan VHC (Wolk, 2005), microdissección con láser de captura (Sansonno, 2004) y ensayos de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica (Chang, 2000). Si bien muchas de estas técnicas confirman el linfotropismo del VHC, su relevancia debe ser confirmada en más estudios.

Con el fin de analizar este aspecto, se realizó un análisis filogenético comparativo de muestras pareadas de secuencias del VHC obtenidas de plasma y linfocitos extraídos simultáneamente. Los resultados confirman que las secuencias de VHC de la fracción linfocitaria son diferentes y se agrupan en el árbol filogenético en una rama independiente de la de las muestras de plasma. Estos datos sugieren que las variantes del VHC identificadas en CMSPs no procederían de la adsorción de partículas virales circulantes en la superficie celular. No se puede descartar sin embargo que las células pudieran estar recubiertas de partículas virales procedentes de procesos replicativos previos. Para analizar este aspecto estudiamos las variantes del VHC de plasma y CMSPs durante el tratamiento. El análisis demostró que tanto en el plasma como en los linfocitos las secuencias virales eran diferentes en las muestras basales y las de tratamiento, sugiriendo que ambas poblaciones evolucionaban con el tiempo.

Especialmente importante fue el hallazgo de que en los pacientes en los que el ARN viral se mantenía positivo únicamente en linfocitos, las secuencias en este tipo celular mostraban variaciones con el tiempo. Esta evolución temporal de las variantes detectadas en linfocitos en ausencia de partículas virales en plasma indicaría que realmente el VHC podría replicarse a ese nivel. No obstante, y debido a la complejidad del problema, la identificación de proteínas virales no constitutivas sería de gran ayuda para definir la funcionalidad de las partículas virales encontradas, especialmente en el caso de los pacientes respondedores. Así, la detección de actividad NS3-proteasa o NS5-polimerasa tras la negativización del ARN-VHC en plasma solo podría ser explicarse en el contexto del mantenimiento de la actividad replicativa del virus y descartaría los procesos de adsorción pasiva de partículas virales a la superficie de los linfocitos como fuente de detección de ARN-VHC extrahepático.

Ante la posibilidad de que la persistencia de reservorios virales esté implicada en procesos de recurrencia tardía de la infección, se han realizado numerosos estudios en los que se correlaciona la RVS con erradicación o persistencia del VHC en tejidos extrahepáticos. La mayoría de los datos disponibles corresponden a tratamientos con Peg-IFN+RBV, que ya no se

utilizan, pero nos permiten evaluar la correlación entre RVS y recurrencia tardía. Los datos de seguimiento de los pacientes respondedores apoyan la idea de erradicación de la infección. Así, en una revisión exhaustiva de 4288 pacientes respondedores de 44 estudios clínicos, se demostró que el 99% mantenían la respuesta virológica durante periodos de seguimiento que oscilaban entre 1-10 años, al tiempo que se verificaba una mejoría de la enfermedad hepática y una disminución de la incidencia de CHC y de la mortalidad por enfermedad hepática.

Por otro lado, en un estudio con 17 pacientes respondedores se confirmó la presencia del VHC en los macrófagos en el 65%, en las células linfoides en el 41% y en el hígado en el 27%. La cadena negativa se encontró en los linfocitos de 2 pacientes y en los macrófagos de 4. Estos resultados confirmaron la persistencia del ARN-VHC en pequeñas cantidades en los tres tipos celulares durante periodos de tiempo de hasta 9 años, que se relacionaba con la persistencia de la inmunidad celular y humoral durante largos periodos de tiempo (Radkowski, 2005). Por el contrario, en otro estudio realizado en 67 pacientes (48 de ellos tratados con RVS) se confirmó que los pacientes no tratados tenían ARN viral en las fracciones de CMSPs, linfocitos B y linfocitos T, pero en ningún caso se encontraron cadenas negativas de ARN-VHC. Además, los ensayos in vitro confirmaron la adsorción de las partículas virales en plasma a la superficie de los linfocitos B. Finalmente, en ninguno de los pacientes con RVS se detectó ARN-VHC, sugiriendo que la respuesta virológica se correlacionaba con la erradicación del virus.

No se dispone en la literatura de información tan detallada para el tratamiento con AADs. En esta tesis se incluyeron 3 pacientes tratados con terapia triple basada en boceprevir (1 paciente) o TVR (2 pacientes) que experimentaron recurrencia tardía de la infección entre 6 y 15 meses después de verificarse la RVS. El análisis filogenético de las secuencias virales de la muestra plasmática basal y de la primera positiva tras la recidiva demostró en todos los casos que las secuencias estaban estrechamente relacionadas, indicando que nos encontrábamos ante una recidiva y no una reinfección. En los tres pacientes fue posible confirmar la positividad del ARN viral en linfocitos en muestras tomadas en la semana 24 de seguimiento post tratamiento.

En definitiva, los resultados de nuestro análisis de secuencias del VHC en CMSPs indican que en un pequeño número de pacientes con RVS al tratamiento con fármacos “poco” potentes pueden persistir secuencias virales en linfocitos durante periodos prolongados de tiempo. Por el contrario, con la utilización de AADs ninguno de los pacientes presenta secuencias en linfocitos después de la RVS. En este escenario se confirmaría la realidad de la erradicación de la infección y la ausencia de reservorios extrahepáticos.

5.4.- MARCADORES DE PROGRESIÓN DE CHC.

La curación de la infección por VHC introduce un cambio radical en la interacción virus/huésped. A través del tratamiento, esta interacción -mantenida en la mayoría de los casos durante periodos muy prolongados de tiempo en los hepatocitos- desaparece de forma brusca. Algunos estudios han demostrado que la inhibición de la actividad Aurora quinasa B (AURKB) a través de una interacción directa con la proteína del core del VHC puede relacionarse con el desarrollo y la evolución del CHC (Madejón, 2015), y esta homeostasis cambia tras la eliminación del virus de los hepatocitos. La sobre-expresión de AURKB en el CHC se asocia con una mayor agresividad del tumor y con la aparición de metástasis intrahepáticas, que dan lugar a inestabilidad cromosómica y a la desregulación de genes supresores de tumores y oncogenes. Por otro lado, la ausencia o desregulación de la AURKB puede dar lugar a inestabilidad cromosómica y a la aparición de aneuploidías. En un estudio realizado sobre 151 pacientes se confirmó que la distribución alélica en la posición rs1059476 del gen de la AURKB es diferente en los que desarrollan cirrosis hepática, de forma que el alelo T aparece con una frecuencia significativamente mayor en los pacientes cirróticos en comparación con los no cirróticos, en los que predomina la variante protectora C (Genetic variability of aurora B kinase coding region in patients with chronic hepatitis C with and without cirrhosis. Comunicación presentada en "The International Liver Congress 2016, EASL, April 10-17, Barcelona). Este diferente comportamiento se debería a que los cambios en la estructura de la AURKB modifican los patrones de interacción con la proteína del core viral y en consecuencia su capacidad de inhibir la actividad enzimática.

En este estudio se analizó la composición alélica de la posición rs1059476 del gen de la AURKB en los pacientes con recidiva del CHC después del tratamiento antiviral y sobre el desarrollo de cáncer *de novo* tanto hepático como extrahepático. Los resultados indican que la distribución alélica en los pacientes analizados es similar a la de la población que evoluciona a cirrosis hepática. Sin duda se debe ser cauto a la hora de establecer conclusiones sobre este punto debido al sesgo por el reducido número (solo 3) de pacientes con CHC que se trataron con AADs en nuestra cohorte, ninguno de los cuales recidivó tras el tratamiento. En este sentido, los últimos estudios señalan que la relación entre el tratamiento con AADs y el incremento del riesgo de desarrollar CHC se sitúa más en la recurrencia que en la que la incidencia *de novo* de tumores. Estos resultados preliminares sugieren la importancia de realizar un ensayo con mayor número de pacientes que contemple una firma genética más amplia que incluya tanto la actividad AURKB como la de otras actividades reguladoras de las modificaciones post-traduccionales de histonas como es el caso de las deacetilasas.

CONCLUSIONES

- Los pacientes tratados con antivirales de acción directa en estudios de vida real presentan una tasa de RVS cercana al 100% presentando además un buen cumplimiento del tratamiento.
- Se disponen de fármacos de segunda línea con una alta efectividad para tratar las recaídas.
- La eliminación del VHC produce una disminución en las descompensaciones hepáticas que presentan los pacientes asociada a una disminución en la fibrosis.
- La cinética de aclaramiento del ARN-VHC es más lenta en la fracción de CMSPs que en plasma, independientemente del tratamiento ensayado.
- La utilización de AADs de última generación garantiza la eliminación de secuencias virales en la fracción de CMSPs tras el tratamiento, reforzando así la posibilidad de eliminación/erradicación definitiva del VHC del organismo de los pacientes tratados.
- No se confirma en nuestra cohorte una relación entre la eliminación del VHC por tratamiento con AADs y la recurrencia o desarrollo de novo de cáncer hepático o extrahepático.
- La infección por el VHC produce un empeoramiento en la percepción de calidad de vida en pacientes asintomáticos. Esta percepción mejora en algunos parámetros una vez que se elimina la infección.
- Debido a la alta tasa de RVS la aplicación de técnicas como la secuenciación masiva o la Cold-PCR para la detección en muestras basales de mutaciones de resistencia al tratamiento no serían coste-efectivas.

BIBLIOGRAFÍA

Afdhal N, Reddy KR, Nelson DR, et al. Ledipasvir and sofosbuvir for previously treated HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2014; 370: 1483-1493

Agborsangaya C, BLahtinen M, Cooke T, et al. Comparing the EQ-5D 3L and 5L: measurement properties and association with chronic conditions and multimorbidity in the general population. *Health Qual Life Outcomes*. 2014;12:74

Aguilera A, Navarro D, Rodriguez-Frias F, et al. Prevalence and distribution of hepatitis C virus genotypes in Spain during the 2000-2015 period (the GEHEP study) *J Viral Hepat* 2017 Sep;24(9):725-732

Ahmed A, Felmlee DJ. Mechanisms of Hepatitis C Viral Resistance to Direct Acting Antivirals. *Viruses*. 2015 Dec; 7(12):6716-6729

Aitken CK, Lewis J, Tracy SL, et al. High incidence of hepatitis c virus reinfection in a cohort of injecting drug users. *Hepatology* 2008;48:1746-1752.

Alric L, Fort M, Izopet J, et al. Genes of the major histocompatibility complex class II influence the outcome of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 1997;113:1675-1681

Badia Llach X. Qué es y cómo se mide la calidad de vida relacionada con la salud. *Gastroenterol hepatol* 2004;27(Supl 3):2-6

Bae A., Sun S.C., Qi X., et al. Susceptibility of treatment-naïve hepatitis C virus (HCV) clinical isolates to HCV protease inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2010;54:5288-5297

Baré P. Hepatitis C virus and peripheral blood mononuclear cell reservoirs. *World J Hepatol* 2009;1(1):67

Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Jacobsen H: Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes serin-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J Virol* 1993, 67: 3835-3844

Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:482-496

Bartenschlager R., Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J. Gen. Virol* 2000;81:1631-1648

Behrens SE, Tomei L, De Francesco R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Embo J* 1996, 15: 12-22

Belli LS, Berenguer M, Cortesi PA, et al. Delisting of liver transplant candidates with chronic hepatitis C after viral eradication: a European study. *J Hepatol* 2016;65:524-531

Benova L, Mohamoud YA, Calvert C, Abu-Raddad LJ. Vertical transmission of hepatitis C virus: systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2014 Sep 15;59(6):765-73

Blach S, Zeuzem S, Manns M, Altraif I, Duberg AS, Muljono DH, Waked I, Polaris Observatory HCV Collaborators. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017;2(3):161-76.

Bourliere M, Gordon SC, Flamm SL, et al. Sofosbuvir, velpatasvir and voxilaprevir for previously treated HCV infection. *N Engl J Med* 2017 ;376:2134-2146

Bruix J, Han KH, Gores G, Llovet JM, Mazzaferro V. Liver cancer: Approaching a personalized care. *J Hepatol.* 2015 Apr;62(1 Suppl):S144-56.

Bunchorntavakul C, Reddy KR. Treat chronic hepatitis C virus infection in decompensated cirrhosis-pre- or post-liver transplantation? The ironic conundrum in the era of effective and well-tolerated therapy. *J Viral hepat* 2016; 23: 408-418

Calleja JL, Crespo J, Rincón D, et al. Effectiveness, safety and clinical outcomes of direct-acting antiviral therapy in HCV genotype 1 infection: Results from a Spanish real-work cohort. *J Hepatol.* 2017 Jun;66(6):1138-1148.

Calleja JL, Fornis X, Macías J, Pineda A. Guía AEEH de tratamiento de la infección por el virus de la Hepatitis C 2018.

Capobianchi MR, Giombini E, Rozera G. Next-generation sequencing technology in clinical virology. *Clin Microbiol and Infect* 2013;19:15-22.

Chen Q, Perales C, Soria ME, et al. Deep-sequencing reveals broad subtype-specific HCV resistance mutations associated with treatment failure. *Antiviral Res.* 2019 Dec 16;174:104694 (In Press).

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-362

Colli A, Fraquelli M, Casazza G, et al. Accuracy of ultrasonography, spiral CT, magnetic resonance, and alpha-fetoprotein in diagnosing hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(3):513–523.

D' Amico G, García-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognosis indicators of survival in cirrosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol.* 2006;44:217-31

Danta M, Brown D, Bhagani S, et al. Recent epidemic of acute hepatitis C virus in VIH-positive men who have sex with men linked to high-risk sexual behaviours. *AIDS.* 2007 ;21(8):983-91

Desnoye A, Pospai D, Le MP, et al. Pharmacokinetics, safety and efficacy of a full dose sofosbuvir-based regimen given daily in hemodialysis patients with chronic hepatitis C. *J hepatol* 2016;65:40-47

Di Bisceglie AM, Sterling RK, Chung RT, et al. Serum α -fetoprotein levels in patients with advanced hepatitis C: results from the HALT-C Trial. *J Hepat.* 2005;43(3):434–441.

Donaldson EF, Harrington PR, O'Rear JJ, Naeger LK. Clinical evidence and bioinformatics characterization of potential hepatitis C virus resistance pathway for sofosbuvir. *Hepatol.* 2015;61:56-65

Douam F, Lavillette D, Cosset FL. The mechanism of HCV entry into host cells. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015;129:63-107

El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2012;142(6):1264-1273.e1.

El-Sherif O, Jiang ZG, Tapper EB, et al. Baseline factors associated cirrhosis after direct-acting antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2018; 154: 2111-2121

Estirado A, Justo S, Limia A, Rodríguez-Cobo I, Arce A, del Amo J. Grupo de trabajo del estudio de prevalencia de la infección por hepatitis C en población general en España; 2017-2018. Resultados del 2º Estudio de Seroprevalencia en España (2017-2018). Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social; 2019.

EASL. European Association for the study of the Liver. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. *J of Hepatol*. 2018, Apr 9

European Medicines Agency. Vosevi EPAR summary for the public .European Medicines Agency. Vosevi EPAR summary for the public. https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/vosevi-epar-summary-public_en.pdf. Accessed April 28, 2019

Farci P, Alter HJ, Wong D, et al. A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1911; 325: 98-104

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975;292:767-770.

Feld JJ, Jacobson IM, Hezode C, et al. Sofosbuvir and velpatasvir for HCV Genotype 1,2,4,5 and 6 infection. *N Engl J Med* 2015;373:2599-2607

Feld JJ, Jacobson IM, Sulkowski MS, et al. Ribavirin revisited in the era of direct-acting antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Liver Int*. 2017 Jan;37(1):5-18

Ferri C, Sebastiani M, Giuggioli D, et al. Hepatitis C virus síndrome: A constellation of organ- and non-organ specific autoimmune disorders, B-cell non-Hodgkin's lymphoma, and cancer. *World J Hepatol.* 2015;7(3):327-43

Forns X, Lee SS, Valdes J, 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. *Lancet Infect Dis* 2017;17:1062-1068

Foster GR, Afdhal N, Roberts SK, et al. Sofosbuvir and velpatasvir for HCV genotype 2 and 3 infection. *N Engl J Med* 2015;373:2608-2617.

Foster GR, Gane E, Asatryam A, et al. ENDURANCE-3: safety and efficacy of glecaprevir/pibrentasvir compared to sofosbuvir plus daclatasvir in treatment-naïve HCV genotype 3-infected patients without cirrhosis. *J hepatol* 2017;66:S33

Fujiwara K, Allison RD, Wang RY, et al. Investigation of residual hepatitis c virus in presumed recovered subjects. *Hepatology* 2013;57:483-491.

Galle PR, Forner A, Llovet JM, et al. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 2018 Jul;69(1):182-236.

Gane EJ, Stedman CA, Hyland RH, et al. Nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus ribavirin for hepatitis C. *N Engl J Med* 2013;368:34-44

Gaultier I, Cohen DE, Dumas LM, Larsen L, Podsadecki T, Bernstein B. 8-week efficacy and safety of ABT-333 or ABT-972 with standard-of-care, following 3-day monotherapy in genotype 1 HCV-infected treatment-naive subjects. *Hepatol Int* 2011;5

Geddaway A, Ibrahim YF, Elbahie NM, et al. Direct acting anti-hepatitis C virus drugs: clinical pharmacology and future directions. *J Transl Int Med.* 2017; 5:8-17

Ghancy MC, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*. 2009;49(4):1335-74

Ghany MG, Nelson DR, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis c virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, *Hepatology*. 2011;54:1433-44

Gisbert JP, García-Buey L, Pajares JM, Moreno-Otero R. Prevalence of hepatitis C virus infection in B-cell non-Hodgkin's lymphoma: Systematic review and meta-analysis. *Gastroenterol* 2003; 125: 1723-32

Gontcharova V, Martin R. Infrequent development of resistance in genotype 1-6 hepatitis C virus-infected subjects treated with sofosbuvir in phase 2 and 3 clinical trials. *Clin Infect Dis* 2014;59:1666-1674

Gottwein JM, Bukh J. Cutting the Gordian knot-development nad biological relevance of hepatitis C virus cell culture systems. *Adv Virus Res* 2008;71:51-133

Goutagny N, Fatmi A, De Ledinghen, et al. Evidence of viral replication in circulating dendritic cell during hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2003;187:1951-1958.

Gregori J., Esteban J.I., Cubero M., et al. Ultra-deep pyrosequencing (UDPS) data treatment to study amplicon HCV minor variants. *PLoS ONE*. December 2013 | Volume 8 | Issue 12 | e83361

Gutteling JJ, De Man RA, Van der Plas SM, et al. Determinants of quality of life in chronic liver patients. *Aliment PharmacolTher*. 2006;23:1629-1635

Halfon P, Locarnini S. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. *J Hepatol*. 2011;55:192-206

Hedskog C, Dvory-Sobol H, Gontcharova V, et al. Evolution of the HCV viral population from a patient with S282T detected at relapse after sofosbuvir monotherapy. *J Viral Hepat* 2015

Helbling B, Overbeck K, Gonvers JJ, et al. Host-rather than virus-related factors reduce health-related quality of life in hepatitis C virus infection. *Gut*. 2008;57:1597-1603

Huang R, Rao H, Shang J. et al. A cross-sectional assessment of health-related quality of life in Chinese patients with chronic hepatitis c virus infection with EQ-5D. *Health and Quality of Life Outcome* (2018) 16:124

Ira M, Jacobson E, Eric L, Edwrđ JG, et al. Efficacy of 8 week of Sofosbuvir, Velpatasvir y Voxilaprevir in patients with chronic HCV infection: 2 Phase 3 randomized trials. *Gastroenterology*. 2017; 153:113-22

Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, et al. for ADVANCE study team. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *New Eng J Med*. 2011;364:2405-16

Janssen MF, Pickard AS, Golicki D, et al. Measurement properties of the EQ-5D-5L compared to the EQ-5D-3L across eight patient groups: a multi-country study. *Qual Life Res*. 2013; 22: 1717-1727

Kanwal F, Kramer J, Asch SM, Chayanupatkul M, Cao Y, El-Serag HB. Risk of hepatocellular cancer in HCV patients treated with direct-acting antiviral agents. *Gastroenterology* 2012 Oct, 153(4):996-1005

Kati W, Koev G, Irvin M, et al. In vitro activity and resistance profile of dasabuvir, a non-nucleoside hepatitis C virus polymerase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:1505-1511

Kieffer T.L., Kwong A.D., Picchio G.R. Iral resistance to specifically targeted antiviral therapies for hepatitis C (STAT-Cs) *J. Antimicrob. Chemother*. 2010;65:202-212

Kieffer T.L., de Meyer S., Bartels D.J., et al. Hepatitis C viral evolution in genotype 1 treatment-naïve and treatment-experienced patients receiving telaprevir-based therapy in clinical trials. *PLoS ONE*. 2012;7

Kudo M, Finn RS, Qin S, et al. Lenvatinib vs. Sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* n.d.; 2018: In press

Kuntzen T., Timm J., Berical A., et al. Naturally occurring dominant resistance mutations to hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naïve patients. *Hepatology*. 2008;48:1769-1778

Kwo P, Gane EJ, Peng CY, et al. Effectiveness of elbasvir and grazoprevir combination, with or without ribavirin, for treatment-experienced patients with chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology* 2017;152:164-175

Kwo PY, Lawitz EJ, McCone J, et al; for SPRINT-1 investigators. Efficacy of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-naïve patients with genotype 1 hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomized, multicentre phase 2 trial. *Lancet*. 2010;376:705-16

Kwo PY, Poordad F, Asatryan A, et al. Glecaprevir and pibrentasvir yield high response rates in patients with HCV genotype 1-6 without cirrhosis. *J Hepatol* 2017;67:263-271

Lenz O, Vijgen L, Berke JM, et al. Virologic response and characterization of HCV genotype 2-6 in patients receiving TMC435 monotherapy (study TMC435-C202). *J hepatol* 2013;58:445-451

Li J, Wang L, Mamon H, et al. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nat Med*. 2008;14(5):579-84.

Lin A, Thadareddy A, Goldstein MJ, Lake-Bakaar G. Immune suppression leading to hepatitis C virus re-emergence after sustained virological response. *J Med Virol* 2008;80:1720-1722

Lindenbach, B.D, Rice C.M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*, 2005. 436(7053): p. 933-8.

Livraghu T, Giorgio A, Marin G, et al. Hepatocellular carcinoma and cirrhosis in 746 patients: long-term results of percutaneous ethanol injection. *Radiology* 1995;197:101-108

Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378-390

Lo CM, Ngan H, Tso WK, et al. Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002;35:1164-1171

Lowry D, Coughlan B, McCarthy O, et al. Investigating health-related quality of life, mood and neuropsychological test performance in a homogeneous cohort of Irish female hepatitis C patients. *J Viral Hepat.*

Macdonald A, Crowder K, Street A, McCormick C, Harris M. The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity. *J Gen Virol* 2004, 85:721-729.

Madejón A, Sheldon J, Francisco-Recuero I, et al. Hepatitis C virus-mediated Aurora B kinase inhibition modulates inflammatory pathway and viral infectivity. *J Hepatol.* 2015 Aug;63(2):312-9.

Maggi F, Fornai C, Morrica A, et al. Divergent evolution of hepatitis C virus in liver and peripheral blood mononuclear cells of infected patients. *J Med Virol* 1999;57:57-63.

Martínez-Bausser E, Forn X, Armelles M, et al. Hospital admission is a relevant source of Hepatitis C virus acquisition in Spain. *J hepatol*, 2008 Jan;48(1):20-7

Matsui J, Funahashi Y, Uenaka T, Watanabe T, Tsuruoka A, Asada M. Multi-kinase inhibitor E7080 suppresses lymph node and lung metastases of human mammary breast tumor MDA-MB-231 via inhibition of vascular endothelial growth factor-receptor (VEGF-R) 2 and VEGF-R3 kinase. *Clin Cancer Res* 2008;14:5459-5465

Matsui O, Kobayashi S, Sanada J, et al. Hepatocellular nodules in liver cirrhosis: hemodynamic evaluation (angiography-assisted CT) with special reference to multi-step hepatocarcinogenesis. *Abdom. Imaging* 2011;36:264-272

McNaughton A.L, Sreenu B.V, Silkie G, Gunson R, Templeton K, Leitch L.C.M. Prevalence of mixed genotype hepatitis C virus infection in the UK as determined by genotype-specific PCR and deep sequencing. *J Viral Hepat.* 2018 May; 25(5): 524-534

Nahon P, Layese R, Bourcier V, et al. for the ANRS CO12 CirVir group, Incidence of Hepatocellular Carcinoma After Direct Antiviral Therapy for HCV in Patients With Cirrhosis Included in Surveillance Programs, *Gastroenterology* (2018)

Negro F. Mechanisms and significance of liver steatosis in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2006;12:6756-6765

Negro F. Adverse effects of drugs in the treatment of viral hepatitis. *Best Prat Res Clin Gastroenterol.* 2010;24:183-92

Nelson DR, Cooper JN, Lalezari JP, 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* 2015; 61: 1127-1135

Niebel M, Singer JB, Nickbakhsh S, Gifford RJ, Thomson EC. Hepatitis C and the absence of genomic data in low-income countries: a barrier on the road to elimination? *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017 ;2(10):700-1

Pépin J, Abou Chakra CN, Pépin E, Nault V. Evolution of the global use of unsafe medical injections, 2000-2010. *PloS one.* 2013;8(12):e80948

Pépin J, Abou Chakra CN, Pépin E, Nault V, Valiquette L. Evolution of the global burden of viral infections from unsafe medical injections, 2000-2010. *PLoS One.* 2014;9(6):e99677

Perez-Alvarez R, García-Smaniego J, Sola R, et al. Acute hepatitis C in Spain: a retrospective study of 131 cases. *Rev Esp Enferm Dig.* 2012 Feb;104(1):21-8

Peterson MS, Baron RL. Radiologica diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis.* 2001;5(1):123–144.

Prati D. Transmission of hepatitis C virus by blood transfusion and other medical procedures: a global review. *H Hepatol.* 2006;45(4):607-16

Preamble to the Constitution of the World Health Organization as adopted by the International Health Conference, New York, 19-22 June, 1946; signed on July 1946 by the representatives of 61 States (Official Records of the World Health Organization, n^o2, p.100)

Puigvehí M, De cuencua B, Viu A, et al. Eight weeks of Paritaprevir/r/Ombitasvir + Dasabuvir in HCV genotype 1b with mild-moderate fibrosis: Results from a real-world cohort. *Liver Int.* 2019 Jan;39(1):90-97

Radkowski M, Gallegos-Orozco JF, Jablonska J, et al. Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005, 41:106-114.

Raimondi S, Bruno S, Mondelli MU, Maisonneuve P. Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis. *J Hepatol.* 2009 Jun;50(6):1142–54.

Reig M, Mariño Z, Perelló C, et al. Unexpected early tumor recurrence in patients with hepatitis C virus –related hepatocellular carcinoma undergoing interferon free therapy: a note of caution. *J Hepatol.* 2016; Jul:65(4)

Santi V, Trevisani F, Gramenzi A, et al. Semiannual surveillance is superior to anual surveillance for detection of early hepatocellular carcinoma and patient survival. *J Hepatol* 2010;53:291-297

Saraswat V, Norris S, de Knecht RJ, et al. Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in selected countries – volumen 2. *J viral Hepat.* 2015; Suppl 1:6-25.

Sarin SK, Kumar M. Natural history of HCV infection. *Hepatol Int.* 2012;6(4):684-95

Sarrazin C, Dvory-Sobol H, Svarovskaia ES, et al. Baseline and post-baseline resistance analyses of phase 2/3 studies of ledipasvir/sofosbuvir +/- RBV. *Hepatology* 2014;60, 1128a-1128a

Sarrazin C, Lathouwers E, Peeters M, et al. Prevalence of the hepatitis C virus NS3 polymorphism Q80K in genotype 1 in patients in the European region. *Antiviral Res* 2015;116:10-16

Sarrazin C. The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice. *J Hepatol* 2016 Feb;64(2):486-504

Saxena V, Korashy FM, Sise ME, et al. Safety and efficacy of sofosbuvir-containing regimens in hepatitis C-infected patients with impaired renal function. *Liver Int* 2016;36:807-816

Seef LB. Sustained virological response: is this equivalent to cure of chronic hepatitis C?. *Hepatology* 2013;57:438-440.

Seri E, Park H, Keane M, et al. Rapid decrease in hepatitis C viremia by direct acting antiviral improves the natural killer cell response to IFNalpha. *Gut.*2016 Jan 4.

Sigueira FM, Ferreira VL, Borba HHL, et al. Quality of life of Brazilian chronic hepatitis C patients treated with interferon-free therapies. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2018 Nov 14;60:e72

Silva JP, Berger NG, Tsai S, et al. Transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombosis: a systematic review and meta-analysis. *HPB* 2017;19:659-666

Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993;74:2391-2399

Smith DB, Bukh J, Kuiken C, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment Web resource. *Hepatology* 2014;59:318-327

Spiegel BM, Younossi ZM, Hays RD, Revicki D, Robbins S, Kanwal F. Impact of hepatitis C on health related quality of life: a systematic review and quantitative assessment. *Hepatology*. 2005;41:790-800

Strauss E, Porto-Ferreira FA, de Almeida-Neto C, et al. Altered quality of life in the early stages of chronic hepatitis C is due to the virus itself- *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2014 Feb; 38(1): 40-45

Svarovskaia ES, Gane E, Dvory-Sobol H, et al. L159F and V321A sofosbuvir associated hepatitis C virus NS5B substitutions. *J Infect Dis* 2016;213:1240-1247.

Terrault N. A., Zeuzem S., Di bisceglie A. M., et al. Effectiveness of Ledipasvir-Sofosbuvir Combination in Patients With Hepatitis C Virus Infection and Factors associated With Sustained Virologic Response. *Gastroenterology*. 2016;151(6):1131-1140

Terrault NA, Dodge JL, Murphy EL, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among monogamous heterosexual couples: the HCV partners study. *Hepatology*. 2013 Mar;57(3):881-9

Terrault NA, Zeuzem S, Di Bisceglie AM, et al. Effectiveness of ledipasvir-sofosbuvir combination in patients with hepatitis c virus infection and factors associated with sustained virologic response. *Gastroenterology* 2016;151:1131-1140, e1135

Thein HH, Yi Q, Dore GJ, Krahn MD. Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression. *Hepatology*. 2008;48(2):418-31

Thomas DL, Astemborski J, Rai RM, et al. The natural history of hepatitis c virus infection: host, viral, an environmental factors. *J A M A* 2000; 284: 450-56

Trinchet JC, Chaffaut C, Bourcier V, et al. Ultrasonographic surveillance of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a randomized trial comparing 3- and 6 month periodicities. *Hepatology* 2011 ;54:1987-1997

Tsai W-C et al. MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009;49:1571-1582

Urbani S, Amadei B, Fisicaro P, et al. Heterologous T cell immunity in severe hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2005; 201:675-80

Vallet S, Viron F, Henquell C, et al. NS3 protease polymorphism and natural resistance to protease inhibitors in French patients infected with HCV genotypes 1-5 *Antivir Ther* 2011;16:1093-1102

Van Meer S, de Man RA, Coenraad MJ, et al. Surveillance for hepatocellular carcinoma is associated with increased survival: results from a large cohort in the Netherlands. *J Hepatol*. 2015;63(5):1156–1163.

Veerapu NS, Raghuraman S, Liang TJ, Heller T, Rehermann B. Sporadic reappearance of minute amounts of hepatitis C virus RNA after successful therapy stimulates cellular immune responses. *Gastroenterology* 2011;140: 676- 685.

Villani R, Facciorusso A, Bellanti F, et al. DAAs rapidly reduce inflammation but increase serum VEGF level. A rationale for tumor risk during anti-HCV treatment. *PLoS One* 2016;11:e0167934

Vosevi[®] (prescribing Information). Foster City, CA: Gilead Sciences, INC; 2017

Waring JF. Serum miR-122 may serve as a biomarker for response to direct acting antiviral: effect of paritaprevir/R with dasabuvir or ombitasvir on miR-122 in HCV-infected subjects. *J Viral Hepat* 2016;23:96-104

Waziry R, Hajarizadeh B, Grebely J, et al. Hepatocellular carcinoma risk following direct-acting antiviral HCV therapy: Asystematic review, meta-analyses, and meta-regression. *J Hepatol* 2017 Dec;67(6):1204-1212

Weissenborn K, Ennen JC, Bokemeyer M, et al. Monoaminergic neurotransmission is altered in hepatitis C virus infected patients with chronic fatigue and cognitive impairment. *Gut*. 2006;55:1624-1630

Welker M-W, Zeuzem S. Occult hepatitis C: how convincing are the current data?. *Hepatology* 2009;49:665-675.

Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* 2014 Nov;66(1 Suppl):S58-68

WHO. Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection. July 108. World Health Organization.

WHO. Global hepatitis report, 2017. Geneva: World Health Organization; 2017

WHOQOL Group. What Quality of life? World Health Organization Quality of Life Assessment. *World Health Forum* 1996; 17(4): 354-6

William A. The EuroQol Instrument. En: Kind P, Brooks R, Rabin R, editors. EQ-5D concepts and methods. Netherlands: Springer, 2005. Pp. 1-17

Yeh WW, Lipardi C, Jumes P, et al. MK-8742, a HCV NS5A inhibitor with a broad spectrum of HCV genotypic activity, demonstrates potent antiviral activity in genotype-1 and -3 HCV-infected patients. *Hepatology* 2013;58:438a-439a

Younossi ZM, Stepanova M, Henry L. Performance and Validation of Chronic Liver Disease Questionnaire-Hepatitis C Version (CLDQ-HCV) in Clinical Trials of Patients with Chronic Hepatitis C. *Value Health* 2016 Jul-Aug; 19(5):544-551

Younossi ZM, Stepanova M, Marcellin P, et al. Treatment with ledipasvir and sofosbuvir improves patient-reported outcomes: Results from the ION-1, -2, and -3 clinical trials. *Hepatology* 2015 Jun;61(6): 1798-808

Zuckerman E, Zuckerman T, Levine AM, et al. Hepatitis c virus infection in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Annals of Internal medicine* 1997;127:423-428

Zeuzem S, Andreone P, Pol S, et al. Telaprevir for retreatment of HCV infection. *New Eng J Med*. 2011;364:2417-28

Zeuzem S, Foster GR, Wang S, et al. Glecaprevir-pibrentasvir for 8 or 12 weeks in HCV genotype 1 or 3 infection. *N Engl J Med* 2018;378:354-369

Zeuzem S, Serfaty L, Vierling J, et al. The safety and efficacy of elbasvir and grazoprevir in participants with hepatitis C virus genotype 1b infection. *J Gastroenterol* 2018

Zhu AX, Duda DG, Sahani DV, Jain RK. HCC and angiogenesis: possible targets and future directions. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011 May;8(5):292-301

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Virus de la hepatitis C. Estructura del genoma viral	23
Figura 2. Distribución mundial VHC y genotipos.....	25
Figura 3. Evolución de la infección por VHC.....	26
Figura 4. Clasificación BCLC.....	30
Figura 5. Esquema de ciclos de temperatura de la técnica de Cold-PCR.....	43
Figura 6. Diagrama de flujo de los diferentes sub-proyectos... ..	53
Figura 7. Factores que afectaron a la elección de pauta de tratamiento durante el proyecto	56
Figura 8. Porcentaje global de respuesta virológica sostenida y fracaso virológico en la cohorte de pacientes	75
Figura 9. Tasas de respuesta virológica sostenida	76
Figura 10. Distribución de tratamientos recibidos por los 12 pacientes que reactivaron la replicación viral tras el tratamiento.....	77
Figura 11. Tratamientos de rescate utilizados... ..	79
Figura 12. Ejemplo de optimización de reacciones de amplificación	83
Figura 13. Ejemplo de ensayo de optimización de reacción de condiciones de Cold-PCR.....	84
Figura 14. Análisis de mezclas de plásmidos.....	85
Figura 15. Resultados de Cold-PCR en plasmas basales.....	89
Figura 16. Perfil de aclaramiento de ARN-VHC en plasma y CMSPs	92
Figura 17. Análisis filogenético de secuencias obtenidas en Cold-PCR	94
Figura 18. Análisis filogenético de la región codificante de la actividad NS3-proteasa durante el tratamiento con telaprevir en cinco pacientes.....	95
Figura 19. Características clínicas y tratamientos administrados a los tres	

pacientes que sufrieron recaída tardía de la infección96

Figura 20. Distribución de los pacientes F 4 que han presentado algún

tipo de descompensación previo al tratamiento 97

Figura 21. Distribución de los pacientes F 4 que han presentado algún tipo de descompensación

después del tratamiento 98

LISTADO DE TABLAS.

Tabla 1. Pautas de tratamiento con los diferentes AADs de última generación en base al genotipo viral infectante... ..	37
Tabla 2. Listado de pautas de tratamiento utilizadas en el proyecto, y los criterios de administración conforme al genotipo infectante	57
Tabla 3. Listado de pautas de tratamiento de rescate utilizadas.....	61
Tabla 4. Listado de cebadores y sondas de hibridación para la identificación/secuenciación del gen de la AURKB.....	63
Tabla 5. Características de la sub-población de pacientes.....	65
Tabla 6. Características basales de los pacientes tratados con antivirales de acción directa	70
Tabla 7. Descripción de los tratamientos y pautas utilizados... ..	71
Tabla 8. Distribución de los tratamientos estratificado según genotipo, estado fibrosis y experiencia previa en tratamiento.....	72
Tabla 9. Diferencias entre los pacientes tratados o no con regímenes basado en sofosbuvir... ..	73
Tabla 10. Diferencias entre pacientes tratados con y sin Ribavirina.....	74
Tabla 11. Características basales de los pacientes que presentaron recidiva	78
Tabla 12. Descripción detallada de las pautas de tratamiento que fracasaron y los tratamientos de rescate utilizados en cada caso	79
Tabla 13. Distribución de mutaciones de resistencia en los pacientes sin respuesta al tratamiento	80
Tabla 14. Secuencia y posición de los cebadores utilizados en las reacciones de cold-PCR.....	82
Tabla 15. Resultados de amplificación de especies minoritarias de plásmido	85
Tabla 16. Detalle de los análisis comparativos de las mutaciones de resistencia utilizando diferentes métodos de análisis en muestras basales y finales de tratamiento	87

Tabla 17. Resultado del análisis secuencial de muestras de los pacientes no respondedores a terapia triple tomadas a diferentes tiempos del tratamiento	88
Tabla 18. Oligonucleótidos utilizados en la amplificación de los genes NS5A/NS5B.....	91
Tabla 19. Datos analíticos y marcadores de fibrosis APRI y FIB-4 de los pacientes F 4 previo y posterior al tratamiento.....	98
Tabla 20. Datos analíticos y escala MELD en pacientes F4 previo al tratamiento y posterior al tratamiento	99
Tabla 21. Características de los pacientes que desarrollaron CHC	99
Tabla 22. Características de los pacientes que desarrollaron tumores extrahepáticos	100
Tabla 23. Comparación de la composición alélica de la posición rs1059476 de la actividad AurKB entre población F3-F4 general y las obtenidas en pacientes con HCC	100
Tabla 24. Estudio de calidad de vida. Características basales de los pacientes.....	101
Tabla 25. Resultados descriptivos del cuestionario SF-36 en pacientes tratados	103
Tabla 26. Resultados descriptivos del cuestionario EQ-5D-5L en el grupo de pacientes tratados.....	104
Tabla 27. Análisis estratificado de parámetros de salud general y vitalidad de acuerdo a situación laboral	105

ANEXO 1

CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS CALIDAD DE VIDA.

Sexo: Hombre Mujer

Edad..... años

Estado civil: Soltero Soltero con pareja Casado Viudo Divorciado

Nivel de estudios: Primarios Secundarios Superior

Situación Laboral: Empleado Desempleado

Nacionalidad: España Extranjero.....

Tratamiento que va a recibir

Grado de fibrosis hepática Fibroscan Biopsia

Tratado previamente Si No

ANEXO 2

Su Salud y Bienestar

Por favor conteste las siguientes preguntas. Algunas preguntas pueden parecerse a otras pero cada una es diferente.

Tómese el tiempo necesario para leer cada pregunta, y marque con una la casilla que mejor describa su respuesta.

¡Gracias por contestar a estas preguntas!

1. En general, usted diría que su salud es:

<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
Excelente	Muy buena	Buena	Regular	Mala

2. ¿Cómo diría usted que es su salud actual, comparada con la de hace un año?:

Mucho mejor ahora que hace un año	Algo mejor ahora que hace un año	Más o menos igual que hace un año	Algo peor ahora que hace un año	Mucho peor ahora que hace un año
<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

3. Las siguientes preguntas se refieren a actividades o cosas que usted podría hacer en un día normal. Su salud actual, ¿le limita para hacer esas actividades o cosas? Si es así, ¿cuánto?

	Sí, me limita mucho	Sí, me limita un poco	No, no me limita nada
a <u>Esfuerzos intensos</u> , tales como correr, levantar objetos pesados, o participar en deportes agotadores.	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³
b <u>Esfuerzos moderados</u> , como mover una mesa, pasar la aspiradora, jugar a los bolos o caminar más de 1 hora.	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³
c Coger o llevar la bolsa de la compra.	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³
d Subir <u>varios</u> pisos por la escalera.	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³
e Subir <u>un sólo</u> piso por la escalera.	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³
f Agacharse o arrodillarse.	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³
g Caminar <u>un kilómetro o más</u>	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³
h Caminar varios centenares de metros.	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³
i Caminar unos 100 metros.	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³
j Bañarse o vestirse por sí mismo.	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³

4. Durante las 4 últimas semanas, ¿con qué frecuencia ha tenido alguno de los siguientes problemas en su trabajo o en sus actividades cotidianas, a causa de su salud física?

	Siempre	Casi siempre	Algunas veces	Sólo alguna vez	Nunca
a ¿Tuvo que <u>reducir el tiempo</u> dedicado al trabajo o a sus actividades cotidianas?	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³	<input type="checkbox"/> ⁴	<input type="checkbox"/> ⁵
b ¿Hizo <u>menos</u> de lo que hubiera querido hacer?	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³	<input type="checkbox"/> ⁴	<input type="checkbox"/> ⁵
c ¿Tuvo que <u>dejar de hacer algunas tareas</u> en su trabajo o en sus actividades cotidianas?	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³	<input type="checkbox"/> ⁴	<input type="checkbox"/> ⁵
d ¿Tuvo <u>dificultad</u> para hacer su trabajo o sus actividades cotidianas (por ejemplo, le costó más de lo normal)?	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³	<input type="checkbox"/> ⁴	<input type="checkbox"/> ⁵

5. Durante las 4 últimas semanas, ¿con qué frecuencia ha tenido alguno de los siguientes problemas en su trabajo o en sus actividades cotidianas, a causa de algún problema emocional (como estar triste, deprimido o nervioso)?

	Siempre	Casi siempre	Algunas veces	Sólo alguna vez	Nunca
a. ¿Tuvo que <u>reducir el tiempo</u> dedicado al trabajo o a sus actividades cotidianas <u>por algún problema emocional</u> ?	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³	<input type="checkbox"/> ⁴	<input type="checkbox"/> ⁵
b. ¿Hizo <u>menos</u> de lo que hubiera querido hacer <u>por algún problema emocional</u> ?	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³	<input type="checkbox"/> ⁴	<input type="checkbox"/> ⁵
c. ¿Hizo su trabajo o sus actividades cotidianas <u>menos cuidadosamente</u> que de costumbre, <u>por algún problema emocional</u> ?	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³	<input type="checkbox"/> ⁴	<input type="checkbox"/> ⁵

6. Durante las 4 últimas semanas, ¿hasta qué punto su salud física o los problemas emocionales han dificultado sus actividades sociales habituales con la familia, los amigos, los vecinos u otras personas?

Nada	Un poco	Regular	Bastante	Mucho
<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³	<input type="checkbox"/> ⁴	<input type="checkbox"/> ⁵

7. ¿Tuvo dolor en alguna parte del cuerpo durante las 4 últimas semanas?

No, ninguno	Sí, muy poco	Sí, un poco	Sí, moderado	Sí, mucho	Sí, muchísimo
<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³	<input type="checkbox"/> ⁴	<input type="checkbox"/> ⁵	<input type="checkbox"/> ⁶

8. Durante las 4 últimas semanas, ¿hasta qué punto el dolor le ha dificultado su trabajo habitual (incluido el trabajo fuera de casa y las tareas domésticas)?

Nada	Un poco	Regular	Bastante	Mucho
<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³	<input type="checkbox"/> ⁴	<input type="checkbox"/> ⁵

9. Las preguntas que siguen se refieren a cómo se ha sentido y cómo le han ido las cosas durante las 4 últimas semanas. En cada pregunta responda lo que se parezca más a cómo se ha sentido usted. Durante las últimas 4 semanas ¿con qué frecuencia...

	Siempre	Casi siempre	Algunas veces	Sólo alguna vez	Nunca
a se sintió lleno de vitalidad?	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³	<input type="checkbox"/> ⁴	<input type="checkbox"/> ⁵
b estuvo muy nervioso?	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³	<input type="checkbox"/> ⁴	<input type="checkbox"/> ⁵
c se sintió tan bajo de moral que nada podía animarle?	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³	<input type="checkbox"/> ⁴	<input type="checkbox"/> ⁵
d se sintió calmado y tranquilo?	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³	<input type="checkbox"/> ⁴	<input type="checkbox"/> ⁵
e tuvo mucha energía?	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³	<input type="checkbox"/> ⁴	<input type="checkbox"/> ⁵
f se sintió desanimado y deprimido?	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³	<input type="checkbox"/> ⁴	<input type="checkbox"/> ⁵
g se sintió agotado?	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³	<input type="checkbox"/> ⁴	<input type="checkbox"/> ⁵
h se sintió feliz?	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³	<input type="checkbox"/> ⁴	<input type="checkbox"/> ⁵
i se sintió cansado?	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³	<input type="checkbox"/> ⁴	<input type="checkbox"/> ⁵

10. Durante las 4 últimas semanas, ¿con qué frecuencia la salud física o los problemas emocionales le han dificultado sus actividades sociales (como visitar a los amigos o familiares)?

Siempre	Casi siempre	Algunas veces	Sólo alguna vez	Nunca
<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³	<input type="checkbox"/> ⁴	<input type="checkbox"/> ⁵

11. Por favor diga si le parece CIERTA o FALSA cada una de las siguientes frases:

	Totalmente cierta	Bastante cierta	No lo sé	Bastante falsa	Totalmente falsa
a Creo que me pongo enfermo más fácilmente que otras personas	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³	<input type="checkbox"/> ⁴	<input type="checkbox"/> ⁵
b Estoy tan sano como cualquiera	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³	<input type="checkbox"/> ⁴	<input type="checkbox"/> ⁵
c Creo que mi salud va a empeorar	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³	<input type="checkbox"/> ⁴	<input type="checkbox"/> ⁵
d Mi salud es excelente	<input type="checkbox"/> ¹	<input type="checkbox"/> ²	<input type="checkbox"/> ³	<input type="checkbox"/> ⁴	<input type="checkbox"/> ⁵

Debajo de cada enunciado, marque UNA casilla, la que mejor describe su salud HOY.

MOVILIDAD

- No tengo problemas para caminar
- Tengo problemas leves para caminar
- Tengo problemas moderados para caminar
- Tengo problemas graves para caminar
- No puedo caminar

AUTO-CUIDADO

- No tengo problemas para lavarme o vestirme
- Tengo problemas leves para lavarme o vestirme
- Tengo problemas moderados para lavarme o vestirme
- Tengo problemas graves para lavarme o vestirme
- No puedo lavarme o vestirme

ACTIVIDADES COTIDIANAS (Ej.: trabajar, estudiar, hacer las tareas domésticas, actividades familiares o actividades durante el tiempo libre)

- No tengo problemas para realizar mis actividades cotidianas
- Tengo problemas leves para realizar mis actividades cotidianas
- Tengo problemas moderados para realizar mis actividades cotidianas
- Tengo problemas graves para realizar mis actividades cotidianas
- No puedo realizar mis actividades cotidianas

DOLOR / MALESTAR

- No tengo dolor ni malestar
- Tengo dolor o malestar leve
- Tengo dolor o malestar moderado
- Tengo dolor o malestar fuerte
- Tengo dolor o malestar extremo

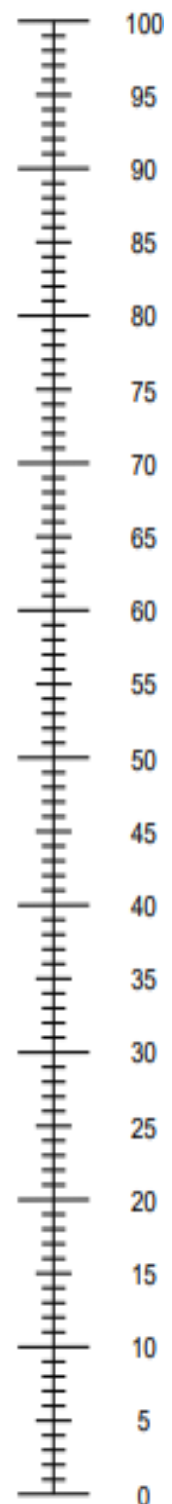
ANSIEDAD / DEPRESIÓN

- No estoy ansioso ni deprimido
- Estoy levemente ansioso o deprimido
- Estoy moderadamente ansioso o deprimido
- Estoy muy ansioso o deprimido
- Estoy extremadamente ansioso o deprimido

- Nos gustaría conocer lo buena o mala que es su salud HOY.
- La escala está numerada del 0 al 100.
- 100 representa la mejor salud que usted se pueda imaginar. 0 representa la peor salud que usted se pueda imaginar.
- Marque con una X en la escala para indicar cuál es su estado de salud HOY.
- Ahora, en la casilla que encontrará a continuación escriba el número que ha marcado en la escala.

SU SALUD HOY =

La mejor salud
que usted se
pueda imaginar



La peor salud
que usted se
pueda imaginar

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS