



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

“Mutaciones asociadas a la resistencia del virus de la hepatitis C frente a los nuevos tratamientos”

“Resistance mutations associated with new direct-acting antiviral drugs against hepatitis C virus”

Autor: Dña. Eva Orviz García

Director/es: D. Jesús Agüero Balbín

Santander, Junio 2015

INDICE:

1. Resumen
2. El virus de la hepatitis C: Descubrimiento y descripción
3. Epidemiología
4. Transmisión
5. Diagnóstico
6. Tratamiento del VHC: Del interferón a los nuevos fármacos de acción directa
 - A. Terapia convencional
 - Los comienzos con interferón
 - Terapia combinada: Utilización de la ribavirina
 - Polimorfismo IL-28B
 - B. Primeros antivirales de acción directa
 - Inhibidores de la proteasa de primera generación
 - C. Nuevos tratamientos
 - Inhibidores de la proteasa de segunda generación
 - Inhibidores de la polimerasa
 - Inhibidores de la NS5A
 - Combinaciones farmacológicas
7. Mutaciones de resistencia frente a los antivirales de acción directa
 - Mutación Q80K
 - Otras mutaciones
 - Fracaso terapéutico
8. El futuro: La secuenciación masiva
9. Conclusiones
10. Trabajo experimental: Detección de la mutación Q80K en muestras clínicas del HUMV
11. Bibliografía
12. Agradecimientos

1. RESUMEN:

En los últimos años, el tratamiento de la hepatitis C ha experimentado un cambio histórico que se traduce en una modificación del abordaje terapéutico de los pacientes infectados por este virus. Sin embargo, la aparición de nuevos fármacos de acción directa contra el virus de la hepatitis C puede generar nuevas mutaciones de resistencia no conocidas hasta ahora, haciendo que su eficacia se reduzca y aumente el fracaso terapéutico. El objetivo de este trabajo ha sido profundizar en aquellos estudios que han abordado la investigación de las mutaciones frente a los nuevos fármacos contra el virus de la hepatitis C, tanto en forma de variantes genéticas que confieren resistencia previa al tratamiento, como en la generación de nuevas mutaciones durante la terapia. Este hecho puede ser fundamental a la hora de elegir la terapia antiviral y, gracias a nuevas técnicas de secuenciación masiva del genoma del virus, podremos conocerlas en profundidad próximamente.

Palabras clave: Mutaciones, resistencia, antivirales de acción directa, hepatitis C, secuenciación masiva.

ABSTRACT:

In recent years, treatment for hepatitis C virus has changed completely due to developing new direct-acting antiviral drugs. The prospective approach of patients with this infection is now different. Nevertheless, the emergence of new drugs may lead to the appearance of unknown resistance mutations that may produce a decrease of efficacy and an increase of the cases with treatment failure. The aim of this paper is to summarize and bring together the results of different studies related to the investigation of appearance of resistance amino acid variants before and/or during treatment with new antivirals. This can be essential when choosing the antiviral therapy and, thanks to new next-generation sequencing techniques of virus genome, we would know them in depth soon.

Key words: mutations, resistance, direct-acting antivirals, hepatitis c virus, next-generation methods.

2. EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

En el año 1980 ya se habían descubierto los virus de la hepatitis A y B, pero varios investigadores observaron que en pacientes hemofílicos que habían sufrido transfusiones sanguíneas seguía habiendo un número importante de casos de hepatitis crónicas, que no eran causadas por ninguno de los virus conocidos hasta el momento, denominándose a este nuevo virus no A, no B (NANB)

En 1987, un fragmento del genoma de estos virus NANB fue identificado en sangre de pacientes trasfundidos. Sin embargo, no fue hasta dos años después, en el año 1989, cuando se hizo pública la detección, aislamiento y clonación del genoma completo y las proteínas del virus NANB, al que se denominó virus de la hepatitis C (VHC). Los investigadores a los que se les atribuye dicho descubrimiento son Qui-Lim Choo, George Kuo, Amy J. Weiner, Lacy R.

Overby, Daniel W. Bradley y Michael Houghton que trabajaban en aquellos años para la corporación estadounidense Chiron (1).

El VHC es un virus RNA de cadena única cubierto por una cápside icosaédrica que se denomina *core*, y rodeado de una envoltura proteica. Posee un tamaño entre 50 y 80 nm de diámetro, y pertenece a la familia de los *Flaviviridae*.

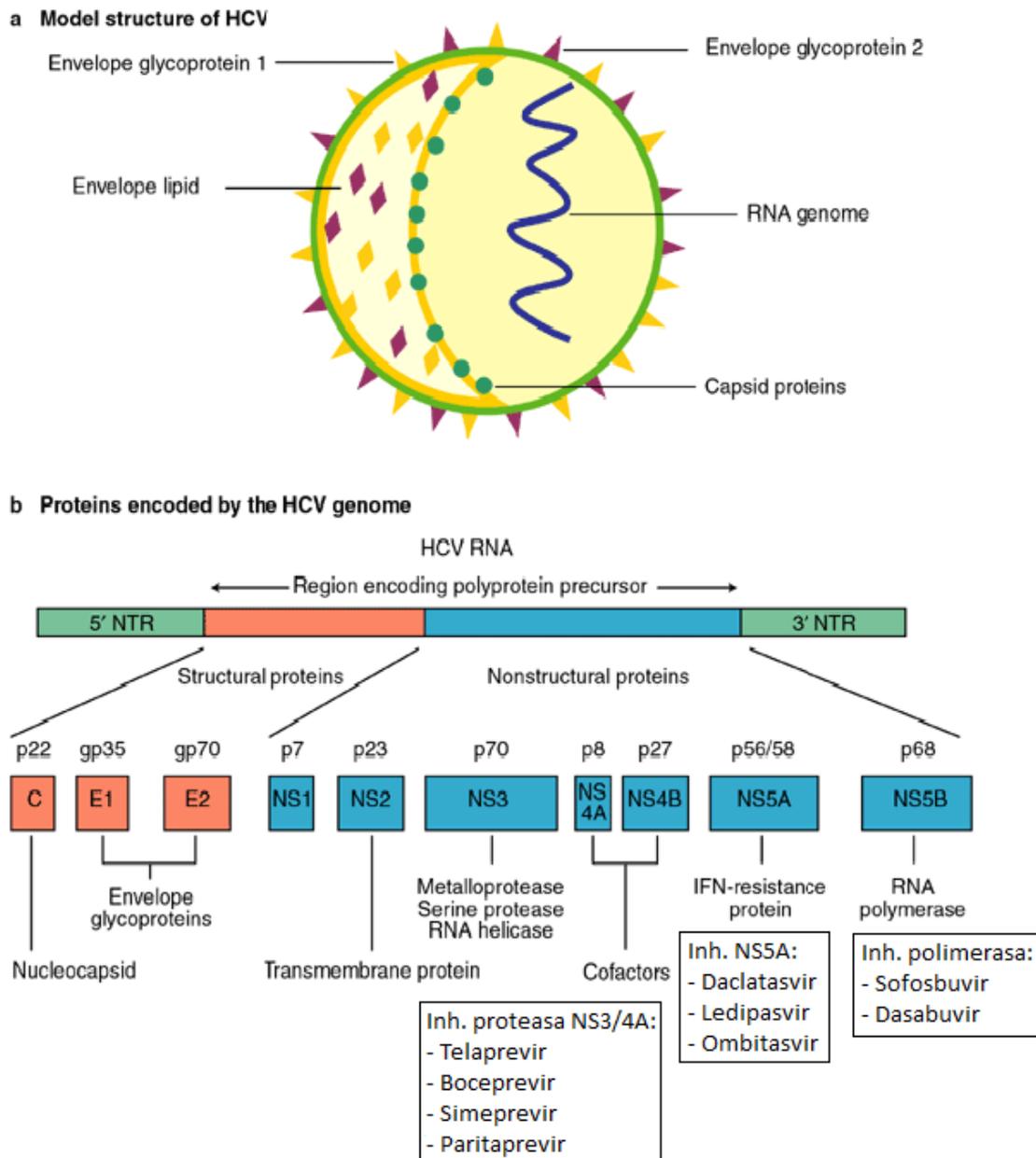
La cadena única de RNA del genoma del VHC tiene una polaridad positiva. Está constituida por algo menos de 10.000 bases y tiene un único punto de inicio de lectura que codifica una poliproteína de aproximadamente 3.000 aminoácidos. A los lados de este único marco de lectura se encuentran unas regiones que no se traducen en proteínas en sí mismas (regiones no codificantes), pero que están altamente conservadas en todos los genotipos del virus. Estas regiones se llaman 3'-UTR y 5'-UTR, siendo la última la más conservada (se ha observado que aproximadamente el 98% de todos los genomas de VHC aislados tienen la misma estructura 5'-UTR). Esto es así porque su función fundamental es la de conseguir la unión del RNA viral a los ribosomas de las células hospedadoras, sin lo cual el virus no podría realizar la traducción o síntesis de proteínas.

El material genético codificante del virus está formado por dos regiones:

- Una región está más cercana al extremo 5' que codifica las proteínas estructurales del virus (región estructural). Estas regiones son la zona C que dará lugar a la proteína p21 de la cápside y las zonas E1 y E2 que darán lugar a las proteínas gp31 y gp70 que formarán la envoltura del virus.
- La segunda región da lugar a las proteínas no estructurales (región no estructural), que se encuentra más cercanas al extremo 3'. En esta región está el RNA a partir del cual se generará un conjunto de enzimas con acción proteasa, helicasa, RNA polimerasa. Es importante destacar las regiones NS3/NS4A, NS5B y NS5A, que codifican la proteasa, polimerasa y una fosfoproteína, respectivamente, ya que son las dianas para los nuevos tratamientos directos frente a virus (ver más adelante).

La región C, que da lugar a la p21 que forma la cápside del virus, es la región más conservada en todas las cuasiespecies de VHC, mientras que la E2 es muy variable. A esta región se le conoce como "zona hipervariable del virus" (HVR1) de manera que es fundamental para escapar a los mecanismos de inmunidad del huésped y crear infecciones crónicas. Además, esta secuencia parece estar implicada en la resistencia al tratamiento con interferón (ver más adelante).

Figura 1. Estructura y genoma del VHC junto a nuevos fármacos de acción directa y sus dianas terapéuticas



(Modificado de: Expert Reviews in Molecular Medicine 2003. Cambridge University Press)

Existen 7 genotipos reconocidos de VHC, numerados del 1 al 7, con una similitud entre ellos del 65% (se diferencian entre sí en más del 30% de su genoma). Estos genotipos, a su vez, se subdividen en subtipos, los cuales se diferencian con una letra minúscula. Se conocen un total de 67 subtipos con una diferencia entre ellos de un 15-30% (2)

Una de las características más destacables del virus es su capacidad de persistir en el interior del huésped, incluso cuando este tiene intacta su inmunidad humoral y celular. Esto se debe fundamentalmente a su elevada tasa de mutaciones por la baja fidelidad que posee

su RNA-polimerasa, y es la causa fundamental de la resistencia al tratamiento farmacológico, así como de la dificultad para generar nuevos fármacos contra él.

Otra característica del virus es su capacidad de replicarse rápidamente con una producción de viriones a un ritmo de 10^{12} viriones/día, siendo la vida media en sangre de cada virión de 2,7 horas. Esta capacidad de replicación a una tasa tan rápida, es incluso mayor que la que tiene el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

En base a estas dos características reseñadas, se considera que cada individuo está infectado por una población de variantes genéticas heterogéneas, pero muy relacionadas entre sí (cuasiespecies) con una homología superior al 98%, y que son las responsables de la variabilidad intragenoma.

Por otra parte, la coinfección con dos o más cepas de VHC con diferentes genotipos o subtipos es un reciente hallazgo en ciertas poblaciones de alto riesgo. En diversos estudios se ha observado que en adictos a drogas por vía parenteral (ADVP) y en hombres homosexuales existen infecciones mixtas en hasta el 25-39% de los casos nuevos detectados (3).

La investigación en el desarrollo de nuevos fármacos frente al VHC no solo ha tenido que superar la alta variabilidad genética que presenta, sino también las dificultades técnicas derivadas del hecho de que el virus no puede multiplicarse en cultivos celulares. El único animal de experimentación útil para la investigación del VHC es el chimpancé. La identificación en 1989 y la invención de un cribado en sangre para el virus no habrían sido posibles sin la existencia de este modelo animal. Actualmente es el único modelo sobre el que se está estudiando la posibilidad de crear una vacuna contra el virus, y aunque esto ha generado debate respecto a la ética del uso de estos mamíferos con este fin, actualmente son la principal fuente de investigación abierta.

3. EPIDEMIOLOGÍA DEL VHC

El VHC es el principal causante de enfermedad hepática en el mundo. Se estima que el 3% de la población mundial está infectada, lo que representa entre 130 y 150 millones de personas en todo el mundo. La incidencia se estima en 3 millones de casos nuevos al año, con una mortalidad anual de 500.000 personas (WHO 2014). La mayoría de infectados está en Asia y África, donde el acceso a nuevos fármacos y a las pruebas de diagnóstico y control son muy limitadas como consecuencia de su coste.

En la Unión Europea están documentados 3,5 millones de casos, con un total de 150.000 casos nuevos cada año, siendo la prevalencia mayor en el sur y el este del continente. En realidad, se cree que el número real de afectados está entre 7 y 8 millones de personas en Europa, habiéndose duplicado desde la última estimación realizada en 1997. Esto es así, porque uno de los grandes problemas es que muchos de los infectados desconocen que son portadores crónicos del virus durante años.

En España se estima que existen 900.000 enfermos de hepatitis C, lo que supone un 2% de la población, con una mortalidad de 3.000-5.000 al año. Sin embargo, se calcula que el

70% de la población desconoce que está infectada. Este hecho ha motivado, entre otros, que los especialistas hayan reclamado un Plan Nacional para conocer cuál es el estado real de esta infección en nuestro país.

La historia natural de la infección es bien conocida. Entre el 70-80% de las personas que padecen una hepatitis aguda por el VHC desarrollará de forma crónica una infección por este patógeno. La mayoría de las hepatitis agudas son asintomáticas, lo que dificulta su diagnóstico precoz y favorece la cronicidad de la enfermedad. De todos los portadores crónicos de VHC si no se realizara ningún tratamiento, en torno al 25% pasarían a desarrollar una cirrosis hepática después de una media de unos 20-25 años.

La mortalidad de los pacientes con cirrosis hepática producida por el VHC es de 3% cada año, debido a complicaciones de la insuficiencia hepática o por la aparición de tumoraciones sobre el hígado cirrótico, especialmente hepatocarcinomas, visibles en el 2% de los pacientes infectados. El VHC es la segunda causa de cáncer hepático en el mundo.

En los países desarrollados, la cirrosis hepática terminal producida por VHC es la primera causa de trasplante de hígado. Se trata, por tanto, de una gran causa de demanda de asistencia sanitaria y de un gran coste económico en nuestro medio.

El VHC es un problema global que se extiende, como hemos apuntado, a toda la población mundial. Es importante destacar que, si bien todos los genotipos están dispersos por los diferentes continentes, existe una clara distribución geográfica de los mismos. Los genotipos 1a, 1b, 2a, 2b y 3a están presentes en el 90% de las infecciones en Europa, América, Rusia, China, Japón, Nueva Zelanda y Australia. Los genotipos 3 y 4 son predominantes en Europa y América, mientras que el resto de genotipos están presentes fundamentalmente en África y Asia. Se estima que el genotipo 1 es el más extendido en todo el mundo, siendo el subtipo 1b es más frecuente en Europa y el 1a el más frecuente en Estados Unidos. Respecto a Europa, los genotipos 5 y 6 son muy raros y el genotipo 2 es típico de la zona mediterránea.

Por otro lado, el genotipo 7 ha sido recientemente descrito en África central (4) y aunque ha sido identificado en pacientes en Bélgica y Canadá, se estima que fueron casos importados de África Central.

En España se estima que los genotipos 1b, 1a, 3 y 4 son los más extendidos, por ese orden.

Es básico resaltar que los diferentes genotipos tienen distintas respuestas al tratamiento. Así, el genotipo 1 tiene peor respuesta a fármacos que los demás y, lamentablemente, en España entre el 80 y el 90% de las infecciones son producidas por este genotipo. Las infecciones por genotipo 4 y 5 también son complejas de tratar. En cambio, los genotipos 2 y 3 cuentan con mejores respuestas farmacológicas, siendo los genotipos que más frecuentemente se han encontrado en ADVP.

De esta forma, la determinación del genotipo en un paciente es clave para el tratamiento de su infección. Es fundamental conocer el genotipo de cada paciente de cara a la planificación del tratamiento con las diferentes armas terapéuticas existentes hasta el

momento, incluso, la determinación del genotipo es básica para conocer las resistencias que este puede presentar frente a uno u otro fármaco.

4. TRANSMISIÓN DEL VHC

Existen diferentes vías de transmisión del virus. El mecanismo fundamental de transmisión es la vía hemática, siendo grupos de riesgo los pacientes politrasfundidos (hemofílicos, talasémicos, etc.), pacientes trasplantados y ADVP. Menos frecuente es el pinchazo accidental que pueden sufrir los trabajadores sanitarios y otros grupos de riesgo en contacto con pacientes VHC positivos, con un riesgo aproximado del 1,8%.

Otra vía de transmisión es la vertical o perinatal, aunque, a diferencia del virus de la hepatitis B (VHB), es poco frecuente. Se cree que el 5% de los hijos nacidos de madre portadora adquieren la infección. El riesgo aumenta si la concentración de virus en sangre es mayor de 10^6 copias/ml y en madres coinfectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La lactancia materna, en cambio, no está contraindicada y tampoco está indicada una cesárea electiva.

Otra vía de transmisión a tener en cuenta es la vía sexual y los contactos familiares. Sin embargo, y a diferencia de otros virus, como el VHB, el VHC tiene una transmisión sexual muy poco eficiente.

En resumen, como vías de transmisión del virus predomina fundamentalmente la transmisión por exposición percutánea a sangre y hemoderivados, siendo la vía sexual y la vía vertical más raros y peor determinados.

Hay que tener en cuenta que hasta los años 90 las transfusiones de sangre conllevaban un alto riesgo de infección por VHC, ya que no se hacía cribado del mismo en la sangre de los donantes. Además, en la misma época era muy habitual, más que hoy en día, la población ADVP, que suponía una importante fuente de transmisión del virus. Ambas causas se consideran responsables de aproximadamente el 70% de los casos de VHC conocidos en países desarrollados. Se estima que tras la introducción del cribado en la sangre en los donantes de EEUU, se redujo el porcentaje de hepatitis postransfusional de un 4% en 1989 a casi un 0% en 2000.

Con el cribado de VHC en sangre por métodos de inmunoanálisis enzimáticos y detección de RNA viral, se ha conseguido prácticamente erradicar cualquier tipo de transmisión del virus por transfusión. Esta práctica es obligatoria en España desde 1990.

De manera menos común, se ha relacionado el uso de material médico y quirúrgico no esterilizado como método de contagio del VHC. Hoy en día esto solo ocurre en lugares en los que no se esterilizan propiamente los materiales o no se desechan los utensilios que no puedan tener un segundo uso, como lugares no autorizados para la realización de tatuajes e intervenciones médico-quirúrgicas, así como en países con un sistema nacional de salud precario.

Por último, se calcula que hasta un 40% de la transmisión del VHC es de origen desconocido, de los que gran parte podrían ser intrahospitalarios.

5. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR EL VHC

El diagnóstico de una hepatitis aguda por VHC se lleva a cabo mediante la detección de anticuerpos anti-VHC por inmunoanálisis, y en algunos casos dudosos, confirmación por técnicas de immunoblotting. En la gran mayoría de los casos, los pacientes con hepatitis aguda de reciente aparición o en pacientes inmunodeprimidos estas detecciones pueden ser falsamente negativas, por lo que la detección del RNA viral puede ser de mucha ayuda. No todos los pacientes en fase aguda tendrán anticuerpos contra el virus, pero la sospecha clínica junto con síntomas y signos de hepatitis aguda, como el aumento de la ALT diez veces por encima de su valor normal o la ictericia en ausencia de enfermedad hepática conocida, deben ponernos bajo la sospecha.

La fase crónica de la enfermedad es determinada por anticuerpos anti-VHC y la detección de RNA viral, con la coexistencia de signos histológicos de hepatopatía crónica. La cuantificación del virus (determinación de la carga viral) es fundamental para evaluar la evolución de la infección y la respuesta al tratamiento.

6. TRATAMIENTO DEL VHC: DEL INTERFERON A LOS NUEVOS FÁRMACOS DE ACCIÓN DIRECTA

A. TERAPIA CONVENCIONAL:

Hasta el año 2011, el tratamiento estándar del VHC era la combinación de interferón pegilado y ribavirina. Es a partir de este año cuando aparecen nuevos fármacos de acción directa frente al virus que suponen un antes y un después en la historia de la enfermedad.

- Los comienzos con interferón:

El interferón (INF) lo constituyen una serie de proteínas, del grupo de las citoquinas, que son producidas en las células del huésped en respuesta a una infección viral u otro tipo de agente, y fue el primer fármaco utilizado para el tratamiento de la hepatitis C. De forma natural produce un aumento de la inmunidad viral del organismo infectado de manera que, cuando lo utilizamos de forma exógena, se espera aumentar aún más esta respuesta.

Tiene dos efectos fundamentales que justifican su utilización. Por un lado, actúa directamente sobre la respuesta inmunológica del huésped, induciendo la síntesis de proteínas y citoquinas que producen un estado antiviral. Por otro, produce un efecto indirecto mediante el cual se activan los complejos HLA1 en las células presentadoras de antígeno, favoreciendo la destrucción de las células infectadas por los linfocitos T citotóxicos.

En su aplicación para el tratamiento de la infección por el VHC, en un principio se precisaba una inyección diaria de INF. Con el tiempo, se descubrió que al unirle una molécula de polietilenglicol y convertirlo en interferón pegilado (PEG-INF) se producía una reducción de su eliminación renal y hepática, haciendo posible la administración semanal del tratamiento. Esto aumentaba directamente la respuesta viral mantenida (*sustained viral response*, SVR) en comparación con la molécula no pegilada, ya que el fármaco hacía efecto durante un intervalo de tiempo mayor.

Pero el INF, a pesar de ser la única herramienta terapéutica para la enfermedad, suponía un gran desafío. Era necesario interrumpirlo en muchos pacientes debido a la elevada incidencia y gravedad de sus efectos secundarios, acentuados por la larga duración del tratamiento. Problemas psiquiátricos como el insomnio, la agresividad o la depresión; síntomas gripales como cansancio y dolores articulares; náuseas, vómitos, fiebre y citopenias obligaban a monitorizar periódicamente a los pacientes sometidos a tratamiento.

- **Terapia combinada. Utilización de la ribavirina:**

En 1998, la ribavirina (RBV) se aprobó por la FDA para su administración en el tratamiento de la hepatitis C, en combinación con PEG-INF. Se administra por vía oral y su mecanismo de acción, a día de hoy, no está aclarado, aunque existen varias hipótesis sobre su acción en la modulación del sistema inmunitario del hospedador.

Hay diferentes parámetros clínicos y analíticos que modifican la respuesta al tratamiento con PEG-INF/RBV. La co-infección con VIH puede ser un factor de mayor tasa de fracaso terapéutico. Sin embargo, en ADVP no se han observado diferencias respecto a la población no ADVP. En diversos estudios se observó que la aparición de citopenias es más elevada en pacientes con cirrosis hepática que en pacientes no cirróticos.

La gran desventaja del tratamiento con PEG-INF/RBV es que solamente un 45% de los pacientes genotipo 1 "naive" (no tratados previamente) consiguen una SVR. Es importante recordar en este punto que en torno al 80% de los pacientes infectados con el VHC en nuestro medio pertenecen a este genotipo. En cambio, en los genotipos 2 y 3, el porcentaje de éxito terapéutico asciende hasta un 75% (5-6).

Otra limitación del tratamiento son los graves y frecuentes efectos secundarios que produce, que se hacen aún más persistentes si tenemos en cuenta que la duración del mismo puede oscilar entre 12 y 24 semanas, según la respuesta, de forma que se considera un tratamiento de larga duración. Los efectos secundarios fundamentales del tratamiento con RBV son la anemia y la hemólisis. Cabe destacar su efecto teratogénico, con lo que no se recomienda su uso tanto en mujeres embarazadas como en sus parejas sexuales.

Por otra parte, con PEG-INF/RBV se ha descrito que una elevada proporción de pacientes tratados presentan una respuesta transitoria (con una recaída posterior), o ausencia de respuesta. Aun existiendo la posibilidad de tratar nuevamente a los pacientes con un primer fracaso en el tratamiento con PEG-INF/RBV, diversos metaanálisis han demostrado que en estos casos solo se consigue hasta un 16% de SVR.

Todas estas observaciones motivaron la búsqueda de nuevos fármacos para mejorar la tasa de SVR y conseguir un tratamiento libre de INF. A pesar de ello, y tras el

descubrimiento de nuevas armas terapéuticas, el uso de PEG-INF/RBV ha continuado siendo un pilar básico para evitar la aparición de resistencias (ver más adelante).

- **Polimorfismo en el gen de IL-28B:**

Existen algunos aspectos que afectan la respuesta al tratamiento convencional con PEG-INF. Además de la diferente eficacia en relación con el genotipo, otros factores como una elevada carga viral al comienzo del tratamiento, el grado de fibrosis hepática, la edad avanzada, el sexo, el número de cuasiespecies presentes al iniciar la terapia, la historia de tratamientos previos, la resistencia a insulina, un alto índice de masa corporal o la existencia de comorbilidades han sido identificados en diferentes estudios como modificadores de la respuesta del huésped al tratamiento con PEG-INF. Pero todos estos aspectos no parecían explicar por completo las diferencias existentes entre las respuestas de los infectados, por lo que se postuló la posibilidad de que hubiera una base genética que pudiera explicar este hecho.

Se realizaron numerosos estudios, agrupados como *Genome-wide association studies (GWAS)*, para intentar encontrar evidencias, y en ellos se observó que un polimorfismo cercano a la región cromosómica codificante del gen de la interleuquina 28B (IL-28B) proporcionaba el doble de respuesta al tratamiento con PEG-INF en los pacientes con el alelo favorable. Este hecho era especialmente evidente en pacientes con genotipo 1 (7).

La IL-28B forma parte de la familia del INF-lambda, que interviene en la inmunidad antiviral del organismo, entre otras funciones. Se codifica en el cromosoma 19, y alrededor de dicho gen se han identificado dos polimorfismos de la IL-28B, el rs12979860 T/C y el rs8099917 T/G que modifican la susceptibilidad al tratamiento con INF (8).

Respecto al polimorfismo rs12979860 la existencia de citosina (C) es un alelo que mejora la respuesta al tratamiento, en cambio, la presencia de timina (T) tiene peor respuesta. Esto significa que, ante la presencia de un paciente homocigoto TT para este polimorfismo, podemos deducir que su respuesta al tratamiento con PEG-INF será desfavorable. De hecho, diferentes estudios han demostrado que el genotipo CC tiene una SVR de más del doble si se compara con el genotipo TT, siendo el mayor predictor de respuesta positiva al tratamiento con PEG-INF del que disponemos, independientemente del genotipo del virus que se vaya a tratar (8). Por otro lado, la presencia de una T en el polimorfismo rs8099917 T/G indica una buena respuesta al tratamiento, mientras que la presencia de una guanina (G) significa lo contrario. En este caso, si un paciente es homocigoto TT para este polimorfismo, podemos esperar que su respuesta al tratamiento con PEG-INF sea favorable. Se ha demostrado que el genotipo GG de este polimorfismo es el mejor marcador para predecir un fracaso en el tratamiento, independientemente de otras variables clínicas o analíticas (8).

Estos alelos varían en la población según la raza y la zona geográfica, siendo la raza caucásica y la región del este asiático quienes poseen más homocigotos CC para el polimorfismo rs12979860.

A pesar de que estos polimorfismos pueden modificar la respuesta al tratamiento, no se sabe bajo qué mecanismos ocurre este efecto, aunque existen varias hipótesis al respecto. Muy recientemente, se ha demostrado que los alelos de pobre respuesta se asocian, paradójicamente, a pacientes con elevada expresión de genes estimuladores de interferón.

Se cree que esta elevación mantenida puede ser la causa de que el tratamiento exógeno con interferón no pueda ejercer más efecto sobre el organismo, lo que deriva en el fracaso terapéutico. A día de hoy esta teoría sigue sin ser demostrada (8).

La detección de estos polimorfismos se realiza en todos los pacientes previo tratamiento con PEG-INF, para individualizar y prever cuál puede ser su respuesta. Este hecho nos acerca cada día más hacia una terapia individualizada de los pacientes con VHC, aunque en la actualidad, con la utilización combinada de los fármacos antivirales de acción directa en terapias libres de PEG-INF, su determinación ya no estaría justificada.

B. PRIMEROS ANTIVIRALES DE ACCIÓN DIRECTA:

Con la aparición de los primeros fármacos de acción directa frente al virus (*direct-acting antivirals*, DAAs) se produce una revolución en la lucha por la erradicación de la hepatitis C. Gracias a una profundización en el conocimiento del virus se logró la síntesis de estos fármacos, que actúan directamente frente a enzimas del virus que son esenciales para su replicación, como son la proteasa, la polimerasa y una fosfoproteína (ver tabla 1). Con la aparición de estos fármacos se abre una nueva línea de tratamiento hacia una terapia más corta, con menos efectos secundarios, libre de INF y con mejores resultados.

Tabla 1. Relación de fármacos DAAs frente al VHC según su diana de actuación:

Inhibidores de la proteasa NS3/4A:	Inhibidores de la polimerasa NS5B:	Inhibidores de la fosfoproteína NS5A:
Telaprevir	Sofosbuvir	Daclatasvir
Boceprevir	Dasabuvir	Ledipasvir
Simeprevir	Deleobuvir	Ombivastir
Paritaprevir	Beclabuvir	Elbasvir
Grazoprevir		
Asunaprevir		

- Inhibidores de proteasa de primera generación:

Los primeros fármacos DAAs que fueron aprobados en 2012 para el tratamiento de la hepatitis C, fueron **telaprevir** y **boceprevir**. Estos dos fármacos actúan uniéndose de forma reversible a la proteasa NS3/NS4A del virus, por lo que son inhibidores de la proteasa (IPs).

Telaprevir y boceprevir supusieron un gran avance en el tratamiento de la infección por el VHC de genotipo 1, consiguiendo una SVR en estos pacientes de hasta el 75%. La mejoría significativa respecto a la terapia con PEG-INF/RBV se observó tanto en pacientes “naive” como en pacientes en los que había fracasado el tratamiento previo. Además, los pacientes cirróticos compensados tratados con estos primeros fármacos DAA obtenían

mejores resultados si se comparaban con los pacientes cirróticos compensados tratados con la terapia convencional.

Sin embargo y a pesar de todos los avances, estos dos fármacos **deben usarse en terapia combinada con PEG-INF/RBV**, ya que se ha demostrado en numerosos estudios que su utilización en monoterapia favorece notablemente la aparición de resistencias.

Otro factor a tener en cuenta es que estos IPs se metabolizan en el hígado a través de la isoenzima CYP3A4 del citocromo P450, lo que conlleva importantes interacciones con otros fármacos, especialmente en el caso del telaprevir. Se debe tener especial precaución, pues, con aquellos compuestos que se metabolizan por esta vía o sean inductores de la misma, ya que se pueden producir sobredosis o dosis insuficientes. Los fármacos a tener en cuenta en este sentido son, especialmente, los antirretrovirales (fundamentales en pacientes coinfectados con VIH), estatinas, rifampicina, azoles, antihipertensivos, antibióticos, antidepresivos y anticonceptivos orales, entre otros.

- **TELAPREVIR:**

Se trata de un inhibidor de la proteasa NS3/4A del VHC. Se administra en triple terapia junto a PEG-INF/RBV por vía oral a dosis de 750 mg cada 8 horas durante 12 semanas, a partir de las cuales se suspende el fármaco y se mantiene el PEG-INF/RBV de 12 a 36 semanas más, dependiendo de la respuesta. Se debe interrumpir el tratamiento en pacientes con más de 1.000 UI/mL a la semana 4 y 12, para evitar resistencias.

Telaprevir no está libre de efectos secundarios. Prurito, exantema, anemia y problemas gastrointestinales tales como náuseas, vómitos, diarrea, hemorroides, picazón o dolor anorrectal son los más comunes. El eritema cutáneo está presente en más de la mitad de los pacientes tratados y obligó en algunos estudios a interrumpir el tratamiento hasta en un 4% de los pacientes. Se recomienda evitar la exposición a la luz solar y utilizar cremas protectoras para disminuir su aparición. Se ha evidenciado algún caso de síndrome de Stevens-Johnson y de síndrome DRESS, siendo la principal limitación a la hora de utilizarlos. Algunos estudios concluyen que los pacientes cirróticos tienen más efectos indeseados con telaprevir, especialmente anemia, rash y prurito, por ello, las personas con cirrosis hepática inestable no deberían tomar telaprevir (9).

- **BOCEPREVIR:**

Boceprevir fue el primer IPs aprobado por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) para el tratamiento de la hepatitis C, y el primero comercializado en nuestro país. Es un inhibidor de la proteasa NS3/4A del VHC que se une de manera covalente, aunque reversible, a la serina del sitio activo del enzima (Ser139) mediante un grupo funcional (alfa)-cetoamida para inhibir la replicación vírica en las células infectadas por el VHC.

Tiene una fase de inducción (conocida en inglés como “lead-in”) con PEG-INF/RBV durante 4 semanas. En la semana 5 se introduce el boceprevir a dosis de 800 mg cada 8 horas por vía oral. Esta triple terapia se mantiene de 24 a 44 semanas más según la respuesta. Su administración debe interrumpirse en todos los pacientes con niveles de RNA del VHC superiores a 100 UI/ml en la semana 12 de tratamiento o RNA detectable en la

semana 24, ya que en estas situaciones difícilmente se consigue llegar a una SVR y así se evita la aparición de resistencias.

La anemia es el efecto secundario más importante. También puede aparecer neutropenia, náuseas, vómitos, diarrea y disgeusia, que desaparecen cuando boceprevir se suspende. Las interacciones con otros fármacos son similares a las de telaprevir, pero la FDA recomienda específicamente no utilizar ciertos antirretrovirales inhibidores de la proteasa del VIH.

C. NUEVOS TRATAMIENTOS:

- Inhibidores de proteasa de segunda generación:

▪ SIMEPREVIR (SMV):

Es un inhibidor de la proteasa NS3/4A, que fue aprobado en Europa en mayo de 2014. Es un fármaco con similar eficacia que telaprevir o boceprevir, pero su éxito radica en que produce menos efectos adversos.

Está disponible en cápsulas de 150 mg. La dosis recomendada es una cápsula al día con alimentos durante 12 semanas. Se utiliza en combinación con otros tratamientos como el PEG-INF, RBV o sofosbuvir (inhibidor de polimerasa, ver más adelante). No se recomienda su uso en combinación con telaprevir o boceprevir, ya que se prevé la aparición de resistencias cruzadas.

SMV ha demostrado ser eficaz para los genotipos 1 y 4 del VHC en diversos estudios, en los cuales se comprobó que un alto porcentaje tanto de los pacientes “naive” como de los que habían recaído, tenían carga viral indetectable después de 12 semanas de tratamiento con triple terapia (SMV/PEG-INF/RBV). Estos resultados eran similares en pacientes coinfectados con VIH.

A la hora de plantearse un tratamiento con SMV es preciso tener en cuenta que aquellos pacientes infectados con el genotipo 1a que poseen la mutación Q80K en la proteasa NS3, presentan una reducción de la eficacia antiviral de dicho fármaco por lo que no se recomienda su uso (mutación Q80K, ver más adelante). De esta forma, esta mutación debe 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.

Otro problema observado en el tratamiento con SMV es la elevación de los niveles séricos de bilirrubina durante el tratamiento. Diversos estudios “in vitro” muestran la inactivación de dos transportadores de la bilirrubina como explicación a este fenómeno. Por tanto, en pacientes con elevados niveles de bilirrubina previo tratamiento debería considerarse una alternativa al tratamiento con este fármaco.

Los efectos secundarios más frecuentemente observados con SMV son náuseas, estreñimiento, erupción cutánea, prurito, disnea, aumento de niveles de bilirrubina y reacciones de fotosensibilidad. SMV se metaboliza a través del citocromo P450 con lo que se debe tener especial cuidado al tomar fármacos que puedan ser inductores o inhibidores de dicha vía metabólica.

- **PARITAPREVIR:**

Paritaprevir es un inhibidor de la proteasa NS3/4A que se metaboliza por el citocromo P450, por lo que se administra junto con ritonavir, que es un potente inhibidor de este citocromo, para aumentar sus niveles y hacer posible la administración diaria única.

Existen otros inhibidores de proteasa en ensayos clínicos o con aprobaciones cercanas, como **grazoprevir** o **asunaprevir**. En cambio otros como **faldaprevir** han sido retirados durante los ensayos viendo que su eficacia era menor que otros fármacos ya aprobados.

- **Inhibidores de la polimerasa:**

Los inhibidores de la polimerasa pueden dividirse en dos grupos, análogos de nucleótidos y no análogos de nucleósidos. Este último grupo ha demostrado tener una barrera genética menor y ser solamente eficaces contra el genotipo 1. En cambio, los inhibidores de la polimerasa análogos de nucleótidos, han demostrado una mayor eficacia y menor aparición de resistencias, no solo frente al genotipo 1, sino contra todos los genotipos virales existentes.

- **SOFOSBUVIR (SOF):**

Es un fármaco inhibidor de la polimerasa NS5B que puede incorporarse en el RNA viral y actúa como terminador de cadena. Se encuentra dentro del grupo de los análogos de nucleótidos, y se recomienda para el tratamiento de pacientes “naive” con cualquier genotipo viral, incluyendo pacientes con cirrosis y pacientes no respondedores a terapia convencional.

Se administra por vía oral, en comprimidos de 400 mg una vez al día, y se puede combinar con RBV, con o sin PEG-INF. También se usa en combinación con ledipasvir (ver más adelante) para genotipo 1 y otros genotipos, y con SMV, con o sin RBV, habiendo demostrado una eficacia de hasta el 90% en pacientes infectados con genotipo 1 después de 12 semanas de tratamiento.

Efectos secundarios del tratamiento con SOF observados hasta ahora son fatiga, cefalea, náuseas, insomnio y prurito. Especialmente importantes son los casos de bradicardia severa y bloqueo cardiaco que implican el uso combinado de SOF con otros DAAs, como ledipasvir o daclatasvir, en pacientes que se encontraban en tratamiento previo con amiodarona (10).

SOF no se metaboliza por el citocromo P450, pero sí por una glicoproteína fosforilada que puede ser inducida por ciertos fármacos, aumentando su eliminación y disminuyendo su efecto terapéutico. Entre estos fármacos no se encuentran los antirretrovirales, lo cual es beneficioso para el tratamiento de los pacientes con coinfección por VIH.

- **DASABUVIR:**

Es un inhibidor de la polimerasa no análogo de nucleósido. Se administra en combinación con ritonavir/paritaprevir/ombitasvir (ver más adelante). Se utiliza una dosis diaria de 250 mg administrado dos veces al día en pacientes con genotipo 1.

Otros inhibidores de polimerasa en desarrollo son **deleabuvir** o **beclabuvir**.

- **Inhibidores de la NS5A:**

Recordemos que la NS5A es una fosfoproteína que se une al RNA viral y es esencial para la proliferación del virus.

▪ **DACLATASVIR:**

Se usa a dosis de 60 mg una vez al día. Está indicado fundamentalmente en pacientes genotipo 1 en combinación con SOF, con o sin RBV, mostrando una eficacia superior al 90%.

Los efectos secundarios observados con daclatasvir son fatiga, cefalea y náuseas.

▪ **LEDIPASVIR:**

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.

Otro inhibidor de NS5A ya aprobado es el **ombitasvir**, y existen otros en desarrollo como 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 fármacos DAAs que actúan por diferentes mecanismos de acción para así evitar la replicación del virus de forma más eficaz. De esta manera 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 (inhibidor de P450) para potenciar sus efectos. Se recomiendan dos píldoras al día de Viekirax que contienen dosis de 50 mg de ritonavir, 75 mg de paritaprevir y 12,5 mg de ombitasvir una vez al día.

Viekirax® también se usa en combinación con el inhibidor de la polimerasa dasabuvir (Viekira Pak®) y puede asociarse también con RBV.

Los efectos secundarios más observados en esta combinación han sido fatiga, náuseas y prurito. Existen interacciones con antirretrovirales que deben tenerse en consideración en pacientes VIH.

Con este tipo de combinaciones, además de otras como SOF/ledipasvir (Harvoni®), SOF/daclatasvir o SOF/SMV/RBV, se ha hecho posible en los últimos años conseguir terapias libres de PEG-INF con la consecuente disminución de los efectos secundarios que este producía, así como el acortamiento de la duración de las terapias. La SVR con los nuevos agentes DAAs ya aprobados y la de aquellos que se encuentran en investigación 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.

La batalla contra el VHC ha alcanzado un punto de no retorno, pero queda mucho aún que investigar. Por ejemplo, se conoce poco sobre la eficacia, seguridad y régimen terapéutico óptimo en pacientes con enfermedad muy avanzada (11). Además, en algunos pacientes no genotipo 1, como los que tienen infección por genotipo 3, las combinaciones terapéuticas disponibles no son totalmente óptimas, especialmente en pacientes con cirrosis (11).

7. MUTACIONES FRENTE A LOS NUEVOS DAAs:

A causa de la gran tasa de replicación del VHC y a la elevada tasa de error de la RNA polimerasa, las mutaciones espontáneas generadas cada día son muy abundantes. Este fenómeno proporciona una reserva genética que puede hacer que se seleccionen ciertos mutantes que escapen al control inmunológico y terapéutico.

Se sabe que la región E2 del VHC, con sus regiones hipervariables 1 y 2, es la región más heterogénea del virus. También es conocido que la respuesta a PEG-INF/RBV está acompañada de una rápida reducción de la complejidad genética en esta región, que se mantiene no variable en pacientes no respondedores. En 2011, Ajishiro Nasu et al., empleando técnicas de secuenciación masiva (12) demostraron que en una población de pacientes con genotipo 1b, antes del tratamiento con terapia convencional no existían diferencias genéticas significativas entre pacientes respondedores y no respondedores. Sin embargo, tras una semana de administración de PEG-INF/RBV los respondedores inmediatos mostraron una disminución en la complejidad genética del virus que abarcaba todas las regiones de su genoma, resultando en una mayor homogeneidad de poblaciones virales. Por el contrario, los no respondedores no demostraron cambios en la complejidad genética de ninguna de las regiones del virus, lo que indicaba que pocos clones virales eran sensibles al tratamiento en este grupo de pacientes. Así mismo, demostraron que los clones virales resistentes a los nuevos DAAs estaban ya presentes antes del inicio del tratamiento. Otros estudios han demostrado la evolución dentro del huésped durante la infección primaria y se ha destacado la existencia de reducciones de la carga genética debidas a la presión inmunológica del huésped (13).

Hoy en día, han sido identificadas mutaciones que confieren resistencia a DAAs en algunas posiciones de NS3/4A y en NS5. Diversos estudios in vivo han demostrado múltiples mutaciones preexistentes en ausencia de DAAs y se está postulando la idea de que no solo el número, sino también la naturaleza de los cambios en los nucleótidos del genoma viral, puedan contribuir a la aparición de resistencias.

La gran variabilidad genética del VHC ha fomentado la realización de múltiples estudios para intentar determinar relaciones estadísticamente significativas entre las variantes genéticas del virus salvaje presentes antes del tratamiento que se relacionen con el fracaso terapéutico, y la aparición de nuevas variantes que confieran resistencia durante la exposición a los diferentes fármacos DAAs. Para ello, cada vez que se investiga la efectividad de un nuevo fármaco contra la hepatitis C se secuencian, tanto previamente (baseline) como durante el tratamiento, las diferentes regiones diana del fármaco, con la intención de detectar cambios genéticos significativos que puedan estar relacionados con la

supervivencia del virus a pesar del uso de antivirales. En este sentido, se ha observado que la mayoría de las variantes asociadas a tratamiento se producen en los primeros días o semanas tras el comienzo del mismo (14).

Los fármacos DAAs tienen, en general, una baja barrera genética para la resistencia (excepto los inhibidores de la polimerasa NS5B, como el SOF), lo que significa que una sola mutación en el genoma viral puede producir un fracaso en el tratamiento. Esto favorece la fácil aparición y selección de mutaciones. Por ejemplo, en la posición 155 de la NS3 del genotipo 1b hacen falta dos cambios nucleotídicos para producir resistencia, mientras que en el genotipo 1a un solo cambio sería suficiente. Esta observación in vitro, se traslada también a la práctica clínica, observándose una mayor barrera genética para la resistencia en el subtipo 1b que en el 1a, siendo estos últimos los que experimentan una mayor tasa de fracaso terapéutico (15).

Además, en un paciente infectado pueden coexistir variantes del virus resistentes al tratamiento con variantes sensibles, de manera que, como ocurre con los antibióticos y las bacterias, al introducir la terapia antiviral se seleccionan las cepas resistentes, haciéndose predominantes y provocando la supervivencia viral (15). Esta es una de las razones por la cual se emplean en los tratamientos combinaciones de DAAs que actúan sobre las diferentes vías de replicación del virus para potenciar la acción antiviral, como se lleva a cabo en el tratamiento de la infección por el VIH.

Tras el análisis de muchas secuenciaciones virales, se ha determinado que hay variantes genéticas del VHC que son más frecuentes en algunos genotipos y subtipos, lo que parece estar asociado con la susceptibilidad basal a los DAAs que se observa entre los diferentes genotipos y subtipos virales.

Sin embargo, y a pesar de todo lo anterior, la **necesidad de detectar resistencias contra DAAs existentes antes de la terapia de primera elección no es necesaria** (14). De hecho, la presencia de variantes de resistencia existentes previo al tratamiento no tiene un gran impacto en los resultados de la terapia y no influye sobre la elección del tratamiento. Pero existe una importante excepción: en los pacientes con genotipo 1a que van a ser tratados en combinación con **SMV/PEG-INF/RBV debe hacerse la detección de la mutación Q80K en NS3** y, en caso de existir, no debe aplicarse dicho tratamiento (14)

- **Mutación Q80K:**

En diversos estudios randomizados se determinó que el tratamiento con triple terapia SMV/PEG-INF/RBV comparado con la terapia convencional con PEG-INF/RBV tenía la misma SVR (alrededor del 50%) en algunos grupos de pacientes, mientras que en otros se llegaba a una tasa de curación de hasta el 90%. Se planteó entonces la existencia de posibles diferencias genéticas en la proteasa del virus que pudieran conferir una mayor resistencia al tratamiento en aquellos grupos en los que la respuesta era menor de la esperada con la introducción de SMV.

Al realizar análisis genéticos para detectar dichas diferencias genéticas, por técnicas de hibridación y amplificación, e incluso, por técnicas de secuenciación masiva (ver más adelante) se localizó, en aquellos pacientes con peor respuesta, una mutación Q80K en la

proteasa NS3. Actualmente se admite que esta mutación anula el efecto del SMV si este se utiliza en triple terapia con RBV/PEG-INF (14).

La prevalencia de la mutación Q80K no se conoce con exactitud. En EEUU se estima entorno al 50% y existen diversos estudios actuales para establecer la prevalencia de esta mutación en Europa. Entre otros, un estudio francés sobre 95 pacientes reveló una prevalencia del 10%, siendo este un número mucho menor que el registrado en EEUU (16). En otro estudio en Suecia, únicamente se detectó un porcentaje del 5,7% (17).

Las últimas y más actualizadas estimaciones muestran que en nuestro medio la mutación se encuentra de forma natural en más del 30% de los pacientes “naive” con genotipo 1a, pero tan solo en menos de un 1% en los pacientes con genotipo 1b (18).

La mutación Q80K, pues, supone una disminución de la SVR a SMV/PEG-INF/RBV muy importante, estimada entre un 30-40% (18). El tratamiento con esta triple terapia, por tanto, está supeditado a la detección de dicho polimorfismo en la NS3 de los pacientes infectados con genotipo 1a, ya que se ha demostrado que en ellos la eficacia y respuesta al tratamiento es claramente menor. Si se encuentra la mutación Q80K se recomienda considerar una terapia alternativa. También debe considerarse otra terapia en aquellos casos en los que no esté accesible el test de detección de dicha mutación.

Al igual que ocurre con lo anteriormente expuesto sobre la determinación del polimorfismo de la IL-28B, tras la aparición de los nuevos DAAs en forma de terapias combinadas que hacen posible tratamientos libres de PEG-INF, esta detección dejaría de estar justificada si el SMV se combina con otros DAAs.

- **Otras mutaciones frente a los nuevos DAAs:**

▪ **VARIANTES DE RESISTENCIA FRENTE A TELAPREVIR Y OTROS IP:**

La mayor parte de los datos disponibles de resistencias a IPs del VHC procede de estudios de pacientes tratados con telaprevir. Aunque este fármaco tiene una elevada potencia antiviral, esta se encuentra comprometida por la rápida selección de mutaciones de resistencia. Hay múltiples ensayos con telaprevir en monoterapia en los que se muestra la elevada aparición de resistencias en poco tiempo (de 7 a 10 días) (15).

Telaprevir ha demostrado seleccionar mutaciones en las posiciones 36, 54, 55, 155, 156, 168 y 170 de la proteasa NS3, siendo el perfil de resistencias diferente según el subtipo de VHC. Las mutaciones V36M+R155K y la T54A/S confieren resistencia al genotipo 1a, mientras que D168A/V, A156S, T54A/S e I170A son las más prevalentes en el genotipo 1b (19).

También se ha observado que cada mutación puede conferir un grado mayor o menor de resistencia a telaprevir. La combinación V36M+R155K y los cambios A156F/T/V confieren un alto grado de resistencia a telaprevir, mientras que otras mutaciones como V36A/G/M, T54A/S, R155G/K/M/T y A156S proporcionan una resistencia menor. En algunos estudios se ven diferencias únicamente en pacientes que han fracasado a tratamiento previo, no mostrándose diferencias entre pacientes “naive”. De hecho, pacientes “naive” con mutaciones de resistencia de forma basal de alto grado, como V36M+R155K, alcanzaron

SVR, mientras que los pacientes con esta misma mutación que antes habían recaído tras tratamiento con PEG-INF/RBV fracasaron.

Sin embargo, la presencia de estos polimorfismos basales o mutaciones asociadas con resistencia a telaprevir es muy baja en el VHC, especialmente las mutaciones de mayor resistencia previamente nombradas (15). En estudios poblacionales se ha determinado que las mutaciones en las posiciones 36, 155, 156 y 168 son inferiores al 1%, mientras que las posiciones 54 o 55 están presentes entre el 3-7% de la población. En el genotipo 1a estos cambios se observan entre el 8-9%, mientras que en el genotipo 1b tienen una prevalencia del 1-2%. (19). Es preciso recordar, no obstante, que el polimorfismo Q80K que produce resistencia a SMV se encuentra en más de un 30% de los subtipos 1a. Por otro lado, el polimorfismo D168Q se encuentra de forma mayoritaria en los genotipos 3 (>99%), siendo este es el responsable de la resistencia natural a SMV de estas variantes (15).

En un estudio de 2013 (17) se analizó la presencia de los polimorfismos (o variantes de aminoácidos asociadas a resistencia: *resistance associated aminoacid variants*, RAVs) frente a inhibidores de la proteasa, en genotipos 1a, 2b y 3a. La prevalencia de RAVs fue encontrada en un 28% de los pacientes con genotipo 1a, tanto de manera aislada (V36L o Q80K) como en combinación (T54A/S y V55A/I). En el genotipo 2b, mutaciones específicas como V36L, Q80G y S122R en la proteasa NS3 fueron encontradas en un 100% de los casos, haciendo probable que estos sean polimorfismos naturales relacionados con dicho genotipo. De forma similar, mutaciones como V36L y D168Q fueron encontradas en todas las muestras de genotipo 3a. Las mutaciones que se encontraron en el virus salvaje del genotipo 1a podrían aumentar hasta diez veces la resistencia a boceprevir y telaprevir, y a los IPs de segunda generación (como SMV), aunque inicialmente parecen tener una resistencia muy baja. Además, los polimorfismos naturales del genotipo 2b, como S122R, y de 3a, como D168Q, conllevan una resistencia natural de hasta 20 y 700 veces respectivamente, lo que explicaría por qué los actuales IP están fundamentalmente dirigidos hacia el genotipo 1 (17).

También se ha observado que tras la finalización del tiempo de tratamiento con telaprevir en triple terapia, la población viral portadora de mutaciones de resistencias era reemplazada por población viral salvaje en un tiempo aproximado de 3 y 7 meses (15). Esta rápida reversión de mutaciones de resistencia a telaprevir una vez terminado el tratamiento, permite el uso de estrategias de “reciclaje” con IPs, a pesar de que se ha determinado que existe un alto grado de resistencia cruzada entre estos fármacos de la misma familia.

En otro estudio sobre mutaciones de resistencia existentes previo tratamiento con la triple terapia telaprevir/RBV/PEG-INF en pacientes genotipo 1 que no habían respondido al tratamiento convencional previo, se describió en NS3 la mutación Arg70, la cual se detectaba en la mayoría de los pacientes que presentaron SVR, por lo que se asoció a una mayor susceptibilidad al tratamiento antiviral (20).

Sin embargo, a pesar todas estos estudios, **a día de hoy no se pueden predecir las respuestas al tratamiento a partir de las variantes del virus** (a excepción del tratamiento con triple terapia con SMV y la mutación Q80K, como ya se ha indicado). Así, son necesarios más estudios en profundidad para intentar correlacionar su relevancia en la práctica clínica, lo que nos acercaría a un tratamiento más dirigido y efectivo contra la enfermedad.

- VARIANTES DE RESISTENCIA FRENTE A OTROS DAAs :

En un estudio japonés muy reciente (21), se utilizó la secuenciación masiva (ver más adelante) para intentar establecer las correlaciones entre las variaciones genéticas existentes en el genotipo 1b, previo tratamiento combinado con daclatasvir y asunaprevir, y la influencia de estas en la respuesta a esta doble terapia. Tanto en algunos pacientes con SVR, como en otros con recaída, se observó una mutación previa a tratamiento para daclatasvir (L31V/M y/o Y93H). Sin embargo, no se observaron mutaciones previas al tratamiento con asunaprevir. Tras la terapia, en algunos pacientes que fracasaron sí que se observó la existencia de una mutación de resistencia para asunaprevir (D168A/V) no existente previamente. Los autores concluyen que pacientes con mutaciones previas de resistencia para daclatasvir pueden ser más susceptibles a recaída durante esta terapia combinada. Sin embargo, aún queda por determinar si la detección en el virus salvaje de estas variantes genéticas que confieren resistencia puede ser un predictor del resultado, ya que no todos los casos con estas variantes tuvieron un fracaso terapéutico.

En otro estudio de 2013 (22), un grupo de pacientes con genotipo 1a, previamente no respondedores a PEG-INF/RBV, fueron tratados con daclatasvir y asunaprevir con o sin PEG-INF/RBV, y en aquellos que no alcanzaron la SVR se determinó la existencia de mutaciones previas, emergentes o persistentes al tratamiento. Se detectaron Q30E/R, L31V/M e Y93C/N en la NS5A y R155K, D168A/E/V/Y en la NS3, variaciones que fueron relacionadas con el fracaso al tratamiento en los pacientes no respondedores. Algunos de estos últimos acabaron respondiendo con una intensificación de PEG-INF/RBV. Sin embargo otros no lo hicieron, sino que durante la intensificación generaron nuevas variantes de resistencia. En las detecciones efectuadas tras el tratamiento, generalmente las variantes asociadas a daclatasvir (inhibidor de la NS5A) persistieron, mientras que las variantes asociadas a la resistencia frente a asunaprevir (inhibidor de la NS3) fueron reemplazadas en su mayoría por las secuencias salvajes. En cambio, la secuencia R155K de la NS3 en un paciente no respondedor no se modificó en ninguna fase del tratamiento.

La conclusión del estudio fue, pues, una asociación del fracaso en el tratamiento con daclatasvir y asunaprevir en pacientes con genotipo 1a no respondedores a terapias previas, con la existencia de variantes de resistencia en NS5A y NS3. Las mutaciones en la NS5A persistieron mientras que las variantes de la NS3 generalmente disminuyeron.

Por último, durante el desarrollo de SOF se comprobó que la variación genética S282T reducía la sensibilidad frente a SOF de 2 a 18 veces en todos los genotipos. Sin embargo, en ensayos clínicos, esta mutación no fue aislada en ningún momento y por tanto no fue causa de fracaso terapéutico (23,14).

Figura 2. Mutaciones en las dianas de los fármacos DAAs asociadas a resistencias:

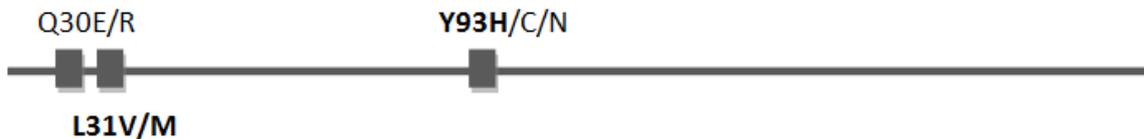
NS3 Proteasa:



NS5B Polimerasa:



NS5A Fosfoproteína:



▪ PACIENTES CON FRACASO TERAPÉUTICO: ¿QUÉ TRATAMIENTO ES INDICADO?

Mientras que los inhibidores de polimerasa análogos de nucleósidos/nucleótidos bloquean la replicación del VHC actuando como terminadores de la cadena del RNA, los análogos interaccionan con la polimerasa y producen cambios alostéricos que comprometen su función. De esta forma, los inhibidores de la polimerasa que pertenecen al grupo de los análogos de nucleótidos, como el SOF, tienen una barrera genética alta comparados con el resto de DAAs. Clínicamente, esto significa que pacientes que tengan variantes de resistencia para SOF, revierten dichas variantes una vez cesa el tratamiento antiviral, de manera que para tratar sus recaídas, puede volver a utilizarse este fármaco. En cambio, otros DAAs como SMV, daclatasvir, ledipasvir, ombitasvir o dasabuvir, cuando fallan en alcanzar una SVR seleccionan sustituciones de aminoácidos en los genes diana del virus, de manera que adquieren resistencia para el tratamiento con estos fármacos y no deben ser utilizados en las recaídas.

Las resistencias frente a IPs, y probablemente contra los inhibidores de la polimerasa no nucleósidos, decrecen lentamente y de forma progresiva hasta hacerse indetectables probablemente después de meses hasta dos años tras el cese del tratamiento. En cambio, las mutaciones de resistencia frente a NS5A son más dominantes y se mantienen presentes durante años, incluso para siempre, tras haber sido seleccionadas con inhibidores de esta fosfoproteína (14).

8. EL FUTURO DE LOS ESTUDIOS DE LAS VARIANTES DEL VHC: LA SECUENCIACIÓN MASIVA

Los métodos de hibridación y amplificación por PCR, si bien son capaces de determinar el genotipo y el subtipo en la mayoría de los pacientes infectados existen, no obstante, algunos casos en los que no son detectados correctamente (24). También han demostrado tener limitaciones para ciertos genotipos menos comunes e incluso genotipos o subtipos no conocidos hasta ahora (13). Un genotipado preciso de los pacientes es necesario debido a que las terapias actuales dependen del genotipo a tratar. Por otra parte, para el conocimiento de la gran variación genética del virus y de aquellas variantes asociadas a la resistencia a fármacos, la secuenciación de todo el virus es necesaria. Sin embargo, dada la complejidad genética existente en el VHC (y otros virus, como el VIH, donde la problemática es similar), las técnicas clásicas de secuenciación (basadas en su mayoría en el método de Sanger), se han mostrado insuficientes. Así por ejemplo, en ausencia de terapia antiviral, las mutaciones que confieren resistencia están generalmente en una cantidad genética muy baja, haciendo que su detección sea un verdadero reto.

Además, como ya ha sido expuesto en otra sección, cada vez ha ido cobrando más importancia en la clínica la existencia de pacientes que poseen infecciones por varios subtipos y genotipos del VHC, lo que se conoce por infecciones mixtas. La mayoría de los pacientes con este tipo de infecciones son grupos de riesgo para el contagio por el virus, como los ADVP (actualmente los agentes transmisores más importantes de esta enfermedad). Debemos tratar, pues, selectivamente dichas infecciones si queremos erradicar la enfermedad.

Así pues, la aparición de los nuevos DAAs y su variable efectividad dependiendo del genotipo y subtipo viral, así como la importancia de la detección de las infecciones mixtas, hacen necesarias la implantación de nuevas técnicas de secuenciación como condición fundamental para un control eficaz de la enfermedad.

En este sentido, en los últimos años han ido apareciendo nuevas formas de secuenciación más rápidas y eficaces, pero de gran complejidad, que se agrupan bajo los términos de secuenciación masiva o NGS (del inglés original, *next generation sequencing*). La metodología basada en la secuenciación masiva permite identificar de forma masiva los genotipos del VHC y sus respectivos subtipos (18). Es una técnica muy eficiente, que produce una gran cantidad de información a un precio relativamente bajo y en un tiempo relativamente corto. Ha proporcionado muchísima información en el campo de la virología, especialmente en el VHC, VIH y virus de la influenza (25).

Estas técnicas favorecen la mejor identificación de las infecciones mixtas, la detección de aquellos genotipos que no sean 1a y 1b, una mejora en la clasificación de genotipo 1a y 1b, la identificación de subtipos en otros genotipos no 1 (especialmente genotipo 4, en el que se han detectado recientemente mutaciones de resistencia y se cree es uno de los genotipos con mayor diversidad), además de determinar la variabilidad y las mutaciones de resistencia que haya podido desarrollar el paciente antes y durante el tratamiento antiviral, incluso cuando su prevalencia es baja. De esta manera, se conocerá mejor quiénes son candidatos a los diferentes tipos de tratamiento, favoreciendo su optimización.

No hay ninguna duda respecto a que el uso de la secuenciación masiva continuará desarrollándose en los próximos años, ya que esta técnica supone una revolución en el campo de la virología destacando, en nuestro caso, el VHC, en el cual seremos capaces de identificar su elevada variabilidad genética y trasladar los conocimientos a la práctica clínica.

Aún existen limitaciones en la técnica, como son el coste, los enormes datos que recoge y la necesidad de personal preparado y experto (la metodología requiere bioinformáticos experimentados que sean capaces de manejar la elevada cantidad de datos que estas nuevas tecnologías aportan). Además, con los millones de secuenciaciones que se generan de una sola muestra, un pequeño error puede malinterpretarse como una mutación o un polimorfismo, por lo que deben investigarse mecanismos de corrección y bases de datos, hardware y software apropiados para analizar los datos y controlar posibles errores.

La necesidad de simplificar los equipos, la estandarización y el desarrollo de herramientas informáticas que faciliten su uso son necesidades urgentes para hacer que la secuenciación masiva sea una realidad en la virología clínica (25).

9. CONCLUSIONES:

El tratamiento de la hepatitis C ha dado un vuelco en los últimos años y hoy en día estamos más cerca de facilitar un tratamiento dirigido hacia la erradicación de la enfermedad. No obstante, debido a la gran variabilidad genética del virus, la necesidad de una individualización de la terapia antiviral es cada día más evidente. En esta dirección, existen nuevas técnicas de secuenciación masiva que pretenden asociar posibles variantes que confieren resistencia, tanto previamente como durante el tratamiento, siendo causa de fracaso terapéutico.

Sin embargo, la evidencia hasta la actualidad sostiene que la detección previa al tratamiento con DAAs de variantes asociadas a resistencia existentes en baseline no es necesaria, debido a que la tasa de SVR es muy alta tanto en pacientes con estas variantes como en pacientes en las que no son detectadas. Sin embargo, existe una importante excepción, con evidencia A1: en pacientes con genotipo 1a se debe hacer el cribado de la mutación Q80K antes de recibir triple terapia con SMV/RBV/PEG-INF, ya que si se detecta esta variante, debe elegirse una terapia alternativa ante la alta probabilidad de fracaso terapéutico (14).

Ante pacientes con recaídas, no existe una clara evidencia sobre qué fármacos deben utilizarse. Siempre debe tenerse en cuenta el genotipo viral, los perfiles de resistencia existentes frente a los fármacos previamente administrados, el número de fármacos usados, el uso de la ribavirina y la duración del tratamiento. Más estudios son necesarios para establecer un protocolo de actuación frente a pacientes que no alcanzan SVR. Al igual que lo indicado anteriormente para el inicio del tratamiento con DAAs, el estudio de resistencias previo al tratamiento de recaídas tampoco tiene una evidencia clara (evidencia B2) (14).

10. TRABAJO EXPERIMENTAL:

Con el fin de realizar una primera aproximación al conocimiento de la prevalencia de la mutación Q80K, relacionada con la falta de respuesta a simprevir, entre los pacientes de hepatitis C de nuestro entorno, se llevó a cabo, en colaboración con el Servicio de Digestivo del HUMV, la determinación de dicho polimorfismo en un número de pacientes. Las características de las muestras clínicas en cuanto al número, genotipo del virus o polimorfismo IL-28B del paciente se muestra en la Tabla 2.

Para la detección de la mutación se realizó, en primer lugar, la extracción del RNA del VHC a partir del plasma del paciente (NucleoSpin[®]RNA, Machery Nagel), amplificando posteriormente por RT-PCR (One Step PrimeScript[®], Takara) una región de 200 bp del gen NS3 del virus, con los cebadores NS31a-Q80F (5'-ATCAATGGGGTATGCTGGACTGTC-3') y NS31a-Q80R (5'-ACATCGGCGTGCCTCGTGACCAG-3') (16). A continuación se secuenció el amplicón con los mismos cebadores (CEQ[®] 2000XL, Beckman) en el servicio de Secuenciación del HUMV, y mediante un software de edición (Sequencher[®] v.4.0.5, Gene Codes) se comparó la secuencia del virus del paciente con la de referencia del subtipo 1a (cepa H77, GenBank acceso: AF009606), para localizar la mutación en el nucleótido de la posición 80 de la proteasa viral.

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 una ausencia del polimorfismo. Solamente en un caso se obtuvo una mutación, Q80L, distinta de la asociada al fenotipo de resistencia (Q80K), y cuyo significado desconocemos.

Este trabajo ha servido para poner a punto la determinación de la mutación Q80K en el VHC, que ha quedado incorporada a la cartera de servicios de Microbiología del HUMV para los pacientes remitidos por los servicios de Digestivo e Infecciosas, fundamentalmente.

Tabla 2. Relación de muestras del HUMV utilizadas para el estudio de la mutación Q80K

RNA	Muestra	Genotipo	IL28 [rs8099917]	A.a. pos. 80
1	14116516	1b	GG	*
2	14116517	1	TG	Q
3	14116518	1	TT	Q
4	14116519		TG	Q
5	14116520	1b	TG	*
6	14116521	1	TT	Q
7	14116522	1	TT	Q
8	14116963	1	TT	*
9	14116978	1	TT	Q
10	14116980	1b	TG	*
11	14116981	1	TT	Q
12	14116982	1	TT	Q
13	14116983	1a/1b	TG	Q
14	14116984	1	TT	Q
15	14116985	1a/1b	TG	Q
16	14116986	1b	TG	*
17	14116987		TT	*
18	14116988	1	TG	*
19	14116989	1	TG	Q
20	14116990	1	TG	Q
21	14116991	1	TT	Q
22	14116992	1	TT	Q
23	14116993	1a	TT	*
24	14116994	1a	TG	*
25	14116995		TG	*
26	14117119	1a	TT	Q
27	14117120	1	TT	*
28	14117121	1b	TG	*
29	14117122	1	TT	*
30	14117123	1	TT	Q
31	14120094	1a	TG	Q
32	14120095	1a	TG	Q
33	14120096	1a	GG	Q
34	14120097	1a	TT	Q
35	14120098	1a	TT	Q
36	14120099	1b	TG	Q
37	14120100	1a	TG	L
38	14120101		TG	*
39	14120102	1a	GG	Q
40	14120103	1a	TT	*
41	14120104	1	TT	Q
42	14120105	1a	TT	Q
43	14120106	1a	TG	*
44	14120107		TG	Q
45	14120108	1a	TG	Q
46	14120109	1a	TT	Q
47	14120110	1a	TG	Q
48	14120111	1a	TG	Q
49	14120112	1	TT	*
50	14120113	1	TT	Q

* No amplificación o secuencia de mala calidad

11. BIBLIOGRAFÍA:

1. Qui-Lim Choo, George Kuo, Amy J. Weiner, Lacy R. Overby, Daniel W. Bradley, Michael Houghton Source. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244 (4902): 359-362
2. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, Simmonds P. 2014. Expanded classification of hepatitis c virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*, 59: 318-327.
3. Grebely J, Pham ST, Matthews GV, Petoumenus K, Bull RA, Yeung B, Rawlinson W, Kaldor J, Lloyd A, Hellard M, Dore GJ, White PA. 2012. Hepatitis C virus reinfection and superinfection among treated and untreated participants with recent infection. *Hepatology*, 55: 1058-1069.
4. Murphy DG, Sablon E, Chamberland J, Fournier E, Dandavino R, Temblay CL. 2015. Hepatitis c virus genotype 7, a new genotype originating from Central África. *J. Clin. Microbiol*, 53 (3): 967-972
5. Doyle JS, Aspinall E, Liew D, Thopson AJ, Hellard ME. 2012. Current and emerging antiviral treatments for hepatitis c infection. *Br J Clin Pharmacol*, 75: 931-943
6. Soriano V, Peters MG, Zeuzem. 2009. New therapies for hepatitis C virus. *Clin Infect Dis*, 48: 313-319
7. Iadonato SP, Katze MG. 2009. Hepatitis C virus gets personal. *Nature*, 461: 357-358
8. Riva E, Scagnolari C, Turriziani O, Antonelli G. 2014. Hepatitis C virus and interferon type III (interferon-lambda3/interleukin-28B and interferon-lambda4): genetic basis of susceptibility to infection and response to antiviral treatment. *Clin Microbiol Infect*, 20: 1237-1245.
9. www.aidsinfonet.org. 2014. Hojas informativas 682 y 683
10. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios (AEMPS). Fecha de publicación: 27 abril 2015.
11. Gentile I, Borgia G. 2015. A pill a day keeps HCV away. *Lancet Infect Dis*, 15: 616-617.
12. Nasu A, Marusawa H, Ueda Y, Nishijima N, Takahashi K, Osaki Y, Yukitaka Y, Inokuma T, Tamada T, Fujiwara T, Sato F, Shimizu K, Chiba T. 2011. Genetic heterogeneity of hepatitis c virus in association with antiviral therapy determined by ultra-deep sequencing. *PLoS One*, 6 (9) e24907

13. M. R. Capobianchi, E. Giombini and G. Rozera. 2013. Next-generation sequencing technology in clinical virology. *Clin Microbiol Infect*, 19: 15-22
14. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C. 2015
15. Poveda E, García F. 2013. Resistencia a telaprevir. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 31: 26-32
16. Morel V, Duverlie G, Brochot E. 2014. Patients eligible for treatment with simeprevir in a French center. *J Clin Virol*, 61: 149-151
17. Palanisamy N, Danielsson A, Kokkula C, Yin H, Bondeson K, Wesslén L, Duberg AS, Lennerstrand J. 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.
18. Quer J, Gregori J, Rodríguez-Frias F, Buti M, Madejon A, Perez-del-Pulgar S, Garcia-Cehic D, Casillas R, Blasi M, Homs M, Tabernero D, Alvarez-tejado M et al. 2015. High-Resolution Hepatitis C Virus Subtyping Using NS5B Deep Sequencing and Phylogeny, an Alternative to Current Methods. *J Clin Microbiol*, 53: 219-226.
19. Soriano V, Vispo E, Poveda E, Labarga P, Martín-Carbonero L, Fernández-Montero JV, Barreiro P. 2011. Directly acting antivirals against hepatitis c virus. *J Antimicrob Chemother*, 66; 1673-1686.
20. Akuta N, Suzuki F, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayasi M, Hara T, Kobayashi M et al. 2013. Emergence of telaprevir-resistant variants detected by Ultra-deep sequencing after triple therapy in patients infected with VHC genotype 1. *J Med Virol*, 85: 1028-1036.
21. Kosaka K, Imamura M, Hayes CN, Chayama K. 2015. Emergence of resistant variants detected by ultra-deep sequencing after asunaprevir and daclatasvir combination therapy in patients infected with hepatitis c virus genotype 1. *J Viral Hepat*, 22: 156-163
22. McPhee F, Hernandez D, Yu F, Ueland J, Monikowski A, Carifa A, Falk P, Wang C, Fridell R, Eley T, Zhou N, Gardiner D. 2013. Resistance analysis of hepatitis c virus genotype 1 prior treatment null responders receiving daclatasvir y asunaprevir. *Hepatology*, 58: 902-911
23. European Medicines Agency (EMA). 2014. Ficha técnica de Sofosbuvir.
24. Larrat S, Poveda, Jd, Coudret C, Fusillier K, Magnant N, Signori-Schmuck A, Thibault V, Morand P. 2013. Sequencing assays for failed genotyping with the Versant hepatitis C virus genotype assay (LIPA), version 2.0. *J Clin Microbiol.*, 51:2815-2821

25. Quiñones-Mateu ME, Avila S, Reyes-Teran G, Martinez MA. 2014. Deep sequencing: becoming a critical tool in clinical virology. J Clin Virol, 61: 9-19

12. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a los servicios de Microbiología y Digestivo del HUMV su esfuerzo para hacer posible el apartado experimental de este documento.

Del mismo modo, quiero dar las gracias con especial cariño a mi director D. Jesús Agüero Balbín por su atención, asesoramiento, seguimiento, esfuerzo y dedicación durante todo el proceso de revisión y elaboración del trabajo.

Agradecer también a mi familia su incesante apoyo a lo largo de estos seis años de carrera.