

**Universidad de Granada**



**Tesis doctoral**

**Evaluación de los métodos de genotipado del virus de la hepatitis C y detección del polimorfismo Q80K del gen NS3 para pacientes naïve a los nuevos antivirales de acción directa**

Directores de tesis:

Dr. Federico García García

Dr. José Hernández Quero

Dra. Marta Álvarez Estévez

Doctoranda:

Natalia Chueca Porcuna

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autora: Natalia Chueca Porcuna  
ISBN: 978-84-9125-686-1  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/43288>



*A veces sentimos que lo que hacemos  
es tan solo una gota en el mar,  
pero el mar sería menos si le faltara una gota*  
Madre Teresa de Calcuta

A mis padres, a mis hermanos

A Federico García García

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Federico García García, el Dr. José Hernández Quero y la Dra. Marta Álvarez Estévez la confianza que han depositado en mi y espero saber recompensar la paciencia que han demostrado tener para ver al fin la tesis realizada.

Gracias a Don Gonzalo Piédrola y a Doña M<sup>a</sup> Carmen Maroto por haberme ayudado en mi formación. A Trini quiero agradecerle tantos buenos momentos compartidos y tantos buenos consejos, a José Antonio debo agradecerle mucho porque ha sido un gran apoyo y un pilar en mi carrera, a Pepe Liébana por enseñarme a disfrutar de la Microbiología, y a todos, Fernando, Carmen, Juan, Vicente, Alejandro, Raquel, Pilar, Ana Belén, José Ángel (hay que dar con la cura del VIH), Silvia, Carmina, Lina, Teresa Cabezas, M<sup>a</sup> Isabel Cabeza, M<sup>a</sup> Carmen Domínguez, Mercedes Maqueda, gracias, de corazón por todo lo que me habéis enseñado y aportado.

Debo un especial reconocimiento a las “niñas” y “niños” con los que he podido trabajar codo a codo para sacar adelante esta tesis, Pepi López, M<sup>a</sup> Dolores Mérida, José Antonio Sánchez, sabed que sin vuestra ayuda no lo hubiera podido conseguir. A Emi Agudo quiero agradecerle el haberse cruzado en mi camino, al igual que a Pilar, nuestra Carmen Ortiz, que ojalá nunca cambie, a José “el secre” (mmmm, buenísimos siempre), M<sup>a</sup> Luz, Carmen Pérez (de lujo te sale), Reme, Felicidad, Juani Torres, Juani Gallego, Costela, Hita, Lola, Puri, Paqui Ginés, Paqui López, Loli (la maestra), Encarnita, Marifé, Trini, M<sup>o</sup> Dolores porque sois todas estupendas y espero poder seguir disfrutando de vuestra compañía. Muchas más personas han contribuido a esta tesis y no olvido, Vivi, Isabeles, celadores y un largo, largo etc.

Especial mención quiero hacer a Isabel Moreno, gracias por haberme estado dando ánimos y aguantándome todos estos años, tu amistad ha sido un apoyo enorme para mi.

Finalmente pero no menos importante, todo esto nunca hubiera sido posible sin el amparo incondicional de mi familia, mis padres y mis hermanos (Sofía, Carlos, Marta, Nicol y Carolina). Esta es también vuestra tesis.

## COMPROMISO DE RESPETO DE DERECHOS DE AUTOR

El doctorando Natalia Chueca Porcuna y los directores de la tesis Federico García García, José Hernández Quero, Marta Álvarez Estévez. Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada a 10 de Noviembre de 2015

Director/es de la Tesis

Dr. Federico García García

Fdo.:

Doctorando

Natalia Chueca Porcuna

Fdo.:

Director/es de la Tesis

Dr. José Hernández Quero

Fdo.:

Director/es de la Tesis

Dra. Marta Álvarez Estévez

Fdo.:

## **TÍTULO**

Evaluación de los métodos de genotipado del virus de la Hepatitis C y detección del polimorfismo Q80K del gen NS3 para pacientes naïve a los nuevos antivirales de acción directa.



## RESÚMEN

Desde el año 2012 en que se aprueban los primeros Antivirales de Acción Directa (AADs), el tratamiento de la hepatitis C (VHC) ha experimentado un cambio histórico y se está viviendo un momento muy esperanzador para erradicar esta enfermedad. Los resultados de los ensayos clínicos realizados con estos nuevos tratamientos alcanzan tasas de respuestas virales del 90 al 100% dependiendo de la combinación del fármaco y del genotipo del virus de la hepatitis C (VHC). Y esto es así, las guías nacionales e internacionales (AASLD/IDSA., 2015) (EASL, 2015) ([GEHEP 2015](#)) nos van a recomendar emplear una u otra combinación de AADs según la condición clínica del paciente (en especial grado de fibrosis), y según el genotipo del VHC. Desde luego hay mas variables que manejar en la consulta clínica como puede ser la valoración clínica de las manifestaciones extrahepáticas, grado de replicación del virus, necesidad de trasplante, embarazo y un largo etc..... En este trabajo de tesis uno de los aspectos en los que hemos incidido ha sido la importancia de la correcta determinación del genotipo del VHC.

Existen varios ensayos comerciales con marcado CE para determinar el genotipo del VHC, todos ellos se basan en amplificar regiones conservadas del genoma del VHC, como pueden ser 5'-UTR, Core y NS5B. La mayoría de los ensayos van dirigidos frente a las 2 primeras regiones ya que al ser mas conservadas aseguran una mayor sensibilidad a la hora de amplificar las muestras. Pero hay que añadir que al ser regiones mas conservadas se discrimina mal entre algunos genotipos y subtipos. En cambio NS5B es una región mucho más variable dentro del genoma del VHC y cabe esperar que discrimine mejor los genotipos. De hecho, así ocurre y actualmente se considera la secuenciación de este gen y el análisis filogenético posterior como la técnica de referencia para genotipo el VHC (Simmonds P B. J., 2005) (Murphy DG, 2007) (Tong, 2015). En 2013 el "International Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV)", el cual se encarga de mantener y actualizar periódicamente las paneles de las cepas de referencia, revisar o proponer nuevos genotipos o subtipos de VHC entre otros cometidos nos recuerda que para asignar nuevos genotipos se requiere de al menos la secuenciación

completa de 1 o más regiones codificadoras, además de otra serie de cumplimientos (Smith DB, 2014), lo cual llama la atención que estemos empleando una región que ni siquiera se contempla en los grupos de estudio de Taxonomía del VHC. La siguiente pregunta que se nos planteaba era averiguar qué grado de concordancia había entre los diferentes ensayos comerciales y la secuenciación de NS5b. Si encontráramos que no existiera mucha discordancia no haría falta realizar una técnica casera de secuenciación y así se podían emplear los ensayos con marcado CE.

Para evaluar este aspecto se seleccionaron las siguientes técnicas por ser las más empleadas: Trugene HCV genotyping kit (Siemens), VERSANT HCV Genotype 2.0 assay (Siemens), y Real Time HCV genotype II (Abbott), y se reclutaron varios laboratorios de diferentes provincias de España: Hospital Conxo-CHUS Santiago de Compostela, Hospital Ramón y Cajal de Madrid, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona y Hospital de la Princesa de Madrid. Gracias a un proyecto que concedió el grupo de estudio de las hepatitis víricas (GEHEP) de la SEIMC (Proyecto GEHEP-007) pudo financiarse el estudio y fruto del trabajo ha sido implantar y recomendar como nueva tecnología para la determinación del genotipado del VHC en el laboratorio de rutina asistencial el empleo de la secuenciación de NS5B.

De los resultados obtenidos se encontró una discordancia total del 34% (exactitud del 66%) para el ensayo de Trugene y del 18% para VERSANT HCV2.0 (exactitud del 82%). El ensayo Abbott identificó correctamente todos los subtipos 1a y 1b y los genotipos 2, 3, 4 y 5, pero no era capaz de discriminar el subtipo de los genotipos 2, 3, 4 y 5. Las principales discordancias que se encontraron en el ensayo de Trugene VHC fue clasificar mal el genotipo 1b (n = 14). 13 de los 14 casos se reclasificaron como 1a mediante secuenciación de ADN NS5B, y 1 caso reclasificados como 3a; además, 5 casos mal clasificados como 1a por Trugene se reclasificaron como 1b mediante secuenciación la técnica de referencia.

Respecto a VERSANT HCV 2.0, encontramos discordancias importantes en el 9% de los casos, siendo, todos excepto uno (n = 8) debidos a una clasificación errónea del genotipo 1b que fueron posteriormente reclasificados como 1a por el método de

referencia; el otro caso registrado fue clasificando erróneamente un genotipo 1 que fue reclasificado como 4d por secuenciación del ADN NS5B.

Existen discordancias mayores y menores entre los diferentes ensayos empleados en el genotipado de VHC, el ensayo Trugene, sobre todo, y el Versant HCV 2.0, en menor medida, puede fallar para diferenciar genotipos del VHC. En virtud de las discordancias observadas, recomendamos implantar la secuenciación de la región NS5B en la rutina asistencial.

En este trabajo también hemos abordado el estudio de la prevalencia de ciertos polimorfismos, que se ha demostrado que tienen un claro impacto sobre la respuesta al tratamiento. Atendiendo a los resultados de los ensayos con los nuevos tratamientos que se iban aprobando, se empezó a describir un polimorfismo en NS3, el polimorfismo Q80K, que claramente disminuía la tasa de respuesta viral sostenida en los pacientes de genotipo 1a que se trataban con Simeprevir+pegIFN+RVB. De hecho, en las nuevas guías que iban apareciendo en el año 2014, con las nuevas pautas de tratamiento, se hacía referencia a la necesidad de detectar este polimorfismo en los pacientes con genotipo 1a que iniciarían tratamiento con esta combinación. Puesto que era el único cambio que se recomendaba estudiar y con la idea de implementar una técnica más sencilla y rápida nace el segundo estudio de esta tesis, cuyo objetivo pasó a ser el desarrollo de una PCR alelo específica (PCR-AE) para la detección del polimorfismo Q80K. Poder desarrollar esta técnica se nos planteaba como un gran desafío debido a la naturaleza del VHC ya que este virus presenta una gran variabilidad en su secuencia. Podemos decir que hemos logrado desarrollar esta metodología y actualmente se encuentra protegida con una patente de invención, (ver Anexo 2) y que además ha servido para poner a punto la determinación del polimorfismo Q80K la cual ha quedado incorporada a la cartera del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario San Cecilio de Granada para los pacientes remitidos por los servicios de Digestivo e Infecciosas de gran parte de la geografía nacional.

Finalmente constatamos que existían pocos estudios que dieran datos sobre la prevalencia del polimorfismo Q80K en nuestro entorno. Se conocía de la alta prevalencia

en EEUU y empezaban a aparecer datos sobre países como Francia y Suecia, pero se desconocía el valor numérico en España. Por tanto aprovechando la nueva tecnología implantada en nuestro laboratorio se calculó la prevalencia de polimorfismo Q80K para genotipo 1a, la cual hemos estimado en el 9,6%. Existen grandes diferencias de prevalencia del polimorfismo Q80K dependiendo del área geográfica, en EEUU se ha documentado hasta un 48.1% (Lenz, 2014) y en Europa (Sarrazin, 2015) varía dependiendo del país, así tenemos tasas en Polonia del 75%, Alemania del 29%, UK del 22,6%, Italia del 20%, Bélgica del 18%, Austria del 16%, Suiza del 15,2%, Francia del 13,8% o 10.5% (Morel V, 2014), Holanda del 11,5% España del 8,5%, Portugal del 8,1% y Noruega con un 4,8%. Esta variabilidad se cree se debe a la diferente distribución de los clados I y II que se han descrito para las secuencias NS3 (Pickett, 2011). Nosotros hemos obtenido un 80% de prevalencia del clado II en nuestro estudio y está descrito que en este clado la prevalencia del polimorfismo Q80K es baja o nula (De Luca, 2013), de ahí la baja prevalencia encontrada.

## **PALABRAS CLAVE**

VHC, Genotipado VHC, NS5B, Polimorfismo Q80K, AAD, PCR alelo específica.  
Proteasa VHC NS3. Simeprevir

## INDICE DE ABREVIATURAS

<b>aa</b>	Aminoácidos
<b>AADs</b>	Agentes antivirales de acción directa
<b>ADN</b>	Acido Desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Acido Desoxirribonucleico copia
<b>ARN</b>	Acido Ribonucleico
<b>ARV</b>	Antirretroviral
<b>BOC</b>	Boceprevir
<b>C</b>	Citosina
<b>Ct</b>	Crossing point
<b>CV</b>	Carga Viral
<b>DCV</b>	Daclatasvir
<b>DGV</b>	Dolutegravir
<b>dNTP</b>	Desoxinucleótidos trifosfato
<b>DRV</b>	Darunavir
<b>E</b>	Estructural
<b>EA</b>	Efectos adversos
<b>EH</b>	Elastometría hepática
<b>EMA</b>	Agencia Europea del Medicamento
<b>G</b>	Guanosina
<b>GEHEP</b>	Grupo Español de Estudio de Hepatitis Viral
<b>GESIDA</b>	Grupo Español de Estudio de SIDA
<b>HVR</b>	Región Hipervariable
<b>IFN</b>	Interferón
<b>INF-<math>\alpha</math>-Peg</b>	interferón $\alpha$ pegilado
<b>IP</b>	Inhibidor de la Proteasa
<b>IRES</b>	Sitio interno de unión al ribosoma
<b>Kda</b>	Kilodalton
<b>M</b>	Molar
<b>min</b>	Minutos
<b>mM</b>	Milimolar
<b>NC</b>	No codificante
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>NS</b>	No estructural
<b>nt</b>	Nucleótidos
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ORF</b>	Marco abierto de lectura

<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBO</b>	Placebo
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PCR-AE</b>	Reacción en cadena de la polimerasa alelo específica
<b>PR</b>	Proteasa
<b>RdRp</b>	ARN polimerasa ARN dependiente
<b>RE</b>	Retículo Endoplásmico
<b>RT</b>	Transcripción reversa
<b>RT-PCR</b>	Transcripción reversa - Reacción en cadena de la polimerasa
<b>RVS</b>	Respuesta virológica sostenida
<b>Sec</b>	Segundos
<b>SMV</b>	Simeprevir
<b>SOF</b>	Sofosbuvir
<b>T</b>	Timidina
<b>TAR</b>	Tratamiento antirretroviral
<b>TGR</b>	Duración de tratamiento guiado por respuesta
<b>TH</b>	Trasplante hepático
<b>Tm</b>	Temperatura melton
<b>U</b>	Unidades
<b>UTRs</b>	Regiones no codificantes
<b>VHC</b>	Virus de la Hepatitis C
<b>μl</b>	Microlitros
<b>μM</b>	Micromolar
<b>DSV</b>	Dasabuvir
<b>LDV</b>	Ledipasvir
<b>OBV</b>	Ombitasvir
<b>PTV</b>	Paritaprevir
<b>TPV</b>	Telaprevir
<b>SIM</b>	Simeprevir
<b>RTV</b>	Ritonavir
<b>SNPs</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido
<b>HTAs</b>	Agentes dirigidos a dianas del huésped
<b>PEG</b>	Polietilenglicol

### Abreviaturas nucleótidos

<b>A</b>	Adenina
<b>C</b>	Citosina
<b>G</b>	Guanina
<b>T (o U)</b>	Timina (o Uracilo)
<b>R</b>	A o G
<b>Y</b>	C o T
<b>S</b>	G o C
<b>W</b>	A o T
<b>K</b>	G o T
<b>M</b>	A o C
<b>B</b>	C o G o T
<b>D</b>	A o G o T
<b>H</b>	A o C o T
<b>V</b>	A o C o G
<b>N</b>	cualquier base

### Abreviaturas aminoácido

<b>A</b>	Ala	Alanina
<b>C</b>	Cys	Cisteína
<b>D</b>	Asp	Ác. Aspártico
<b>E</b>	Glu	Ác. Glutámico
<b>F</b>	Phe	Fenilalanina
<b>G</b>	Gly	Glicina
<b>H</b>	His	Histidina
<b>I</b>	Ile	Isoleucina
<b>K</b>	Lys	Lisina
<b>L</b>	Leu	Leucina
<b>M</b>	Met	Metionina
<b>N</b>	Asn	Asparagina
<b>P</b>	Pro	Prolina
<b>Q</b>	Gln	Glutamina



<b>R</b>	Arg	Arginina
<b>S</b>	Ser	Serina
<b>T</b>	Thr	Treonina
<b>V</b>	Val	Valina
<b>W</b>	Trp	Triptófano
<b>Y</b>	Tyr	Tirosina

## INDICE DE CONTENIDOS

<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>2</b>
<b>Estructura molecular del VHC .....</b>	<b>2</b>
Características y funciones de las proteínas del VHC .....	4
<b>El ciclo de vida del VHC.....</b>	<b>8</b>
La unión y entrada de los viriones de VHC a la célula.....	10
Traducción del ARN y Procesamiento post-traslacional .....	11
Procesamiento postraduccional y replicación del VHC.....	12
Ensamblaje y Liberación de los virus .....	13
Aspectos a destacar derivados del ciclo de vida .....	13
<b>Historia natural de la enfermedad .....</b>	<b>13</b>
<b>Variabilidad genética del VHC.....</b>	<b>16</b>
Distribución de genotipos mundial.....	20
Variabilidad genética dentro del genoma del VHC .....	22
Variabilidad genética dentro del gen NS3. Clados I y II.....	23
Impacto variabilidad genética en el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad.....	23
<b>Tratamiento de la infección crónica por VHC .....</b>	<b>24</b>
Inhibidores de la proteasa: .....	26
Inhibidores de la polimerasa viral (NS5B) .....	28
Inhibidores del complejo de replicación NS5A .....	30
Combinaciones farmacológicas: .....	31
Recomendaciones de la agencia de evaluación de tecnologías sanitarias de andalucía (AETSA) sobre la evaluación clínica a realizar a los pacientes que van a iniciar tratamiento.....	31
Documento de consenso del grupo español para el estudio de la hepatitis (gehep) sobre el tratamiento de la hepatitis c.....	32
<b>El Polimorfismo Q80K en NS3 de genotipo 1a y su efecto frente a los antivirales de acción directa .....</b>	<b>35</b>
Efecto de la presencia basal del polimorfismo Q80K.....	35

<u>Genotipo 1 en pacientes sin tratamiento previo</u> .....	36
<u>Genotipo 1 en pacientes pretratados</u> .....	36
<u>Régimen libre de interferón</u> .....	37
<b>Capítulo 2: Objetivos</b> .....	<b>40</b>
<b>Objetivo 1</b> .....	<b>40</b>
<b>Objetivo 2</b> .....	<b>40</b>
<b>Objetivo 3</b> .....	<b>40</b>
<b>Capítulo 3: Justificación de la investigación</b> .....	<b>42</b>
<b>Justificación del estudio 1:</b> .....	<b>42</b>
<b>Justificación del estudio 2:</b> .....	<b>43</b>
<b>Justificación del estudio 3:</b> .....	<b>45</b>
<b>Capítulo 4: Estudio del análisis de datos y resultados</b> .....	<b>47</b>
<b>Objetivo 1. Describir el grado de discordancia entre los diferentes ensayos comerciales de genotipado de VHC y la secuenciación en NS5b, como técnica de referencia. Estudio GEHEP-007</b> .....	<b>48</b>
Diseño del estudio y Pacientes: .....	48
Metodología empleada en el genotipado:.....	49
Definición de discordancias mayores y discordancias menores: .....	52
<b>Resultados</b> .....	<b>53</b>
Distribución de los genotipos: .....	53
Distribución de las discordancias mayores y menores: .....	54
<b>Objetivo 2. Desarrollar una PCR-Alelo Específica para la detección del polimorfismo Q80K en pacientes con VHC de genotipo 1a</b> .....	<b>59</b>
<b>Metodología. La PCR alelo específica (PCR-AE):</b> .....	<b>60</b>
<b>DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL DESARROLLO DE LA PCR-AE</b> .....	<b>60</b>
Obtención de cebadores para detección de variantes mayoritarias .....	62
Validación de la técnica mediante método alternativo al método de referencia (Tipo II). obtención controles positivos:.....	63

Obtencion de cebadores para deteccion de variantes minoritarias .....	64
procedimiento de pcr alelo especifica q80k: .....	65
<b>Objetivo 3. Estudio de validación de la PCR-AS y determinación de la prevalencia de Q80K, en la proteasa viral en pacientes con genotipo 1a, así como los clados de genotipo 1a circulantes en nuestra cohorte y su asociación con Q80K.....</b>	<b>69</b>
<b>Material y métodos: .....</b>	<b>69</b>
<b>Validación de la PCR-AS .....</b>	<b>70</b>
Fase A: "training set": .....	70
Fase B: "validation set": .....	70
<b>Determinación de la prevalencia de Q80K en nuestra población de estudio, así como en los clados de genotipo 1a circulantes en nuestra cohorte .....</b>	<b>72</b>
<b>Capítulo 5. Discusión.....</b>	<b>74</b>
<b>Capítulo 6. Conclusiones .....</b>	<b>81</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>82</b>
<b>Anexo I .....</b>	<b>92</b>
<b>Anexo II .....</b>	<b>94</b>
<b>Anexo III .....</b>	<b>96</b>

# Capítulo 1. Introducción

# CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

## ESTRUCTURA MOLECULAR DEL VHC

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus hepatotrópo que pertenece a la familia Flaviviridae, género Hepacivirus (Mayo MA, 2003), y fue descubierto por Michael Houghton, Qui-Lim Choo, George Kuo y Daniel W Bradleyen en 1989. Inicialmente se reconoció como agente productor de la hepatitis no-A, no-B (Choo Q. e., 1989).

### Datos del " International Committee on Taxonomy of Viruses" 2014:

Order->Familia->Subfamilia->Género->Especie

*No asignado->Flaviviridae-> No asignado->Hepacivirus->Hepatitis C virus*

Todos los miembros de la familia Flaviviridae comparten la característica de ser virus envueltos y en la bicapa lipídica están anclados dos o más proteínas de la envoltura (E), que en el caso del VHC resultan ser la proteína E1 y E2. E2 se va a ir modificando a lo largo de la infección debido a la existencia de regiones hipervariables en sus genes (Mandell, 2010). Además vamos a encontrar una nucleocápside icosaédrica formada por unidades repetitivas de una única proteína, conocida como proteína de la cápsida C o antígeno Core del VHC (HCcAg), en cuyo interior se encuentra el genoma viral (Figura 1).

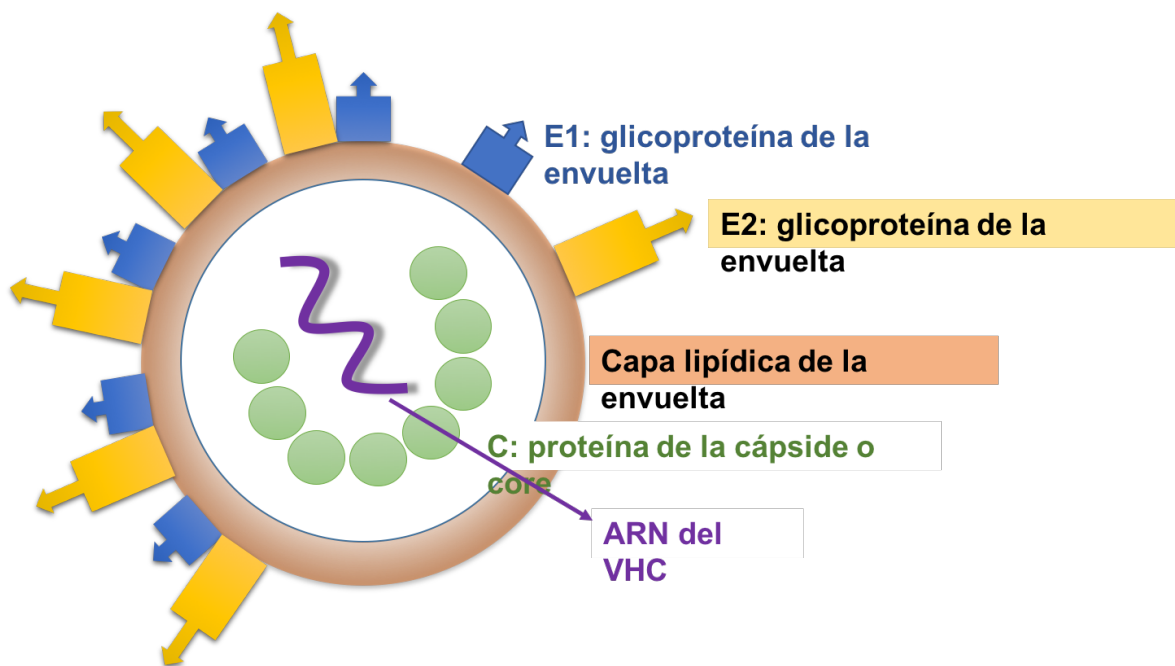


Figura 1. Estructura molecular del VHC

Las proteínas estructurales son codificadas por la parte N-terminal del marco de lectura abierto (open reading frame, ORF). El ORF está flanqueado en 5' y en 3' por regiones no traducidas (UTR) de 95 a 555 y 114 a 624 nt de longitud, respectivamente, que desempeñan un papel importante en la traducción de la poliproteína y en la replicación del ARN (Thurner C, 2004) (Simmonds P. , 2004)

El genoma del VHC está constituido por una cadena de ARN monocatenario de aproximadamente 9600 nucleótidos (nt) y de polaridad positiva. Presenta una amplia región codificante con un único marco de lectura abierta (open reading frame, ORF) que codifica para una poliproteína precursora de unos 3000 aminoácidos (aa) o más, con ligeras variaciones dependiendo del genotipo (Penin, 2004). (Figura 2). Las proteínas estructurales (S) son codificadas por la parte N-terminal del ORF. Las proteínas no estructurales (NS) por la parte C-terminal del ORF.

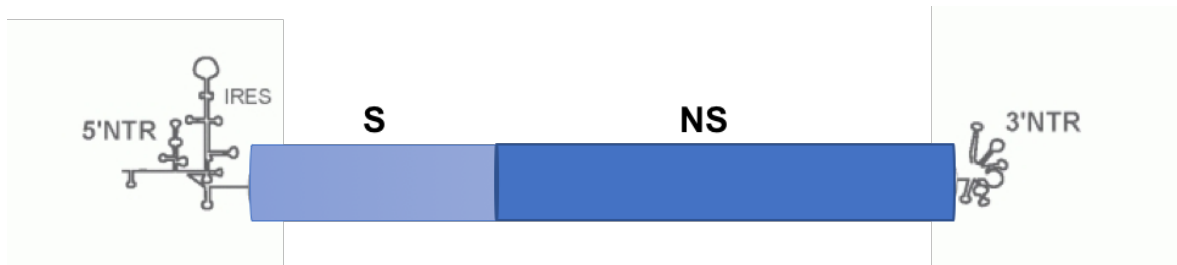


Figura 2. La organización estructural del genoma del VHC. S: proteínas estructurales, NS: proteína no estructural.

La región codificante está flanqueada por dos zonas no codificantes (región no traducible, UTR) que resultan esenciales para la replicación (figura 2):

La región 5'-UTR consta de 341 nt y es la región más conservada del genoma, presenta porcentajes de analogías superiores al 98% entre todas las cepas hasta ahora secuenciadas (Choo QL, 1991) (Han JH, 1991). El 5'-UTR contiene cuatro dominios; dominios I a IV (Wang C, 1995). Los dominios II, III y IV junto con los primeros 12 a 30 nt de la región del Core constituyen los IRES (internal ribosome entry site) (Honda M, 1996) los cuales tienen la capacidad de formar un complejo pre-iniciación estable al unirse directamente a la subunidad 40S ribosoma (sin la necesidad de factores de iniciación de la traducción) (Honda M, 1996). Esta unión constituye el primer paso e inicio de la traducción de la poliproteína del VHC.

La región 3'-UTR en cambio, presenta una secuencia muy variable entre los diferentes genotipos virales, aunque las estructuras secundaria y terciaria se mantienen conservadas. El 3'-UTR contiene aproximadamente 225 nt., se organiza en tres regiones y resulta esencial para la replicación del ARN (Yi M, 2003).

### **CARACTERÍSTICAS Y FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS DEL VHC**

El ORF codifica al menos 11 proteínas, de estas 3 son proteínas estructurales (C o núcleo, E1 y E2), una proteína pequeña, p7, cuya función aún no se conoce con exactitud



y 6 proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B). (figura 3). Además hay que mencionar a la denominada proteína "F", la cual se genera por el desplazamiento del marco de lectura en la región de codificación de núcleo.

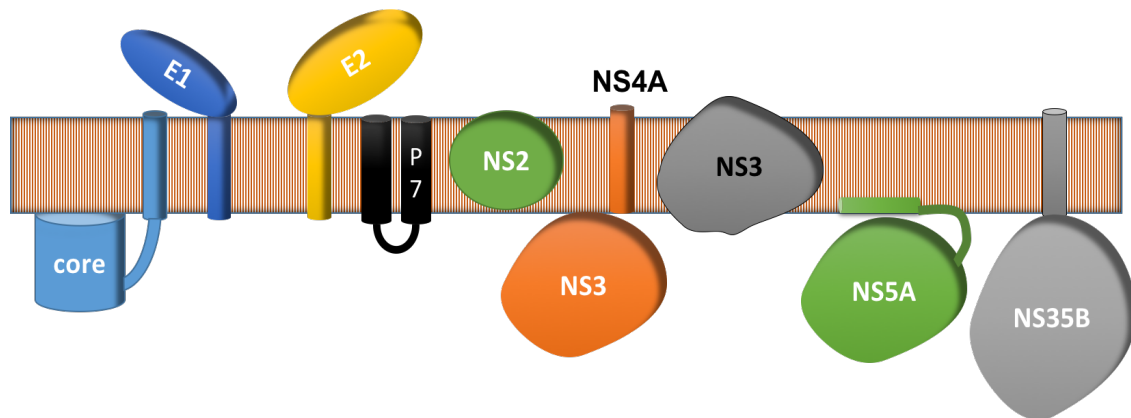


Figura 3. El ORF codifica para una poliproteína de aproximadamente 3.000 aminoácidos, la cual incluye las glicoproteínas E1-E2 (proteínas estructurales), NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (proteínas no estructurales).

## LAS PROTEÍNAS ESTRUCTURALES

La proteína de la cápsida o del Core: es una proteína muy básica y va a constituir la cápsida viral.

La proteína del Core se libera como un precursor de 191 aa de 23-kDa (P23). Presenta tres dominios:

- un dominio hidrófilo N-terminal de 120 aa (dominio D1) muy cargado positivamente y con capacidad de unir ARN, un dominio hidrofóbico C-terminal de aproximadamente 50 aa (dominio D2) responsable de la asociación con proteínas del retículo endoplásmico (RE), membranas mitocondriales y gotas lipídicas y el péptido señal de unión (Santolini E, 1994).

Hay que destacar en referencia a nuestro estudio que se trata de la estructura más conservada del genoma y de ahí su importancia como componente de algunos de los sistemas de diagnóstico del genotipado del VHC.

E1 y E2; glicoproteínas de la envuelta: Ambas glicoproteínas son componentes esenciales en la formación de la envuelta del virión del VHC y necesarias tanto para la entrada como para la fusión (Bartosch B, 2003), (Nielsen SU, 2004). E1 y E2 tienen pesos moleculares de 33 a 35 y 70 a 72 kDa, respectivamente y están altamente glicosiladas.

E2 contiene regiones hipervariables (RHV) que difieren hasta en un 80% entre los diferentes genotipos (Weiner AJ, 1991). La región hipervariable 1 (RHV1) contiene 27 aa y es un importante (pero no el único) epítipo neutralizante. (Zibert A, 1997). E2 tiene un papel crucial en las primeras etapas de la infección, la unión del virus se cree que se inicia a través de la interacción de E2 con uno o varios componentes del complejo receptor (Flint M, 2000). Sobre E1 se sabe menos aunque parece que participa en la fusión del virus a la membrana intra-citoplasmática (Flint M, 2000)

Las regiones E1 y E2 que codifican para las glicoproteínas de la envuelta gp33 y gp70, respectivamente, se caracterizan por presentar una amplia variabilidad genética y por participar en el proceso de entrada viral. Son especialmente variables en las subregiones hipervariables (RHV-1 y RHV-2) localizadas en la región E2/NS1.

## **LAS PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES**

Son proteínas que únicamente se expresan en el hepatocito infectado y que están implicadas en el procesamiento de la poliproteína y en la replicación viral.

Proteína no estructural NS4 (NS4) se procesa en dos subunidades, la NS4A actúa como cofactor de la actividad serín-proteasa de la proteína NS3, mientras que la función de la NS4B se desconoce hasta el momento aunque parece que sirve como un anclaje a la membrana para el complejo de replicación (Gretton SN, 2005).

Proteína no estructural NS5 (NS5); también se procesa en dos subunidades: La proteína no estructural NS5A (NS5A) y proteína no estructural NS5B (NS5B).

NS5A; actualmente no se conoce a ciencia cierta la función específica de esta proteína, aunque se sabe que es una fosfoproteína multifuncional y que es un componente esencial del complejo de replicación del VHC (Ross-Thrieland, 2013) Además la proteína NS5A está relacionada con la resistencia al interferón (Gale MJ Jr, 1998).

NS5B tiene actividad ARN-polimerasa dependiente de ARN (RdRp) y por tanto es la proteína encargada de la replicación del ARN viral usando el genoma viral (ARN positivo) como molde (Jin, 2012) (Huang, 2007) (Moradpour, 2007). La estructura tridimensional de NS5B ha revelado que el RdRp tiene una estructura clásica formada por "dedos, palma y pulgar" en sus 530 aa N-terminal (Ago H, 1999). Por tanto, el RdRp es una de las dianas mas importante para el desarrollo de fármacos anti-VHC (Pawlotsky, 2006)

P7; p7 es un proteína integral de membrana pequeña, (63 aa), compuesta de dos dominios transmembrana organizados en alfa-hélices y conectados por un bucle citoplásmico. Los estudios in vitro sugieren que p7 pertenece a la familia viroporina y actúa como un canal de iones calcio (Vanesa Madan, 2015).

Proteína no estructural NS2 (NS2); es una proteína transmembrana no glicosilada de 21 a 23 kDa. Presenta dos secuencias de señal internas (en las posiciones aa 839-883 y 928 a 960), que son responsables de la asociación a la membrana del Retículo Endoplásmico (RE) (Boukadida, 2014) (Popescu, 2011)

NS2 junto con el dominio N-terminal de la proteína no estructural NS3 conforman la proteasa NS2-3, metaloproteasa dependiente de cinc que escindiré el sitio entre NS2 y NS3 (Grakoui et al, 1993b;. Grakoui et al, 1993c;. Hijikata et al., 1993).

Proteína no estructural NS3 (NS3); es una proteína viral multifuncional que contiene un dominio serin-proteasa en su tercio N-terminal y un dominio helicasa-NTPasa en su dominio C-terminal. (Lin, 2006)

NS3-NS4A Proteasa; La proteasa NS3-NS4A es esencial para el ciclo vital del VHC. Cataliza la escisión de la poliproteína del VHC en las uniones NS3 / NS4A, NS4A / NS4B, NS4B / NS5A y NS5A / NS5B. (Bartenschlager R. A.-L., 1993) Se conoce su estructura tridimensional (Yan Y, 1998). El centro catalítico está formado por los residuos His<sup>57</sup>, Asp<sup>81</sup> y Ser<sup>139</sup> (Bartenschlager R. L., Replication of hepatitis C virus., 2000). La región central de NS4A (aa 21-30) actúa como un cofactor de la actividad serin-proteasa NS3, permitiendo su estabilización.

NS3 helicasa-NTPasa; El dominio helicasa se encuentra en los 442 residuos C-terminal de la proteína NS3 y es miembro de la superfamilia de helicasas-2. Tiene varias funciones, incluyendo el desenrollado del ARN mediante la hidrólisis de NTP (Gwack Y, 1997) (Tai CL, 1996)

## **EL CICLO DE VIDA DEL VHC**

Gracias al desarrollo reciente de un sistema de cultivo celular capaz de producir grandes cantidades de viriones de VHC infecciosos se está dilucidando los aspectos claves del ciclo celular. (Bartenschlager R. , 2006) (Wakita T, 2005)

En la figura 4 podemos ver una partícula viral del VHC producido en un sistema de cultivo de tejido de un genoma viral clonado. (Wakita T, 2005)

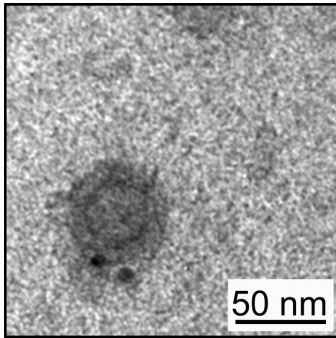


Fig. 4. partícula viral de HCV producido en un sistema de cultivo de tejido de un genoma viral clonado

El VHC se replica principalmente en hepatocitos (Sugano, 1995), aunque se ha detectado genoma y antígenos virales en otras células del hígado, entre las que se incluyen las células de Kupffer y las células endoteliales (Blight, 1994). En la figura 5 se resume los pasos en los que se divide el ciclo biológico del VHC

Fig. 5. Ciclo biológico del VHC.

1) Liberación del genoma al citoplasma del hepatocito, 2) traducción, 3) procesamiento, 4) replicación del genoma, 5) ensamblaje y 6) maduración.

### **LA UNIÓN Y ENTRADA DE LOS VIRIONES DE VHC A LA CELULA**

Los viriones del VHC circulan en la sangre libre, unido a inmunoglobulinas o asociado a lipoproteínas VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad), LDL (lipoproteínas de baja densidad), siendo esta última la forma infectiva más plausible. Se unen a las células huésped a través de una interacción específica entre las glicoproteínas de la envoltura del VHC y un receptor celular aún desconocido. Se han propuesto varias moléculas de superficie celular que pueden mediar la unión o la unión e internalización del VHC;

CD81: el más ampliamente estudiado (Pileri P, 1998) es una molécula de 25 kDa que pertenece a la familia de la tetraspanina.

SR-BI; El receptor de tipo scavenger BI (SR-BI) (Scarselli, 2002)). Se trata de una glicoproteína de 509 aa con un gran bucle extracelular anclada a la membrana plasmática tanto en N- y C-terminales por medio de dominios transmembrana con extensiones citoplasmáticas cortas (Krieger, 2001). El ligando natural de SR-BI son las lipoproteínas de alta densidad (HDL). DC-SIGN y L-SIGN; son lectinas de tipo C que reconocen estructuras de carbohidratos presentes en las glicoproteínas virales y funcionan como factores de unión de varios virus envueltos, incluyendo VHC (Lozach PY, 2007). También han sido propuestas la claudina-1 (CLDN1) (Evans, 2007) y las ocludinas (OCLN) (Ploss, 2009). -

Una vez tiene lugar la unión específica con el receptor, se van a producir cambios que darán lugar a una endocitosis mediada por clatrina. Clatrina favorece la invaginación de la membrana celular formándose la vesícula endosomal. Dentro del endosoma y se cree que favorecido por al ambiente ácido del interior de la vesícula, se dará una reorganización estructural de las glicoproteínas de la envuelta, en la cual se expondrán las proteínas de fusión. Se sabe que existen dos clases diferentes de proteínas de fusión (I y II) (Lescar J, 2001), y que esta proteínas de fusión irán a la membrana del endosoma y es cuando tiene lugar la fusión de las membranas y la liberación de la nucleocápside en el citoplasma (Huang, 2007).

## **TRADUCCIÓN DEL ARN Y PROCESAMIENTO POST-TRASLACIONAL**

Tras la decapsidación se libera el ARN viral de cadena positiva en el citoplasma celular, donde funcionará como un ARN mensajero para la síntesis de la poliproteína del VHC.

La traducción del genoma del VHC está bajo el control del IRES. El IRES va a mediar la iniciación de la traducción de la poliproteína del VHC al unir el ARN viral con el ribosoma y mediante el reclutamiento de proteínas celulares como son los factores

eucarióticos de iniciación (FEI) 2 y 3 y las proteínas virales tiene lugar la traducción y por tanto la formación de la poliproteína del VHC (Ji H, 2004) (Otto GA, 2004).

## PROCESAMIENTO POSTRADUCCIONAL Y REPLICACION DEL VHC

La poliproteína es procesada tanto por proteasas virales como celulares dando lugar a las proteínas virales, que van a quedarse unidas a las membranas intracelulares del hepatocito, formando de este modo el complejo de replicación asociado a membranas (figura 6).

### Complejo de replicación del VHC

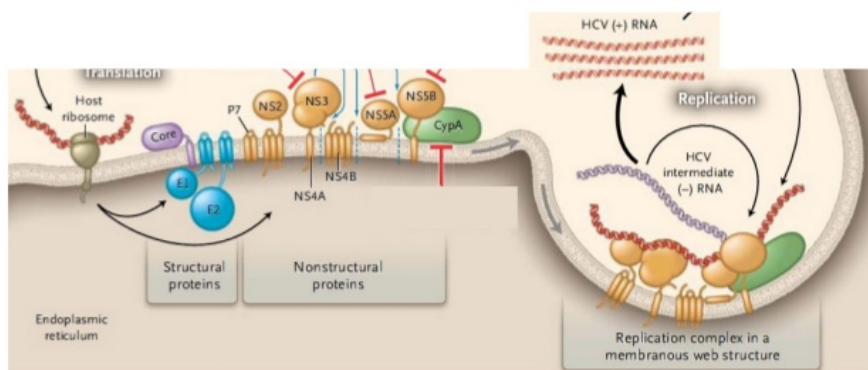


Figura 6. Complejo de replicación del VHC

Dentro de este complejo, la replicación del VHC se realiza en dos pasos, ambos de los cuales son catalizados por la RdRp (NS5B). Durante el primer paso, el ARN de cadena positiva sirve como molde para la síntesis de una cadena negativa intermedia que a su vez servirá de molde para producir numerosas hebras de ARN de polaridad positiva que posteriormente se utilizarán para la traducción de la poliproteína.

Los ARN de polaridad positiva que se forman interaccionan con proteínas del Core que se van sintetizando formando la nucleocápside.



La progenie de ARN de cadena positiva se transcribe en un período de cinco a diez veces superior en comparación con los de cadena negativa de ARN

### **ENSAMBLAJE Y LIBERACIÓN DE LOS VIRUS**

Poco se sabe sobre el ensamblaje del VHC y liberación de los viriones debido a la falta de modelos de estudio apropiados. Se sabe que la proteína de la nucleocápside del VHC es capaz de autoensamblarse en ausencia de ARN viral en partículas similares a virus con un diámetro medio de 35 nm (Acosta-Rivero N, 2004).

La envuelta la adquirirán tras gemación al salir del retículo endoplásmico. Por último, los viriones son exportados fuera de la célula a través de los sistemas celulares de excreción (Penin, 2004)

### **ASPECTOS A DESTACAR DERIVADOS DEL CICLO DE VIDA**

Hay que destacar que durante el ciclo de vida el genoma del VHC no se integra con el genoma de la célula huésped y por tanto todo su ciclo de vida tiene lugar en el citoplasma del hepatocito. Este aspecto permite la erradicación del virus dentro de un individuo, aspecto ventajoso frente a otros virus de ARN que en cambio si se integran como puede serlo el VIH-1. Para que tenga lugar la persistencia de la infección se requiere de la generación continua de nuevas moléculas de ARN viral (Soriano, 2008) Si es posible cortar estos ciclos de replicación con el tratamiento tendrá lugar la erradicación y los nuevos tratamiento deben ir dirigidos a este aspecto.

### **HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD**

La historia natural de la hepatitis por VHC se caracteriza porque hasta un 55-85% de los pacientes infectados evoluciona hacia la cronicidad. Aproximadamente un 30% de los

pacientes que se cronifican permanecerán estable, otro 40% tendrá una progresión variable y el 30% restante desarrollará una grave progresión de la hepatitis, que se caracterizará por fibrosis progresiva, y finalmente cirrosis hepática y hepatocarcinoma (Boykinova OB, 2009) (Webster, 2015) (figura 7)

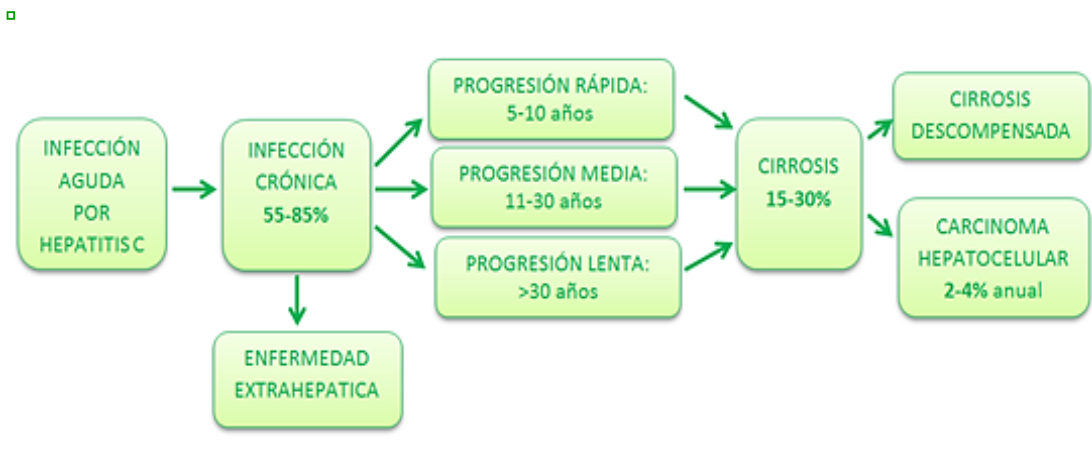


Figura 7: Elaboración a partir de “WHO Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection. April 2014”

La fibrosis hepática (FH) es el depósito progresivo de matriz extracelular en el parénquima hepático que precede al desarrollo de cirrosis. Conocer el grado de fibrosis hepática es muy importante ya que sirve para establecer el pronóstico de una enfermedad hepática y la urgencia de tratamiento antiviral.

El grado de fibrosis hepática se clasifica de diferentes formas, pero la más utilizada es la que emplea el score METAVIR, que considera:

- Estadio 0 (F0) Ausencia de fibrosis
- Estadio 1 (F1) Fibrosis leve (hay fibrosis localizada en espacios porta)
- Estadio 2 (F2) Fibrosis moderada (sobrepasa los espacios porta)
- Estadio 3 (F3) Fibrosis grave (se forman puentes de fibrosis que pasan de un lobulillo hepático a otro)
- Estadio 4 (F4) Cirrosis (se añade la pérdida de la arquitectura hepática)

El paso de un estadio a otro se produce en un tiempo variable y hay circunstancias que lo acortan, como la infección VIH.

Desde hace relativamente poco tiempo se dispone de otra metodología para evaluar la fibrosis hepática de forma no invasiva: la Elastometría transitoria (FibroScan), que permite de forma incruenta conocer la rigidez hepática y extrapolar este dato a la clasificación de METAVIR. Así, se asume que valores  $\geq 9$  kPa (kilopascales) se corresponden con estadio F2-F3 con un valor predictivo positivo (VPP) y VPN del 87 y el 74%, respectivamente; para F4, valores  $\geq 14,6$  kPa tienen un VPP del 86% y VPN del 94%<sup>8</sup>.

El 1 Abril 2015 se publica el plan Plan Estratégico para el abordaje de la hepatitis C, aprobado en el Pleno del Consejo Interterritorial del SNS el 26 de marzo de 2015 [Plan estratégico VHC 2015](#), el cual describe las Recomendaciones generales y pautas actuales de tratamiento para la hepatitis crónica causada por el VHC en el Sistema Nacional de Salud. En dicho documento deja reflejado la clara urgencia de tratamiento antiviral a tratar dependiendo del grado de fibrosis.

- “Debido a la magnitud de la infección en nuestro país, el tratamiento oral con antivirales de acción directa (AAD) debe priorizarse para los siguientes grupos de pacientes:
- Pacientes con una fibrosis hepática significativa (F2-F4), independientemente de la existencia o no de complicaciones previas de la hepatopatía.”
- En los pacientes con fibrosis F0-F1, el tratamiento se puede diferir y considerar su indicación individualmente. Estos pacientes deberán monitorizarse de manera estrecha y tratarse si se producen cambios relevantes en su evolución o en la progresión de su enfermedad.

## VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VHC

El VHC, como en el caso de otros virus ARN, posee una gran variabilidad genética, de hecho es de los virus de ARN con mayor variabilidad (Echeverría N, 2015) (Kim T, 1996).

Entre los factores que intentan explicar esta alta variabilidad estarían (Bartenschlager R. L., Replication of hepatitis C virus., 2000);

- La replicación de los virus de ARN de cadena positiva se transcribe en un período de cinco a diez veces superior en comparación con los de cadena negativa (Domingo E, 1997).
- La alta tasa de producción diaria de viriones (alrededor de  $10^{12}$ /día),
- La alta tasa de error de la ARN polimerasa ya que carece de función correctora (tasa de error estimada de  $10^{-4}$  mutaciones por nucleótido por genoma replicado).

**Genotipo y subtipo:** Todo lo anterior, junto con la presión ejercida por el sistema inmune del huésped, ha dirigido la evolución del VHC hacia el desarrollo de la diversidad global actual. Se han descrito siete genotipos (genotipos 1 a 7) y dentro de los genotipos 1 a 6 aparecen una serie de virus más estrechamente relacionados los cuales se definen como subtipos, en la actualidad se admiten hasta 67 subtipos (Echeverría N, 2015). Para definir un genotipo y subtipo hace falta cumplir con características: (1) tener secuenciada en su totalidad una o más de una secuencia de una región codificante, (2) que coexistan al menos tres aislamientos no relacionados epidemiológicamente, (3) que se unan a un grupo filogenético distinto de las secuencias ya descritas anteriormente y que el valor de bootstrap sea del 100%. Además hay que (4) descartar si se trata de fenómenos de recombinación.

Sobre la base de estos criterios y gracias al análisis de multitud de secuencias depositadas en Los Álamos HCV Sequence Database (Yusim K, 2005), euHCVdb

(Combet C, 2007), Hepatitis Virus Database ([Hepatitis Virus Database](#)) se confirma como umbral de diferencia para definir un genotipo/subtipo el 15%. (Smith DB, 2014). Por lo tanto, aislados que difieren en <13% con respecto a sus secuencias codificadoras completas serán miembros de un mismo subtipo, y los que difieren en >15% pertenecerán a genotipos o subtipos diferentes. (Echeverría N, 2015)

En la siguiente tabla se resumen los genotipos/subtipos aceptados actualmente: (<http://hcv.lanl.gov/content/sequence/HCV/classification/genotable.html>)

**Tabla1:** Genotipos/subtipos aceptados:

Genotipo/subtipos asignados

- 1 a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m
- 2 a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r
- 3 a, b, c, d, e, f, g, h, i, k, l
- 4 a, b, c, d, e, f, g, h, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t
- 5 a
- 6 a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t, u
- 7 a

**Formas recombinantes (FR).** Una cuestión que no se tuvo en cuenta el anterior documento de consenso (Simmonds P B. J., 2005) fue la denominación de las formas recombinantes recién descubiertos del VHC. Existen nueve formas recombinantes diferentes de VHC (Tabla 2), de los cuales sólo uno (2k / 1b) está representado por múltiples aislamientos (González-Candelas F, 2011). La nomenclatura utilizada es "FR" seguido por los subtipos contributivos separadas por "/" en el orden en que aparecen en el genoma completo.

**Tabla 2. Formas Recombinantes del VHC**

FR	Punto de corte	Nº Acceso	Aislados	Referencia
RF2k/1b	3186	AY587845	33	(Kalinina O, 2002) (Kurbanov F, 2010)
RF2i/6p	3405-3464	DQ155560	1	(Noppornpanth S, 2006)
RF2b/1b_1	3456	DQ364460	1	(Kageyama S, 2006)
RF2/5	3366-3389	AM408911	1	(Legrand-Abravanel F, 2007)
RF2b/6w	3429	EU643835	1	(Lee YM, 2010)
RF2b/1b_2	3432	AB622121	1	(Yokoyama K, 2011)
RF2b/1a	3429-3440	JF779679	1	(Bhattacharya D, 2011)
RF2b/1b_3	3286-3293	AB677530	1	(Hoshino H, 2012)
RF2b/1b_4	3286-3293	AB677527	1	(Hoshino H, 2012)

**Cuasiespecies:** Otro concepto que hay que considerar dentro de la variabilidad del VHC es que durante la infección se producen un gran número de diferentes pero estrechamente relacionadas variantes virales, a estas variantes se les conoce comúnmente como Cuasiespecies (Martell M, 1992). Cuando nosotros secuenciamos una muestra de un paciente, dependiendo de la técnica empleada seremos capaces de determinar los polimorfismos o mutaciones según su grado de prevalencia. Técnicas de secuenciación de tipo Sanger nos dan sobre todo información acerca de la secuencia master (secuencia que está más representada, la que es mas abundante dentro de la población) que en la mayor parte de los casos estará representada en más de un 20% de

prevalencia, que es el límite de detección de estas técnicas. En cambio ahora se dispone de técnicas de secuenciación profunda (secuenciación masiva) la cual nos permite llegar a detectar mutaciones hasta en 1% de prevalencia, esta metodología nos dará una mejor descripción de la colección de Cuasiespecies.

**Variabilidad en la web:** Existen actualmente más de 225.000 secuencias del VHC disponibles en GenBank ([GenBank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)) y aproximadamente se están añadiendo unas 30.000 cada año. Este enorme volumen de información de secuencias y diversidad de variantes del VHC hacen que sea cada vez más importante que los investigadores busquen recursos consensuados para poder trabajar con los diferentes genomas. De hecho es posible descargarse secuencias consenso para cada uno de los genotipos/subtipos y poder simplificar las tareas.

En esta tesis hacemos mención a la creación de un sitio web de referencia organizada por el Comité Internacional para la Taxonomía de Virus (ICTV) para validar los nuevo genotipos y subtipo y poder disponer de la nuevas asignaciones, además de proporcionar alineaciones de referencia actualizados: [ICTV-VHC Clasificación](http://www.ictvonline.org/VirusTaxonomy/VirusList.php)

Para realizar nuestro trabajo de tesis hemos empleado las secuencias de referencia de los genotipos del VHC de la base de datos de Los Álamos (1.364 secuencias mayores de 8.000 nt) (<http://hcv.lanl.gov/content/index>), y para la numeración nos hemos basado en la secuencia de referencia de genotipo 1a aceptada: el aislado H77 (AF009606) tal y como se puede ver en la figura 8.

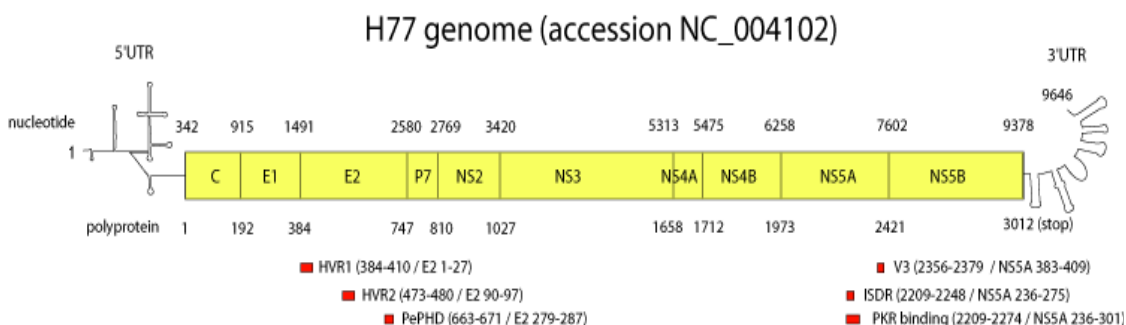


Figura 8: Mapa genómico con la numeración consensuada de cada uno de los genes de la cepa de referencia 1ª aislado H77 (AF009606)

Las secuencias fastas de VHC para cada genotipo/subtipo que ha hecho falta para realizar la tesis se ha descargado de las base de datos de los Álamos (<http://hcv.lanl.gov/content/index>), y NCBI Genome [NCBI Genome](#). Los alineamientos se han realizado en el programa MUSCLE ([MUSCLE](#)). Jalview ha sido el programa de edición de secuencias ([Jalview](#)).

### DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS MUNDIAL.

La distribución de los diferentes genotipos/subtipos varía en el mundo. Los subtipos 1a y 1b se encuentran en todas las regiones del mundo, aunque el subtipo 1a es más prevalente en EEUU y en el Centro y Norte de Europa, en tanto que 1b lo es en el Extremo Oriente, en la Europa del Este y en la cuenca del Mediterráneo. El genotipo 3 también es ubicuo, pero se da una alta prevalencia en el subcontinente Indio, en Australia y en las islas Británicas. El resto de los genotipos muestran, por el contrario, mayor restricción geográfica. Así, el genotipo 4 aparece en el norte de África y algo en la Cuenca Mediterránea y el genotipo 5 es casi exclusivo del sur de África. En el África subsahariana, se detectan además los genotipos 1 y 2, incluyendo el subtipo 1c que parece exclusivo de esta región. Por último, el genotipo 6 se halla muy localizado en el sureste de Asia, donde predomina claramente sobre el resto. (tabla 3).

**Tabla 3. Distribución de genotipos del VHC.**

Países	Genotipos	Res.
Europa del Norte y EEUU	1a	(Simmonds P. , 2004)
América, Europa, Japón e Italia	2a, 2b, 2c	(Zein, 2000) y (Simmonds P. , 2001)
India, Nepal y Pakistán	3, 3a	(Idrees, 2008)
África y Oeste Media	4	(Simmonds P. , 2004) (Simmonds P. , 2001)
Sud-África	5	(Alter, 2002)
Hong Kong y Asia	6	(Alter, 2002)



En la figura 9 se puede observar un representación de la distribución geográfica mundial de los diferentes genotipos/subtipos del VHC. (Llanes MS, 2015)

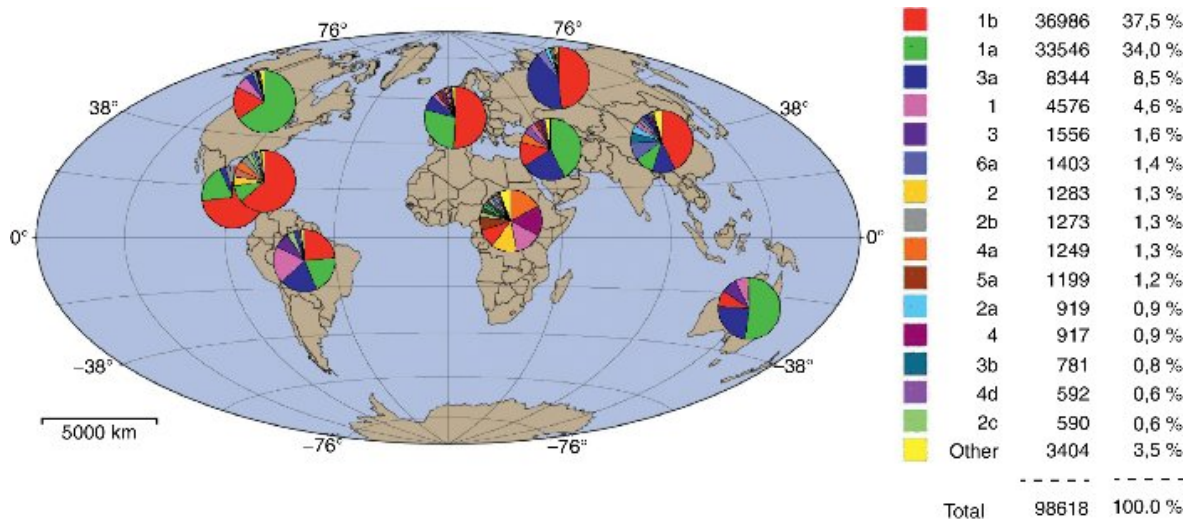


Figura 9 Distribución geográfica mundial de los diferentes genotipos del VHC. Se observa la distribución geográfica en las distintas regiones de las secuencias con diferentes genotipos del VHC. Puede apreciarse el predominio del genotipo 1b en el sur y este de Europa y en Japón, mientras que el genotipo 1a se ubica en el norte de Europa y América. A la derecha de la figura se muestra el porcentaje total de cada genotipo; los genotipos 1a y 1b abarcan más del 70% del total.

**Distribución de genotipos en España:** En España, la prevalencia de adultos con serología positiva frente al VHC es de 1.7% (0.4%-2.6%), con una población afectada de 688.000 habitantes (159-1049). La tasa de viremia se estima en un 68.6% con una prevalencia de viremia en adultos de 1.2% (0.3%-1.8%) lo que corresponde a 472.000 personas con viremia (109-719). El genotipo más frecuente es el 1b (Gower E, 2014). La frecuencia de los diferentes genotipos se muestra en la siguiente figura 10.

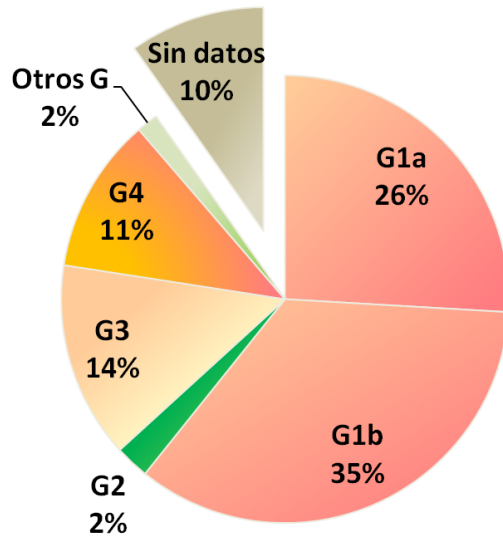


Figura 10. Distribución de genotipos en España

### VARIABILIDAD GENÉTICA DENTRO DEL GENOMA DEL VHC

La variabilidad genética no se distribuye uniformemente en todo el genoma viral. Las regiones del genoma que se corresponden con funciones virales esenciales (tales como los implicados en la traducción y la replicación) (5'-y 3'-NCR NCR) son las más conservada. La región 5' NCR es la región más conservada del genoma con un 90% de identidad de secuencia entre las cepas distantes (Bukh J, 1992) (Piñeiro D, 2012). La región que codifica la cápsida viral también está altamente conservada con 81% - 88% de identidad de secuencia entre diferentes aislados.

La región más variable del genoma es el que codifica para las glicoproteínas de membrana E1 y E2 (Argentini C, 2009). Las secuencias que pertenecen a las regiones hipervariables 1 y 2 (HVR1 y HVR2) de gen E2 son los que muestran menos homología de secuencia con sólo el 50% de identidad entre diferentes aislados (Le Guillou-Guillemette H, 2007).

## **VARIABILIDAD GENÉTICA DENTRO DEL GEN NS3. CLADOS I Y II.**

Se han descrito dos clados diferentes dentro del genotipo 1a; el clado I y el clado II, empleando análisis filogenético (Pickett, 2011). Se sabe que existe una diferente distribución de los polimorfismos y sustituciones de aminoácidos entre los clados. A modo de ejemplo, el polimorfismo Q80K que será objeto de nuestro estudio sólo se encuentra en el clado I y no en el clado II (48,9% frente al 0%; n = 293) (De Luca, 2013). Actualmente se cree que el polimorfismo Q80K (clado I) se originó en los EE.UU. en la década de 1940 (McCloskey, 2014) y que el clado II se origino en Europa (De Luca, 2013)

Hay que mencionar que en las bases de datos de las secuencias de NS3, en especial la base de datos de Los Álamos, existe claramente una mayor prevalencia de secuencias del clado I (72,7%) ya que mayoritariamente están incluidas secuencias procedentes de los EE.UU.

## **IMPACTO VARIABILIDAD GENÉTICA EN EL DIAGNOSTICO Y EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD.**

El genotipo del VHC no va a influir en la progresión de la enfermedad, en cambio es un fuerte factor predictivo independiente de la respuesta al tratamiento. Se sabe que los pacientes con genotipo 1 y 4 responden un 40% menos que los genotipos 2 y 3 al tratamiento estándar INFpeg+RBV. Además también es útil para la elección de la duración del tratamiento (Berg, 2008)

Dando un paso más, estudios recientes han observado que existen diferentes tasas de respuesta no solo a nivel de subtipo, sino que también entre los subtipos genéticos, como es el caso de los genotipos 1a que presentan peores tasas de respuesta que los genotipos 1b.

Otras características virológicas que hay que destacar en relación a los tratamientos con AADs IP activos son las diferencias que hay con relación a los subtipos 1a y 1b ya que se ha visto diferentes niveles de respuesta viral sostenida (RVS) y diferencia en cuanto a la aparición de variantes asociadas a resistencia (VAR) (Jacobson, 2011) (Sherman, 2011). En efecto, y como ejemplo, la selección de la VAR R155K, de especial importancia para los IP frente al VHC, requiere tan solo 1 cambio en una base (AGA→AAA, transición) para el VHC subtipo 1a, mientras que se requieren 2 cambios (CGA→AAA, transversión) para el VHC subtipo 1b, lo que hace más fácil su selección en los pacientes infectados por subtipo 1a.

Con todo esto consideramos fundamental la adecuada detección del genotipo del VHC del paciente

## **TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN CRÓNICA POR VHC**

El tratamiento de la infección crónica por el VHC tiene 2 objetivos:

El primero es lograr la erradicación del VHC, es decir, conseguir y mantener en el tiempo una respuesta viral sostenida (RVS). La RVS en el tratamiento del VHC se define como la ausencia persistente de ARN del VHC en plasma a los 6 meses o más después de completar el tratamiento antiviral.

El segundo objetivo es prevenir la progresión a cirrosis, carcinoma hepatocelular (HCC) y enfermedad hepática descompensada que requerirá un trasplante de hígado en el futuro.

El tratamiento de la hepatitis C ha evolucionado a lo largo de los años. Al principio se basaba en utilizar IFN en monoterapia con tasas de curación realmente bajas (7%), mas adelante se usaba la combinación de ribavirina/IFN o ribavirina/IFN-PEG, y con esta combinación se lograban tasas de curación superiores al 50% en genotipos 1 y 4, y por encima del 70% en genotipos 2 y 3 (McHutchison, 2009) (Hadziyannis, 2004) pero los

efectos adversos como la depresión y/o la anemia eran una amenaza y había que tenerlas en cuenta.

Gracia a los nuevos conocimientos adquiridos de las características estructurales de las proteínas del VHC así como de su ciclo vital, se ha ido preparando un camino que está logrando el desarrollo de nuevos agentes antivirales de acción directa (AADs) así como también otros agentes dirigidos a dianas del huésped (HTAs); ambos tipos de fármacos actúan de forma específica sobre una o varias partes del ciclo de vida del VHC el cual interrumpe y supone la eliminación del virus. En la figura 11 se aprecian las dianas en la que se están centrando los nuevos desarrollos de antivirales frente al VHC

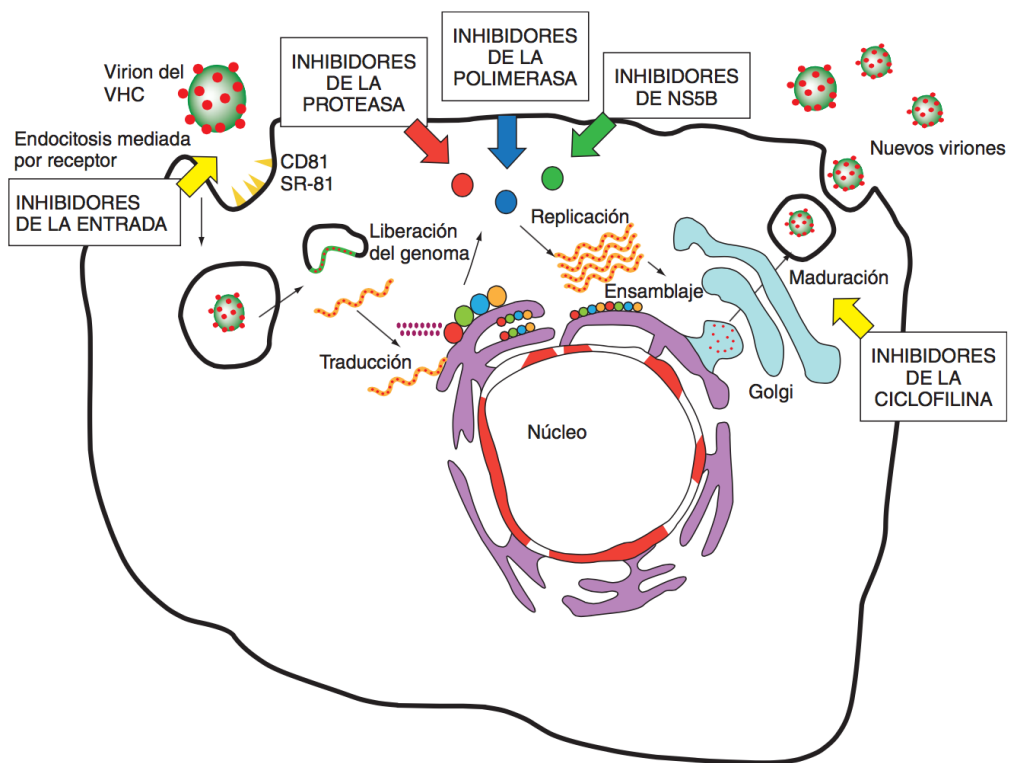


Figura 11. Dianas terapéuticas para el desarrollo de agentes antivirales de acción directa.

Destacamos tres familias de fármacos que se dirigen frente a dianas diferentes y que reciben diferentes nombres agrupándose por clases o familias de fármacos. Los nombres genéricos de los fármacos nos van a dar una pista, si nos fijamos en su terminación:

1. Inhibidores de la proteasa: terminación en “previr”: simeprevir, paritaprevir.
2. Inhibidores de la polimerasa: terminación en “buvir”: sofosbuvir, dasabuvir.
3. Inhibidores de la proteína NS5A: terminación en “asvir”: daclatasvir, ombitasvir.

En la figura 12 podemos ver resumido los principales antivirales disponibles así como sus dianas.

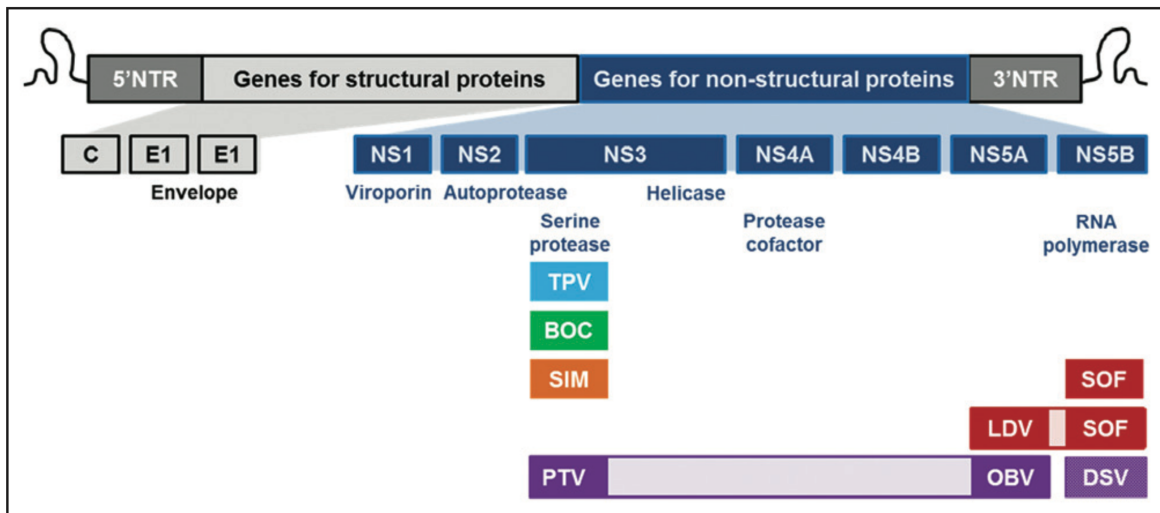


Figura 12. Diana de los antiretrovirales del virus hepatitis C virus. Nota: Sofosbuvir (SOF), Dasabuvir (DSV). BOC Boceprevir; LDV Ledipasvir; OBV Ombitasvir; PTV Paritaprevir; SIM Simeprevir; TPV Telaprevir. (Robert P Myers MD MSc, 2015)

### INHIBIDORES DE LA PROTEASA:

Estructuralmente, los IP frente al VHC se clasifican en lineales (TEL, BOC, BI-201355) y macrocíclicos de  $\alpha$ -cetoamidas (danoprevir, simeprevir, asunaprevir, ABT-450, GS-9451 y MK-5172, entre otros). Se vio que estos fármacos incrementaban de forma

significativa las tasas de curación (~70%) y acortaban la duración del tratamiento (Poordad, 2011) (Zeuzem, 2011)

#### **INHIBIDORES DE LA PROTEASA DE PRIMERA GENERACIÓN**

El primer inhibidor de la proteasa indicado para su uso fue boceprevir (Victrelis®), aprobado por la FDA en Mayo de 2011 y seguida de la aprobación de telaprevir (Incivo®) Sin embargo, estos dos inhibidores de la proteasa no se recomiendan debido a que actualmente existen mejores opciones terapéuticas.

#### **INHIBIDORES DE LA PROTEASA DE SEGUNDA GENERACIÓN**

##### **SIMEPREVIR (OLYSIO®)(SMV), [SMV](#)**

Fue aprobado en noviembre de 2013 y se recomienda como parte de la terapia de combinación para la infección por hepatitis C crónica. Se administra una vez al día, y ha demostrado una actividad antiviral potente frente a genotipos 1 y 4 después de 12 semanas de tratamiento con triple terapia (SMV/PEG-INF/RBV).

El estudio ASPIRE que incluyó 462 pacientes pre-tratados de genotipo 1, a los cuales se administró 100mg o 150mg una vez al día (QD) de simeprevir en combinación con IFNpeg/RBV presentaron tasas de respuesta (RVS24) del 85%. De los resultados en los que se ha administrado 150mg de simeprevir con IFNpeg/RBV a ~392 pacientes de genotipo 1: QUEST-1 y QUEST-2 (pacientes naïve), y el ensayo PROMISE (previos relapsers). A la semana 12 de tratamiento alcanzaban viremia indetectable el 80%, 81% y 79% de los pacientes, respectivamente.

Hasta el año 2015, a la hora de plantearse un tratamiento con SMV era preciso tener en cuenta que aquellos pacientes infectados con el genotipo 1a que poseían el polimorfismo Q80K en la proteasa NS3, presentaban una reducción de la eficacia antiviral de dicho fármaco por lo que no se recomendaba su uso, tal y como recogían las guías de

tratamiento. Así, hasta 2015, la mutación debía buscarse siempre en el genotipo 1a del virus antes de iniciar tratamiento con SMV/PEG-INF/RBV. No así en genotipo 1b u otros genotipos.

### **PARITAPREVIR (PTV):**

PTV es un acilsulfonamida fabricado por Abbott Laboratories (Abbott, 2014). Se usa en combinación: Ombitasvir, paritaprevir/ritonavir y dasabuvir (Viekira Pak®) con o sin ribavirina. Será para genotipo 1 y 4.

### **INHIBIDORES DE LA POLIMERASA VIRAL (NS5B)**

Hay 2 grandes grupos de fármacos en esta clase de AAD; los análogos de nucleós(t)idos, que son fármacos con una estructura similar a los sustratos naturales de la enzima y que actúan como terminadores de la cadena de polimerización del ARN, y los no análogos de nucleósidos, que son inhibidores alostéricos de la ARN polimerasa, e inducen cambios conformacionales en la enzima inactivando el complejo de replicación.

### **ANÁLOGOS DE NUCLEÓS(T)IDOS.**

Estos fármacos han demostrado una mayor eficacia y menor aparición de resistencias, no solo frente al genotipo 1, sino contra todos los genotipos virales existentes. El centro activo de NS5B está altamente conservado y por esta razón, estos fármacos son potencialmente activos frente a todos los genotipos del VHC (actividad pangotípica). Tras monoterapia durante 3-14 días consiguen una reducción entre 0,7 a 2,7 log de la CV (Vermehren J, 2011). Presentan una alta barrera genética y baja resistencia cruzada de clase.

### **SOFOSBUVIR (SOVALDI®)(SOF).**



Este fármaco ha demostrado una actividad antiviral muy potente frente a todos los genotipos del VHC así como una barrera genética muy alta para el desarrollo de resistencias (Rodríguez-Torres, 2012). El estudio ELECTRON ha evaluado sofosbuvir en combinación con RBV en pacientes naïve con genotipos 1, 2 y 3 y en pacientes no respondedores (NR) a una terapia previa con IFNpegα/RBV de genotipo 1. En los pacientes NR las tasas de respuesta fueron del 100%, aunque las tasas de recidivas durante el seguimiento (24 semanas tras finalizar el tratamiento) fueron del 90% (Gane, 2013).

Sofosbuvir se recomienda para el tratamiento de pacientes “naïve” con cualquier genotipo viral, incluyendo pacientes con cirrosis y pacientes no respondedores a terapia convencional.

### **DASABUVIR (EXVIERA®) (DSV)**

Se administra en combinación con ritonavir/paritaprevir/ombitasvir, en el momento actual, la pauta habitual de combinación es OBV/PTV/rtv ± DSV ± RBV.

Cada comprimido de Exviera® está compuesto por 250 mg de dasabuvir. La dosis recomendada es de 1 comprimido cada 12 horas, tomado con alimento. El régimen OBV/PTV/rtv y DSV con RBV durante 12 semanas es una alternativa terapéutica a otras combinaciones de AAD, en pacientes con genotipo 1, tanto mono como coinfectados por VIH, con y sin cirrosis.

### **NO ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS.**

Estos fármacos han demostrado tener una barrera genética menor y ser solamente eficaces contra el genotipo 1. Se pueden agrupar en 5 familias (NNI-1, NNI-2, NNI-3, NNI-4 y NNI-5) dependiendo del lugar de la polimerasa al que se unan.

Todos estos compuestos se caracterizan por presentar de forma generalizada una barrera genética baja para el desarrollo de resistencias sumado a una actividad genotipo/subtipo dependiente.

### **INHIBIDORES DEL COMPLEJO DE REPLICACIÓN NS5A**

La proteína que codifica NS5A es esencial para el ciclo de replicación del VHC, aunque su función exacta es desconocida. Aun así, se han diseñado fármacos que son capaces de inhibir su función. Las principales características de esta clase son su actividad pangenotípica, la ausencia de resistencia cruzada con otros AAD y una buena actividad antiviral (aunque esta es menor en los genotipos 1a por la baja barrera genética a la resistencia en este genotipo en concreto).

### **INHIBIDORES DE NS5A**

Se trata de una nueva familia de antivirales que actúan inhibiendo la proteína NS5A. Esta proteína forma parte del complejo de replicación del VHC, aunque se desconocen los mecanismos exactos de acción. Los fármacos de esta familia han demostrado una gran actividad antiviral frente a todos los genotipos.

#### **▪ DACLATASVIR (DAKLINZA®) (DCV). INFORME DE POSICIONAMIENTO TERAPÉUTICO DE DACLATASVIR (DAKLINZA®)**

DCV es activo in vitro frente a los genotipos 1, 2, 3 y 4, aunque en ficha técnica solo se ha incluido régimen y curación recomendada para los genotipos 1, 3 y 4

#### **▪ LEPIDASVIR:**

Se usa en combinación con SOF bajo el nombre de Harvoni® (ver más adelante), que es una píldora única con 90 mg de Ledipasvir y 400 mg de SOF.

Otros inhibidores de NS5A ya aprobados serían el ombitasvir, y existen otros en desarrollo como es el elbasvir.

#### **COMBINACIONES FARMACOLÓGICAS:**

Lo que parece ser el futuro en el tratamiento de la hepatitis C, son las combinaciones en pastillas únicas de varios AADs que actúan por diferentes mecanismos de acción para así evitar la replicación del virus de forma más eficaz. Así se combinan IPs con inhibidores, por ejemplo, de la NS5A, para potenciar la acción antiviral. Este es el caso de Viekirax®, una reciente combinación de fármacos indicada en el tratamiento del genotipo 1, que contiene paritaprevir y ombitasvir, junto con ritonavir para potenciar sus efectos. Viekirax® también se usa en combinación con el inhibidor de la polimerasa dasabuvir (Viekira Pak®) y puede asociarse también con RBV.

Otro tipo de combinaciones, como SOF/Ledipasvir (Harvoni®) (20 de Marzo: [Informe de Posicionamiento Terapéutico de Ledipasvir/sofosbuvir \(Harvoni®\)](#) (Gentileemail, 2015), SOF/daclatasvir (Sulkowski MS & Group., 2014) o SOF/SMV/RBV (estudio COSMOS, con muy buenos resultados presentados, con las que se ha hecho posible conseguir terapias libres de PEG-INF y el acortamiento de la curación de las terapias.

La RVS de los nuevos AADs ya aprobados llegan incluso al 100% en algunos estudios. Este hecho constituye un hito en la historia de la hepatitis C que nos acerca a la posibilidad de erradicar esta enfermedad de alta prevalencia y mortalidad a nivel mundial.

#### **RECOMENDACIONES DE LA AGENCIA DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS SANITARIAS DE ANDALUCÍA (AETSA) SOBRE LA EVALUACIÓN CLÍNICA A REALIZAR A LOS PACIENTES QUE VAN A INICIAR TRATAMIENTO**

Según AETSA, es necesaria la siguiente evaluación clínica de los enfermos con la hepatitis crónica por VHC en los que se prevé la necesidad de tratamiento antiviral:

1. Determinación del genotipo y subtipo del virus y de la carga viral para poder establecer la estrategia terapéutica más adecuada.

2. Estimación del grado de fibrosis hepática del paciente a través de cualquiera de los siguientes procedimientos:

a. Biopsia hepática reciente, aplicando un sistema de puntuación de la fibrosis, como Metavir, criterios de Scheuer u otros.

b. Fibroscan, considerando que hay una fibrosis significativa (equivalente a F2 o más) a partir de un valor igual o superior a 7,6 Kilopascascales.

3. Determinación del polimorfismo IL28B.

4. Clasificación de los pacientes con hepatitis crónica por VHC en función de si han recibido o no tratamiento previo (con interferón y ribavirina o con un inhibidor de la proteasa) y del tipo de respuesta:

a. Pacientes naïve

b. Pacientes que han recaído después de un tratamiento (pacientes recidivantes)

c. Pacientes no respondedores (respuesta parcial o nula al tratamiento previo).

d. Pacientes no respondedores por tratamiento inadecuado o pacientes en los que se ignora como fue la respuesta al tratamiento previo.

## **DOCUMENTO DE CONSENSO DEL GRUPO ESPAÑOL PARA EL ESTUDIO DE LA HEPATITIS (GEHEP) SOBRE EL TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS C**

Con fecha 11/06/2015 en España se han actualizado las recomendaciones de tratamiento que se hacen en este documento. Dicha actualización puede consultarse en el siguiente enlace:

[\(DOCUMENTO DE CONSENSO DEL GRUPO ESPAÑOL PARA EL ESTUDIO DE LA HEPATITIS \(GEHEP\) SOBRE EL TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS C\)](#)

## RECOMENDACIONES DE TRATAMIENTO PARA PACIENTES CON GENOTIPO 1:

### **PACIENTES SIN TRATAMIENTO PREVIO**

<i>Pautas recomendadas</i>	Sofosbuvir/Ledipasvir	
	Recomendación general, incluyendo pacientes con cirrosis compensada:	
	Sofosbuvir/Ledipasvir durante 12 semanas (AI). Pacientes sin cirrosis con ARN VHC < 6,8 log: considerar Sofosbuvir/Ledipasvir durante 8 semanas (BI)	
	En pacientes con cirrosis descompensada: Sofosbuvir/Ledipasvir + RBV durante 12 semanas o Sofosbuvir/Ledipasvir durante 24 semanas (AI)	
	Paritaprevir/r- Ombitasvir + Dasabuvir (3D) <sup>1</sup>	
	Genotipo 1b: 3D durante 12 semanas (AI). Pacientes con cirrosis: 3D + RBV durante 12 semanas (AI)	
	Genotipo 1a: 3D + RBV durante 12 semanas (AI). Pacientes con cirrosis: 3D + RBV durante 12 semanas <sup>2</sup> (A1)	
	Sofosbuvir + Simeprevir <sup>1</sup>	
	Pacientes sin cirrosis <sup>3,4</sup> : Sofosbuvir + Simeprevir durante 12 semanas, (AI).	
	Sofosbuvir + Daclatasvir	
	Sofosbuvir + Daclatasvir durante 12 semanas (AI).	
	Pacientes con cirrosis compensada y descompensada: Sofosbuvir + Daclatasvir + RBV durante 12 semanas (AI)	
	<i>Pautas desaconsejadas</i>	PR solo o combinado con Sofosbuvir, Simeprevir, Daclatasvir, Boceprevir o Telaprevir; Sofosbuvir con RBV (se desaconseja el uso de estas pautas en pacientes infectados por genotipo 1, en cualquier escenario clínico)

### **PACIENTES CON FRACASO PREVIO A PR**

<i>Pautas recomendadas</i>	Sofosbuvir/Ledipasvir
	Sofosbuvir/Ledipasvir durante 12 semanas (A1)
	En pacientes con cirrosis: Sofosbuvir/Ledipasvir + RBV durante 12 semanas (A1) o Sofosbuvir/Ledipasvir durante 24 semanas (AI)
	Paritaprevir/r- Ombitasvir + Dasabuvir (3D) <sup>1</sup>
	Genotipo 1b: 3D durante 12 semanas (AI).
	En pacientes con cirrosis, 3D + RBV durante 12 semanas (A1)
	Genotipo 1a: 3D + RBV durante 12 semanas (AI).
	En pacientes con cirrosis, 3D + RBV durante 24 semanas (AI)
	Sofosbuvir + Daclatasvir
	Sofosbuvir + Daclatasvir durante 12 semanas (AI).
	Pacientes con cirrosis: Sofosbuvir + Daclatasvir + RBV x 12 semanas (AI)
	Sofosbuvir + Simeprevir <sup>1</sup>
	Pacientes sin cirrosis: Sofosbuvir + Simeprevir durante 12 semanas <sup>4</sup> (AI).

**PACIENTES CON FRACASO PREVIO A PR + NS3/4A**

<i>Pautas recomendadas</i>	Sofosbuvir/Ledipasvir
	Sofosbuvir/Ledipasvir durante 12 semanas (A1)
	En pacientes con cirrosis: Sofosbuvir/Ledipasvir + RBV durante 12 semanas (A1) o Sofosbuvir/Ledipasvir durante 24 semanas (AI)
	Sofosbuvir + Daclatasvir
	Sofosbuvir + Daclatasvir durante 12 semanas (AI)
	En pacientes con cirrosis: Sofosbuvir + Daclatasvir + RBV durante 12 semanas (AI)
	Cualquier pauta con un inhibidor de NS3A (Simeprevir; 3D) si no podemos descartar la presencia de mutaciones de resistencia en NS3A
<b>PACIENTES CON FRACASO PREVIO A SOFOSBUVIR + RBV +/- IFN <sub>5</sub></b>	
<i>Pautas recomendadas</i>	Sofosbuvir/Ledipasvir + RBV durante 12 semanas (AII)
<b>PACIENTES CON FRACASO PREVIO A NS5A<sub>6</sub></b>	
<i>Pautas recomendadas</i>	Sofosbuvir + Simeprevir + RBV durante 12 semanas <sub>1</sub> (BIII)
<i>Pautas desaconsejadas</i>	Cualquier pauta con un inhibidor de NS5A (Ledipasvir, Daclatasvir u Ombitasvir) si no podemos descartar la presencia de mutaciones de resistencia en NS5A

**RECOMENDACIONES DE TRATAMIENTO PARA PACIENTES CON GENOTIPO 2:**

<b>Pautas recomendadas</b>	<b>Recomendación general:</b> Sofosbuvir + RBV durante 12 semanas (AI) <b>Pacientes cirróticos pretratados:</b> IFN no contraindicado: Sofosbuvir + PR durante 12 semanas (AI) IFN contraindicado: Sofosbuvir + RBV durante 16-24 semanas (AI)
----------------------------	---

**RECOMENDACIONES DE TRATAMIENTO PARA PACIENTES CON GENOTIPO 3:**

<b>Pautas recomendadas</b>	<b>Paciente sin cirrosis:</b> Sofosbuvir + Daclatasvir durante 12 semanas (A1) <b>Pacientes con cirrosis:</b> IFN no contraindicado: Sofosbuvir + PR durante 12 semanas (AI) IFN contraindicado: Sofosbuvir + Daclatasvir + RBV durante 12
----------------------------	---

semanas (BII)

---

RECOMENDACIONES DE TRATAMIENTO PARA PACIENTES CON GENOTIPO 4:

---

<b>Pautas recomendadas</b>	<b>Pacientes con cirrosis:</b> 2D + RBV durante 24 semanas (BIII) Sofosbuvir/Ledipasvir durante 12 semanas (A1). En pacientes con cirrosis añadir RBV (BIII). En pacientes con cirrosis descompensada: Sofosbuvir/Ledipasvir + RBV durante 24 semanas (BII)
--------------------------------	--

---

**EL POLIMORFISMO Q80K EN NS3 DE GENOTIPO 1A Y SU EFECTO FRENTE A LOS ANTIVIRALES DE ACCIÓN DIRECTA**

Un polimorfismo se define como la variación en la secuencia en una posición determinada del ADN entre los individuos de una población. Por definición debe aparecer por lo menos en el 1% de la población.

**EFFECTO DE LA PRESENCIA BASAL DEL POLIMORFISMO Q80K**

El polimorfismo Q80K es un polimorfismo que ocurre naturalmente en el 0-75% dependiendo del área geográfica en la que se estudie (Sarrazin, 2015) y que se asocia con una menor tasa de respuesta a simeprevir, asunaprevir y Sovaprevir.

Las tasas de RVS en los pacientes con genotipo 1a y polimorfismo Q80K basal fueron sistemáticamente inferiores en todos los estudios (en comparación con los pacientes que no presentaban este polimorfismo), siendo incluso comparables con las del grupo placebo en el estudio QUEST-1. A continuación se resumen los ensayos mas relevantes en lo que se ha implicado el empleo de simeprevir y el efecto del polimorfismo Q80K.

## GENOTIPO 1 EN PACIENTES SIN TRATAMIENTO PREVIO

**Estudio C208 (QUEST-1):** Estudio de fase III multicéntrico, doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo (PBO) para investigar la eficacia de SMV 150 mg/día durante 12 semanas en combinación con interferón pegilado alfa 2a 180 µg subcutáneos/semana y RBV 1.000-1.200 mg/día durante 24 o 48 semanas en función de la respuesta al tratamiento.

La RVS12 en los pacientes con genotipo 1a y polimorfismo Q80K presente tratados con SMV fue 51,7% frente al 53% del grupo PBO; mientras que la respuesta de los pacientes sin el polimorfismo fue 84,9% para SMV y 44% para PBO. En pacientes con genotipo 1a y polimorfismo Q80K, la diferencia entre SMV y placebo no fue estadísticamente significativa.

**Estudio C216 (QUEST-2):** El diseño de este estudio es idéntico al anterior, la principal diferencia es que los pacientes podían recibir tratamiento con PEG alfa 2a o 2b. En el brazo de SMV, la RVS12 en los pacientes con genotipo 1a y polimorfismo Q80K presente tratados con SMV fue 75% frente a 50% en el grupo PBO y en los pacientes sin este polimorfismo, 82.3% para SMV y 43% en PBO. En este estudio, en los pacientes con genotipo 1a y polimorfismo Q80K, aunque la RVS de SMV fue numéricamente mayor que en el grupo PBO, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

## GENOTIPO 1 EN PACIENTES PRETRATADOS

**Estudio HPC3007 (PROMISE):** Estudio de fase 3 multicéntrico, aleatorizado (2:1), controlado con placebo, doble ciego, para evaluar la eficacia y seguridad de SMV 150 mg/día durante 12 semanas en combinación con interferón pegilado alfa 2a 180 µg subcutáneos/semana y RBV 1.000-1.200 mg/día durante 24 o 48 semanas en función de la respuesta al tratamiento. Al igual que los estudios anteriores, en los pacientes con genotipo 1a y polimorfismo Q80K presente tratados con SMV se observó una menor tasa de RVS12 (46,7%) que en los pacientes sin este polimorfismo (78,5%). En este estudio,



en los pacientes con genotipo 1a y polimorfismo Q80K, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes tratados con PBO y SMV.

#### RÉGIMEN LIBRE DE INTERFERÓN

**Estudio HPC2002 (COSMOS):** Estudio abierto, aleatorizado, fase IIa, para investigar la eficacia y seguridad de 12 ó 24 semanas de tratamiento con SMV (150 mg una vez al día) en combinación con SOF (400 mg una vez al día) con o sin RBV en pacientes infectados por el genotipo 1 del VHC en dos cohortes distintas. La cohorte 1 estaba constituida por pacientes respondedores nulos a un tratamiento previo basado en interferón y tenían una fibrosis F0-F2 según la escala METAVIR y la cohorte 2 por pacientes naïve o con respuesta nula previa a un tratamiento previo basado en interferón con fibrosis F3-F4 según la escala METAVIR y enfermedad hepática compensada.

Las tasas de RVS12 en función del geno/subtipo del VHC y del polimorfismo basal Q80K fueron similares en los diferentes subgrupos. Se notificaron un total de 6 pacientes con recidiva viral (6/167, 3,5%): cuatro ocurrieron en pacientes con genotipo 1a y polimorfismo basal Q80K (3 en la cohorte 1 y uno en la cohorte 2) y dos en pacientes con genotipo 1a sin polimorfismo Q80K.

**Estudio OPTIMIST:** Fase 3, abierto, internacional (EE.UU. y Canadá). Pacientes naïve y pretratados, con y sin cirrosis compensada. Se evalúa: SOF + SMV x12s. Las tasas de RVS12 en función del geno/subtipo del VHC y del polimorfismo basal Q80K fueron para Gt-1a + Q80K; 74% y para Gt-1a sin Q80K del 92%. En virtud a esta respuesta en las guías actuales de la European Association for the Study of the Liver ([EASL](#)) la recomendación de determinar Q80K en:

- a) Pacientes cirróticos 1a que van a empezar Sofosvuir+Simeprevir
- b) Pacientes 1a que han fallado a AADS y que tienen necesidad urgente de retratamiento

En estudios in vitro de resistencia a Simeprevir, el 96% de los replicones resistentes portaron una o múltiples sustituciones de aminoácidos en las posiciones 43, 80, 155, 156 y/o 168 de la proteasa NS3, siendo las sustituciones en la posición D168 de NS3 las observadas con más frecuencia (78%). Todas estas sustituciones de aminoácidos en las posiciones 43, 80, 122, 155, 156 y 168 de NS3 redujeron in vitro la actividad de simeprevir.

Resistencia en los ensayos clínicos: los pacientes 1a tratados con simeprevir que no conseguían RVS presentaron de modo predominante la mutación R155K, sola o combinada con sustituciones de aminoácidos en las posiciones 80, 122 y/o 168 de NS3, mientras que en los pacientes con el genotipo 1b del VHC aparecía con mayor frecuencia la sustitución D168V. En los pacientes con el genotipo 1a del VHC con una sustitución del aminoácido Q80K basal se observó la aparición más frecuentemente de una sustitución R155K en el momento del fracaso. Por tanto otra indicación para realizar detección de polimorfismo Q80K estaría avalado para evitar la aparición de R155K.

# Capítulo 2: Objetivos

# **CAPÍTULO 2: OBJETIVOS**

Los objetivos del presente estudio son:

## **OBJETIVO 1.**

Describir el grado de discordancia entre los diferentes ensayos comerciales de genotipado de VHC y la secuenciación en NS5b, como técnica de referencia.

## **OBJETIVO 2.**

Desarrollar de una PCR-Alelo Específica para la detección del polimorfismo Q80K en pacientes con VHC de genotipo 1a.

## **OBJETIVO 3.**

Estudiar la prevalencia del polimorfismo Q80K en los pacientes con VHC de genotipo 1a y su asociación con los diferentes clados de VHC.

# **Capítulo 3: Justificación de la investigación**

# CAPÍTULO 3: JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

## JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO 1:

Es evidente que la determinación del genotipo es clínicamente relevante, tanto para la toma de decisiones a la hora de instaurar la terapia antiviral como para establecer la duración de la misma, tal y como queda reflejado en las Recomendaciones de la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía (AETSA) en el apartado sobre la evaluación clínica de los pacientes.

Los ensayos comerciales actuales que se emplean para genotipado de VHC se basan en diferentes estrategias de amplificación y diferentes estrategias de detección de los amplificados, pero lo que más llama la atención es que se dirigen a diferentes dianas del HCV genómico (5'-UTR, Core, NS5b). Por tanto nos encontramos con diferentes técnicas para amplificar diferentes dianas. Este es el estado actual del problema.

La región 5'UTR es la región de elección debido a su alto nivel de conservación y sensibilidad, y por esta razón, los ensayos comerciales se han fijado en estas dianas. Pero, a su vez, debido a este alto nivel de conservación, el 5'UTR tiene una capacidad limitada para discriminar el genotipo 6 de genotipo 1 y subtipos dentro de los genotipos 1, 2, 3, 4, y 6. A modo de ejemplo, los subtipos de genotipo 6 que no sean 6a y 6B muestran secuencias 5'UTR idénticas o similares a las de tipo 1 y, como consecuencia, no pueden ser diferenciados (Stuyver, 1996) (Chen, 2002) (Chinchai, 2003). Existe un gran número de subtipos a menudo comparten la misma secuencia 5'UTR, otro buen ejemplo sería la

incapacidad para distinguir el subtipo 2c del subtipo 2a en el 5'UTR. (Bukh, 1995) (Tamalet, 2003) (Cantaloube, 2006). (Guelfo JR, 2014) (McCormick AL, 2015)

Sin embargo, no existe un ensayo comercial que esté basado en la secuenciación de la región NS5b seguido del análisis filogenético correspondiente, que es la metodología que se considera como el método de referencia (Simmonds P S. D., 1994) (Murphy DG, 2007) (Tong, 2015)

Ante semejante escenario no es de suponer que se den casos de errores de clasificación del genotipo del VHC, con un impacto negativo en la selección del tratamiento y en consecuencia sobre la respuesta al tratamiento.

Con el fin de lograr el más alto grado de la respuesta al tratamiento consideramos un buen objetivo lograr alcanzar una estimación mas precisa en la determinación del genotipo VHC. Para ello, y gracias a el entorno del Grupo Español para la Hepatitis Viral Estudio (GEHEP) de la Sociedad Española de Microbiología y Enfermedades Infecciosas (SEIMC), que nos dio la oportunidad de solicitar y conceder el Proyecto GEHEP 007 se pudo evaluar la correcta asignación de los genotipos del VHC por tres métodos comerciales, kit de genotipado Trugene VHC (Siemens), VERSANT VHC genotipo de ensayo 2.0 (Siemens), y Tiempo real VHC genotipo II (Abbott), en comparación con la secuenciación Sanger del ADN NS5B. De los datos obtenidos de este proyecto se esperaba modificar el protocolo empleado en la rutina asistencial y empezar a realizar la secuenciación poblacional de la región NS5B.

## **JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO 2:**

Como ya hemos visto anteriormente existen varios grupos de AADs para poder conseguir la erradicación del VHC; los inhibidores de la proteasa NS3/4A, los inhibidores de la polimerasa viral NS5B e los inhibidores de la región reguladora NS5A.

Para la realización del objetivo 2 nos vamos a detener en el primer grupo: los inhibidores de la proteasa NS3/4a, y mas concretamente en el fármaco Simeprevir. La razón de fijarnos en este fármaco es porque hasta la fecha es el único antiviral que ha demandado la detección de una mutación en la secuencia NS3 antes de iniciar tratamiento. Esto es así porque los ensayos (QUEST 1 y 2; PROMISE, OPTIMIST) en los que se empleaba simeprevir había una clara falta de respuesta en los pacientes que portaban la mutación Q80K.

Teniendo en cuenta estos ensayos en los que claramente se indicaba la necesidad de detectar la mutación Q80K, y atendiendo a las guías Europeas de recomendación de tratamientos de 2014, se consideró oportuno montar dicha técnica en el laboratorio de rutina asistencial.

Ahora bien, como la única técnica posible para la determinación de Q80K era la secuenciación convencional de la región NS3 previamente amplificada y esta tecnología no está disponible para la mayoría de los laboratorios de diagnóstico clínico, nos planteamos desarrollar un método mas sencillo, rápido, seguro y eficaz para determinar la mutación, así, de lograrla, supone acercar esta prueba a la cartera de servicios de los laboratorios asistenciales, y facilitar el acceso a este fármaco a los pacientes con infección crónica por VHC de genotipo 1a en los que exista criterios de inicio de tratamiento antiviral.

Así que nos planteamos como objetivo desarrollar una PCR alelo específica (PCR-AE) para detectar la mutación Q80K, objetivo que se convertía en un reto interesante dada la alta variabilidad que como hemos descrito presenta el VHC.

Hay que añadir que actualmente las recomendaciones de la AASLD-IDSA del año 2015 dicen que se debe determinar Q80K:

1) en pacientes cirróticos de genotipo 1a que van a empezar Sofosvuvir+Simeprevir (Optimist )



2) pacientes 1a que han fallado a AADs y que tienen necesidad urgente de retratamiento

Por tanto en el objetivo 2 se describe el método de obtención del polimorfismo Q80K mediante técnica PCR alelo específica (PCR-AE)

### **JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO 3:**

No disponemos de datos acerca de la tasa de prevalencia de la mutación Q80K en Andalucía. Los datos que disponemos varían del 1% al 50% según el país donde se estudia. En EEUU hay datos que la sitúan alrededor del 50%. En Europa existen datos documentados de Francia, donde se ha calculado una tasa del 10% (Morel V, 2014) y en Suecia se detectó un porcentaje del 5,7% (Palanisamy N, 2013). Recientemente se han publicado datos de prevalencia de Q80K en Europa para VHC genotipo 1 global, VHC 1a y 1b, fue de 7,5%, 19,8% y 0,5%, respectivamente y entre los países incluidos en el estudio, la prevalencia de Q80K en G1 varió por país (0% en Bulgaria hasta el 18,2% en el Reino Unido) (Sarrazin, 2015). Es de notar la diferencia de prevalencia entre EEUU y los países de Europa.

En España se han hecho un estudio de prevalencia empleando técnicas de secuenciación masiva y se ha estimado que en nuestro medio la mutación se encuentra de forma natural en más del 30% de los pacientes “naïve” con genotipo 1a, pero tan solo en menos de un 1% en los pacientes con genotipo 1b (Quer J G. J.-F.-d.-P.-C.-t., 2015). Estos estudios se han realizado empleando secuencias de la zona Norte de España y no contamos con datos de la zona Sur, por tanto en virtud de la realización de la determinación de la mutación Q80K por PCR-AE pretendemos realizar una estima de la prevalencia de la mutación Q80K en nuestro medio.

# **Capítulo 4: Estudio del análisis de datos y resultados**

# **CAPÍTULO 4: ESTUDIO DEL ANÁLISIS DE DATOS Y RESULTADOS**

**OBJETIVO 1. DESCRIBIR EL GRADO DE DISCORDANCIA ENTRE LOS DIFERENTES ENSAYOS COMERCIALES DE GENOTIPADO DE VHC Y LA SECUENCIACIÓN EN NS5B, COMO TÉCNICA DE REFERENCIA. ESTUDIO GEHEP-007.**

**DISEÑO DEL ESTUDIO Y PACIENTES:**

Para responder a la pregunta objetivo nº1 se diseña el estudio ambispectivamente y se otorga un carácter multicéntrico, en el cual se reclutan cuatro laboratorios certificados en España:

- Hospital Conxo-CHUS Santiago de Compostela
- Hospital Ramón y Cajal de Madrid
- Clínica Universidad de Navarra, Pamplona
- Hospital de la Princesa de Madrid.

De los diferentes ensayos comerciales que se emplean para genotipo VHC se seleccionaron los tres ensayos que mas se emplean en la actualidad:

- TRUGENE *HCV 5'NC* Genotyping Kit (Siemens Medical Solutions Diagnostics)
- Ensayo de VERSANT VHC genotipo (VERSANT 2.0, Bayer/Siemens)
- Abbott Real Time® HCV Genotipo (Abbott Molecular Diagnostics)

Se incluyeron 329 muestras clínicas en las que había representación de varios de los genotipos y subtipos que circulan en España. De éstas muestras analizadas:

- 135 muestras fueron analizadas por TRUGENE *HCV 5'NC* Genotyping Kit.
- 94 muestras fueron analizadas con el ensayo de VERSANT VHC genotipo 2,0.
- 100 muestras por Real Time VHC genotipo II.

Además, cada laboratorio debía ser capaz de amplificar y secuenciar un fragmento de 330 pb del gen NS5B (posiciones de nucleótidos 7935 a 8266) siguiendo un protocolo común y único. Se planteó poder evaluar la variación intralaboratorio por si se dieran diferencias en los resultados emitidos y se diseñó un panel de control de calidad que se trabajó a ciegas y que fue preparado por uno de los laboratorios participantes el cual posteriormente distribuyó al resto de los laboratorios. Se estableció que los laboratorios propuestos no podían entrar en el estudio a menos que logaran un resultado 100% concordante con el panel ciego.

Se describe a continuación en qué consistió el panel de calidad: Los participantes de Clínica Universitaria de Navarra prepararon 10 muestras previamente caracterizadas y enviaron una alícuota de 1 ml de una dilución 1/5 de la muestra original que se congeló a -80°C en hielo seco y se enviaron a los otros tres laboratorios participantes. Los genotipos y la carga viral (Log UI / ml) de las muestras del panel fueron: 1a\_clade I (6,62), 1a\_clade II (6,45), 1a\_Interclade (5,56), 1b (6,21), 1b (6,59), 2a (5,65), 3a (5,69), 4a (5,33), 4d (5,81), y 5a (5,43).

#### **METODOLOGÍA EMPLEADA EN EL GENOTIPADO:**

##### **PCR CASERA NS5B:**

Esta determinación era común en todos los laboratorios participantes, y consistía en la extracción de ARN VHC empleando métodos automatizados (Magna Pure LC , Roche Diagnostics, etc.). El ARN obtenido se usará como molde para obtener ADNc (Transcripción reversa, RT) que posteriormente se amplificará (PCR) en un fragmento de 330 pb que abarca los codones 240-360 de la región NS5B. La amplificación se llevará a cabo usando el protocolo publicado (Weck, 2002) al cual se le había realizado una modificación a uno de los cebadores publicados por petición de la Clínica Universidad de Navarra, Pamplona.

La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl y consistía de una mezcla de reacción (enzima de RT-PCR, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Tris) con 1,0 pmol de cebador externo forward y reverse (véase tabla) en los que se incluían 10 µl de ARN. Dicha mezcla se lleva a un termociclador y se programan las siguientes condiciones: 45 ° C durante 45 minutos, seguido de 95 ° C durante 15 minutos y 45 ciclos de desnaturalización a 95 ° C durante 30 segundos, hibridación a 56 ° C durante 30 segundos, extensión a 68 ° C durante 1 minuto, y elongación final a 68 ° C durante 10 minutos. Un microlitro del primer producto de PCR fue amplificado de nuevo empleando una PCR anidada, de nuevo se empleó un volumen final de 50 µl que consistía de una mezcla de reacción (polimerasa de ADN, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Tris) con 1,0 pmol de con los cebadores forward y reverse internos (véase tabla 4) que se amplificaron con las siguientes condiciones de: desnaturalización a 95 ° C durante 10 minutos y 30 ciclos de desnaturalización a 94 ° C durante 20 segundos, hibridación a 58 ° C durante 30 segundos, extensión a 72 ° C durante 1 minuto, y elongación final a 72 ° C durante 10 minutos.

**Tabla 4. Descripción de los cebadores empleados para secuenciar región NS5B**

Cebadores NS5B	Secuencia del cebador	Posición H77
Cebador externo forward	5'-TGG GGT TCT CGT ATA ATG CCC-3	7904 a 7922
Cebador externo reverse	5'- CAT GGT CCT AGC CTC CGT GAA-3 '	8295 a 8275
Cebador interno forward	5'-GAT ACC CGC TGC TTT GAC TC-3 '	7916 a 7935
Cebador interno reverse	5'-CCT CCG TGA ARR CTC KYA G-3 '	8284 a 8266

La reacción de secuenciación del amplicón de ADN resultante se realizó mediante tres plataformas diferentes según el centro participante:

- Analizador del sistema de secuenciación de Applied Biosystems
- Sistema de secuenciación de ADN Opengene de Siemens
- Secuenciación capilar de Beckman Coulter.

La asignación de los genotipos del VHC se obtenían al analizar las secuencias en la siguiente dirección: [Geno2pheno HCV](#). Esta pagina web se dedica al análisis de secuencias del gen NS3, NS5A y NS5B del VHC, la cual nos proporciona información sobre mutaciones de resistencia y genotipado.

A continuación se detallará los kit empleados en el estudio:

### **TRUGENE KIT DE GENOTIPADO DE HCV (SIEMENS);**

El ensayo de TRUGENE *HCV 5'NC* Genotyping Kit (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, NY, EEUU) consta de 5 etapas para la obtención de las secuencias de la región 5'-UTR exclusivamente según el protocolo del fabricante:

- Extracción del ácido nucleico a partir de 1 ml de plasma
- Amplificación mediante RT-PCR
- Reacción de secuenciación bidireccional
- Electroforesis en gel de poliacrilamida de los secuenciados
- Alineamiento de las secuencias e interpretación de los resultados.

### **ENSAYO DE VERSANT 2.0 VHC GENOTIPO (SIEMENS):**

Esta técnica emplea las regiones 5'UTR y *Core*. Se van a generar amplicones biotinilados mediante RT-PCR de las regiones -299 a -239 y -46 a -6 de la región 5'UTR. Posteriormente se desnaturalizan estos amplicones y se someten a hibridación con varias sondas diana y dos de control que se encuentran fijadas a una membrana de nitrocelulosa mediante colas poli-(T). Los híbridos formados se hacen patentes mediante la adición de un conjugado (estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina) seguida del sustrato cromógeno (BCIP/NBT). El genotipo se determina tras la alineación de la tira problema con la tarjeta de referencia del ensayo. La diferencia entre las versiones I y II

del LiPA radica en que la primera incluía 17 sondas (1 genérica del genotipo 1, 1a, 1b; 2 genéricas del genotipo 2, 2 del subtipo 2a, 2 del subtipo 2b, 4 del subtipo 3a, 3 de los genotipos 4/5) mientras que la versión II incluye 5 más, específicas de los genotipos 4, 5, y 6. A esta técnica se le conoce con el nombre de LiPA y tiene una gran aceptación al no requerir de un secuenciador en el laboratorio.

### **REAL TIME VHC GENOTIPO II (ABBOTT, MS):**

El ensayo Abbott Real Time® HCV Genotipo es el único que emplea la tecnología de PCR a Tiempo Real (PCR-TR). Este ensayo parte de ARN purificado a partir del plasma, el cual es amplificado mediante el uso de cebadores específicos de las regiones NS5B y 5'UTR gracias a una polimerasa termoestable recombinante (Z05 modificada) con actividad retro transcriptasa y ADN polimerasa. El ensayo utiliza sondas MGB® (*Minor Groove Binder*) con doble marcado fluorescente específicas de 1a y 1b (región NS5B) y otras específicas de los genotipos 2 (2a, 2b), 3, 4, 5 y 6 (estos últimos de la región 5'UTR). La prueba se realiza en 3 reacciones independientes; la primera contiene iniciadores y sondas control destinadas a detectar cualquier genotipo presente, e iniciadores y sondas específicas de 1a y 1b; la segunda reacción contiene los iniciadores y las sondas específicas de 2a, 2b y 3, y, finalmente, la tercera reacción contiene los iniciadores correspondiente y las sondas específicas de los genotipos 4, 5 y 6. Tras 50 ciclos de amplificación el amplicón se secuencía en un secuenciador de Applied Biosystems y los datos obtenidos son analizados mediante el programa Sequence Genotyping Software, v2.0 (Celera Diagnostics, Alameda, California).

### **DEFINICIÓN DE DISCORDANCIAS MAYORES Y DISCORDANCIAS MENORES:**

Hemos dividido las discordancias que nos pudiéramos encontrar en;

- **Discordancias mayores**, que serían los cambios que se pueden dar a nivel de genotipo asignado por un método comercial y secuenciación NS5b y



hemos incluido en esta categoría a los subtipos 1a y 1b dada su prevalencia en España.

- **Discordancias menores**, cuando las diferencias sean a nivel de subtipo.

## **RESULTADOS**

### **DISTRIBUCIÓN DE LOS GENOTIPOS:**

La distribución de los genotipos empleando los 3 ensayos comerciales se muestran en la tabla . La mayoría de las muestras resultaron ser del genotipo 1 (n = 216; 66%), seguido por el genotipo 3 (n = 63; 19 %) y el genotipo 4 (n = 44; 13%). Para el genotipo 1, el subtipo 1a se encontró en 119 muestras (55%), el subtipo 1b en 84 muestras (39%), y en 13 muestras no se pudo determinar el subtipo (6%).

**Tabla 5. Resultados por tres ensayos comerciales de las 329 muestras incluidas en el estudio**

Genotipo	Subtipo	Trugene	Abbott RT	VERSANT HCV 2.0	Total	Total Genotipo
						n (%)
1	1a	33	48	38	119	216 (66%)
	1b	47	18	19	84	
	No	6	-	7	13	
2	2a	1	-	2*	3	13 (4%)
	2c	1	-	2*	3	
	No	-	7	-	7	
3	3a	23	-	16	39	63 (19%)
	3d	1	-	-	1	
	No	2	19	2	23	
4	4a	8	-	1	9	44 (13%)
	4c	12	-	1	13	
	No	-	6	6	12	
5	5a	1	-	-	1	3
	No	-	2	-	2	
<b>Total</b>		135	100	94	329	

**DISTRIBUCIÓN DE LAS DISCORDANCIAS MAYORES Y MENORES:**

Se obtuvieron los siguientes valores de discordancia total para cada ensayo comercial con respecto al método de referencia;

- 34% para Trugene
- 18% para VERSANT HCV2.0
- el ensayo Abbott identificó correctamente todos los subtipos 1a y 1b y los genotipos 2, 3, 4 y 5, pero no discrimina el subtipo en estos casos.

Entre la discordancias mayores se encontró que el 16% de los casos los daba Trugene VHC, de éstos , la mayoría fueron debido a una mala clasificación del genotipo 1b por el ensayo comercial (n = 14; 13 casos Trugene VHC los clasifica como 1b y en cambio serian reclasificados como 1a mediante secuenciación de ADN NS5b, y 1 caso

reclasificados como 3a); además, 5 casos mal clasificados como 1a por Trugene se reclasificaron como 1b de emplear la técnica de referencia.

Respecto VERSANT HCV 2.0, encontramos un 9% de discordancias mayores, en este caso era debido a que todos excepto uno de los casos (n = 8) el ensayo daba u cuando el método de referencia los reclasificó como 1a. El otro caso discordante se trataba de un genotipo 1 que sería reclasificado como 4d por secuenciación del ADN NS5b. Estos resultados se resumen en la tabla 2.

Tabla 2.- Discordancias mayores (las diferencias en el genotipo asignado por un método comercial y secuenciación NS5b, incluyendo genotipos 1a y 1b clasificación errónea) de las tres pruebas comerciales ensayadas, en comparación con la secuenciación del ADN NS5b.

**Tabla 6. Discordancias mayoritarias encontradas de los tres ensayos comerciales incluidos en el estudio**

<b>Ensayo comercial</b>	<b>Secuenciación ADN NS5b (Método de referencia)</b>	<b>Trugene n (%)</b>	<b>VERSANT HCV 2.0 n (%)</b>	<b>ABBOTT n (%)</b>
<b>1b</b>	<b>1a</b>	13 (10%)	8 (8%)	-
<b>1</b>	<b>4d</b>	-	1 (1%)	-
<b>1a</b>	<b>1b</b>	5 (4%)	-	-
<b>1b</b>	<b>3a</b>	1 (0,7%)	-	-
<b>3a</b>	<b>1b</b>	1 (0,7%)	-	-
<b>4c</b>	<b>1b</b>	1 (0,7%)	-	-
<b>TOTAL</b>		<b>21 (16%)</b>	<b>9 (9%)</b>	<b>0</b>

Con respecto a las discordancias menores, se encontró que en 24 de las muestras obtenidas por la técnica de Trugene (18%) aparecieron, la mayoría de estas discordancias eran de error en la clasificación de los subtipos del genotipo 4 (n = 13) que serían reclasificados por secuenciación NS5b en diferentes subtipos, pero algunos casos de genotipo 3 (n = 3) y de genotipo 2 (n = 2) fueron también reclasificados; de interés, seis muestras de genotipo 1 que no podían ser subtipificadas por la prueba comercial fueron reclasificadas como subtipo 1a (n = 2), y el subtipo 1b (n = 4) por el método de referencia.

En cuanto a VERSANT HCV 2.0, se registraron en 9 (9%) casos discordancias menores. Para este ensayo comercial todos los casos discordantes eran debido a la falta de una asignación de subtipo del genotipo 4 (n = 5), el genotipo 3 (n = 2), y el genotipo 1 (n = 2; un subtipo 1a y un subtipo 1b) por el método de referencia.

Con la secuenciación NS5b, los genotipos 2, 3, 4 y 5 obtenidos el ensayo de Abbott VHC Real Time ensayo II se clasificaron como subtipos 2a (n = 2), 2b (n = 2), 2c (n = 3), 3 bis (n = 19), 4a (n = 2), 4d (n = 4) y 5a (n = 2). Los resultados para las discordancias menores se pueden encontrar en la tabla 3.

**Tabla 7.- Discordancias menores (las diferencias a nivel de subtipo) de las tres pruebas comerciales analizadas, en comparación con la secuenciación del ADN NS5b**

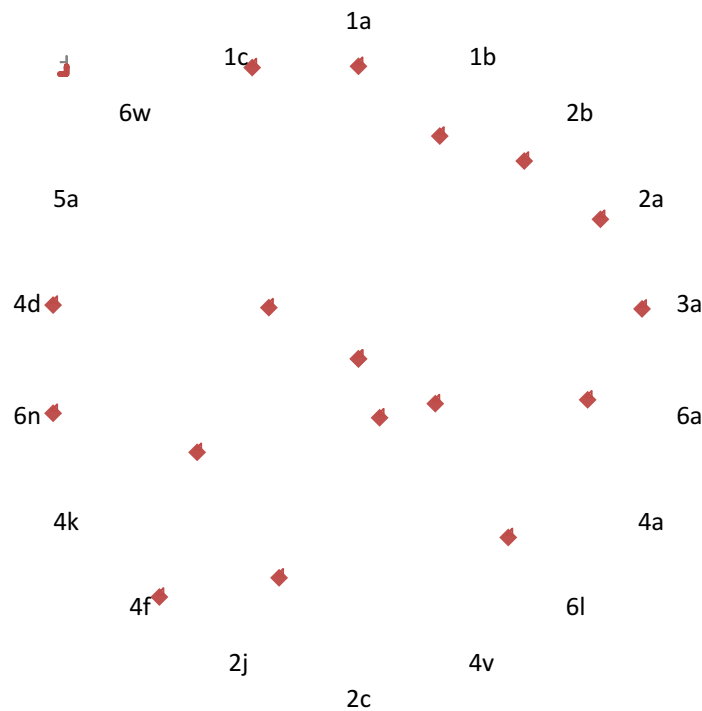
Ensayo comercial	Secuenciación ADN NS5B	Trugene n (%)	VERSANT HCV 2.0 n (%)	ABBOTT n (%)
<b>1</b>	<b>1a</b>	2 (1,4%)	1 (1%)	-
<b>1</b>	<b>1b</b>	4 (2,8%)	1 (1%)	-
<b>2</b>	<b>2a/b/c/i</b>	2 <sup>1</sup> (1,4%)	-	7 (7%)
<b>3</b>	<b>3a</b>	3 <sup>2</sup> (2,1%)	2 (2%)	19 (19%)
<b>4</b>	<b>4a/c/d</b>	13 <sup>3</sup> (10,3%)	5 (5%)	6 (6%)
<b>5</b>	<b>5a</b>	-	-	2 (2%)
<b>TOTAL</b>		<b>24 (18%)</b>	<b>9 (9%)</b>	<b>34 (34%)</b>

<sup>1</sup> Trugene subtipo 2a (n = 1), 2c (n = 1); NS5b subtipo 2i. <sup>2</sup> Trugene genotipo 3 (n = 2), el subtipo 3d (n = 1); NS5b subtipo 3a. <sup>3</sup> Trugene subtipo 4a, 4d NS5b subtipo (n = 2); Trugene subtipo 4c, NS5b subtipo 4a (n = 1); Trugene subtipo 4c, 4d NS5b subtipo (n = 10).

Para poder conocer cómo la región 5'-UTR contribuye a los errores de clasificación se descargaron 330 genomas enteros de diferentes genotipos y subtipos de las bases de datos del VHC presentes en la web. Se estudiaron separadamente dentro del mismo genoma la región 5' ÛTR y la región NS5B. Puesto que se trataba del mismo genoma era

de esperar una concordancia total en el genotipado. Los resultados de la comparación intra-5'UTR-NS5b se muestran en la figura 13. Como puede verse, y refiriéndonos a los genotipos del VHC clínicamente más relevantes se encontraron diferencias notables, como se puede observar para el subtipo 1b donde encontramos un 20 % de errores de clasificación, o para el subtipo 4a donde se dan más de un 60% de los errores de clasificación. Los resultados de este ejercicio de genotipado mediante genoma entero debe hacernos cuestionar como mínimo la utilidad de emplear regiones altamente conservadas.

**Figura 13.- Comparación intra-subtipo Intra de la secuencia de ADN de la 5'UTR y las regiones NS5b de HCV. Las líneas radiales crecientes indican cambios en 20%, desde el centro del gráfico**



**OBJETIVO 2. DESARROLLAR UNA PCR-ALELO ESPECÍFICA PARA LA  
DETECCIÓN DEL POLIMORFISMO Q80K EN PACIENTES CON VHC DE  
GENOTIPO 1A**

*Objetivo 2.* Desarrollar una PCR-Alelo Específica para la detección del polimorfismo Q80K en pacientes con VHC de genotipo 1a.

METODOLOGÍA. LA PCR ALELO ESPECIFICA (PCR-AE):

Se trata de una técnica de diagnóstico usada para identificar y diferenciar los polimorfismos de una sola base presentes en el ADN. Para ello se emplean cebadores que reconocen la secuencia alterada por su extremo 3' y así se consigue amplificar exclusivamente un alelo concreto y no el resto de alelos posibles. Empleando esta estrategia de amplificación tendremos solamente producto amplificado en el caso de que exista una polimorfismo concreto en el ADN del paciente. Además, teóricamente utilizando esta variante de la PCR convencional se consigue aumentar la sensibilidad, lo que permite detectar mutaciones que están poco representadas en la muestra problema.

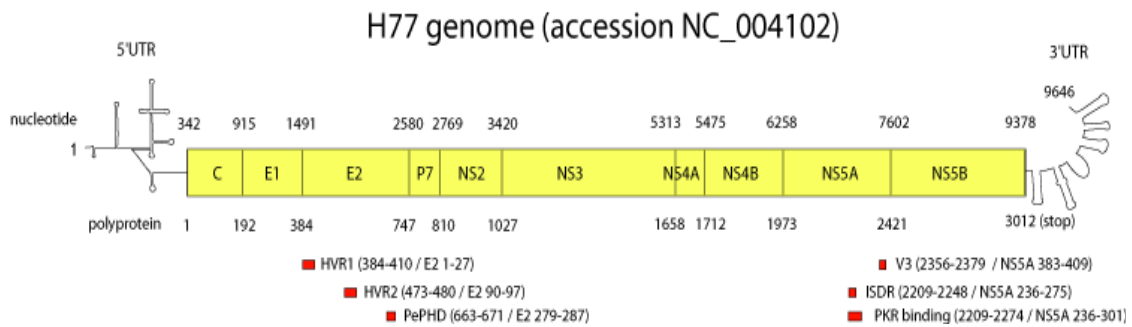
## **DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL DESARROLLO DE LA PCR-AE**

### **Diseño de los cebadores necesarios para detectar el polimorfismo Q80K:**

Posicionamiento Q80K: La variante alélica objeto de nuestro estudio se posiciona dentro del gen NS3, el cual se encuentra en la posición nº 3420-5313 según nomenclatura de la cepa de referencia NC\_004102, ver figura 14.



**Figura 14: Localización gen NS3 referenciado a la cepa de referencia NC\_004102**



La variante alélica objeto de nuestro estudio se posiciona de la siguiente manera sobre el gen NS3; teniendo en cuenta la posición de los *aminoácidos*: posición 80 de la proteína NS3

**Q(80):** APITAYAQQTRGLLGCIITSLTGRDKNQVEGEVQIVSTATQTFLATCINGVCWT  
 VYHGAGTRTIASPKGPVIQMYTNVD**Q**

La variante alélica objeto de nuestro estudio se posiciona de la siguiente manera sobre la cepa de referencia NC\_004102; posición según *nucleótidos*:

**C(3657), A(3658), A(3659):**

Ref.1a.US.77.H77.NC\_004102  
 GCGCCATCACGGCGTACGCCAGCAGACGAGAGGCCTCCTAGGGTGTATAATCACCAGCCTGACTGGCCGGGACAA  
 AAACCAAGTGGAGGGTGAAGTCCAGATCGTGTCAACTGCTACCCAAACCTTCCTGGCAACGTGCATCAATGGGGTATG  
 CTGGACTGTCTACCACGGGGCCGGAACGAGGACCATCGCATCACCCAAGGGTCTGTATCCAGATGTATACCAATGT  
 GGAC**CAA**

Variabilidad en la posición **C(3657), A(3658), A(3659)**: Hay que mencionar que no solo existe una variante alélica que explicaría el polimorfismo de Q a K, sino que existen diferentes variantes alélicas. La detección de todas estas variantes son el objetivo número 2 de la tesis presente. Se estudió la variabilidad de estas posiciones mediante análisis de 372 secuencias de NS3 de genotipo 1a descargadas de la base de datos de los Álamos. Entonces se pudo diferenciar entre variantes mayoritarias (se corresponden con los nucleótidos más prevalentes del triplete que codifica Q en la posición 80 dentro

de las secuencias de NS3 descargadas) y variantes minoritarias (se corresponden con los nucleótidos menos prevalentes).

Las variantes que se encuentran mayoritariamente en la población del VHC de genotipo 1a son:

**Tabla 8. Variantes mayoritarias que explican el polimorfismo Q80K**

	triplete			aminoácido
	1ª base	2ª base	3ª base	
alelos mayoritarios	C	A	A	<b>Gln (Q)</b>
	-	-	G	<b>Gln (Q)</b>
	A	-	G	<b>Lys (K)</b>
	A	-	-	<b>Lys (K)</b>

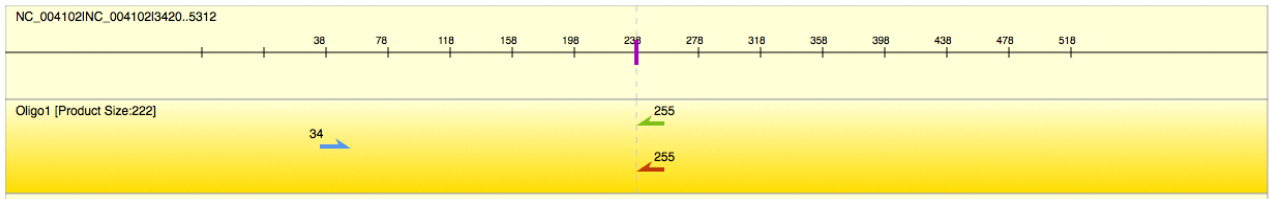
#### **OBTENCIÓN DE CEBADORES PARA DETECCIÓN DE VARIANTES MAYORITARIAS**

Se seleccionan diferentes cebadores empleando el software Primer Premier ([Primer premier](#)) de los cuales se evalúan cuales se ajustan a las mejores condiciones de PCR con máxima especificidad y finalmente se escogen los siguientes cebadores para realizar la PCR alelo específica para variantes alélicas **mayoritarias** Q80K:

Cebadores:		Pos.	Len.	Tm	GC%
<b>Wildtype Reverse Primer</b>	5': <b>CCAGCCCAAGGTCTCG</b>	255	18	62.87	66.67
<b>Mutante Reverse Primer</b>	5': <b>CCAGCCCAAGGTCTCT</b>	255	18	58.75	61.11
<b>Común Forward Primer</b>	5': <b>GGCCTCYTRGGRTGYATAAT</b>	34	20	54.82	50

El tamaño del amplicón resultante será de 222 nucleótidos. En la siguiente figura se puede observar el posicionamiento de los cebadores basados en H77\_NC\_004102

**Figura 15. Gráfico de posición de los cebadores basado en H77. NC\_004102**



La localización de Cebador Común Forward 5' y del Cebador Wildtype y Mutante Reverse se resumen en la tabla 9.

**Tabla 9. Localización de cebadores:**

Query: seq	<b>GGCCTCyTrGGrTGyATAAT</b>
<a href="http://hcv.lanl.gov/content/sequence/LOCATE/locate.html">H77 HYPERLINK "http://hcv.lanl.gov/content/sequence/LOCATE/locate.html"</a> Location:	genoma: 3453→3472
Query: seq:	<b>CCAGCCCACAAGGTCTCG</b>
<a href="http://hcv.lanl.gov/content/sequence/LOCATE/locate.html">H77 HYPERLINK "http://hcv.lanl.gov/content/sequence/LOCATE/locate.html"</a> Location:	genoma: 3657←3674 <b>reverse complement</b>

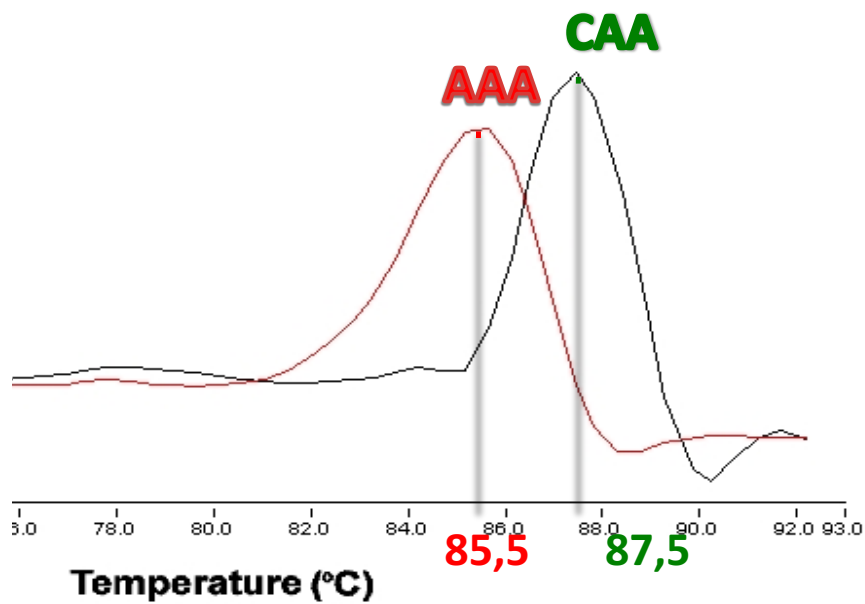
**VALIDACION DE LA TECNICA MEDIANTE METODO ALTERNATIVO AL MÉTODO DE REFERENCIA (TIPO II). OBTENCION CONTROLES POSITIVOS:**

Se empleó para validar y evaluar la PCR-AE un método basado en la comparación con el método de referencia, para ello se obtienen controles o muestras positivos (en este caso con variantes alélicas conocidas) que han sido obtenidos con el método de referencia que en este caso es la secuenciación de la región NS3.

Se obtienen 10 controles positivos cedidos por el instituto de Virología de la Universidad de Colonia. De estos, la mitad presentaban la variante CAA y la otra mitad la variante AAA.

Resultados PCR empleando los controles positivos: Todas los controles dieron amplificación menos una muestra. La PCR reconoció con un 100 de exactitud las 9 muestras amplificadas. En la figura 15 se pueden observar los datos de Tm para cada una de las variantes mayoritarias.

**Figura 15. Valores de laTm para las variantes mayoritarias**



Tras verificar el 100% de la exactitud de la técnica se realizan las primeras PCR-AE con muestras de pacientes y se obtiene un 15% de ausencia de amplificación, con lo que se valora tener en cuenta los alelos que se encuentran en menor frecuencia.

#### **OBTENCION DE CEBADORES PARA DETECCION DE VARIANTES MINORIARIAS**

Las variantes minoritarias encontradas en menor proporción entre las 372 se encuentran, ver tabla 9:

**Tabla 9. Variantes minoritarias del polimorfismo Q80K:**

	triplete			aminoácido
	1ª base	2ª base	3ª base	
alelos minoritarios	-	T	G	<b>Leu (L)</b>
	A	-	T	<b>Asn (N)</b>
	G	G	G	<b>Gly (G)</b>

Consecuentemente se diseñan además los siguientes cebadores empleando el mismo software Primer Premier:

Cebadores:		Pos.	Len.	Tm	GC%
<b>Wildtype2 Reverse Primer</b>	5': <b>CCAGCCCACAAGGTCcCG</b>	255	18	62.87	66.67
<b>Mutante2 Reverse Primer</b>	5': <b>CCAGCCCACAAGGTCgCT</b>	255	18	58.75	61.11

Una vez obtenidos y evaluados los cebadores son rediseñados y se degeneran para poder detectar todas las variantes polimórficas encontradas en las secuencias depositadas en los bancos de secuencias (variantes mayoritarias y minoritarias) presentes en la posición Q80K.

**PROCEDIMIENTO DE PCR ALELO ESPECIFICA Q80K:**

Para detección de todas las variantes polimórficas se emplea los cebadores modificados y mezclados como se describe a continuación, se emplearán 2 tubos de reacción por muestra en la cual,

- En el tubo A mezcla de reacción irán los cebadores Rev-M1 / Rev-W1
- En el tubo B mezcla de reacción irán los cebadores Rev-M2 / Rev-W2

Para cada ensayo se debe incluir una muestra de plasma negativa y un control positivo procedente de una muestra previamente secuenciada y portadora de una variante polimórfica conocida

El procedimiento de mezclado de los reactivos para obtención de la master mix y poder realizar amplificación de ácidos nucleicos se detalla a continuación:

Añadir según el orden de la tabla los siguientes reactivos en la cantidad indicada:

<b>PROCEDIMIENTO Q80K:</b>	
<b>PREPARACIÓN DE LA MMX</b>	<b>μL</b>
<b>H2O</b>	<b>2</b>
<b>BSA (Albumina 1/100)</b>	<b>1</b>
<b>Forward</b>	<b>2</b>
<b>Rev-M1 / Rev-W1</b>	<b>2</b>
<b>Rev-M2 / Rev-W2</b>	<b>2</b>
<b>Q-Mix</b>	<b>10</b>
<b>MMX</b>	<b>19</b>
<b>Muestra (La muestra será la 1ª PCR o el ADNc diluido a 1/25)</b>	<b>1</b>

Programa termociclador Lightcycler(Roche):

la mezcla resultante será introducida en el termociclador. El programa específico será:

95°C	10 min	1 ciclo
95°C	10 sec	45 ciclos
56°C	15 sec	
72°C	30 sec	
95°C	0	1 ciclo
70°C	10 sec	
95°C	0	
40°C	30 sec	1 ciclo

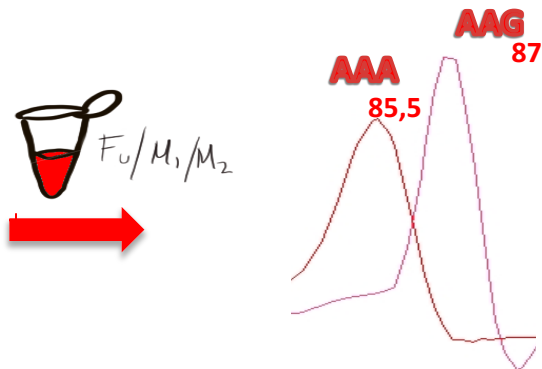
La PCR tiempo real se basa en un método de detección de ADN que es totalmente automatizado por medio de un equipo sensor para la detección de la presencia de fluorescencia (SYBR Green) en presencia de cadena doble.

Lectura de los resultados: hay que tener en cuenta para dar un resultado positivo los valores de :

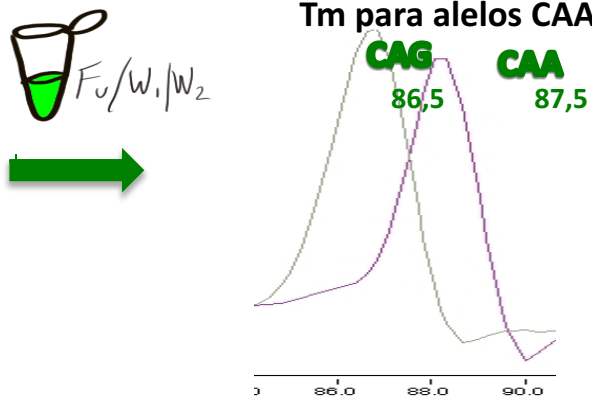
- **Valores Ct;** Número de ciclo, conocido como ciclo umbral en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia (Ct, de threshold cycle en inglés ) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN diana presente en la muestra. El valor Ct siempre debe ser inferior al del control negativo.
- **Valores Tm:** Temperatura de fusión de los fragmentos amplificados (Tm = temperatura a la que el 50% del ADN de la molécula está desnaturalizado)), que es específica para cada alelo, de tal manera que se puede observar en la figura 15 los valores para los alelos mayoritarios y minoritarios que se obtienen y describen el polimorfismo Q80K.

**Figura 15. Valores de Tm encontrados para las diferentes variantes alélicas en Q80K**

### Tm para alelos AAA/G



### Tm para alelos CAA/G



Según el valor de Tm que nos encontremos sabremos qué alelo contiene la posición 80 y definiremos el polimorfismo.



### **OBJETIVO 3. ESTUDIO DE VALIDACIÓN DE LA PCR-AS Y DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE Q80K, EN LA PROTEASA VIRAL EN PACIENTES CON GENOTIPO 1A, ASÍ COMO LOS CLADOS DE GENOTIPO 1A CIRCULANTES EN NUESTRA COHORTE Y SU ASOCIACIÓN CON Q80K**

#### **MATERIAL Y MÉTODOS:**

Se trata de un estudio observacional, ambispectivo, y que ha recibido muestras de la Comunidad de Andalucía y de Levante.

Ha contado con una fase retrospectiva en la que se ha secuenciado la proteasa viral en los genotipos 1a del periodo 2011-2015 del Hospital Universitario San Cecilio y en la fase prospectiva se han incluido pacientes de nuestro hospital y del resto de Andalucía y de Levante.

Se secuenció una región del gen NS3 que incluían las posiciones 1 a las 181 mediante PCR casera empleando ADN polimerasa estándar de Biotools. Las secuencias obtenidas se han interpretado utilizando el software de geno2pheno HCV ([geno2pheno HCV](#)) que proporciona información sobre el genotipo, el clado del virus y las mutaciones encontradas en NS3. En paralelo además, se sometieron al ensayo de PCR-AS en tiempo real icasero para discriminar los alelos AAA/AAG (mutante) de los CAA/CAG (wild type).

Para la detección de la mutación se realizó, en primer lugar, la extracción del ARN del VHC a partir del plasma del paciente (MagNA Pure Compact System, Roche life Science), amplificando posteriormente por RT-PCR (Titan One Tube RT-PCR System, Roche) una región de 200 bp del gen NS3 del virus, con los cebadores:

**NS31a-Q80F: 5'-ATCAATGGGGTATGCTGGACTGTC-3'**

**NS31a-Q80R: 5'-ACATCGGCGTGCCTCGTGACCAG-3'**

En cuanto a los resultados, de las 33 muestras (de un total de 50) de las que se obtuvo un amplicón (66%), prácticamente la totalidad de ellas (32) mostró ausencia del polimorfismo Q80K. Solamente en un caso se obtuvo una mutación, Q80L, distinta de la asociada al fenotipo de resistencia (Q80K), y cuyo significado desconocemos.

### **VALIDACIÓN DE LA PCR-AS**

Nuestro estudio se ha desarrollado en dos fases;

#### **FASE A: "TRAINING SET":**

Se han testado por la PCR-AS todas las muestras de genotipo 1a que previamente se habían testado con otras técnicas en el Hospital San Cecilio durante los años 2011 a 2014 además de las muestras que se han ido recibiendo a lo largo del año 2015.

Resultados del "training set": se componía de 132 muestras de pacientes con genotipo 1a [mediana de edad, 46 años (IQR 41,25-53,75); 108 hombres (82%); mediana carga viral HCV (Log IU/ml) 6,39 (IQR 6,12-6,76)]; se detectó Q80K en 10 casos (7,6%), y en todos ellos la PCR alelo específica fue capaz de identificar este polimorfismo (AAA en 9 casos y AAG en 1), y todos los casos negativos por secuenciación también lo fueron mediante AS-PCR.

#### **FASE B: "VALIDATION SET":**

Para la validación de la PCR-AS se empleó un panel de validación, que se solicitó a investigadores del Instituto de Virología de la Universidad de Colonia. Se trató de un ensayo a ciegas en el cual se estudiaba la detección del polimorfismo Q80K que incluía la detección de las variantes asociadas al triplete Q80K.

El set de validación estaba compuesto por 48 muestras:

- 26 muestras eran positivas para Q80K,
- 22 tenían el alelo AAA,
- 3 portaban el alelo AAG,
- 1 tenía mezcla en la tercera posición del alelo
- y el resto de muestras no presentaban el polimorfismo.

Entre los resultados del "validación set"; la PCR-AS en tiempo real detectó correctamente todos los casos, a excepción de un alelo AAA.

Valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo con respecto a la secuenciación Sanger,

Para calcular los valores se emplearon el conjunto de los datos obtenidos tanto del "training set" como del "validación set".

El objetivo de la validación en los diferentes tipos de métodos, se define a continuación.

En los **métodos cualitativos** el objetivo de la validación es asegurar que: a) se detectan las muestras positivas hasta un nivel de positividad bajo; b) no se obtienen falsos positivos que podrían dar lugar a un resultado erróneo. Por ello, los parámetros más adecuados para evaluar son:

2. Parámetros que tengan que ver con la correcta detección del método: sensibilidad, especificidad, falsos positivos, falsos negativos, eficiencia.

Nuestro ensayo tiene una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de 97%, 99%, 97% y 99% respectivamente.

EXACTITUD del ensayo: 100% (grado de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado)

DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE Q80K EN NUESTRA POBLACIÓN DE ESTUDIO,  
ASÍ COMO EN LOS CLADOS DE GENOTIPO 1A CIRCULANTES EN NUESTRA COHORTE

Para la obtención de la prevalencia basal de Q80K en los pacientes se emplearon los datos obtenidos del “training set” y hemos obtenido una prevalencia basal de Q80K del 7,6% (10/132),

No existen diferencias significativas de prevalencia entre Andalucía (7%, 8/114) y Levante (11%, 2/18).

En nuestra población existe una clara situación dominante del clado II del genotipo 1 ya que el 80% (n=106) de los casos pertenecían a este clado. Cabe llamar la atención que tan solo se han detectado 2 casos de Q80K para los pacientes del clado II (2%).

El 20% (n=26) de los pacientes con VHC de genotipo 1a pertenecen al clado I y sin embargo se encontró en n=8 casos de polimorfismo Q80K en el clado I (30%).

Existiendo una asociación estadísticamente significativa entre clado y prevalencia de Q80K ( $p < 0,001$ ). No existieron diferencias en la distribución de clados entre Andalucía y Levante.

# Capítulo 5. Discusión

# CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

El genotipado del VHC es un componente clave en el procedimiento de erradicación de la infección por VHC tal y como lo recomiendan la guías y documentos consenso actuales. El genotipado se debe realizar antes de comenzar la terapia antiviral, ya que la elección de los agentes antivirales directos (y su combinación), la necesidad de añadir ribavirina, y la duración del tratamiento están directamente influenciadas por el genotipo del VHC. El éxito del tratamiento y la cura del paciente depende en gran medida de una correcta estimación del genotipo del VHC. El genotipado también sirve en los estudios de epidemiología molecular, para conocer la distribución del VHC en todo el mundo (Llanes MS, 2015) Por último, el genotipo también es importante para la interpretación de las variantes asociadas a resistencia (Lontok E, 2015), ya que algunos cambios pueden ser polimorfismos comunes en función de el geno/subtipo específico que está infectando un paciente.

En este estudio hemos investigado la exactitud de tres ensayos comerciales que se han utilizado ampliamente para el genotipado de HCV, utilizando la secuenciación del ADN de la región NS5b del VHC como referencia. Para calificar para el estudio, los laboratorios debieron ser certificados, pasando un panel con controles de resultado conocido; tras la cualificación, cada laboratorio utilizó un protocolo de secuenciación NS5b único para reanalizar las muestras clínicas que habían sido clasificadas previamente por el ensayo comercial en uso en cada laboratorio. Los tres laboratorios pasaron el control de calidad, aunque en uno de ellos fue necesario reanalizar dos de las muestras debido a problemas técnicos

La distribución genotípica del VHC en la muestra que hemos utilizado es totalmente representativa de la prevalencia de genotipos de VHC en España y Europa. De acuerdo con el "Plan Nacional Contra la Hepatitis C", aprobado en Abril de 2015 ([Plan estratégico](#)

[para el abordaje de la Hepatitis C en el sistema nacional de salud. Ministerio de Sanidad, Servicios sociales e igualdad. Mayo 2015.](#)), el genotipo 1 es el más frecuente en España, representando el 69% del total de la población, seguido por el genotipo 3, que está infectando a 20% de los pacientes españoles, y el genotipo 4, que se detecta actualmente en el 8% de la población. En nuestro estudio, el 66%, 19% y 13% de las muestras eran VHC genotipo 1, 3 y 4 respectivamente. En Europa y en los EE.UU., varios estudios (Esteban et al., 2008) describen una distribución similar de los genotipos del VHC.

Casi un tercio de los resultados obtenidos por el ensayo de Trugene fueron discordantes con los obtenidos secuenciación de la región NS5b. Aunque un método de secuenciación, este ensayo comercial interroga sólo la región 5'-UTR para el genotipado de HCV. Esta región es más conservada que NS5b, y aunque se espera que las tasas de amplificación sean mayores, tiene menor potencial para discriminar el genotipo (y subtipo). De hecho, como se puede observar en la figura 1, cuando se compararon 5'UTR y NS5b en 330 secuencias de GenBank, se observó un alto grado de discordancias entre ambas regiones, especialmente para 1b y 4a subtipos. De este modo, en nuestra comparación, Trugene no logró clasificar correctamente trece subtipos 1b, que fueron reclasificados además como subtipos 1a y cinco subtipos 1a, que fueron reclasificados como 1b. Estos son errores críticos, que tienen un impacto directo sobre la práctica clínica y que pueden ser responsables de la falta de respuesta viral sostenida. Por el momento, una correcta caracterización de los subtipos del genotipo 1 es fundamental para determinar la duración del tratamiento (EASL, 2015), para decidir si se debe o no añadir ribavirina (GEHEP-2015) (EASL, 2015) (AASLD/IDSA., 2015), y para decidir si es necesaria la investigación de Q80K en la región NS3 (si se va a utilizar Simeprevir) y / o la investigación de las variantes asociadas a resistencia en NS5a (en caso de que se pretenda utilizar un inhibidor NS5a), especialmente para el retratamiento de los pacientes que fracasaron a una combinación de AADs que incluía alguno de estos fármacos (AASLD/IDSA., 2015). Otros autores, (Sarrazin et al; Macormick et al; Quer et al) también han informado sobre la frecuencia de errores en el genotipado utilizando ensayos basados en 5'UTR, y sobre la necesidad de orientar y / o añadir otras regiones para el genotipado del VHC.

El ensayo Versant HCV genotipo 2.0 se basa en sondas que, además de la región 5'UTR se dirigen a la región del core del VHC. Con esta estrategia, los errores en la clasificación de genotipo/subtipos se reduce significativamente, en comparación con el ensayo Trugene. Sin embargo, cuando se compara con la secuenciación NS5b todavía hemos detectado una serie de errores de clasificación (hasta 9%), debiéndose , nuevamente, principalmente a errores en la clasificación de subtipos 1b, que fueron reclasificados como 1<sup>a</sup> por la técnica de referencia. Este hecho ha sido comunicado también por otros investigadores: Guelfo et al describen un 11% de los errores de clasificación por Versant HCV 2.0, y de nuevo todo se debe a subtipos 1b que fueron reclasificados (en este caso comparando con secuenciación de la región core) como subtipos 1a. Como se muestra en la figura 1, la región 5'UTR no discrimina adecuadamente los subtipos 1b, ya que hasta en el 20% de los casos estos se reclasifican como subtipos 1a cuando se investiga la región NS5b. Esta puede ser una explicación a por que Versant HCV 2.0, que incluye un fragmento de 5'UTR, comete estos errores en la clasificación de subtipos 1. Aunque otros investigadores han comunicado tasas menores de error que las que nosotros hemos encontrado, la mayoría de los errores, como en nuestro estudio, fueron subtipos 1b que fueron reclasificados posteriormente como 1a (Sarrazin et al). Como en el estudio de Larrat S et al, y en contraste con los de Avo et al, y Quer et al, en nuestro estudio no encontramos muchos indeterminados de genotipo 1 por la prueba de Versant HCV 2.0. Las guías de tratamiento actuales (AASLD/IDSA., 2015) recomiendan tratar todos los resultados indeterminados de genotipo 1 como si fueran subtipos 1a, ya que este subtipo actualmente "más difícil de tratar" que el subtipo 1b., La correcta clasificación estos indeterminados de la técnica de Versant, ayudaría a preservar opciones de tratamiento futuras para estos pacientes. Otro factor que puede explicar los errores de clasificación es la posibilidad de recombinación viral; Hedskog C, et al han comunicado 12 casos de recombinantes que fueron identificados como diferentes subtipos del genotipo 2 utilizando Versant HCV 2.0; estos aislados fueron reclasificados como subtipos 1a o 1b en NS5b, y finalmente fueron clasificados como recombinantes de los subtipos 2 y 1 al realizar la secuenciación completa del genoma de VHC.



El ensayo Abbott RealTime HCV Genotipo II se basa en sondas que, además de la región 5'UTR se dirigen a la región NS5B. Aunque en nuestro estudio no encontramos discordancias importantes para este ensayo, González V et al, describen 29 de 533 (5,4%) casos en los que no pudieron discriminar el subtipo de genotipos 1, (Chevaliez S, 2009). en el 6,1% (González V, 2013) (Benedet M, 2014) en el 10.9%, y (Ceccherini Silberstein F, 2015) en el 4%, (Quer J G. J.-F., 2015) también reportan importantes discordancias en comparación con la secuenciación masiva y la secuenciación poblacional de la región NS5b. En nuestro estudio no se encontró ninguna clasificación errónea para los muestras que no eran genotipo 1, que con el ensayo de Abbott se investigan con sondas dirigidas a la región 5'UTR. En número limitado de casos de genotipos no-1 puede explicar por qué no se encontraron discordancias tampoco para estos genotipos.

Es precisa en la determinación de los subtipos 1a/1b 2a, 2b y 3, pero no tanto en la de los genotipos 4 y 6. Un inconveniente añadido es su alta tasa de resultados indeterminados (alrededor del 6%)<sup>38,39</sup>, que, sin embargo, es comparable con la que se obtiene con TRUGENE® y el INNO-LiPA®.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones. En primer lugar, no todas las muestras fueron analizadas por los tres ensayos comerciales que hemos comparado; hemos tratado de superar esta limitación utilizando un protocolo de amplificación y secuenciación único en los tres laboratorios que hemos participado en el estudio, y realiendo la acreditación inicial de estos con el panel de certificación y control de calidad. En segundo lugar, el tamaño muestral para genotipos no-1 puede ser bajo, y no tener suficiente potencia para emitir conclusiones en el caso de estos genotipos, especialmente para el ensayo de Abbott. En tercer lugar, ya que no se realizó la secuenciación del genoma completo, los fenómenos de recombinación, aunque es un evento raro en el VHC, podrían ser responsables de algunas de las discordancias que hemos encontrado.

A pesar de estas limitaciones, nuestros resultados indican que el ensayo Trugene, sobre todo, y el Versant HCV 2.0, en menor medida, cometen errores al caracterizar los genotipos del VHC, lo que conduce a errores importantes en la práctica clínica para el

uso correcto de los agentes antivirales de acción directa. Debido al elevado coste de la terapia antiviral de HCV, la implementación de las pruebas de referencia para la determinación del genotipo del VHC en los laboratorios de microbiología clínica, basados en la secuenciación Sanger de NS5b, con un relativo bajo coste en comparación con el tratamiento, pueden contribuir a la mejora de los resultados emitidos por los ensayos comerciales, y debe participar en la toma de decisiones para lograr la respuesta viral sostenida en el tratamiento del VHC, y para contribuir a la cura y la erradicación del virus de la hepatitis C.

Como añadidura dentro de la discusión, quisiera mencionar. Además debo añadir que los resultados de este trabajo se han presentado al I CONGRESO NACIONAL DEL GRUPO DE ESTUDIO DE LAS HEPATITIS VÍRICAS GEHEP DE LA SEIMC y recibió el PREMIO A LA MEJOR COMUNICACIÓN (Anexo 1), y en el XVI CONGRESO DE LA SOCIEDAD ANDALUZA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS celebrado en El Toyo (Almería) en Diciembre de 2014 recibió el PREMIO A LA MEJOR COMUNICACIÓN (Anexo 2).

Nuestros estudios han contribuido, en segundo lugar, a facilitar el acceso al correcto uso de Simeprevir, un inhibidor de la proteasa del VHC que en la actualidad se emplea en combinación con Sofosbuvir. Para los pacientes infectados por genotipo 1a, se ha demostrado que existe un polimorfismo en posición 80 (Q80K), con un impacto capital en la tasa de respuesta viral sostenida y de curación. Nuestras aportaciones en este campo han ido dirigidas en dos sentidos: en primer lugar, la gran novedad y originalidad de nuestro estudio ha consistido en desarrollar un ensayo de PCR a tiempo real (alelo específico) que es capaz de discriminar con valores excelentes de sensibilidad, especificidad, y valores predictivos positivos y negativos, la presencia de este polimorfismo. Nuestro ensayo ha demostrado robustez, fiabilidad, reproducibilidad, y facilidad de uso. Frente a la secuenciación poblacional tipo Sanger, este ensayo es fácil de incorporar a la rutina asistencial de los laboratorios de microbiología clínica molecular, por lo que esta determinación puede ser fácilmente incorporada a la cartera de servicios de muchos hospitales. Sin duda alguna, este hecho contribuirá a un mejor uso de Simeprevir, asegurando tasa de respuesta más elevadas y evitando costes innecesarios de reatamientos de pacientes. Como reflejo de la novedad de este desarrollo cabe citar

que el método ha sido protegido y registrado y patentado en la oficina nacional de patentes.(Anexo III)

En segundo lugar, nuestro estudio aporta datos novedosos sobre la prevalencia de este polimorfismo en nuestro medio. Como hemos descrito, la mayor introducción del clado II del genotipo 1a en nuestro entorno, ha condicionado, afortunadamente para nuestros pacientes, una menor prevalencia a la descrita en otras áreas geográficas, como en EEUU (buscar citas) y en Europa (Sarrazin, 2015) ha documentado las siguientes tasas de prevalencia: Polonia un 75%, Alemania un 29%, UK un 22,6%, Italia un 20%, Bélgica un 18%, Austria un 16%, Suiza un 15,2%, Francia un 13,8% o 10.5% (Morel V, 2014), Holanda un 11,5% España un 8,5%, Portugal un 8,1% y Noruega con un 4,8%. (buscar citas y poner datos de Alemania, Francia, reino unido y España-hay un estudio que se presentó en GEHEP Vigo).

# Capítulo 6. Conclusiones

## **CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES**

Existen discordancias mayores y menores entre los diferentes ensayos empleados en el genotipado de VHC, el ensayo Trugene, sobre todo, y el Versant HCV 2.0, en menor medida, pueden fallar para diferenciar genotipos del VHC, especialmente los genotipos 1b, que se reclasifican en hasta un 10-15% de los casos como genotipos 1a.

En base a estas diferencias, en aquellos laboratorios en los que se utilicen estas técnicas creemos que está justificado implementar la secuenciación Sanger de la región NS5B.

Hemos diseñado un ensayo de PCR alelo específica en tiempo real que se puede realizar fácilmente en los laboratorios de microbiología clínica, sin necesidad de realizar técnicas de secuenciación, que permiten detectar con excelentes parámetros de calidad, el polimorfismo Q80K en la proteasa viral de los genotipos 1a del virus de la hepatitis C.

La prevalencia de Q80K es baja en la población de pacientes infectados por VHC genotipo 1a de Andalucía y Levante. El clado II del genotipo 1a predomina en la cohorte de pacientes que hemos analizado. La baja prevalencia de Q80K respecto de otras zonas geográficas, en especial con respecto a los Estados Unidos, puede explicarse por las diferencias en la prevalencia de clados.

# BIBLIOGRAFÍA

1. AASLD/IDSA. (2015). Hepatitis C guidance: AASLD-IDSA 409 recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus. *Hepatology* , 62 (3), 932-954.
2. Abbott, c. (28 de abril de 2014). Abbott Announces Phase 3 Hepatitis C Program Details. *Abbott Laboratories*. Retrieved 28 April 2014. , 1.
3. Acosta-Rivero N, R. A.-G.-C. (2004). Nucleic acid binding properties and intermediates of HCV core protein multimerization in *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res Commun.* , 323, 926–931.
4. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. (2015). *Informe de Posicionamiento Terapéutico de Daclatasvir (Daklinza®)*. Obtenido de Informe de Posicionamiento Terapéutico de Daclatasvir (Daklinza®): <http://asscat-hepatitis.org/wp-content/uploads/IPT-daclatasvir-daklinza1.pdf>
5. Ago H, A. T. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Structure Fold Des.* , 7, 1999;7:1417–1426.
6. Alter, M. (2002). Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology.* , 36, 93–98.
7. Argentini C, G. D. (2009). HCV genetic variability: from quasispecies evolution to genotype classification. *Future Microbiol* , 4, 359–373.
8. Bartenschlager, R. A.-L. (1993). Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J Virol.* , 67, 3835–3844.
9. Bartenschlager, R. (2006). Hepatitis C Virus Molecular Clones: From cDNA to Infectious Virus Particles in Cell Culture. *Current Opinion in Microbiology.* , 9 (4), 416–422.
10. Bartenschlager, R. L. (2000). Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol.* , 81 (Pt 7), 1631-1648.
11. Bartenschlager, R. L. (2000). Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol.* , 81 (Pt 7), 1631-1648.
12. Bartosch B, D. J. (2003). Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med.* , 3 (197(5)), 633-642.

13. Benedet M, A. D. (2014). The need for a sequencing-based assay to supplement the Abbott m2000 RealTime HCV Genotype II assay: a 1 year analysis. *J Clin Virol.* , 60 (3), 301-304.
14. Berg, T. (2008). Tailored Treatment for Hepatitis C. *Clinics in Liver Disease.* , 12 (3), 507–528.
15. Bhattacharya D, A. M. (2011). Naturally occurring genotype 2b/1a hepatitis C virus in the United States. *Virology* , 8, 458.
16. Blight, K. L. (1994). Detection and distribution of hepatitis C-specific antigens in naturally infected liver. 1994. *Hepatology* 20, pág 553-557. . *Hepatology* , 20, 553-557.
17. Boukadida, C. M. (2014). NS2 Proteins of GB Virus B and Hepatitis C Virus Share Common Protease Activities and Membrane Topologies. . *Journal of Virology.* , 88 (13), 7426–7444.
18. Boykinova OB, S. Y. (2009). Epidemiological, immunological and clinical characteristics of acute hepatitis C. *Folia Med (Plovdiv).* , 51 (1), 61-69.
19. Bukh J, P. R. (1992). Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 89 (11), 4942-6.
20. Bukh, J. R. (1995). Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin. Liver Dis.* , 15, 41-63.
21. Cantaloube JF, L. S. (2006). Analysis of the 5' noncoding region versus the NS5b region in genotyping hepatitis C virus isolates from blood donors in France. *J Clin Microbiol* , 44, 2051-6.
22. Cantaloube, J. F. (2006). Analysis of the 5' noncoding region versus the NS5b region in genotyping hepatitis C virus isolates from blood donors in France. *J. Clin. Microbiol.* 44:2051-2056. , 44, 2051-2056.
23. Ceccherini Silberstein F, D. M. (2015). Hepatitis C virus gene sequencing as a tool for precise genotyping in the era of new direct antiviral agents. *Hepatology.* 2015 May 14. doi: 10.1002/hep.27895. [Epub ahead of print]. , 14, [Epub ahead of print].
24. Chen, Z. K. (2002). Hepatitis C virus genotyping: interrogation of the 5' untranslated region cannot accurately distinguish genotypes 1a and 1b. *J. Clin. Microbiol.* 40:3127-3134. . *J. Clin. Microbiol.* , 40, 3127-3134.

25. Chevaliez S, B.-A. M. (2009). Hepatitis C virus (HCV) genotype 1 subtype identification in new HCV drug development and future clinical practice. *PLoS One* 2009; 4, e8209 , 4, e8209.
26. Chinchai, T. J. (2003). Comparative study of different methods to genotype hepatitis C virus type 6 variants. *J. Virol. Methods* 109:195-201. . *J. Virol. Methods.* , 109, 195-201.
27. Choo QL, R. K.-S. (1991). Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. . *Proc Natl Acad Sci U S A* , 88, 2451–2455.
28. Choo, I. (1989). Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood-borne non-A, non-B Viral Hepatitis Genome. *Science* , 244 (4902), 359–362.
29. Choo, Q. e. (1989). Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood-borne non-A, non-B Viral Hepatitis Genome. *Science* , 244 (4902), 359–362.
30. Combet C, G. N. (2007). euHCVdb: the European hepatitis C virus database. *Nucleic Acids Res.* , 35, D363-D366.
31. De Luca, A. D. (2013). Two distinct HCV genotype 1a clades: geographical distribution and association with natural resistance mutations to HCV NS3/4A inhibitors. *Antiviral Ther.* , 18 ((Suppl. 1), A47 (Abstract 39).
32. Domingo E, H. J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* , 51, 151-178.
33. Dustin, L. a. (2007). Flying Under the Radar: The Immunobiology of Hepatitis C. (25), 71-99.
34. EASL, E. A. (2015). EASL Recommendations on Treatment of 406 Hepatitis C 2015. *J Hepatol* , 63 (1), 199-236.
35. Echeverría N, M. G. (2015). Hepatitis C virus genetic variability and evolution. *World J Hepatol.* , 7 (6), 831-845.
36. Esteban JI, S. S. (2008). The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol.* , 48 (1), 148-162.
37. Evans, M. e. (2007). Claudin-1 Is a Hepatitis C Virus Co-receptor Required for a Late Step in Entry. *Nature.* , 446 (7137), 801–805.
38. Flint M, M. J. (2000). The role of the hepatitis C virus glycoproteins in infection. *Rev Med Virol.* , 10, 101–117.



39. Gale MJ Jr, K. M. (1998). Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance. *Clin Diagn Virol.* , 10, 157–162.
40. Gane, E. e. (2013). Nucleotide Polymerase Inhibitor Sofosbuvir Plus Ribavirin for Hepatitis C. *The New England Journal of Medicine.* , 368 (1), 34–44.
41. Gentileemail, I. B. (2015). A pill a day keeps HCV away. *The Lancet Infectious Diseases.* , 15 (6), 616–617.
42. González V, G.-F. M. (2013). Accuracy of a commercially available assay for HCV genotyping and subtyping in the clinical practice. *J Clin Virol.* , 58 (1), 249-253.
43. González-Candelas F, L.-L. F. (2011). Recombination in hepatitis C virus. *Viruses* , 3, 2006-2024.
44. Gower E, E. C.-S. (2014). Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* , 61 (1 Suppl), S45-57.
45. Gretton SN, T. A. (2005). Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci. *J Gen Virol.* , 86, 1415–1421.
46. Guelfo JR, M. J.-T. (2014). Reassessment of genotype 1 hepatitis C virus subtype misclassification by LiPA 2.0: implications for direct-acting antiviral treatment. *J Clin Microbiol.* , 52 (11), 4027-4029.
47. Gwack Y, K. D. (1997). DNA helicase activity of the hepatitis C virus nonstructural protein 3. *Eur J Biochem* , 250, 47–54.
48. Hadziyannis, S. e. (2004). Peginterferon-alpha2a and Ribavirin Combination Therapy in Chronic Hepatitis C: a Randomized Study of Treatment Duration and Ribavirin Dose. *Annals of Internal Medicine.* , 140 (5), 346–355.
49. Han JH, S. V.-O. (1991). Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. *Proc Natl Acad Sci USA.* , 88, 1711-1715.
50. Honda M, P. L. (1996). Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology* , 222, 31-42.

51. Hoshino H, H. K. (2012). Intergenotypic recombinant hepatitis C virus strains in Japan noted by discrepancies between immunoassay and sequencing. *J Med Virol.* , 1024, 1018-1024.
52. Huang, Y. S. (2007). Phosphorylation of hepatitis C virus NS5A nonstructural protein: A new paradigm for phosphorylation-dependent viral RNA replication? *Virology* , 364 (1), 1–9.
53. Idrees, M. R. (2008). Frequency distribution of hepatitis C virus genotypes in different geographical regions of Pakistan and their possible routes of transmission. *BMC Infect Dis.* , 8, 69.
54. Jacobson, I. e. (2011). Telaprevir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Virus Infection. *The New England Journal of Medicine.* , 364 (25), 2405–2416.
55. Ji H, F. C. (2004). Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* , 101, 16990–16995.
56. Jin, Z. L. (2012). Assembly, purification, and pre-steady-state kinetic analysis of active RNA-dependent RNA polymerase elongation complex. *Journal of Biological Chemistry* , 13, 10674–10683.
57. Kageyama S, A. D.-T.-A. (2006). A natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant of hepatitis C virus in the Philippines. *J Med Virol.* , 78, 1423-1428.
58. Kalinina O, N. H. (2002). A natural inter-genotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *J Virol* 2002;76:4034-4043. *J Virol.* , 76, 4034-4043.
59. Kim T, M. R. (1996). Retroviral mutation rates and A-to-G hypermutations during different stages of retroviral replication. *J Virol.* , 70, 7594–7602.
60. Kurbanov F, T. Y. (2010). Molecular epidemiology and Interferon-sensitivity of the natural recombinant hepatitis C virus strain RF1 \_ 2k / 1b. . *J Infect Dis.* , 151, 19-25.
61. Le Guillou-Guillemette H, V. S.-G.-F. (2007). Genetic diversity of the hepatitis C virus: impact and issues in the antiviral therapy. *World J Gastroenterol* , 13 (51), 151-178.
62. Lee YM, L. H. (2010). Molecular epidemiology of HCV genotypes among injection drug users in Taiwan: full-length sequences of two new subtype 6w strains and a recombinant form\_2b6w. *J Med Virol.* , 82, 57-68.

63. Legrand-Abravanel F, C. J.-R.-S. (2007). New natural intergenotypic (2/5) recombinant of hepatitis C virus. *J Virol.* , 81, 4357-4362.
64. Lenz, O. V.-M. (2014). Virology analyses of simeprevir in Phase 2b and 3 studies. . *EASL International Liver Congress 2014.* , Póster 221.
65. Lescar J, R. A. (2001). The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell.* , 105, 137–148.
66. Lin, C. (2006). HCV NS3-4A Serine Protease. Chapter 6. En S. Tan, *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. Norfolk, UK: Horizon Bioscience.
67. Llanes MS, P. N. (2015). Molecular aspects of the antiviral response against hepatitis C virus implicated in vaccines development. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* , 33 (4), 273-280.
68. Lontok E, H. P. (2015). Hepatitis C virus drug resistance-associated substitutions: State of the art summary. *Hepatology.* , 10, Epub ahead of print].
69. Lozach PY, B. L. (2007). The C type lectins DC-SIGN and L-SIGN: receptors for viral glycoproteins. *Methods Mol Biol.* , 379, 51-68.
70. Mandell, D. a. (2010). Principles and Practice of Infectious Diseases. 7<sup>a</sup> ed.
71. Martell M, E. J. (1992). Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol.* , 66, 3225–3229.
72. Mayo MA, F. C. (2003). Taxonomic proposals on the Web: new ICTV consultative procedures. *Arch Virol.* , 148 (3), 609-11.
73. McCloskey, R. L. (2014). Global origin and transmission of hepatitis C virus NS3 Q80K polymorphism. [*Epub ahead of print*].
74. McCormick AL, M. M.-A. (2015). Evaluation of sequencing of HCV core/E1, NS5A and NS5B as a genotype predictive tool in comparison with commercial assays targeting 5'\_UTR. *Journal of Clinical Virology.* , 66, 56–59.
75. McHutchison, J. e. (2009). Peginterferon Alfa-2b or Alfa-2a with Ribavirin for Treatment of Hepatitis C Infection. *The New England Journal of Medicine.* , 361 (6), 580–593.
76. Moradpour, D. P. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nature reviews. Microbiology* , 5 (6), 453–463.

77. Morel V, D. G. (2014). Patients eligible for treatment with simeprevir in a French center. *J Clin Virol*, 61: 149-151 , 61, 149-151.
78. Murphy DG, W. B. (2007). Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. *J Clin Microbiol.* , 45 (4), 1102-1112.
79. Nielsen SU, B. M. (2004). Characterization of the genome and structural proteins of hepatitis C virus resolved from infected human liver. *J Gen Virol.* , 85, 1497–1507.
80. Noppornpanth S, L. T. (2006). Identification of a naturally occurring recombinant genotype 2/6 hepatitis C virus. *J Virol.* , 80, 7569- 7577.
81. Otto GA, P. J. (2004). The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell.* , 119, 369–380.
82. Palanisamy N, D. A. (2013). Implications of baseline polymorphisms for potential resistance to NS3 protease inhibitors in hepatitis C virus genotypes 1a, 2b and 3a. *. Antiviral Research.* , 99, 12-17.
83. Pawlotsky, J. (2006). Therapy of hepatitis C: from empiricism to cure. *Hepatology.* , 43 ((Suppl 1)), S207–S220.
84. Penin, F. e. (2004). Structural Biology of Hepatitis C Virus. *Hepatology* , 39 (1), 5-19.
85. Pickett, B. S. (2011). Evidence for separation of HCV subtype 1a into two distinct clades. *J. Viral. Hepat.* , 18, 608–618.
86. Pileri P, U. Y. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* , 282, 938-941.
87. Piñeiro D, M.-S. E. (2012). RNA structural elements of hepatitis C virus controlling viral RNA translation and the implications for viral pathogenesis. *Viruses* , 4, 2233–2250.
88. Ploss, A. e. (2009). Human Occludin Is a Hepatitis C Virus Entry Factor Required for Infection of Mouse Cells. *Nature.* , 457 (7231), 882–886. .
89. Poordad, F. e. (2011). Boceprevir for Untreated Chronic HCV Genotype 1 Infection. *The New England Journal of Medicine* , 364 (13), 1195–1206.
90. Popescu, C.-I. C. (2011). NS2 Protein of Hepatitis C Virus Interacts with Structural and Non-Structural Proteins towards Virus Assembly. *PLoS Pathogens*, 7(2), e1001278. *PLoS Pathogens.* , 7 (2), e1001278.

91. Quer J, G. J.-F. (2015). High-resolution hepatitis C virus 462 subtyping using NS5B deep sequencing and phylogeny, an alternative to current 463 methods. *J Clin Microbiol.* , 53 (1), 219-226.
92. Quer J, G. J.-F.-d.-P.-C.-t. (2015). High-Resolution Hepatitis C Virus Subtyping Using NS5B Deep Sequencing and Phylogeny, an Alternative to Current Methods. *J Clin Microbiol*, 53: 219-226. , 53, 219-226.
93. Robert P Myers MD MSc, H. S. (2015). An update on the management of chronic hepatitis C: 2015 consensus guidelines from the Canadian Association for the Study of the Liver. *Can J Gastroenterol Hepatol* , In press.
94. Rodriguez-Torres, M. e. (2012). Sofosbuvir (GS-7977) Plus Peginterferon/ribavirin in Treatment-naïve Patients with HCV Genotype 1: A Randomized, 28-day, Dose-ranging Trial. *Journal of Hepatology.* , 58 (4), 663-668.
95. Ross-Thriepand, D. A. (2013). “The C-terminus of NS5A Domain II Is a Key Determinant of Hepatitis C Virus Genome Replication, but Is Not Required for Virion Assembly and Release.”. *The Journal of General Virology.* , 94 (Pt 5), 1009-1018.
96. Santolini E, M. G. (1994). Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol.* , 68, 3631–3641.
97. Sarrazin, C. L. (2015). Prevalence of the hepatitis C virus NS3 polymorphism Q80K in genotype 1 patients in the European region. *Antiviral Research* , 116, 10-16.
98. Scarselli, E. e. (2002). he Human Scavenger Receptor Class B Type I Is a Novel Candidate Receptor for the Hepatitis C Virus. *The EMBO Journal* , 21 (19), 5017–5025.
99. Sherman, K. e. (2011). Response-guided Telaprevir Combination Treatment for Hepatitis C Virus Infection. *The New England Journal of Medicine.* , 365 (11), 1014–1024.
100. Simmonds P, B. J. (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. . *Hepatology* , 43, 962-973.
101. Simmonds P, S. D. (1994). Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol.* , 75, 1053–1061.

102. Simmonds, P. (2004). Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol.* , 85 (pt 11), 3173-88.
103. Simmonds, P. (2001). The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *J Gen Virol* , 82, 693–712.
104. Smith DB, B. J. (2014). Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology.* , 59 (1), 318-327.
105. Soriano, V. P. (2008). Why Are There Different Dynamics in the Selection of Drug Resistance in HIV and Hepatitis B and C Viruses? *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* , 62 (1), 1–4.
106. Stuyver, L. A. (1996). Second-generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. *J. Clin. Microbiol.* , 34, 2259-2266.
107. Sugano, M. Y. (1995). Quantitation of hepatitis C viral RNA in liver and serum samples using competitive polymerase chain reaction. *J.Clin.Pathol* , 48, 820-825. .
108. Sulkowski MS, G. D.-T.-R., & Group., A. S. (2014). Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. *N Engl J Med.* , 370 (3), 211-221.
109. Tai CL, C. W. (1996). The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J Virol.* , 70, 8477–8484.
110. Tamalet, C. P.-D.-M.-3. (2003). Genomic and phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates: a survey of 535 strains circulating in southern France. *J. Med. Virol.* 71:391-398. *J. Med. Virol.* , 71, 391-398.
111. Thurner C, W. C. (2004). Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. *J Gen Virol* , 85, 1113–1124.
112. Tong, Y.-Q. L.-Y. (2015). Accurate genotyping of hepatitis C virus through nucleotide sequencing and identification of new HCV subtypes in China population. . *Clinical Microbiology and Infection.* , 21 (9), 874.e9–874.e21.
113. Vanesa Madan, R. B. (2015). Structural and Functional Properties of the Hepatitis C Virus p7 Viroprotein. *Viruses.* , 7 (8), 4461–4481.
114. Vermehren J, S. C. (2011). New HCV therapies on the horizon. *Clin Microbiol Infect.* , 17, 122-134.

115. Wakita T, P. T. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med.* , 11, 791–796.
116. Wang C, L. S. (1995). An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. *RNA* , 1, 526-537.
117. Webster, D. P. (2015). Hepatitis C. *The Lancet.* , 385 (9973), 1124 - 1135.
118. Weck, Z. C. (2002). Hepatitis C Virus Genotyping: Interrogation of the 5' Untranslated Region Cannot Accurately Distinguish Genotypes 1a and 1b. *J. Clin. Microbiol* , 40 (9), 3127-3134.
119. Weiner AJ, C. C. (1991). Sequence variation in hepatitis C viral isolates. *J Hepatol.* , 13 ((Suppl 4)), S6-14.
120. Wyles D, e. a. (2015). Abstract 235 AADSL 2014. *Hepatology* .
121. Yan Y, L. Y. (1998). Complex of NS3 protease and NS4A peptide of BK strain hepatitis C virus: a 2.2 Å resolution structure in a hexagonal crystal form. *Protein Sci.* , 7, 837–847.
122. Yi M, L. S. (2003). 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J Virol* , 77, 3557-3568.
123. Yokoyama K, T. M. (2011). Identification and characterization of a natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant hepatitis C virus in Japan. *Arch Virol.* , 156, 1591-1601.
124. Yusim K, R. R. (2005). Los alamos hepatitis C immunology database. *Appl Bioinformatics.* , 4, 217-225.
125. Zein, N. (2000). Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* , 13 (2000), 223–235.
126. Zeuzem, S. e. (2011). Telaprevir for Retreatment of HCV Infection. *The New England Journal of Medicine* , 364 (25), 2417–2428.
127. Zibert A, K. W. (1997). Epitope mapping of antibodies directed against hypervariable region 1 in acute selflimiting and chronic infections due to hepatitis C virus. *J Virol.* , 71, 4123–4127. .

# ANEXO I

PREMIO A LA MEJOR COMUNICACIÓN del I CONGRESO NACIONAL DEL GRUPO  
DE ESTUDIO DE LAS HEPATITIS VÍRICAS GEHEP DE LA SEIMC





## **PREMIO A LA MEJOR COMUNICACIÓN**

El presidente del Comité Organizador del I Congreso Nacional del Grupo de Estudio de las Hepatitis Víricas (GEHEP) de la SEIMC

**CERTIFICA QUE LA COMUNICACIÓN CON TÍTULO Y AUTORES:**

**Cod. OR-09. Using NS5b sequencing for Hepatitis C Virus Genotyping reveals discordances with commercial platforms. The GEHEP-007 study.**

Natalia Chueca (1), Ignacio Rivadulla (2), Ruben Lovatti (3), Marta Álvarez (1), Miriam Fernández-Alonso (4), Ana Blanco (5), Laura Cardeñoso (5), Gabriel Reina (4), Antonio Aguilera (2), Juan Carlos Galán (3), Federico García (1).

(1) Complejo Hospitalario Universitario de Granada, Granada; (2) Complejo Hospitalario Universitario Santiago, Santiago de Compostela; (3) Hospital Ramón y Cajal, Madrid; (4) Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona; (5) Hospital La Princesa, Madrid.

Presentada en el I Congreso Nacional del Grupo de Estudio de las Hepatitis Víricas (GEHEP) de la SEIMC, celebrado en Vigo del 24 al 26 de septiembre de 2015 ha recibido el **PREMIO A LA MEJOR COMUNICACIÓN**.

Y para que conste se expide el presente certificado en Vigo, a 26 de septiembre de 2015.



**Dr. Luis E. Morano**  
Presidente del Comité Organizador

# **ANEXO II**

PREMIO A LA MEJOR COMUNICACIÓN del XVI CONGRESO DE LA SOCIEDAD  
ANDALUZA DE ENFERMEDADS INFECCIOSAS



**XVI Congreso**  
de la Sociedad Andaluza  
de Enfermedades Infecciosas  
**El Toyo-Almería**  
11 al 16 de diciembre de 2014



Sociedad Andaluza de  
Enfermedades Infecciosas

## PREMIO A LA MEJOR COMUNICACIÓN

El Comité Organizador del XVI Congreso de la Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas ha otorgado el Premio a la mejor Comunicación al trabajo titulado:

### *¿Identifican los métodos comerciales correctamente el genotipo del virus de la hepatitis C?*

Realizado por los siguientes autores:

**N. Chueca, J.A. Fernández-Caballero, M. Álvarez, J.A. Sánchez, M.D. Mérida, J. López-Bueno y F. García**

Ana Belén Lozano Serrano  
Presidenta del Comité Organizador

Antonio Rivero Román  
Presidente del Comité Científico

# **ANEXO III**

JUSTIFICANTE PRESENTACION ELECTRONICA DE SOLICITUD DE PATENTE



**MINISTERIO  
DE INDUSTRIA, ENERGIA  
Y TURISMO**



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

## Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201530734	
Fecha de recepción:	27 mayo 2015, 13:12 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	P12129ES00	
Solicitante:	SERVICIO ANDALUZ DE SALUD	
Número de solicitantes:	1	
País:	ES	
Título:	Método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento antiviral de pacientes con hepatitis C	
Documentos enviados:	Descripcion.pdf (21 p.) Reivindicaciones.pdf (2 p.) Dibujos.pdf (5 p.) Resumen.pdf (1 p.) OLF-ARCHIVE.zip SEQLPDF.pdf (4 p.) SEQLTXT.txt	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=NOMBRE ARIAS SANZ JUAN - NIF 00809834G,OU=500050022,OU=FNMT Clase 2 CA,O=FNMT,C=ES	
Fecha y hora de recepción:	27 mayo 2015, 13:12 (CEST)	
Codificación del envío:	88:3C:D6:AA:F4:25:F0:01:22:8E:6B:2D:D2:5C:E4:B6:49:97:87:CD	

---

ADVERTENCIA: POR DISPOSICIÓN LEGAL LOS DATOS CONTENIDOS EN ESTA SOLICITUD PODRÁN SER PUBLICADOS EN EL BOLETÍN OFICIAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL E INSCRITOS EN EL REGISTRO DE PATENTES DE LA OEPM, SIENDO AMBAS BASES DE DATOS DE CARÁCTER PÚBLICO Y ACCESIBLES VÍA REDES MUNDIALES DE INFORMÁTICA.  
Para cualquier aclaración puede contactar con la O.E.P.M.

*/Madrid, Oficina Receptora/*



(1) MODALIDAD:	<b>PATENTE DE INVENCION</b> <b>MODELO DE UTILIDAD</b>	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(2) TIPO DE SOLICITUD:	PRIMERA PRESENTACIÓN ADICIÓN A LA PATENTE EUROPEA ADICIÓN A LA PATENTE ESPAÑOLA SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:	MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:	
4) LUGAR DE PRESENTACIÓN:		OEPM, Presentación Electrónica
(5-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACIÓN SOCIAL: UNIVERSIDAD PÚBLICA  NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE: CNAE: PYME:  DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO:  MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO: INVENCIÓN LABORAL: CONTRATO: SUCESIÓN:  PORCENTAJE DE TITULARIDAD:	SERVICIO ANDALUZ DE SALUD <input type="checkbox"/>  España ES Q9150013B  Avda. de la Constitución, 18 Sevilla 41 Sevilla 41071 España ES  <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>  100,00 %
(6-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE:	GARCÍA GARCÍA Federico España ES 28711062-R
(6-2) INVENTOR 2:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE:	CHUECA PORCUNA Natalia España ES 11803902-A
(6-3) INVENTOR 3:	APELLIDOS:	SÁNCHEZ ÁLVAREZ

	NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE:	Antonio España ES 24251947-B
(7) TÍTULO DE LA INVENCIÓN:		Método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento antiviral de pacientes con hepatitis C
(8) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(9) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACCELERADO DE CONCESIÓN	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(10) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(11) DEPÓSITO:	REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO: NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):	
(12) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS:	LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD LA LISTA DE SECUENCIAS EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS	<input checked="" type="checkbox"/>
(13) EXPOSICIONES OFICIALES:	LUGAR: FECHA:	
(14) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	PAÍS DE ORIGEN: CÓDIGO PAÍS: NÚMERO: FECHA:	
(15) AGENTE DE PROPIEDAD INDUSTRIAL:	APELLIDOS: NOMBRE: CÓDIGO DE AGENTE: NÚMERO DE PODER:	ARIAS SANZ JUAN 0958/X
(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:	DESCRIPCIÓN: REIVINDICACIONES: DIBUJOS: RESUMEN: FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: ARCHIVO DE PRECONVERSION: DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: LISTA DE SECUENCIAS PDF: ARCHIVO PARA LA BUSQUEDA DE LS: OTROS (Aparecerán detallados):	<input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 21 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de reivindicaciones: 12 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de dibujos: 5 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 <input type="checkbox"/> N.º de figura(s): <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 4 <input checked="" type="checkbox"/>
(17) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASA PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES, DECLARA: BAJO JURAMIENTO O PROMESA SER CIERTOS TODOS LOS DATOS QUE FIGURAN EN LA DOCUMENTACIÓN ADJUNTA:	DOC COPIA DNI: DOC COPIA DECLARACIÓN DE CARENCIA DE MEDIOS:	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:



<p style="text-align: center;">DOC COPIA CERTIFICACIÓN DE HABERES:  DOC COPIA ÚLTIMA DECLARACIÓN DE LA RENTA:  DOC COPIA LIBRO DE FAMILIA:  DOC COPIA OTROS:</p>	<p>[ ] N.º de páginas:  [ ] N.º de páginas:  [ ] N.º de páginas:  [ ] N.º de páginas:</p>
(18) NOTAS:	
(19) FIRMA:	<p style="text-align: center;">FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE:</p> <p style="text-align: center;">LUGAR DE FIRMA:</p> <p style="text-align: center;">FECHA DE FIRMA:</p>

ES, FNMT, NOMBRE ARIAS  
SANZ JUAN - NIF  
00809834G  
Madrid  
27 Mayo 2015



<b>OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS</b>		
<b>Hoja informativa sobre pago de tasas de una solicitud de patente o modelo de utilidad</b>		
<b>1. REFERENCIA DE SOLICITUD</b>	<b>P12129ES00</b>	
<b>2. TASAS</b>	<b>Importe (en euros)</b>	
<b>Concepto</b>	<b>Código de barras asignado</b>	<b>Importe</b>
IE01 Solicitud de demanda de depósito o de rehabilitación.	85017197640	63,68
IE02 Solicitud de cambio de modalidad en la protección		0,00
IE04 Petición IET		0,00
IE06 Prioridad extranjera (0)		0,00
El solicitante se acoge a la exención del pago de tasas	<input type="checkbox"/>	
El solicitante es una Universidad pública	<input type="checkbox"/>	
	<b>Importe total</b>	63,68
	<b>Importe abonado</b>	63,68

Se ha aplicado el 15% de descuento sobre la tasa de solicitud de acuerdo con la D. Adic. 8.2 Ley de Marcas.