



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Historia natural de la infección crónica por Hepatitis C e impacto del tratamiento en pacientes con cirrosis o manifestaciones extrahepáticas

Sabela Lens Garcia

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Historia natural de la infección crónica por Hepatitis C e impacto del tratamiento en pacientes con cirrosis o manifestaciones extrahepáticas.

Doctoranda:

Sabela Lens García

Director de Tesis:

Xavier Forns Bernhardt



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Barcelona, 2016

Índice

1. Introducción	5
1.1 Virus de la hepatitis C	7
1.1.1 Estructura viral	7
1.1.2 Infección crónica por VHC. Historia Natural	8
1.1.3 Manifestaciones extrahepáticas asociadas al VHC: Crioglobulinemia mixta	11
1.2 Fibrosis Hepática	17
1.2.1 Proceso de fibrogénesis hepática	17
1.2.2 Evaluación de la fibrosis hepática: Métodos directos	19
1.2.3 Evaluación de la fibrosis hepática: Métodos indirectos	20
1.3 Hipertensión Portal	24
1.3.1 Definición y estimación	24
1.3.2 Implicaciones clínicas	24
1.3.3 Marcadores no invasivos de Hipertensión Portal	25
1.4 Tratamiento antiviral en la hepatitis crónica C	27
1.4.1 Generalidades	27
1.4.2 Efecto de la respuesta virológica sobre la enfermedad hepática	31
1.4.3 Efecto de la respuesta virológica sobre la crioglobulinemia mixta	34
2. Hipótesis y Objetivos	39
3. Copia de los estudios originales	47
4. Discusión	95
5. Conclusiones	111
6. Bibliografía	115
7. Agradecimientos	125

Abreviaturas:

ALT: Alanina aminotransferasa, ARN: Ácido ribonucleico, AUC: Área bajo la curva, AST: Aspartato aminotransferasa, C4: fracción C4 del complemento, CH50: actividad 50% del complemento hemolítico, CM: Crioglobulinemia Mixta, CTP: Clasificación Child-Turcotte-Pugh, CSPH: Hipertensión Portal Clínicamente Significativa (en inglés, *Clinical Significant Portal Hypertension*), DAAs: Agentes Antivirales Directos (en inglés *Direct-acting Antiviral Agents*), ET: Elastografía de Transición, FA: Fosfatasa alcalina, FR: Factor Reumatoide, GGT: Gammaglutamil transferasa, GPVH: Gradiente de Presión Venosa Hepática, HTP: Hipertensión Portal, HCC: Carcinoma Hepatocelular (en inglés *Hepatocellular Carcinoma*), IP: Inhibidor de Proteasa, IPol: Inhibidor de Polimerasa, kPa: Kilopascal, MEC: Matriz Extracelular, MELD: Model for End Stage Liver Disease, mmHg: Milímetros de mercurio, Peg-IFN: Interferón Pegilado, RBV: Ribavirina, RVS: Respuesta Virológica Sostenida, UI: Unidades Internacionales, VC: Vasculitis Crioglobulinémica, VHC: Virus de la Hepatitis C.

1. Introducción

1.1 El virus de la hepatitis C

1.1.1 Estructura viral

El virus de la hepatitis C

El VHC es un virus pequeño (~ 50 nm de diámetro) y con envuelta que pertenece al género hepacivirus de la familia *Flaviviridae* ¹. El VHC replica preferentemente en el citoplasma de los hepatocitos, aunque también se ha descrito la presencia del VHC en otros compartimentos o tipos celulares ^{2,3}. Su genoma está constituido por una única molécula de ARN de doble polaridad, cuyo marco de lectura está flanqueado por 2 regiones no traducidas en los extremos 5' y 3', las cuales tienen una estructura secundaria conservada (**Figura 1**). Estas 2 regiones del virus son esenciales para la replicación y la traducción del ARN. La traducción del marco de lectura da lugar a una poliproteína precursora de unos 3.000 aminoácidos (aa), aproximadamente. Esta poliproteína es procesada tanto por proteasas virales como del huésped dando lugar a 3 proteínas estructurales, core, E1, E2, la proteína p7 y 6 proteínas no estructurales denominadas NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B ⁴.

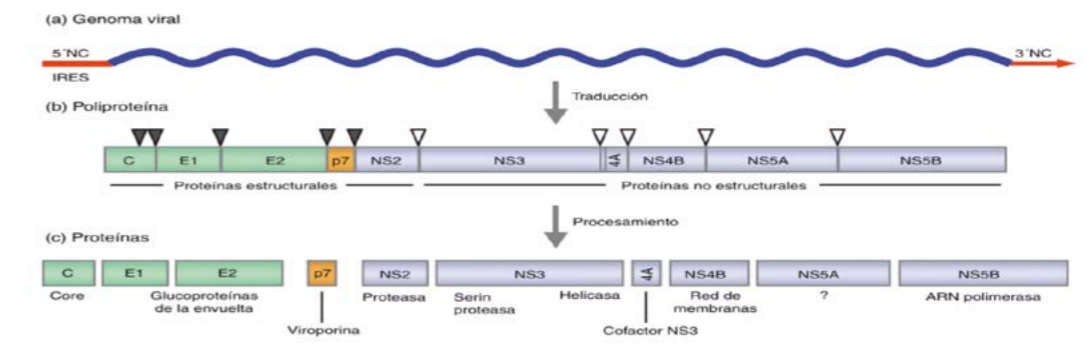


Figura 1. Esquema de la organización genómica del VHC y las proteínas virales asociadas. Imagen adaptada de Koutsoudakis G *et al.* Gastroenterol Hepatol 2013⁴.

La proteína NS2 junto con el dominio aminoterminal de NS3 forma la proteasa NS2-NS3 que tiene un papel crucial en la producción de viriones ⁵. La NS4A es un cofactor que se asocia a la proteasa NS3. La proteasa NS3-NS4A es esencial para el ciclo de vida del VHC, catalizando el procesamiento del resto de las proteínas no estructurales. La NS5A es una metaloproteasa dependiente de cinc muy fosforilada, cuya función en el ciclo de vida del VHC no está claramente definida ⁶. Sin embargo, diversos estudios demuestran que además de desempeñar

un papel importante en la replicación viral ^{7,8} y en la producción de partículas infecciosas ⁹, interacciona con un gran número de proteínas celulares, regulando diversas vías de señalización. Finalmente, la NS5B es la polimerasa viral. Es una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), capaz de sintetizar ARN *de novo* y dependiente de cebador. El hecho de que la función de las proteínas no estructurales se centra básicamente en el procesamiento de la poliproteína y en la replicación viral, ha hecho que se hayan convertido en las dianas terapéuticas contra las que se dirigen los tres grupos principales de agentes antivirales directos (los inhibidores de proteasa, polimerasa y NS5A) ¹⁰.

La variabilidad genética es una de las características biológicas más relevantes del VHC. La diversidad de secuencias se genera continuamente durante la replicación viral debido a que la polimerasa viral no tiene capacidad correctora de errores (1 error cada 10^4 o 10^5 nucleótidos), y a que la tasa de producción de nuevos viriones es muy alta (10^{12} viriones por día) ¹¹. Mediante el análisis de las secuencias genómicas de virus aislados en diferentes zonas geográficas se han podido identificar hasta 7 genotipos distintos del VHC, denominados del 1 al 7 según el orden de descubrimiento. Los distintos genotipos difieren entre sí en un 30-35% de los nucleótidos. Asimismo, cada uno de estos genotipos está dividido en subtipos, los cuales difieren entre sí en un 20-25% de la secuencia y son identificados mediante letras, por ejemplo, 1 a, 1 b, 2 a, 2 b, 3 a, etc, siendo el genotipo 1b el más frecuente en nuestro medio ^{12,13}.

1.1.2 Infección crónica por VHC. Historia Natural

Globalmente, la morbilidad y mortalidad atribuible al virus de la hepatitis C (VHC) sigue en aumento. Aproximadamente 700 000 personas mueren cada año por complicaciones relacionadas con el VHC, que incluyen la cirrosis, el carcinoma hepatocelular (HCC) y la insuficiencia hepatocelular. En nuestro medio, la infección por VHC es la primera causa de hepatopatía crónica y por tanto constituye la causa más frecuente de cirrosis hepática, hepatocarcinoma y trasplante hepático ^{13,14,15}.

Debido a la naturaleza asintomática de la enfermedad, muchas personas infectadas no son conscientes de su infección y, para aquellos diagnosticados en entornos diversos el acceso al tratamiento sigue siendo deficiente ^{16,17}. Mejorar el acceso al cribado del VHC es uno de los objetivos más importantes tanto para aumentar el número de personas diagnosticadas con el VHC como para mejorar la comprensión de la distribución de la infección por VHC en la población general y en los grupos de mayor riesgo.

La prevalencia del VHC y la distribución de genotipos varían considerablemente, dependiendo de la región geográfica y la población estudiada (**Figura 2**).

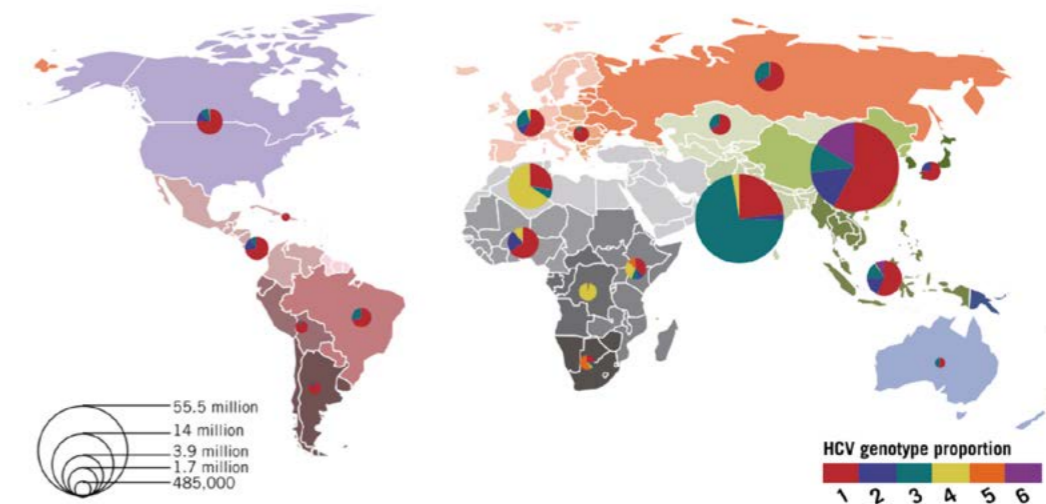


Figura 2. Distribución global de los genotipos VHC. Imagen adaptada de WHO Guidelines for screening care and treatment of persons with hepatitis C infection ¹⁶.

Entre los grupos de riesgo asociados a la infección por VHC se encuentran los usuarios de drogas por vía parenteral o intranasal, los receptores de productos sanguíneos (especialmente antes del año 1990, cuando aún no se había identificado el VHC), hijos de madres infectadas por VHC, personas infectadas por VIH y parejas sexuales de personas infectadas por VHC ¹⁶, especialmente hombres que practican sexo con hombres.

El VHC provoca tanto hepatitis aguda como crónica. La eliminación espontánea (en ausencia de tratamiento) de la infección aguda por el VHC se produce dentro de los seis meses de la infección en el 15-45% de los individuos infectados. El 55-85% restante desarrollará una infección crónica por el VHC. Los anticuerpos anti-VHC se desarrollan a las pocas semanas de una infección aguda y persisten durante toda la vida. En las personas que tienen anticuerpos anti-VHC, es necesario determinar la presencia de ARN del VHC (que detecta la presencia del virus) para confirmar el diagnóstico de la infección por VHC crónica ^{18,19}.

En ausencia de tratamiento, la infección crónica por el VHC puede causar cirrosis hepática, insuficiencia hepática y carcinoma hepatocelular (**Figura 3**). La velocidad de progresión de una hepatitis crónica C a cirrosis es variable y depende del grado de lesión hepática en el momento del diagnóstico ²⁰ así como de la existencia o no de otros cofactores tales como la ingesta de alcohol ²¹, la sobrecarga férrica ²², la esteatosis ²³ o la coinfección por otros virus ²⁴⁻²⁷. Diversos estudios han estimado que en los pacientes con infección crónica por el VHC, el riesgo de desarrollar cirrosis hepática se sitúa en torno a 15-30%

en aproximadamente 20 años^{28,29}. Sin embargo, debido a la lenta progresión de la enfermedad, para obtener datos fiables de la tasa de progresión del daño hepático durante la infección por VHC, es preciso disponer de amplias cohortes de pacientes monitorizados durante un largo periodo de tiempo³⁰.

La cirrosis se caracteriza histológicamente por nódulos de regeneración difusos rodeados de septos fibrosos densos con la consecuente extinción del parénquima hepático y colapso de las estructuras hepáticas, lo que a su vez provoca una gran distorsión de la arquitectura hepática vascular³¹. Esta distorsión causa un aumento de la resistencia del flujo portal y, por tanto, hipertensión portal y disfunción de la síntesis hepática¹⁸. Los episodios de descompensación de la cirrosis (ascitis, hemorragia por varices, encefalopatía hepática) ocurren en contexto de hipertensión portal clínicamente significativa (gradiente presión portal ≥ 10 mmHg) y con una tasa anual del 5-7%^{32,33}. Actualmente la cirrosis no se considera una enfermedad terminal sino un proceso dinámico en el que se han descrito hasta 4 estadios con claras diferencias en cuanto a la supervivencia del paciente. El estadio 1 (compensado sin varices esofágicas) presenta una mortalidad estimada de 1% por año mientras que los estadios 2 (compensado con varices), 3 (descompensado con ascitis) y 4 (descompensado con hemorragia gastrointestinal) presentan una tasa de mortalidad anual del 4%, 20% y 57% respectivamente. El desarrollo de descompensación, por tanto, supone una disminución de la supervivencia mediana de los pacientes con cirrosis a los dos años del 85% al 50%³⁴. En el caso del hepatocarcinoma (HCC), el riesgo de desarrollo de HCC en personas con cirrosis se sitúa en torno a aproximadamente 2-4% por año^{35,36}. Debido a este incremento del riesgo de HCC, se recomienda el cribado semestral mediante ecografía abdominal a todos los pacientes con cirrosis³⁷.

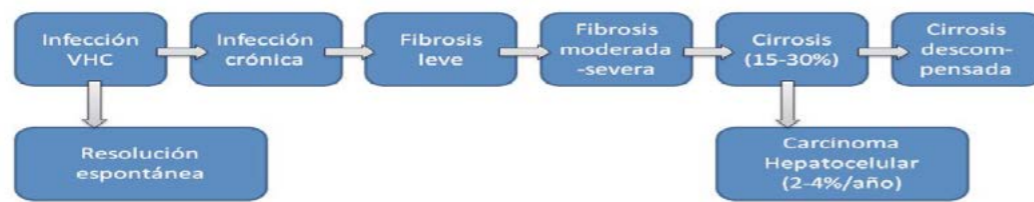


Figura 3. Esquema de la Historia Natural de la infección crónica por VHC.

1.1.3 Manifestaciones extrahepáticas asociadas al VHC: Crioglobulinemia Mixta

En algunas series, hasta dos tercios de los pacientes con infección crónica por VHC pueden presentar también manifestaciones extrahepáticas³⁸. Algunas de estas condiciones han sido ampliamente descritas y estudiadas mientras que otras son relativamente infrecuentes en el transcurso de la enfermedad, aunque algunas implican una importante morbi-mortalidad (**Tabla 1**).

Manifestaciones inmuno-mediadas	Crioglobulinemia Mixta
	Linfoma no-Hodgkin células B
	Síndrome seco
	Poliarteritis Nodosa
	Gammapatía Monoclonal
	Trombocitopenia Inmune
Manifestaciones inflamatorias	Diabetes Mellitus tipo 2
	Afectación cardiovascular
	Fatiga
	Alteraciones cognitivas
	Depresión
	Fibromialgia

Tabla 1. Manifestaciones extrahepáticas asociadas a a infección crónica por VHC.

La Crioglobulinemia Mixta (CM) es una de las manifestaciones extrahepáticas del VHC mejor descritas. Se caracteriza por la presencia de inmunocomplejos llamados crioglobulinas que precipitan a temperaturas bajas ($<37^{\circ}\text{C}$). Las crioglobulinas presentan un componente IgG policlonal asociado a un componente IgM monoclonal (CM tipo II) o policlonal (CM tipo III) (**Figura 4**) y actividad del factor reumatoide (FR)³⁹. La cuantificación de la crioglobulinemia y otros marcadores subrogados de actividad como la fracción del complemento C4, el complemento hemolítico 50 (CH50) y el factor reumatoideo (FR) permiten evaluar la actividad de la enfermedad de forma dinámica.

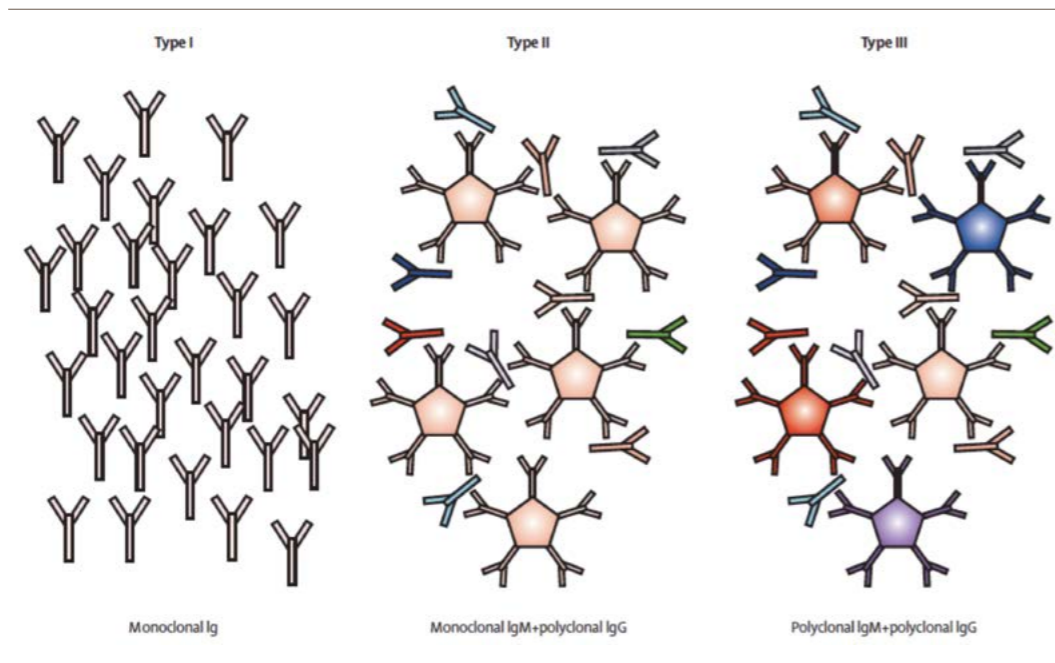


Figura 4. Tipos de Crioglobulinemia mixta. Adaptado de Ramos-Casals *et al.* Lancet 2012 ⁴⁰

El descubrimiento del virus de la hepatitis C en 1989 permitió acuñar el término de "Crioglobulinemia Mixta asociada al VHC". En la mayoría de los estudios hasta un 25-30% de los pacientes VHC presentan crioglobulinemia mixta (predominantemente la CM tipo II) siendo el Mediterráneo una de las zonas geográficas con mayor prevalencia. Algunos estudios han asociado la presencia de CM a la duración de la infección por VHC estimando la incidencia anual de crioglobulinemia en un 3% ⁴¹.

A pesar de la gran prevalencia de CM en pacientes con VHC, menos de un 15% de pacientes desarrolla manifestaciones clínicas. La CM sintomática es conocida como Vasculitis Crioglobulinémica (VC), una vasculitis de pequeño vaso de afectación principalmente cutánea, articular, renal y del sistema nervioso periférico. De hecho, la infección crónica por VHC es la causa de la VC hasta en un 80% de los casos ⁴².

Se han descrito varios factores que predisponen al desarrollo de VC en los pacientes VHC. La interacción entre el virus y los linfocitos modula de forma directa la función de las células B y T provocando una activación y expansión policlonal de células B productoras de IgM con actividad FR. Se sabe que presencia de algunos

HLA se ha asociado al desarrollo de VC, no obstante, no se han identificado aún los factores virológicos específicos implicados en el desarrollo de la VC ⁴³.

Se cree que el VHC, con independencia de la presencia de crioglobulinas, presenta cierto linfotropismo. La proteína E2 de la envuelta interacciona con CD81, una molécula de señalización que expresan tanto hepatocitos como linfocitos B y T, por lo que esta interacción podría ser la responsable de la activación de las células B ⁴⁴.

La expresión clínica de la VC es variable, desde la presencia de sintomatología leve hasta complicaciones que pueden poner en peligro la vida del paciente. La presentación clínica más frecuente es la presencia de púrpura, artralgia y astenia (tríada de Meltzer⁴⁵), que se ha reportado hasta en un 80% de los pacientes en el debut de la enfermedad. El órgano diana afecto con más frecuencia es la piel. Entre las manifestaciones cutáneas se encuentran la púrpura palpable, la presencia de úlceras, el fenómeno de Raynaud o la acrocianosis. No obstante, la presencia de púrpura cutánea es la manifestación más característica de la vasculitis crioglobulinémica (54-82%) ⁴⁰ cuya presentación típica consiste en la presencia de múltiples lesiones petequiales en las extremidades inferiores.

La afectación articular consiste principalmente en dolor articular de manos, rodillas y muñecas sin signos de inflamación (44-71%). Se ha reportado la presencia de artritis en menos de un 10% de los pacientes. Más de un 50% presentan debilidad y fatiga. Por este motivo es relevante descartar la presencia concomitante de fibromialgia u otros procesos endocrinos, relativamente frecuentes en pacientes crioglobulinémicos. La afectación renal se caracteriza por la presencia de una glomerulonefritis membranoproliferativa tipo I con proteinuria, hematuria microscópica y diferentes grados de insuficiencia renal. Aproximadamente un 20% de los pacientes con crioglobulinemia presentan nefropatía en el momento del diagnóstico y hasta un 30% presentan complicaciones renales durante el curso de la enfermedad. Entre un 17-60% de los pacientes con crioglobulinemia presentan también neuropatía periférica. La manifestación neurológica más frecuente es la polineuropatía sensitiva distal o sensitivo-motora con parestesias asimétricas y dolorosas aunque en ocasiones puede presentarse en forma de mononeuritis múltiple^{40,46}. Otras manifestaciones clínicas menos frecuentes son la afectación intestinal (2-6%) o pulmonar (<5%). En los pacientes con VC, la edad avanzada y la afectación renal e intestinal, se han asociado a un peor pronóstico de la enfermedad con una supervivencia a 5 años del 50-90% ⁴³.

En 2012, se definió el documento de consenso de Chapel-Hill para el diagnóstico de vasculitis ⁴⁷. El diagnóstico de vasculitis crioglobulinémica asociada al VHC se apoya en la presencia de datos clínicos, de laboratorio e histopatológicos (**Tabla 2**). La presencia de crioglobulinas circulantes en suero es funda-

mental para el diagnóstico, de hecho, la cuantificación del criocrito se puede asociar con la severidad de los síntomas y se usa para monitorizar la respuesta al tratamiento.

Hallazgos Clínicos	Laboratorio	Histología
Púrpura cutánea	Crioglobulinas circulantes	Vasculitis leucocitoclástica
Úlceras necróticas	Fracción C4 o CH50 baja	Glomerulonefritis membrano-proliferativa
Glomerulonefritis	Factor Reumatoideo positivo	Vasculitis endoneural
Neuropatía periférica	Gammapatía monoclonal	Trombos hialinos en capilares
Artritis no erosiva		Vasculitis necrotizante de pequeño-mediano vaso
Acrocianosis		
Fenómeno de Raynaud		

Tabla 2. Hallazgos que apoyan el diagnóstico de vasculitis crioglobulinémica, adaptado de Ramos-Casals *et al.* Lancet 2012⁴⁰

La puntuación BVAS.v3 (Birmingham Vasculitis Score version 3) es un índice clínico que refleja la actividad de las vasculitis de forma genérica. El resultado final corresponde a la suma ponderada de la afectación en diferentes grupos de órganos (**Figura 5**). Es un sistema de puntuación que se correlaciona bien con la evaluación global de la actividad de la enfermedad y es sensible al cambio ya que incluye la presencia de “remisión” o de “reactivación”⁴⁸. Por este motivo se considera una herramienta útil para evaluar el papel de las terapias inmunomoduladoras en pacientes con VC asociada a VHC, fundamentalmente ineliminables o no respondedores al tratamiento antiviral convencional. Sin embargo, existen pocos datos en la literatura sobre el papel del BVAS antes y tras la terapia antiviral con antivirales directos.

Birmingham Vasculitis Activity Score (version 3)

Patient ID: _____ Date of birth: _____ Total score: _____

Assessor: _____ Date of assessment: _____

Tick an item **only** if attributable to active vasculitis. If there are no abnormalities in a section, please tick "None" for that organ-system. **If all abnormalities are due to persistent disease (active vasculitis which is not new/worse in the prior 4 weeks), tick the PERSISTENT box at the bottom right corner.**

Is this the patient's first assessment?		No	
None	Active disease	None	Active disease
1. General			
Myalgia	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Arthralgia / arthritis	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Fever ≥38° C	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Weight loss ≥2 kg	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
2. Cutaneous			
Infarct	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Purpura	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Ulcer	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Gangrene	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Other skin vasculitis	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
3. Mucous membranes / eyes			
Mouth ulcers	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Genital ulcers	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Adnexal inflammation	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Significant proptosis	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Scleritis / Episcleritis	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Conjunctivitis / Blepharitis / Keratitis	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Blurred vision	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Sudden visual loss	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Uveitis	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Retinal changes (vasculitis / thrombosis / exudate / haemorrhage)	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
4. ENT			
Bloody nasal discharge / crusts / ulcers / granulomata	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Paranasal sinus involvement	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Subglottic stenosis	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Conductive hearing loss	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Sensorineural hearing loss	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
5. Chest			
Wheeze	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Nodules or cavities	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Pleural effusion / pleurisy	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Infiltrate	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Endobronchial involvement	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Massive haemoptysis / alveolar haemorrhage	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Respiratory failure	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
6. Cardiovascular			
Loss of pulses	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Valvular heart disease	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Pericarditis	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Ischaemic cardiac pain	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Cardiomyopathy	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Congestive cardiac failure	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
7. Abdominal			
Peritonitis	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Bloody diarrhoea	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Ischaemic abdominal pain	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
8. Renal			
Hypertension	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Proteinuria >1+	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Haematuria ≥10 RBCs/hpf	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Serum creatinine 125-249 µmol/L*	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Serum creatinine 250-499 µmol/L*	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Serum creatinine ≥500 µmol/L*	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Rise in serum creatinine >30% or fall in creatinine clearance >25%	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
9. Nervous system			
Headache	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Meningitis	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Organic confusion	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Seizures (not hypertensive)	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Cerebrovascular accident	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Spinal cord lesion	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Cranial nerve palsy	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Sensory peripheral neuropathy	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
Mononeuritis multiplex	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
10. Other			
a.	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
b.	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
c.	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
d.	<input type="radio"/>		<input type="radio"/>
PERSISTENT DISEASE ONLY:			
(Tick here if all the abnormalities are due to persistent disease) <input type="checkbox"/>			

Figura 5. Parámetros clínicos evaluados en el Birmingham Vasculitis Score version 3. <http://www.canvasc.ca/pdf/bvasv3.pdf>

Por su relevancia clínica, conviene destacar también la asociación entre el VHC, la VC y el desarrollo de enfermedades linfoproliferativas de células B. Varios metanálisis han reportado una alta prevalencia de infección por VHC en pacientes con linfoma no Hodgkin tipo B (B-LNH)⁴⁹. De hecho, aunque inicialmente se trata de un trastorno benigno, la VC es un trastorno linfoproliferativo que puede predisponer al desarrollo de linfoma hasta en un 5-10% de casos. Se ha descrito que los pacientes con VC presentan un riesgo de LNH 35 veces mayor que la población general⁵⁰⁻⁵². Asimismo, diversos estudios han detectado que la erradicación del virus se asocia a una disminución de la incidencia de linfoma y, por otro lado, la adquisición de respuesta virológica puede anticipar incluso la remisión del proceso linfoproliferativo^{53,54}.

La estrecha asociación entre el VHC y la VC ha promovido que la combinación del tratamiento inmunomodulador y antiviral, sea una pieza clave en la historia natural de estos pacientes. La mayor parte de las manifestaciones clínicas en los pacientes con VC mejoran tras el aclaramiento viral inducido por el tratamiento. Sin embargo, en caso de reaparición de la carga viral tras el tratamiento, las manifestaciones de la VC volvían a aparecer⁵². Un estudio demostró que, en algunos casos, la persistencia de la MC a pesar de la adquisición de respuesta virológica se asociaba a la presencia oculta de un linfoma de células B⁵³.

Además del tratamiento antiviral, el tratamiento inmunomodulador se usa principalmente en aquellos casos de VC con afectación grave del órgano diana. Los glucocorticoides se consideran esenciales cuando existe una afectación orgánica grave; no obstante, su uso está limitado por la importante tasa de efectos secundarios. En este contexto, una vez logrado el control o remisión de la enfermedad, se recomienda reducir la dosis al mínimo o incluso eliminarlos al introducir otros fármacos inmunosupresores. Curiosamente, ni los glucocorticoides ni otros inmunosupresores como la azatioprina, la ciclofosfamida, el micofenolato mofetilo o los recambios plasmáticos, han sido evaluados en ensayos clínicos sino que su uso se ha extendido en base a su eficacia en otros tipos de vasculitis ⁴⁶.

En este contexto, la combinación de rituximab como tratamiento modulador de linfocitos B, en asociación con el tratamiento antiviral, obtuvo tasas de remisión clínica y virológica mayores que el tratamiento antiviral en monoterapia ^{55,56}. Además, en pacientes refractarios o intolerantes al tratamiento antiviral, 2 ensayos clínicos demostraron que el tratamiento con rituximab lograba mayor tasa de remisión de la enfermedad en comparación a otros fármacos inmunosupresores ^{57,58}. Por este motivo, el rituximab se considera actualmente el tratamiento de elección en situaciones refractarias o graves, teniendo en cuenta que su eficacia mejora al combinarlo con el tratamiento antiviral.

Por todo ello resulta evidente que la llegada de los nuevos antivirales de acción directa usados en combinaciones libres de interferón, con su mejor perfil de eficacia y seguridad, anticipan un hito en la historia natural de estos pacientes. No obstante, hasta la fecha no existen suficientes datos de seguridad en esta población. Asimismo, el impacto clínico e inmunológico del aclaramiento del virus con los nuevos antivirales directos en los pacientes con VC no ha sido aún establecido.

1.2 Fibrosis Hepática

1.2.1 Proceso de fibrogénesis hepática

Las enfermedades crónicas del hígado, independientemente de su etiología, producen una acumulación progresiva de fibra colágena en el parénquima hepático. En condiciones normales, el parénquima hepático está formado por una matriz extracelular (MEC) de tejido colágeno sobre la que se asientan las células parenquimatosas (hepatocitos y colangiocitos) así como otras células no parenquimatosas (células estrelladas hepáticas, células endoteliales y células de Kupffer) ^{59,60}.

Tras un daño agudo, incluso tras una destrucción parenquimatosas considerable, el hígado tiene capacidad de restablecer su arquitectura original en un intervalo relativamente corto de tiempo. No obstante, un daño crónico hepático independientemente de la etiología, induce un daño tisular repetitivo que a su vez provoca una alteración de la capacidad regenerativa del hígado. Durante la infección crónica por VHC existe un daño inflamatorio crónico que produce una alteración en la regulación de los procesos de síntesis y degradación de la MEC que a su vez genera la aparición de fibrosis hepática ⁶⁰. La MEC fisiológica se transforma en una MEC cicatricial, constituida principalmente por colágeno fibrilar tipo I y tipo III, proteoglicanos, fibronectina y ácido hialurónico. El colágeno tipo I es el principal constituyente de la MEC cicatricial en el hígado fibrótico. Los principales sistemas reguladores de la degradación de la MEC son las metaloproteasas, que son reguladas a su vez por sus inhibidores tisulares conocidos como TIMP (tissular inhibitor metalloprotease) ⁵⁹⁻⁶¹. El cambio en la constitución de la MEC no sólo tiene consecuencias físicas y mecánicas, como se describe más adelante, sino que también contribuye a la modulación de funciones celulares como el crecimiento, la migración y la expresión de genes.

Sin duda, otro de los principales actores del proceso de fibrogénesis hepática son las células hepáticas estrelladas (**Figura 6**). Las células estrelladas se han postulado como los moduladores principales de la inflamación hepática y de la inmunidad y no solo como objetivos pasivos de citocinas inflamatorias ⁶². Dichas células producen grandes cantidades de componentes de la MEC como colágeno y proteoglicanos y además presentan la capacidad de inhibir la fibrinólisis mediante la producción de TIMP. Las células hepáticas estrelladas activadas adquieren un fenotipo

tipo contráctil, altamente proliferativo y profibrogénico que se perpetuará hasta la desaparición del estímulo inflamatorio. Hasta la fecha se han descrito una serie de citocinas y sus receptores afines que realizan la doble función de incentivar la fibrogénesis así como de promover la interacción con células inflamatorias para modificar la respuesta inmune durante la lesión hepática ⁶⁰.

A medida que avanza la fibrosis, las bandas de colágeno típicas de la etapa final de la cirrosis contienen un gran número de células estrelladas activadas cuya capacidad contráctil les permite responder a estímulos vasoactivos y provocar secundariamente la vasoconstricción del endotelio. La sustitución de la población normal de la MEC por material cicatricial y la pérdida gradual de la morfología hepática provocan un aumento de la resistencia al flujo sanguíneo portal a través del hígado que a la larga sienta las bases para el desarrollo de hipertensión portal en la cirrosis ^{63,64}.

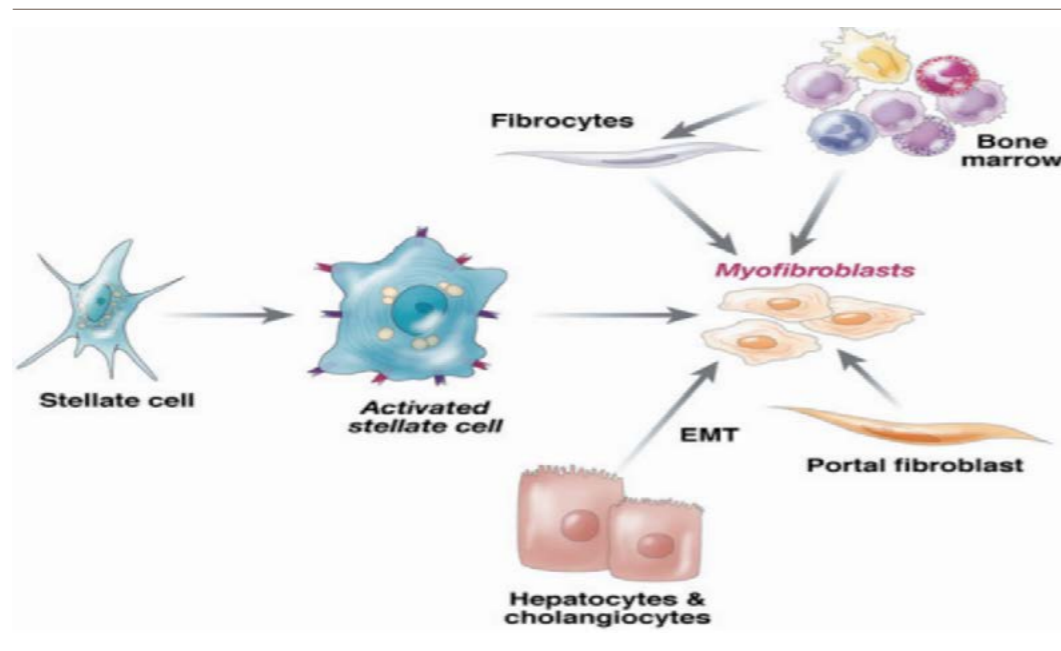


Figura 6. Contribución de las células estrelladas activadas y otros tipos de células fibrogénicas a la fibrosis hepática. Adaptado de Friedman SL *et al.* Gastroenterology 2008 ⁶⁰

1.2.2 Evaluación de la fibrosis hepática: Métodos directos

La evaluación de la fibrosis hepática es un paso clave para el manejo de los pacientes con enfermedad hepática crónica, ya que las complicaciones ocurren fundamentalmente en pacientes con estadios avanzados de fibrosis. La presencia de hipertensión portal, la descompensación clínica y la aparición de hepatocarcinoma se asocian a una menor supervivencia, por lo que identificar de forma temprana a los pacientes con mayor riesgo permite tomar decisiones en cuanto al manejo de los pacientes. La evaluación del grado de fibrosis hepática mediante el análisis histológico de una muestra de tejido hepático (biopsia hepática) sigue siendo el método de referencia para cuantificar la fibrosis ⁶⁵.

Diferentes clasificaciones anatómo-patológicas permiten clasificar la gravedad de una hepatopatía en función del grado de actividad necroinflamatoria (ANI) y del estadio de fibrosis. Entre las diferentes clasificaciones, las más utilizadas son el sistema METAVIR ⁶⁶, la clasificación de Ishak ⁶⁷, la de Knodell ⁶⁸ o la de Scheuer ⁶⁹. En el ámbito de la infección crónica por VHC la escala más usada es la METAVIR que clasifica 5 estadios de fibrosis (del 0 al 4) basados en los cambios de la arquitectura normal secundarios al depósito de fibra (Figura 7).

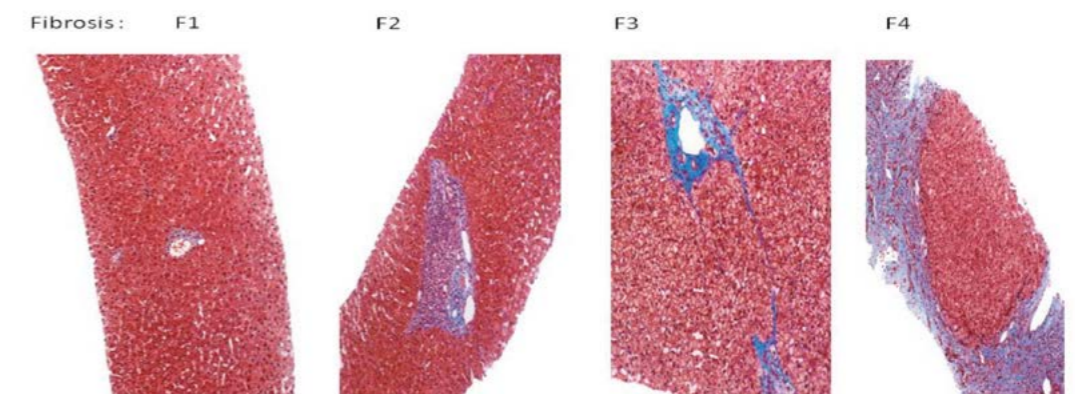


Figura 7. Diferentes estadios de fibrosis basados en la escala METAVIR. Fibrosis 0-1: ausencia de fibrosis o expansión fibrosa portal. F2: fibrosis periportal. F3: puentes o septos de fibrosis entre los espacios porta. F4: formación de nódulos de cirrosis. Imagen adaptada de Faria SC, MR Imaging of Liver Fibrosis: Current State of the Art. Radiographics. 2009 Oct,29(6):1615-35

Sin embargo, entre los principales inconvenientes de la biopsia hepática se encuentra su invasividad, por lo que su realización no está exenta de posibles efectos adversos, especialmente en pacientes con alteración de la coagulación ⁷⁰. Este hecho ha motivado que no se considere una técnica adecuada para monitorizar de forma dinámica el proceso de fibrosis (evaluaciones repetidas a lo largo del tiempo). Además, la fiabilidad de la biopsia para graduar la fibrosis es limitada. La muestra de tejido hepático representa sólo una pequeña parte del hígado por lo que la biopsia puede sobre/infra-estimar el grado de fibrosis dado que la distribución de la fibra puede ser heterogénea en el parénquima hepático ⁷¹. Además, se requiere ingreso hospitalario, un correcto procesado de la muestra así como de un observador experimentado para su idónea interpretación, lo que incrementa su coste ^{70,72}.

Las limitaciones de la biopsia y la necesidad de una evaluación periódica de la enfermedad hepática, dado que la fibrosis es un proceso dinámico, han impulsado la búsqueda de alternativas no invasivas para evaluar el grado de fibrosis hepática.

1.2.3 Evaluación de la fibrosis hepática: Métodos indirectos

I. Marcadores séricos no invasivos

Se han identificado marcadores serológicos implicados directa o indirectamente en el proceso de fibrosis hepática cuya capacidad diagnóstica viene definida por su correlación con la biopsia hepática (método de referencia). Existen dos grandes grupos de marcadores séricos, directos e indirectos.

Los marcadores directos, a diferencia de los indirectos, miden valores sanguíneos de productos de la síntesis o degradación de la matriz extracelular como el colágeno, ácido hialurónico o metaloproteasas. Tienen la ventaja de ser más sensibles pero presentan menor especificidad ya que pueden aumentar en procesos fibrogénicos de otros órganos ⁷³.

El Fibrotest® (macroglobulina alfa 2, la globulina alfa 2 (o haptoglobina), gammaglobulina, apolipoproteína A1, gamma glutamil y bilirrubina total) fue uno de los primeros algoritmos descrito ⁷⁴. Otro marcador sérico directo es el European Liver Fibrosis (ELF), que combina la edad con la medición del péptido amino-terminal

del procolágeno tipo III (PIIINP), el ácido hialurónico (HA) y el inhibidor tisular de la metaloproteasa de matriz tipo 1 (TIMP-1) ⁷⁵. La limitación fundamental de estos marcadores es su elevado coste, algunos son fórmulas patentadas, lo que limita su aplicabilidad en la práctica clínica.

Entre los marcadores indirectos se encuentran combinaciones de variables analíticas usadas en la práctica clínica diaria (transaminasas, plaquetas, colesterol) asociadas con la existencia de fibrosis: los más frecuentemente utilizados son el índice APRI (AST y plaquetas) ⁷⁶, FIB-4 (plaquetas, edad, AST y ALT) ⁷⁷ e índice de Forns (edad, GGT, plaquetas y colesterol) ⁷⁸.

II. Elastografía Hepática

Las características propias de la elastografía hepática como técnica no invasiva, fácil, rápida, reproducible y fiable, la han convertido en la herramienta más usada para evaluar y monitorizar el grado de fibrosis en los pacientes con infección crónica por VHC ⁷⁹. La elastografía hepática se basa en una técnica de ultrasonidos que permite medir la velocidad a la que se propaga una onda elástica a través del tejido hepático ⁸⁰ generando una imagen correspondiente a la onda elástica con un valor de rigidez hepática medida en kilopascales. La onda mecánica que se propaga dentro del hígado evalúa un volumen de parénquima mayor que la biopsia.

Las ventajas de la elastografía de transición (ET) o Fibroscan® son claras: rápida, indolora, reproducible y permite fácilmente la evaluación dinámica de la fibrosis durante la evolución de la enfermedad. No obstante, entre sus limitaciones destaca la imposibilidad de medición en caso de ascitis y la dificultad técnica en caso de pacientes con espacios intercostales estrechos u obesos. En estos pacientes se pueden obtener registros anómalos o ausencia de registros a pesar de realizar múltiples mediciones. De hecho, la tasa de fallo en la obtención de medidas válidas oscila entre 2.4% y 9.4% en diferentes estudios, siendo el índice de masa corporal el factor independiente más influyente ⁸⁰. Esta limitación ha sido parcialmente superada con el desarrollo de sondas especiales para pacientes con índices de masa corporal elevados (sondas XL) ⁸¹. Por el contrario, la presencia de transaminasas elevadas, de colestasis o de congestión, puede sobrestimar el valor de la elastografía ^{82,83}.

Por todo ello se concluye que la interpretación clínica de los resultados de la ET debe ser crítica y realizada por un experto con conocimiento de los datos demográficos del paciente, etiología de la enfermedad y los parámetros de laboratorio.

Evaluación del grado de fibrosis mediante ET en la infección crónica por VHC

El primer paso en la evaluación de la utilidad de una herramienta para medir la fibrosis hepática es su validación (sensibilidad, especificidad y valores predictivos) frente al estándar clínico, en este caso la biopsia hepática. La eficacia de una prueba se expresa como el área bajo la curva ROC (AUROC) que traza la sensibilidad más 1 –especificidad siendo la prueba perfecta aquella cuya AUROC se acerque al 1.0.

Diferentes estudios prospectivos han evaluado la utilidad de la elastografía de transición en los pacientes con infección crónica por VHC mostrando que los valores de elasticidad hepática se correlacionaban con la escala METAVIR. El área bajo la curva para fibrosis significativa ($\geq F2$) oscila entre 0.79-0.83 y se han establecido diferentes puntos de corte para identificar cada estadio de fibrosis (**Tabla 3**).

Autor	Año	Pacientes	F2 (kPa)	F4 (kPa)	S (%) F2/F4	E (%) F2/F4
Castera	2005	183	7.1	12.5	67/87	89/91
Ziol	2005	251	8.6	14.6	56/86	91/96
Arena	2008	150	7.8	14.8	83/94	82/92
Lupsor	2008	324	7.4	11.9	76/87	84/91
Degos	2010	913	5.2	12.9	90/72	32/89
Zarski	2012	382	5.2	12.9	97/77	35/90

Tabla 3. Rendimiento diagnóstico de la elastografía de transición para determinar la presencia de fibrosis $\geq F2$ o $\geq F4$ en diferentes estudios en pacientes con infección crónica por VHC. (S: Sensibilidad, E: especificidad). Adaptado de Castera L *et al.* Gastroenterology 2012⁷³

En los pacientes con hepatitis crónica C, los valores de rigidez hepática superiores a 6.8-7.6 kPa indican una alta probabilidad de fibrosis significativa ($F \geq 2$) en la biopsia. Los valores de corte para la predicción de la cirrosis ($F = 4$) oscilan entre 11.0 y 14 kPa. Es importante remarcar que a pesar de que las AUROC son altas, existe cierto solapamiento entre estadios de fibrosis adyacentes, particularmente en los estadios más leves⁷³. No obstante, la ET es una técnica adecuada para diferenciar claramente ausencia de fibrosis o fibrosis leve de fibrosis significativa y cirrosis, siendo esta diferenciación la más relevante desde un punto de vista clínico para la toma de decisiones en cuanto el manejo y tratamiento del paciente.

III. Otros

Actualmente se han desarrollado otras técnicas de imagen basadas en la elasticidad, que incluyen el ARFI (Acoustic Radiation Force Impulse Imaging) y la resonancia magnética (RM) basada en elastografía.

El ARFI mide una región más pequeña que la ET (10-mm de largo y 6 mm de ancho), pero esta región puede ser escogida por el operador mediante visualización directa por ecografía. Así pues, la principal ventaja de ARFI es que puede ser fácilmente implementado en una máquina de ultrasonido. Sin embargo, los valores de ARFI, en contraste con los valores de TE, tienen un rango estrecho (0.5-4.4 m/seg) lo cual limita las definiciones de los puntos de corte y por tanto, la toma de decisiones en el manejo de los pacientes⁸⁴.

La elastografía RM utiliza un método de contraste que proporciona una imagen acorde a las características de elasticidad hepática que se cuantifica en kilopascals. Entre las ventajas teóricas de la elastografía RM se encuentran su capacidad para analizar casi todo el hígado y su aplicabilidad a pacientes con obesidad o ascitis. No obstante, es una técnica que no se puede realizar en los hígados de pacientes con sobrecarga de hierro por interferencia técnica, es costosa y su realización y aprendizaje requieren tiempo⁸⁵.

1.3 Hipertensión Portal

1.3.1 Definición y estimación

La hipertensión portal se define como la existencia de un incremento patológico de la presión en el territorio venoso esplácnico, que a su vez determina un aumento del gradiente porto-cava por encima de su valor normal (5 mmHg). El método de referencia para evaluar el grado de presión portal es el gradiente de presión venosa hepática o GPVH. El GPVH se corresponde con la diferencia entre la presión suprahepática enclavada (PSHE) y la presión suprahepática libre (PSHL), representativas de la presión de la porta y de la cava, respectivamente ³³.

La evaluación del GPVH se realiza mediante cateterismo de las venas suprahepáticas. Tras la oclusión de la vena suprahepática, se crea una columna de sangre que transmite la presión del territorio vascular precedente, en este caso del territorio sinusoidal. Este valor se corresponde con la PSHE y a su vez, con la presión de la vena porta. El correcto enclavamiento del catéter es fundamental para obtener una medición fiable y debe verificarse siempre que existan variaciones importantes entre las estimaciones. Otras consideraciones para asegurar que el procedimiento es de calidad es descartar la presencia de fístulas venosas, estenosis o confluencias de venas hepáticas distales a la punta del catéter, así como confirmar la buena oclusión al inflar el balón⁸⁶.

1.3.2 Implicaciones clínicas

La presencia de hipertensión portal, y no la disfunción hepática per se, es la causa de la mayoría de las complicaciones de la cirrosis y de la tasa de mortalidad asociada. Existe una estrecha relación entre el GPVH y la aparición de las complicaciones características de la hipertensión portal ⁸⁷.

De hecho, en una cohorte de pacientes compensados sin varices, el GPVH fue el predictor más sólido de descompensación clínica ya que aquellos sujetos con valores inferiores a 10 mmHg tuvieron un 90% de probabilidades de no descompensarse en un periodo de 4 años, mientras que en los que presentaban un gradiente >10 mmHg, la incidencia fue 6 veces mayor ⁸⁸. Asimismo, el grado de hipertensión portal se relaciona directamente con el riesgo de desarrollo y hemorragia por varices. Diversos estudios han demostrado que un HVPG superior a 10mmHg (Hiper-

tensión portal clínicamente significativa [CSPH, en inglés *Clinical Significant Portal Hypertension*]) es un factor de riesgo para el desarrollo de varices. En los pacientes cirróticos sin varices el riesgo de desarrollarlas es de un 5% anual si el GPVH es <10mmHg y del 10% anual si es \geq 10mmHg ⁸⁹.

Asimismo, un gradiente de presión venosa hepática de > 12 mmHg supone mayor riesgo de hemorragia por varices ⁹⁰. Los pacientes con cirrosis y varices presentan una incidencia media anual de hemorragia por varices que oscila entre el 5 y 15%, estimándose un riesgo de hemorragia a los 2 años del 10% en los pacientes con varices de pequeño tamaño y superior al 30% en los pacientes con varices de gran tamaño ⁸⁷.

Por otra parte, una reducción del GPVH \geq 20% respecto el valor basal disminuye significativamente el riesgo de recidiva hemorrágica^{91,92}. Por este motivo, la reducción del GPVH en más del 20% respecto el valor basal o por debajo de 10-12 mmHg se considera el objetivo terapéutico en el tratamiento de la hipertensión portal. Varios estudios longitudinales han demostrado que si el GPVH se reduce por debajo de 12mmHg el riesgo de hemorragia y de recidiva hemorrágica por varices es menor y las varices disminuyen de tamaño pudiendo incluso desaparecer (<10 mmHg) ^{91,93}.

La prevalencia de CSPH en pacientes con cirrosis es muy elevada, del 100% en pacientes con enfermedad descompensada, superior al 70% en los pacientes con enfermedad compensada (con o sin varices esofágicas), y del 50% en los pacientes con enfermedad compensada y sin varices ⁹⁴. En estos últimos la presencia de CSPH es un importante factor pronóstico, ya que predice de forma independiente el desarrollo de varices ⁹¹, el desarrollo de primera descompensación de la cirrosis⁸⁸ y la aparición de hepatocarcinoma ⁹⁵. Por lo tanto, identificar los pacientes con CSPH en la fase compensada de la cirrosis permite una mejor estratificación del pronóstico.

1.3.3 Marcadores no invasivos de Hipertensión Portal

Hasta la fecha no se ha descrito ningún signo clínico o parámetro de laboratorio suficientemente sensible y específico para el diagnóstico no invasivo de la presencia de varices o de CSPH. Entre los parámetros clínicos destaca la presencia de plaquetopenia o esplenomegalia o la combinación de ambos (plaquetas/diámetro esplénico), sin embargo, su valor predictivo dista mucho de ser ideal. Diversos estudios han mostrado que el grado de rigidez hepática medido mediante elasto-

grafía de transición (ET) se relaciona con el GPVH. Varios estudios han demostrado una buena correlación entre ambas técnicas en pacientes compensados con valores de GPVH inferiores a 12mmHg^{96,97}. Sin embargo, en pacientes con HVPG >12 mmHg y en pacientes descompensados la correlación no fue tan buena. Una de las posibles explicaciones es que en contexto de hipertensión portal clínicamente significativa no sólo existe un incremento de fibrosis sino también un aumento del flujo circulatorio que pueda alterar los valores de ET. El mejor punto de corte de ET para identificar un HVPG \geq 10mmHg (CSPH) fue 13.6 kPa en el estudio de Vizutti⁹⁶ y 21 kPa en el estudio de Bureau⁹⁷. Además del valor pronóstico, una de las aplicaciones prácticas de estos puntos de corte sería clasificar aquellos pacientes con cirrosis y HCC tributarios de cirugía en ausencia de CSPH. El estudio de Llop y colaboradores⁹⁸ observó una moderada correlación entre ET y HVPG en una cohorte de⁹⁷ pacientes con cirrosis y HCC potencialmente resecable ($r = 0,552$, $p < 0,001$). Al evaluar la utilidad de los 2 puntos de corte descritos previamente para excluir CSPH, los valores <13.6 kPa tenían una alta sensibilidad (91%), pero baja especificidad (57%) mientras que los valores de ET > 21 kPa presentaban una baja sensibilidad (53%) y una alta especificidad (91%). Como hallazgo destacable, hasta un 35% de los pacientes se encontraban en una "zona gris" con valores de ET entre 13.6 y 21 kPa por lo que no se podían clasificar en ninguno de los grupos siendo indispensable la medición de HVPG.

La elastografía también se ha evaluado para la predicción de la presencia de varices^{96,97,99}. Estos estudios han propuesto puntos de corte óptimos para el diagnóstico de varices entre 13.9 y 21.1 KPa. No obstante, dado que el punto de corte con mayor sensibilidad (13.9 kPa) se superpone con el punto de corte para predecir la presencia de cirrosis, la validez de la ET para descartar la presencia de varices es limitada.

1.4 Tratamiento antiviral en la hepatitis crónica C

1.4.1 Generalidades

El objetivo principal de la terapia antiviral es curar la infección por VHC. Una respuesta virológica sostenida (RVS) se define como un ARN del VHC indetectable 12 semanas (RVS12) o 24 semanas (RVS24) después de la finalización del tratamiento. Una vez adquirida la RVS, más del 99% de los pacientes habrán logrado la curación¹⁰⁰.

El campo de la hepatitis C ha vivido una revolución con la llegada de los nuevos fármacos antivirales de acción directa (DAAs, en inglés *Direct-acting Antiviral Agents*). Hasta el año 2011, la combinación de interferón pegilado (PegIFN) y ribavirina durante 24 o 48 semanas era el tratamiento estándar de los pacientes con infección crónica por VHC. Con este régimen, los pacientes infectados con el genotipo 1 del VHC presentaban tasas de RVS de aproximadamente el 40%-50%¹⁸. Los pacientes infectados con los genotipos del VHC 2, 3, 5, y 6 presentaban tasas de RVS más altas (alrededor de 80%), mientras que aquellos con el genotipo del VHC 4 presentaban tasas de curación intermedias.

En 2011, se autorizó el uso del telaprevir y boceprevir en pacientes con infección por genotipo 1. Estos dos medicamentos fueron la primera generación de DAAs, cuya diana terapéutica es la proteasa NS3-4A del VHC por lo que se conocen como inhibidores de proteasa (IP). Tanto telaprevir y boceprevir deben ser administrados en combinación con PegIFN-a y ribavirina (triple terapia). En los ensayos de fase III en pacientes genotipo 1 y naive (sin tratamiento previo), los regímenes de terapia triple lograron tasas de RVS más altas (65%-75%) que PegIFN-a y ribavirina¹⁰¹⁻¹⁰⁴. Sin embargo, el perfil de efectos secundarios de estas terapias especialmente en pacientes con fibrosis hepática avanzada, hace que actualmente no se recomiende su uso, dado que existen otras opciones más eficaces y mejor toleradas.

En el año 2014 se aprobó el uso en Estados Unidos y Europa de tres nuevos DAAs. Simeprevir, un IP con actividad contra los genotipos 1 y 4 pero con mejor perfil de seguridad y posología más sencilla que telaprevir y boceprevir, daclatasvir, un inhibidor de la enzima NS5A con actividad pangénotípica y sofosbuvir, un análogo nucleótido inhibidor de la polimerasa viral (IPol) NS5B también pangénotípico.

Cada uno de estos tres DAAs se puede utilizar como un componente de un triple régimen en combinación con PegIFN-a y ribavirina, logrando tasas de RVS entre un 60-100% en función del DAA utilizado, el genotipo del VHC, la presencia de mutantes resistentes preexistentes y de la gravedad de la enfermedad hepática ¹⁰⁵. A pesar de que estas combinaciones se toleran mejor que las terapias triples con telaprevir o boceprevir, la presencia de efectos secundarios asociados a PegIFN-a y a la ribavirina ha hecho que estas combinaciones no se consideren primera línea.

En Europa, en el año 2014, con tres DAAs aprobados, se comenzaron a usar combinaciones libres de IFN. Inicialmente la población diana la formaban pacientes con enfermedad hepática avanzada (fibrosis METAVIR F3 o F4 puntuación) y en muchos casos como parte de programas de acceso temprano. La mayor parte de las combinaciones libres de interferón presentan aún hoy en día un IPol análogo de nucleótido (AN) como sofosbuvir como eje central.

La combinación libre de IFN sofosbuvir y simeprevir, con o sin ribavirina, se utilizó a partir de los resultados del estudio de Fase II (COSMOS) en pacientes infectados con el genotipo 1 en el que se logró una RVS en el 93-100% ¹⁰⁶. Los últimos datos de práctica clínica real preliminares de los EE.UU. han mostrado tasas de RVS ligeramente inferiores (~84%) a los del ensayo COSMOS en pacientes con infección por genotipo 1 ¹⁰⁷. La combinación de sofosbuvir y daclatasvir, con o sin ribavirina, también ha sido ampliamente utilizada en pacientes con enfermedad hepática avanzada en toda Europa, sobre la base de los resultados de un estudio de fase II en pacientes infectados por genotipo 1 con tasas de curación entre el 95% y el 100% ¹⁰⁸. La combinación de sofosbuvir y ribavirina está indicada en pacientes infectados con el genotipo 2 (12 semanas) o 3 (24 semanas), obteniéndose tasas de RVS del orden del 80-95% ¹⁰⁹.

En el año 2015 se aprobaron nuevas combinaciones de DAAs en Europa y EE.UU., la combinación en dosis fija de sofosbuvir/ledipasvir (IPol NA/NS5A) y los combos de paritaprevir/ritonavir + ombitasvir (IP+NS5A "2D") con dasabuvir (IP+NS5A+I-Pol NNI "3D"). Estas combinaciones se han convertido en el tratamiento de primera línea de los pacientes con infección crónica VHC (**Figura 8**).

En los estudios ION se analizó la eficacia y seguridad de ledipasvir (LDV)/sofosbuvir (SOF) con o sin ribavirina durante 12-24 semanas en más de 200 pacientes en cada rama de tratamiento ¹¹⁰⁻¹¹². En pacientes naïve las tasas de RVS se situaron entre el 97-100% sin diferencias entre el subtipo del virus (1a o 1b) o la presencia de cirrosis. En pacientes con fracaso previo a un tratamiento basado en interferón (incluyendo triple terapia), la tasa de RVS osciló entre el 94-99%. Un estudio recopiló los datos de más de 500 pacientes con cirrosis tratados con LDV/SOF con o

sin RBV durante 12 o 24 semanas obteniendo una tasa de RVS del 96% sin que la duración del tratamiento modificara la tasa de RVS ¹¹³.

En los estudios de fase III que evaluaron la combinación 3D con o sin RBV en más de 1100 pacientes sin cirrosis se objetivó una cifra global de RVS del 96-99% sin que hubiera diferencias entre las ramas con o sin RBV en pacientes genotipo 1b. No obstante, en pacientes G1a, los valores fueron menores por lo que la recomendación es usar esta combinación con ribavirina ¹¹⁴. En un estudio en más de 300 pacientes con cirrosis, naïves o pre-tratados, la tasa global de RVS fue del 92% (12 semanas) y del 98% (24 semanas). El 100% de los pacientes infectados por G1b alcanzaron RVS, sin embargo, en pacientes G1a se observó un beneficio al prolongar el tratamiento de 12 a 24 semanas (88 vs 94%) ^{115,116}.

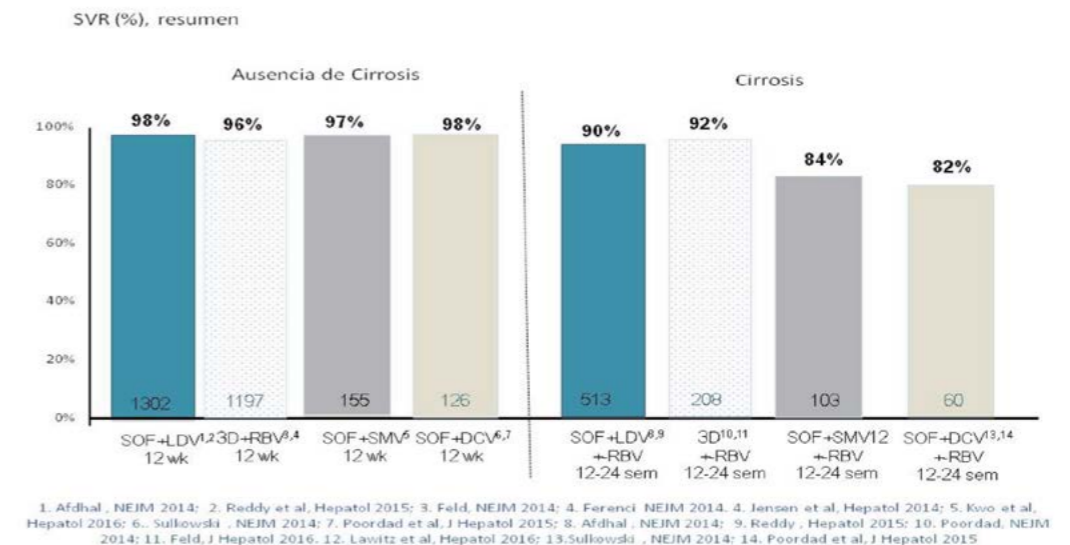


Figura 8. Datos agrupados de RVS en pacientes con genotipo 1 basados en las diferentes combinaciones disponibles (elaboración propia).

Es importante resaltar que estas excelentes tasas de curación fueron confirmadas en los estudios de práctica clínica real¹¹⁷. Por ejemplo, un estudio de práctica clínica español en 1778 pacientes tratados con LDV/SOF y en 1635 pacientes tratados con 3D obtuvo tasas de RVS del 96% y 97%, respectivamente (Crespo J, et al. Presentado en EASL 2016).

Durante el año 2016 se espera, además, la aprobación de dos nuevas combinaciones. Por un lado, el régimen que incluye el IP grazoprevir y el inhibidor NS5A elbasvir para el tratamiento de pacientes con G1 y G4. En un estudio en pacientes naïve G1 sin cirrosis se obtuvieron tasas de RVS del 92% en pacientes G1a y del 99% en pacientes G1b tras 12 semanas de tratamiento. Un análisis de 376 pacientes con cirrosis de nuevo mostró tasas de RVS superiores en pacientes G1b con respecto a 1a (100% y 96%, respectivamente). Esto ha provocado que se recomiende el análisis de sustituciones asociadas a resistencias de la NS5A antes de iniciar el tratamiento (M28A/G/T, Q30D/E/G/H/K/L/R, L31F/M/V, H58D y/o Y93C/H/N/S) y en caso de estar presentes, extender la duración del tratamiento a 16 semanas y asociar RBV¹¹⁸.

Finalmente, se espera la disponibilidad a lo largo de este año de la combinación pangénica de sofosbuvir y velpatasvir (inhibidor NS5A). En un estudio en más de 300 pacientes G1, 24% con cirrosis, 66% naïve y 34% pre-tratados incluyendo fracasos a triple terapia, se alcanzaron tasas de RVS del 99% tras 12 semanas de tratamiento sin RBV^{119,120}.

En los pacientes genotipo 2, las dos primeras líneas de tratamiento con la combinación de sofosbuvir con daclatasvir o velpatasvir. En el estudio de fase 3 ASTRAL-2 en pacientes con genotipo 2 (14% con cirrosis compensada, 86% naïve), la combinación de sofosbuvir y velpatasvir logró tasas de curación del 99%¹²¹. En caso de no disponer de estas combinaciones, el uso de sofosbuvir y ribavirina durante 12-16 semanas estaría aceptado en base a las recomendaciones de las guías clínicas¹⁰.

Las opciones terapéuticas más eficaces en los pacientes genotipo 3 son, de nuevo, la combinación de sofosbuvir y daclatasvir o velpatasvir. El estudio ASTRAL-3 evaluó la combinación sofosbuvir/velpatasvir sin RBV durante 12 semanas en pacientes genotipo 3 (29% con cirrosis y 74% naïve) obteniendo tasas de curación del 98% en naïve sin cirrosis, 93% en naïve con cirrosis, 91% en pre-tratados sin cirrosis y 89% en pre-tratados con cirrosis¹²². Por otro lado, la combinación de sofosbuvir y daclatasvir durante 12-24 semanas logró RVS superiores en pacientes sin cirrosis (97%) que en pacientes cirróticos (60-90% 12 y 24 semanas respectivamente)¹²³. La misma combinación fue evaluada con ribavirina durante 12-16 semanas en pacientes genotipo 3 y fibrosis avanzada (F3-F4) logrando tasas de RVS similares¹²⁴.

En pacientes genotipo 4, las combinaciones recomendadas son sofosbuvir y ledipasvir en base al estudio SINERGY en el que la tasa de eficacia fue del 95%¹⁰; la combinación sofosbuvir y velpatasvir en base al estudio ASTRAL-1 en que se obtuvieron tasas de RVS del 100%¹²⁰, el combo 2D (paritaprevir/ritonavir y ombitasvir)

con resultados de RVS 97-99%¹²⁵, sofosbuvir y simeprevir con datos de RVS 100% en el estudio PLUTO¹²⁶ y, finalmente, la combinación grazoprevir y elbasvir con tasa de eficacia en torno al 96%¹¹⁸.

En la **Tabla 4** se resumen las principales combinaciones antivirales recomendadas en función del genotipo del VHC.

Combinación	Genotipo-1	Genotipo-2	Genotipo-3	Genotipo-4	Genotipos-5/6
Sofosbuvir+RBV	No	No óptima	No óptima	No	No
SOF/LDV±RBV	Sí	No	No	Sí	Sí
SOF/VEL±RBV	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
3D	Sí	No	No	No	No
2D	No	No	No	Sí	No
GZR/EBR±RBV	Sí	No	No	Sí	Sí
SOF+DCV±RBV	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
SOF+SIM±RBV	No óptima	No	No	Sí	No

Tabla 4. Regímenes libres de interferón recomendados actualmente según en función del genotipo del VHC. Adaptado de las "EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016" J Hepatology 2016 (in press).

SOF: sofosbuvir, LDV: ledipasvir, VEL: velpatasvir, 3D: paritaprevir/ritonavir/ombitasvir+dasabuvir, 2D: paritaprevir/ritonavir/ombitasvir, GZR: grazoprevir, EBR: elbasvir, DCV: daclatasvir, SIM: simeprevir, RBV: ribavirina.

1.4.2 Efecto de la respuesta virológica sobre la enfermedad hepática

La adquisición de RVS se asocia a una disminución de la morbimortalidad por todas las causas así como a una mejoría en la calidad de vida. Los pacientes que logran la RVS presentan una incidencia más baja de complicaciones asociadas a la enfermedad hepática (ascitis, encefalopatía, hemorragia por varices y HCC)¹²⁷. Existen diferentes estudios que han analizado la progresión de la enfermedad hepática pre y post-tratamiento detectando una estabilización o incluso disminución de la fibrosis hepática y, en algunos casos, la reversión de la cirrosis. No obstante, se ha detectado que hasta un 1-14% de los pacientes con RVS pueden presentar progresión de la fibrosis a pesar de la erradicación virológica¹²⁸⁻¹³¹.

Mecanismos celulares de regresión de la fibrosis

Algunas características específicas de la matriz extracelular (MEC) pueden explicar, al menos en parte, las diferencias en la reversibilidad de la fibrosis hepática tras la adquisición de RVS. A mayor tiempo de evolución de la fibrosis y de la cirrosis se observa mayor acúmulo de colágeno fibrilar de alta densidad (colágeno tipo I y tipo III) así como de proteoglicanos y otros constituyentes ⁵⁹.

Los modelos murinos han proporcionado un mayor conocimiento acerca de los procesos de reversión de la fibrosis tras un daño hepático de diversa etiología (tioacetamida, CCl4 o ligadura del conducto biliar). En estos modelos se ha detectado que los septos fibrosos más antiguos se caracterizaban por la presencia de *cross-linking* a nivel de la MEC y que la regresión de la fibrosis provocaba un cambio en el patrón de cirrosis de micronodular a macronodular ¹³². El *cross-linking* de las fibras de colágeno incrementa su resistencia a la degradación por lo que es un factor determinante clave en la irreversibilidad de la fibrosis. La elastina, otro componente de la MEC, también puede contribuir. De hecho, se ha demostrado que en el hígado cirrótico existe un acúmulo de elastina dependiente del MMP12 sintetizado por los macrófagos ¹³³. Curiosamente, los macrófagos también son un factor clave en la resolución de la fibrosis hepática. Los resultados de diversos estudios sugieren que existen dos patrones de macrófagos, aquellos con actividad de fibrogénesis y otros fibrinolíticos. Aquellos macrófagos que promueven la resolución de la fibrosis lo hacen a través de la producción de diferentes metaloproteasas que pueden degradar directamente la MEC. Además, los macrófagos contribuyen a la resolución de la fibrosis mediante acciones anti-inflamatorias como por ejemplo la fagocitosis de hepatocitos apoptóticos, que a su vez pueden activar células estrelladas hepáticas o mediante la diferenciación a macrófagos reguladores que producen citocinas supresoras ¹³³. Los macrófagos, por tanto, representan una población altamente heterogénea que puede tener efectos diversos en función del subtipo. Mientras que las células derivadas de monocitos (Mreg/m2c-like macrófagos) contribuyen a la resolución de la inflamación y la fibrosis, el subgrupo de macrófagos Ly-6C+ reclutados a través de monocitos inflamatorios vía CCL2/CCR2 pueden ser responsables de efectos profibrogénicos ¹³⁴.

Previamente se ha discutido la contribución profibrogénica de las células estrelladas hepáticas (ver apartado Fibrogenesis Hepática). La disminución del número de células estrelladas hepáticas activadas es un factor crítico en la reversibilidad de la fibrosis. La apoptosis ha sido descrita como una de las vías mediante la cual disminuye el número de células estrelladas activadas ¹³⁵. Además, existe evidencia de la reversión a quiescencia de las células estrelladas una vez que desaparece el estímulo nocivo ¹³⁶. Sin embargo, estas células persisten con una capacidad aumentada de reactivarse tras una nueva exposición o daño hepático. La persistencia de estas cé-

lulas estrelladas “inactivadas” podría explicar el hecho de que pacientes con daño hepático previo son más sensibles a una fibrosis acelerada tras un nuevo daño (por ejemplo, recaídas de consumo enólico abusivo o recurrencia/reactivación de hepatitis vírica).

Datos clínicos de regresión de la fibrosis (e hipertensión portal) tras la respuesta virológica

La evidencia en humanos del comportamiento de las células estrelladas hepáticas, macrófagos y otras células durante la regresión de la fibrosis es limitada en comparación con la extensa evidencia en modelos murinos. Asimismo, el análisis de la histología pre y post-RVS se ha limitado a la descripción del grado de inflamación y de fibrosis usando escalas cuantitativas como las escalas METAVIR e Ishak. Un estudio de D’Ambrosio y colaboradores ¹³¹ evaluó 38 pacientes con cirrosis histológica pre-tratamiento antiviral tras una media de 67 meses post-RVS, objetivando un descenso significativo de la fibrosis (METAVIR) y del contenido colágeno (cuantificado mediante sirius red). Uno de los hallazgos más relevantes es que el grado de capilarización sinusoidal (tinción CD34) y el número de miofibroblastos (tinción de α -SMA) fueron similares antes y después del tratamiento. Incluso hasta un 30% de los pacientes mostraron un incremento en el score α -SMA tras la adquisición de la RVS independientemente del grado de fibrosis post-tratamiento, lo que sugiere un aumento del número de miofibroblastos potencialmente fibrogénicos.

En un contexto clínico en el que la tendencia es evitar la realización de biopsias hepáticas, sobre todo tras la adquisición de RVS, la mayor parte de los datos clínicos de regresión de fibrosis están basados en técnicas no invasivas. En un estudio ¹³⁷, se evaluaron 993 pacientes mediante elastografía de transición y el marcador no invasivo Fibrotest tras 10 años del tratamiento antiviral. Los resultados mostraron la reversión de la cirrosis en un 49% (24/42) de los pacientes con RVS pero también se detectaron 15 (15/128, 12%) nuevos casos de cirrosis a pesar de la erradicación de la infección. Globalmente, la tasa de regresión de la cirrosis fue tan sólo del 5% a los 10 años de la finalización del tratamiento antiviral.

La presencia de edad avanzada y plaquetopenia se asociaron a una menor posibilidad de regresión de la fibrosis lo que sugiere que una cirrosis “temprana” tiene más posibilidades de revertir que una cirrosis establecida, y que probablemente la presencia de hipertensión portal puede ser un determinante de irreversibilidad. De hecho, varios estudios han demostrado que la RVS se asocia a una reducción del gradiente de presión portal mayor que en los no respondedores ¹³⁸. Sin embargo existen pocos datos todavía de la regresión de la fibrosis en pacientes con cirrosis

e hipertensión portal significativa, fundamentalmente debido a que la mayoría de los estudios publicados disponen de un corto periodo de seguimiento.

Es importante remarcar que la presencia de comorbilidades significativas o factores de riesgo asociados como el consumo de alcohol o la hemocromatosis pueden contribuir significativamente a la progresión de la fibrosis en ausencia de la infección viral activa. Además, diversos estudios epidemiológicos han mostrado que el VHC se relaciona con una alteración en el metabolismo de la glucosa y puede promover el desarrollo de resistencia a la insulina lo que a su vez puede tener un impacto tanto en la adquisición de la RVS como en la progresión de la fibrosis ^{22,23,139}.

Por último, los pacientes con fibrosis avanzada o cirrosis pre-tratamiento antiviral permanecen en riesgo de desarrollar HCC a pesar de haber logrado la curación virológica. No obstante, la adquisición de RVS presenta un efecto positivo en la tasa de desarrollo de HCC. En un meta-análisis que recogió los datos de 30 estudios, la incidencia de HCC fue del 1.05% por persona y año entre los pacientes con RVS y del 3.3% en aquellos no respondedores al tratamiento antiviral ¹⁴⁰. En otro estudio, la incidencia acumulada de HCC en pacientes con fibrosis avanzada (Ishak 4-6) a los 10 años fue del 21.8% sin RVS y del 5.1% con RVS. Entre los factores de riesgo asociados al desarrollo de HCC se encuentran el estadio de fibrosis basal, el sexo masculino, la edad, la presencia de esteatosis o diabetes y el consumo de alcohol ¹²⁷. Actualmente no hay información suficiente para poder discernir si hay pacientes cuya regresión de la fibrosis hepática a largo plazo permite que dejen de estar en riesgo de desarrollo de HCC por lo que de momento se recomienda el cribado semestral de HCC de por vida en caso de fibrosis avanzada F3-F4 pre-tratamiento.

1.4.3 Efecto de la respuesta virológica sobre la crioglobulinemia mixta

Como se ha comentado previamente, las crioglobulinas se pueden detectar hasta en un 25-30% de los pacientes con VHC, en su gran mayoría se trata de crioglobulinemia mixtas. No obstante, sólo un 10-15% de los pacientes con crioglobulinemia presentan sintomatología clínica de tipo vasculitis ⁴³. El tratamiento del agente etiológico, en este caso el VHC, debe plantearse siempre. Los objetivos del tratamiento antiviral en pacientes con vasculitis crioglobulinémica son lograr la erradicación virológica pero también lograr la remisión clínica e inmunológica.

En caso de un daño orgánico grave, la administración de inmunodepresores en monoterapia o, preferiblemente asociados al tratamiento antiviral, ha mostrado una mayor tasa de eficacia ^{55,141}.

La respuesta clínica al tratamiento antiviral ha sido limitada tanto por la propia eficacia virológica como por la aparición de efectos adversos. Un estudio demostró que la presencia de crioglobulinemia mixta se asociaba a una peor respuesta al tratamiento antiviral ¹⁴². Además de los propios efectos adversos del tratamiento, en los pacientes con vasculitis crioglobulinémica se ha descrito el desarrollo de anemia hemolítica durante el tratamiento y la exacerbación de manifestaciones vasculíticas ⁴⁶. No obstante, la mayor parte de los estudios encontraron una asociación clara entre la adquisición de respuesta virológica y la respuesta clínica (remisión de sintomatología) e inmunológica (disminución criocrito, aumento complemento y descenso de FR) ^{38,141,142}.

La aprobación de los primeros DAAs, los inhibidores de proteasa telaprevir y boceprevir, mejoró la barrera de la eficacia virológica logrando tasas de curación en pacientes con genotipo 1 cercanas al 70%. No obstante, su propio perfil de seguridad y la necesidad de administrarlos en combinación con interferón y ribavirina, supuso un aumento de la tasa de efectos secundarios ¹⁴³.

La llegada de las nuevas combinaciones de DAAs libres de interferón puede suponer un hito en la historia natural de los pacientes con vasculitis crioglobulinémica. Debido al mayor perfil de seguridad y de eficacia (>90%), se ha establecido que la presencia de manifestaciones extrahepáticas asociadas al VHC, incluido la vasculitis crioglobulinémica, es una indicación de tratamiento antiviral con independencia del grado de enfermedad hepática ¹⁰. No obstante, hasta la fecha todavía existen pocos datos de la seguridad de estos fármacos en pacientes con crioglobulinemia mixta.

En 2015 se publicaron los primeros resultados con terapias basadas en agentes antivirales directos. En un estudio ⁵⁵ en el que se trataron 30 pacientes con vasculitis crioglobulinémica con triple terapia basada en telaprevir o boceprevir, la tasa de curación virológica fue del 67%. A nivel de respuesta clínica de la vasculitis, ésta se relacionó directamente con la adquisición de RVS. El 70% (14/20) de los pacientes con RVS presentaron una respuesta clínica completa y el 30% (6/20) parcial. De los 10 no respondedores, 6 pacientes presentaron respuesta clínica completa y 4 parcial. La púrpura cutánea desapareció en 19/20 pacientes, la neuropatía en 6/17, la afectación articular en 11/13 y la nefropatía en 5/7. La puntuación media del BVAS bajó de 8[3-16] a 0 [0-5]. Al final del seguimiento (semana 72), el criocrito se había negativizado en un 54% de los pacientes. Sin embargo, casi la mitad de los pacientes presentaron algún efecto adverso, principalmente de tipo hematológico. El 93% de los pacientes precisó tratamiento con EPO por anemia, un 47% transfu-

sión sanguínea y un 7% factores estimulantes de colonias por neutropenia. Todo ello hace que actualmente estos tratamientos no se recomienden en pacientes con VC asociada al VHC y hayan sido sustituidos por los regímenes libres de interferón.

El estudio VASCUVALDIC¹⁴⁴ reportó por primera vez la eficacia y seguridad de una combinación libre de interferón en pacientes con VC. Veinticuatro pacientes con VC asociada al VHC recibieron tratamiento basado en sofosbuvir y ribavirina durante 24 semanas. A las 12 semanas de la finalización del tratamiento, un 64% de pacientes presentaban RVS. Esta baja tasa de respuesta se debe a que un 50% de los pacientes estaban infectados por genotipo 1, en el que se ha demostrado que este régimen antiviral no es óptimo. Aún así, 21 pacientes (87%) adquirieron remisión clínica completa tras el tratamiento y un 46% lograron negativizar el criocrito. La tasa de efectos adversos fue baja y de perfil leve.

Sise y colaboradores¹⁴⁵ reportaron los resultados de la combinación de sofosbuvir asociado a simeprevir o a ribavirina en 12 pacientes con VC, de los cuales 7 presentaban afectación renal. La tasa de RVS a las 12 semanas fue del 83%. Cuatro de 9 pacientes evaluados (44%) presentaron negativización del criocrito y en aquellos pacientes con afectación renal, los niveles de creatinina y proteinuria mejoraron tras el tratamiento antiviral.

Recientemente un grupo italiano ha publicado los resultados tras el tratamiento con regímenes basados en sofosbuvir (asociado a ribavirina, simeprevir, daclatasvir o ledipasvir) en una cohorte de 44 pacientes con VC¹⁴⁶. Las principales manifestaciones clínicas de la VC en la cohorte fueron: púrpura (73%), artralgia (59%), debilidad (77%), neuropatía periférica (63%), Raynaud (32%), afectación renal (89%), síndrome seco (41%) y úlceras cutáneas (14%). Dos de los pacientes presentaban, además, un linfoma de células B. En este estudio, la respuesta clínica se consideró total si desaparecían todos los síntomas asociados a la VC, completa si mejoraban todos y parcial si mejoraban al menos la mitad de los síntomas. A las 24 semanas de finalización del tratamiento antiviral, la tasa de RVS fue del 100% y todos los pacientes habían experimentado respuesta clínica siendo ésta total en un 36%, completa en 41% y parcial en 23%. En la misma línea, la puntuación del BVAS bajó de 5.4 [± 3.5] a 2.3 [± 2.2] a las 12 semanas de finalización del tratamiento y a las 24 semanas a 1.3 [± 1.7]. La respuesta inmunológica a las 12 semanas (todos los pacientes evaluados) fue completa (negativización del criocrito) en un 32% de los pacientes, parcial en un 39% y nula (disminución de <50% del valor basal) en 29%. En los dos pacientes con linfoma la sintomatología clínica y los niveles de crioglobulinas mejoraron, no obstante no se objetivó una mejoría de los parámetros hematológicos (linfocitosis). A pesar de que hasta un 59% de los pacientes presentó algún efecto adverso durante el tratamiento éstos fueron leves y no hubo ningún caso de discontinuación precoz del tratamiento.

Todos los estudios mencionados coinciden en un aumento de la tasa de respuesta virológica asociada a un mejor perfil de seguridad incluso en aquellos pacientes con VC graves. En asociación al mayor porcentaje de erradicación virológica se ha reportado un aumento de la tasa respuesta clínica y, por tanto, una mayor probabilidad de remisión completa o parcial de los síntomas asociados a la VC. No obstante en algunos casos persiste un cierto grado de afectación renal o de neuropatía tras el tratamiento antiviral, lo que sugiere que este tipo de afectación orgánica puede presentar una mejoría más lenta. Asimismo, todavía existe un porcentaje de pacientes con criocrito positivo tras el tratamiento cuyo significado clínico es aún desconocido. No obstante, estos resultados tan satisfactorios hacen pensar que los regímenes libres de interferón van a lograr cambiar el paradigma de la VC asociada a VHC en los que el tratamiento inmunosupresor quedaría limitado a aquellos pacientes con sintomatología orgánica grave.

2. Hipótesis y objetivos

Estudio 1:

Predicting the development of liver cirrhosis by simple modelling in patients with chronic hepatitis C.

Sabela Lens, Ferran Torres, Marc Puigvehí, Zoe Mariño, María-Carlota Londoño, Stella Martínez, Ignacio García-Juárez, Ángeles García-Criado, Rosa Gilabert, Concepció Bru, Ricard Solà, Jose María Sánchez-Tapias, Jose Antonio Carrión, Xavier Forns.

Aliment Pharmacol Ther 2016, 43: 364–374

Factor impacto 6.32

Hipótesis:

El objetivo principal del tratamiento antiviral contra el VHC es evitar la progresión de la enfermedad y el desarrollo de cirrosis y sus complicaciones. Aunque en el contexto de la infección crónica por VHC la progresión de la fibrosis es altamente variable, aproximadamente un 15-20% de los pacientes desarrollan cirrosis en el transcurso de su enfermedad. En un estudio basado en una cohorte alemana con fecha conocida del momento de la transmisión del VHC, a los 35 años de la infección un 15% de los pacientes había desarrollado cirrosis, siendo este porcentaje mayor en aquellos pacientes que no habían logrado una RVS tras el tratamiento antiviral³⁰. Sin embargo, debido a que se necesitan amplias cohortes de pacientes con fibrosis leve con un periodo de seguimiento prolongado, actualmente existen pocos datos de los factores asociados al desarrollo de cirrosis. En el momento del artículo, el uso de agentes antivirales de acción directa en terapias libres de interferón estaba únicamente limitado a aquellos pacientes con diagnóstico establecido de cirrosis debido al elevado coste del mismo. En este contexto, el uso limitado de estos fármacos hacía que la cuidadosa selección de los pacientes con mayor riesgo de progresión durante los siguientes años fuera primordial. Nuestra hipótesis de trabajo era que mediante una selección adecuada de variables en el paciente con hepatitis C es posible predecir, con elevada fiabilidad, el riesgo de desarrollar cirrosis en los próximos años.

Objetivos:

- Describir las características clínicas y bioquímicas de los pacientes con infección crónica VHC no respondedores a tratamiento antiviral con o sin progresión a cirrosis durante el seguimiento.
- Identificar aquellos factores asociados al desarrollo de cirrosis y construir un modelo matemático que permita identificar el riesgo individual de cirrosis.
- Validar el modelo en una segunda cohorte de pacientes y estratificar a los pacientes en tres grupos de riesgo (bajo, intermedio o alto) de desarrollo de cirrosis.

Estudio 2:

Association between severe portal hypertension and risk of liver decompensation in patients with hepatitis C, regardless of response to antiviral therapy.

Sabela Lens, Diego Rincón, Montserrat García-Retortillo, Agustín Albillos, Jose Luís Calleja, Rafael Bañares, Juan González-Abraldes, Jaume Bosch, Jose María Sánchez-Tapias, Xavier Forns, Juan Carlos García-Pagán

Clin Gastroenterol Hepatol. 2015 Oct, 13(10):1846-1853.

Factor impacto 7.68

Hipótesis:

En pacientes con cirrosis compensada, la medición del gradiente de presión venosa hepática (GPVH) predice el riesgo de complicaciones asociadas a la presencia de hipertensión portal⁸⁸. De hecho, la presencia de un GPVH ≥ 10 mmHg (hipertensión portal clínicamente significativa) se ha asociado a un mayor riesgo de descompensación clínica durante el seguimiento, carcinoma hepatocelular y muerte^{88,95}. Los resultados de estudios previos sugieren que la adquisición de RVS tras el tratamiento antiviral se asocia a una reducción del GPVH incluso en pacientes con cirrosis avanzada. Esto se deba probablemente a la disminución de la actividad necroinflamatoria tras la erradicación virológica y a medio-largo plazo, a la regresión de la fibrosis¹⁴⁷. Sin embargo, los datos sobre el impacto de la curación en aquellos pacientes con cirrosis e hipertensión portal clínicamente significativa establecida son escasos por lo que se desconoce si realmente la adquisición de la RVS logra modificar el curso evolutivo de estos pacientes. Entre otros factores, el uso de terapias basadas en interferón en los pacientes con mayor grado de presión portal era limitado debido al riesgo de efectos secundarios potencialmente graves durante el tratamiento¹⁸. No obstante, esta información es de gran utilidad clínica en contexto de la aprobación de los nuevos agentes antivirales directos, con mejor perfil de eficacia y seguridad, ya que una gran proporción de pacientes con cirrosis avanzada e hipertensión portal significativa podrán recibir tratamientos antivirales libres de interferón¹⁰. Nuestra hipótesis es que en efecto, en un subgrupo de pacientes es posible que se produzca un descenso significativo de presión portal tras la

RVS y que existen variables que permiten identificar en qué pacientes se va a producir esta mejoría.

Objetivos:

- Evaluar el impacto de la RVS en la historia natural (descompensación clínica, desarrollo de carcinoma hepatocelular y supervivencia) de pacientes con cirrosis e hipertensión portal clínicamente significativa.
- Identificar los factores clínicos asociados específicamente al desarrollo de descompensación clínica en pacientes con cirrosis e hipertensión portal clínicamente significativa.
- Evaluar si el grado de hipertensión portal se asocia a la tasa de RVS tras el tratamiento antiviral.
- Estudiar si los cambios precoces en el GPVH (12 semanas de tratamiento antiviral) se asocian con la reducción del GPVH tras el tratamiento antiviral.

Estudio 3:

Virological, clinical and immunological outcomes of patients with hepatitis C virus-associated cryoglobulinemia treated with direct-acting antivirals.

Martín Bonacci*, Sabela Lens*, María-Carlota Londoño, Zoe Mariño, Maria C. Cid, Manuel Ramos-Casals, Jose María Sánchez-Tapias, Xavier Forns, José Hernández-Rodríguez

(*) Ambos autores comparten primera autoría

Clin Gastroenterol Hepatol. 2016 (Accepted)

Factor impacto 7.68

Hipótesis:

La presencia de crioglobulinemia mixta se detecta hasta en un 40-60% de los pacientes con VHC, no obstante sólo un 10-15% presentan manifestaciones asociadas a la vasculitis crioglobulinémica (VC)⁴⁰. Se ha descrito que aquellos pacientes con crioglobulinemia mixta asintomática, presentan mayor riesgo de desarrollar VC durante el seguimiento. Sin embargo, actualmente la presencia de crioglobulinemia asintomática no es indicación de priorización de tratamiento antiviral¹⁰. La presencia de VC se asocia a una mayor morbimortalidad durante la historia natural de los pacientes con hepatitis C por lo que el tratamiento antiviral de estos pacientes está indicado con independencia del grado de enfermedad hepática¹⁰. En la era del interferón, la presencia de VC se consideraba un factor asociado a baja tasa de respuesta virológica. Además, el tratamiento basado en interferón provocaba una alta tasa de efectos adversos que eran causa de suspensión precoz del tratamiento con frecuencia en los pacientes VC. En casos de afectación orgánica severa o no respuesta tras el tratamiento antiviral, se ha demostrado que la asociación de glucocorticoides o agentes inmunomoduladores como el rituximab puede ser beneficiosa, no obstante, el tratamiento prolongado con estos agentes no está exento de efectos secundarios⁴⁶.

Por tanto, hasta la llegada de los agentes antivirales directos (DAAs), los pacientes con VC se consideraban una población especial en necesidad urgente de tratamiento. Nuestra hipótesis de trabajo es que las elevadas tasas de RVS que muy probablemente se obtendrán en estos pacientes revertirán en una mejoría signifi-

cativa de los síntomas asociados a la VC e incluso que en pacientes con crioglobulinemia asintomática la erradicación del virus podría comportar la desaparición de las crioglobulinas circulantes.

Objetivos:

Primarios

- Analizar la tasa de respuesta virológica (RVS12) con agentes antivirales directos en pacientes con crioglobulinemia mixta asociada al VHC.
- Evaluar la tasa de respuesta clínica en pacientes con vasculitis crioglobulinémica tras el tratamiento antiviral.
- Evaluar la respuesta inmunológica en pacientes con crioglobulinas circulantes (con o sin vasculitis) tras el tratamiento antiviral.

Secundarios:

- Analizar el impacto del tratamiento antiviral con DAAs sobre el tratamiento inmunopresor (reducción de dosis o suspensión)
- Identificar posibles factores predictivos asociados a la respuesta clínica o inmunológica.

3. Copia de los artículos originales

Predicting the development of liver cirrhosis by simple modelling in patients with chronic hepatitis C

S. Lens*, F. Torres^{†,‡}, M. Puigvehí[§], Z. Mariño*, M.-C. Londoño*, S. M. Martínez*, I. García-Juárez*, Á. García-Criado[¶], R. Gilabert[¶], C. Bru[¶], R. Solà[§], J. M. Sanchez-Tapias*, J. A. Carrión[§] & X. Forns*

*Liver Unit, Hospital Clinic, IDIBAPS, CIBEREHD, Barcelona, Spain.

[†]Biostatistics and Data Management Platform, IDIBAPS, Hospital Clinic, Barcelona, Spain.

[‡]Biostatistics Unit, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

[§]Liver Section, Gastroenterology Department, Hospital del Mar, IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

[¶]CDIC, IDIBAPS, Hospital Clinic, Barcelona, Spain.

Correspondence to:

Dr S. Lens, Liver Unit, Hospital Clinic, IDIBAPS and CIBEREhd, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain.
E-mail: slens@clinic.ub.es

Publication data

Submitted 1 April 2015
First decision 9 May 2015
Resubmitted 19 June 2015
Resubmitted 30 August 2015
Resubmitted 21 October 2015
Accepted 21 October 2015

This article was accepted for publication after full peer-review.

SUMMARY

Background

Data are scarce on the natural history of chronic hepatitis C (CHC) in patients with mild hepatitis C who did not respond to anti-viral therapy.

Aim

To predict the risk of progression to cirrhosis, identifying patients with the more urgent need for therapy with effective anti-virals.

Methods

A cohort of 1289 noncirrhotic CHC patients treated with interferon-based therapy between 1990 and 2004 in two referral hospitals were followed up for a median of 12 years.

Results

Overall, SVR was achieved in 46.6% of patients. Data from a randomly split sample ($n = 832$) was used to estimate a model to predict outcomes. Among nonresponders ($n = 444$), cirrhosis developed in 123 (28%) patients. In this group, the 3, 5 and 10-year cumulative probabilities of cirrhosis were 4%, 7% and 22%, respectively, compared to <1% in the SVR-group ($P < 0.05$). Baseline factors independently associated with progression to cirrhosis in nonresponders were: fibrosis \geq F2, age >40 years, AST >100 IU/L, GGT >40 IU/L. Three logistic regression models that combined these simple variables were highly accurate in predicting the individual risk of developing cirrhosis with areas under the receiving operating characteristic curves (AUC) at 5, 7 and 10 years of \sim 0.80. The reproducibility of the models in the validation cohort ($n = 457$, nonresponders = 244), was consistently high.

Conclusions

Modelling based on simple laboratory and clinical data can accurately identify the individual risk of progression to cirrhosis in nonresponder patients with chronic hepatitis C, becoming a very helpful tool to prioritise the start of oral anti-viral therapy in clinical practice.

Aliment Pharmacol Ther

INTRODUCTION

Treatment of chronic hepatitis C (CHC) using a combination of pegylated interferon and ribavirin (PR) results in a sustained virologic response (SVR) in ~50% of treated patients.¹ New direct anti-viral therapies (DAAs) have been approved in the U.S and Europe and have become the new standard of care for CHC therapy.² Besides increased efficacy, one of the main advantages of these drugs is their excellent safety profile and the possibility of achieving SVR in an all-oral interferon-free combination.^{3–7} Nevertheless, the wide use of such drugs implies a high economical burden so the Health Care Systems of many countries will not afford treating all HCV-infected patients. In this setting, a careful selection of patients is essential, at least during the next few years.

The main goal of viral clearance in patients with chronic hepatitis C is to avoid progression to liver cirrhosis and its complications. Although the progression rate of liver fibrosis in patients with CHC is highly variable, cirrhosis develops in approximately 15–20% of patients over time.⁸ A community-based study in Germany in patients with known data of HCV infection provided evidence of disease progression 35 years after infection, with the highest proportion of patients with clinical signs of cirrhosis in the non-SVR group (15%).⁹

A recent study established a risk score to assess long-term mortality among patients with advanced fibrosis¹⁰; however, due to the slow progression of CHC, large cohorts and long follow-up periods are necessary to reach solid conclusions in patients with mild fibrosis.

The main aim of this study is to identify which factors are related to disease progression in patients with chronic hepatitis C who did not respond to anti-viral therapy and are potential candidates for oral anti-viral treatment. A common question in patients, particularly in those with mild disease who may not fulfil criteria for drug reimbursement, is if receiving anti-viral therapy can be delayed and, more importantly, for how long.

PATIENTS AND METHODS

Patients and study design

This is a retrospective-prospective cohort study performed at two referral centres in Barcelona (Hospital Clinic and Hospital del Mar). The cohort study included 1289 patients with noncirrhotic chronic hepatitis C who received anti-viral therapy between 1990 and 2004. Cirrhosis was excluded clinically and by histological assessment at baseline. Patients with other causes of liver disease (HBV infection, hemochromatosis, autoimmune

hepatitis, primary biliary cirrhosis and Wilson's disease) and those coinfecting with the HIV were excluded from the study.

Follow-up started after the last dose of interferon and ended in December 2013, at death or at the last follow-up visit. Physical examination and complete blood testing were performed monthly during anti-viral therapy and 6 months after treatment interruption. Thereafter, all patients underwent at least yearly laboratory tests and an abdominal ultrasound (US) every 2 years. In patients with bridging fibrosis at the time of baseline liver biopsy, or in those who developed cirrhosis during follow-up, laboratory tests and ultrasonographic studies were performed every 6 months and upper gastrointestinal endoscopy every 2 years. All patients provided written informed consent to data handling in accordance with a protocol approved by the local Ethics Committee.

Liver histology

Percutaneous liver biopsies were performed under local anaesthesia by expert radiologists. Specimens were fixed, paraffin-embedded, and stained with haematoxylin-eosin and Masson's trichrome. Histological grade and stage were determined according to the METAVIR scoring system.¹¹ Liver fibrosis was considered significant if located beyond the portal tract ($F \geq 2$).

Anti-viral treatment

Treatment regimens varied over time. Interferon monotherapy was the standard of care from 1990 to 1996. From 1997 all treated patients received combined treatment with interferon and ribavirin (pegylated alfa-2a or 2b after 2001): 24-week regimens for genotype 2 and 3 HCV-infected patients and 24/48-week regimens for genotype 1 HCV-infected patients. Sustained virological response (SVR) was defined as undetectable serum HCV-RNA 24 weeks after discontinuation of anti-viral treatment. Patients not achieving this criterion were defined as nonresponders.

Ultrasonographic assessments

All abdominal US studies were performed by expert radiologists. The more recent abdominal ultrasound study was reviewed by two expert radiologists (AGC and RG). For this purpose, saved images were recovered and the following characteristics were assessed blindly: presence of surface nodularity, portal vein diameter greater than 12 mm and splenomegaly (spleen size > 12 cm). In patients with ultrasonographic evidence of liver cirrhosis, all previous follow-up ultrasound studies were reviewed

in order to establish the first in which cirrhosis could be established.

Outcome measures

The main aim of our study was to identify the variables independently related to the development of liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis who failed to achieve SVR after treatment. Although liver biopsy remains as the gold standard for the diagnosis of liver cirrhosis, repeated biopsies are not regularly performed in patients with chronic hepatitis C since they do not allow for a dynamic approach when evaluating disease progression in patients with CHC. Therefore, the diagnosis of liver cirrhosis during follow-up was based on the presence of at least one of the following criteria: (i) presence of F4 fibrosis stage in a liver biopsy; (ii) presence of portal hypertension, defined as an hepatic venous pressure gradient ≥ 6 mmHg or presence of gastroesophageal varices in an upper endoscopic study; (iii) presence of at least two signs of cirrhosis (nodular liver surface, portal vein diameter >12 mm, spleen size >12 cm) in two consecutive ultrasound studies.^{12–14} The date of cirrhosis was established as the earliest date at which any of the previous criteria was present. It is important to note that US examinations in patients with chronic hepatitis C are specifically aimed at excluding the presence of cirrhosis and, in patients with evidence of cirrhosis, at excluding the presence of hepatocellular carcinoma (HCC).

The effects of anti-viral therapy on the development of clinical liver decompensation or HCC during follow-up were analysed. Clinical liver decompensation was defined as the occurrence of ascites, spontaneous bacterial peritonitis (SBP), hepatic encephalopathy or variceal bleeding at any time during follow-up.

Statistical analyses

Continuous variables are reported as median and interquartile range (percentiles 25–75%) and categorical variables as absolute and relative frequencies. Groups were compared using the Mann–Whitney test for continuous variables and the Fisher's exact test for the categorical ones. The main endpoint was the occurrence of cirrhosis and clinical liver decompensation during follow-up. The survival function for cirrhosis development was estimated by means of the Kaplan–Meier method. Survival distributions were compared using the log-rank test for the univariate testing, and Cox proportional hazard models were used for the multivariate analyses and to estimate hazard ratios [HR (95% CI)]. Logistic regression models were used to study the predictors of cirrho-

Prediction of cirrhosis development in HCV patients

sis development at 5, 7 and 10 years and of liver events (hepatic decompensation or HCC) at 7 and 10 years in nonresponder patients. Variables with a 10% significance level on univariate testing were included in the multivariate analysis. In selecting the final model, we constructed receiver operating characteristic (ROC) curves for the multivariate models, and then chose the model with the greater area under the curve (AUC). Data from a randomly generated split-sample of 832 patients (2/3) were used to estimate the model, and data from the remaining 457 patients (1/3) were used for validation. Split was performed stratifying by centre and response to therapy. Each of the variables included in the model was analysed to rule out any significant differences between the estimation and the validation cohorts. The analysis was performed with SAS version 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Significance was established at a two-sided *P*-value of 0.05.

RESULTS

Patients' characteristics

The baseline characteristics of the 1289 patients included in the study are summarised in Table 1. Most patients included in this study had mild fibrosis (METAVIR F0–F1) at the time of treatment initiation (76%), whereas only 22% had fibrosis expansion beyond the portal tract (F2) or bridging fibrosis (F3). Sixty-seven (5%) patients did not undergo a liver biopsy or had a biopsy that was considered insufficient for establishing the fibrosis stage, but they were considered noncirrhotic based on clinical, laboratory and US criteria. The presence of any of these criteria was also discarded in patients with histological assessment to exclude liver biopsy sampling error. As expected in our geographical area, most patients (67%) were infected with genotype-1. SVR was achieved in 492 (38%) patients after the first treatment course. One-hundred nine patients obtained SVR after a second treatment course; the remaining 688 (53.4%) individuals were considered nonresponders. Patients were followed up for a median of 12 years (IQR 9–16).

Overall, 207 (16%) patients developed cirrhosis during follow-up. First suspicion of cirrhosis diagnosis was based on US criteria in 174 patients (84%). Importantly, only 13 (2.2%) of those who achieved SVR ($n = 601$) were classified as cirrhotics during follow-up in the whole cohort. Seven of these patients had bridging fibrosis (F3) at baseline. The remaining six patients (F0–1 at baseline) achieved SVR during a second course of anti-viral therapy 8–10 years after the first treatment, poten-

Table 1 | Characteristics of patients in the estimation and validation groups (total n = 1289)

	Cohorts		P-value†
	Estimation (n = 832)*	Validation (n = 457)*	
Age (years)	40 (33–50)	40 (33–50)	0.96
Sex (males), n (%)	533 (64.1%)	287 (62.8%)	0.67
AST (IU/L)	59 (42–83)	53 (40–84)	0.20
ALT (IU/L)	102 (69–150)	92 (68–153)	0.15
GGT (IU/L)	35 (22–56)	38 (23–62)	0.27
AP (IU/L)	157 (131–190)	160 (135–195)	0.15
Glucose (mg/dL)	93 (86–101)	93 (87–101)	0.44
Cholesterol (mg/dL)	173 (149–198)	173 (149–200)	0.85
Platelets (×10 ⁹)	193 (163–228)	198 (163–233)	0.33
APRI	0.68 (0.5–1)	0.63 (0.4–1.1)	0.22
FIB-4	1.19 (0.8–1.6)	1.17 (0.8–1.7)	0.36
Forns	4.5 (3.6–5.3)	4.46 (3.4–5.6)	0.85
HCV genotype			
1a	89 (11.0%)	57 (12.8%)	0.40
1b	445 (54.8%)	255 (57.0%)	
2	51 (6.3%)	22 (4.9%)	
3	122 (15.0%)	63 (14.1%)	
4	41 (5.0%)	26 (5.8%)	
Nontypable/unavailable	64 (7.9%)	24 (5.4%)	
Liver fibrosis (baseline)			
Minimal/portal fibrosis (F0/F1)	612 (78.2%)	318 (73.3%)	0.22
Fibrosis beyond portal tract (F2)	94 (11.4%)	58 (12.7%)	
Bridging fibrosis (F3)	74 (8.9%)	58 (12.7%)	
Insufficient material/No biopsy	44 (5.3%)	23 (5.0%)	
SVR (1st treatment) n (%)	316 (38.0%)	176 (38.5%)	0.98
SVR (final treatment) n (%)	388 (46.6%)	213 (46.6%)	0.88
Hospital Clinic n (%)	580 (69.7%)	316 (69.1%)	0.85
Follow-up (years)	12 (9–16)	12 (9–16)	0.73
Cirrhosis on follow-up n (%)	130 (15.6%)	77 (16.8%)	0.58
Decompensation or HCC n (%)	50 (6.0%)	33 (7.2%)	0.41
Death on follow-up n (%)	43 (5.2%)	26 (5.7%)	0.79

* Qualitative variables are expressed as n (%) and quantitative variables as median and interquartile range (P25–P75).
 † Inferential analysis using the Fisher's exact test for nominal variables and the Mann-Whitney test for the rest of variables.

tially explaining fibrosis progression from baseline. In addition, one patient concomitantly presented alcohol abuse which possibly contributed to the development of cirrhosis. There were no significant differences between the estimation and validation cohort in any of the assessed variables.

Predictors of cirrhosis in the estimation cohort

In the estimation cohort (n = 832), the cumulative probabilities of developing cirrhosis among nonresponders (n = 123/444, 28%) were 4%, 7%, 12% and 22%, at 3, 5, 7 and 10 years respectively. For patients who had achieved SVR (n = 7/388), the cumulative probabilities of developing cirrhosis were less than 1% at all time points (Log-rank P < 0.001; Figure 1).

Analysing which variables predicted the occurrence of cirrhosis in nonresponders was of major interest, since cirrhosis developed almost exclusively in this group (Table 2).

Based on multivariate analysis, the only variables identified as independent predictors of cirrhosis were age, fibrosis stage, GGT and AST at baseline (Table 3).

APRI, FIB-4 and Forns scores were also independent predictors of cirrhosis development if the individual variables contained in the scores were removed from the analysis (data not shown). As expected, when performing the same analysis in the overall estimation cohort (responders and nonresponders), the same variables were identified as independent predictors for cirrhosis development, as well as failure to achieve virological response.

Figure 1 | Survival function for cirrhosis observed in patients achieving SVR and in nonresponders (log-rank P < 0.001).

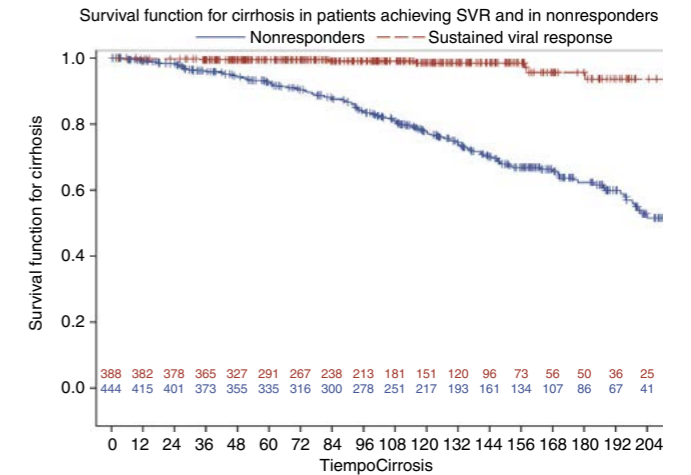


Table 2 | Baseline characteristics and hazard ratios (95% CI) estimates for the development of cirrhosis among nonresponder patients in the estimation cohort

	Cohorts		HR† [95% CI]	P-value†
	No cirrhosis (n = 321)*	Cirrhosis (n = 123)*		
Age (years)	39 (32–50)	51 (41–57)	1.05 [1.04–1.07]	<0.001
Sex (males), n (%)	206 (64.2%)	66 (53.7%)	1.25 [0.89–1.77]	0.20
AST (IU/L)	56 (40–77)	76 (51–105)	1.01 [1–1.01]	<0.001
ALT (IU/L)	91 (65–138)	109 (68–160)	1.01 [1–1.01]	0.023
GGT (IU/L)	36 (23–62)	54 (36–93)	1.01 [1–1.01]	<0.001
AP (IU/L)	153 (131–183)	179 (139–221)	1.01 [1.01–1.01]	<0.001
Glucose (mg/dL)	93 (86–100)	101 (91–110)	1.01 [1.01–1.01]	<0.001
Cholesterol (mg/dL)	175 (153–196)	172 (154–195)	1.01 [1–1.01]	0.590
Platelets (×10 ⁹)	197 (166–231)	182 (153–220)	1.01 [0.99–1.01]	0.138
APRI	0.63 (0.4–0.9)	0.92 (0.6–1.4)	1.39 [1.24–1.56]	<0.001
FIB-4	1.16 (0.8–1.6)	1.83 (1.2–2.7)	1.39 [1.29–1.50]	<0.001
Forns	4.4 (3.3–5.5)	5.5 (4.7–6.6)	1.59 [1.41–1.79]	<0.001
HCV genotype				
1a	54 (17.3%)	14 (11.7%)	1	0.002
1b	190 (60.9%)	92 (76.7%)	1.34 [0.78–2.31]	
2	9 (2.9%)	3 (2.5%)	0.51 [0.17–1.53]	
3	19 (6.1%)	4 (3.3%)	0.35 [0.13–0.96]	
4	16 (5.1%)	1 (0.8%)	0.2 [0.03–1.51]	
Nontypable/unavailable	24 (7.7%)	6 (5.0%)	0.5 [0.19–1.3]	
Liver fibrosis (baseline)				
Minimal/portal fibrosis (F0/F1)	256 (79.7%)	64 (52%)	1	<0.001
Fibrosis beyond portal tract (F2)	27 (8.4%)	25 (20.8%)	3.16 [1.99–5.02]	
Bridging fibrosis (F3)	19 (5.9%)	24 (20.0%)	3.91 [2.51–6.08]	
Insufficient material/no biopsy	44 (5.3%)	23 (5.0%)	1.73 [0.83–3.60]	
Follow-up (years)	10 (5–14)	14 (10–17)	0.99 [0.99–1]	0.007
HCC development n (%)	2 (0.6%)	21 (17.1%)	17.89 [12.4–25.8]	<0.001
Death on follow-up n (%)	14 (4.4%)	21 (17.4%)	0.18 [0.11–0.28]	<0.001

* Qualitative variables are expressed as n (%) and quantitative variables as median and interquartile range (P25–P75).
 † Using Cox-Regression analysis.

Construction and validation of a model to predict the individual risk of developing cirrhosis

In order to construct a model to calculate the individual risk of cirrhosis development, quantitative variables were categorised by the best cut-off point according to the area under the ROC curve (AUROC): AST ≤ 100 (0) AST > 100 (1), GGT ≤ 40 (0) GGT > 40 (1), age ≤ 40 (0) age > 40 (1), fibrosis stage F0–1 (0), F2–F3 (1) (Table 3).

The following models were constructed (Table 4): (i) Model I, which included all four variables (age, fibrosis stage, AST and GGT); (ii) Model II, which was aimed to assess patients without a liver biopsy and thus included age, AST and GGT; (iii) Model III, which resulted from the combination of fibrosis stage, AST and Forns score.

As shown in Table 5, all models presented similar diagnostic accuracy expressed by ROC analysis and importantly, their value remained very high over time (5 and 10-year prediction from baseline). Harrell's C-Index

Table 3 | Variables independently related to the development of cirrhosis by Cox-regression analysis in nonresponders (estimation cohort)

	Nonresponders (n = 444)	
	HR [95% CI]	P-value
Fibrosis stage at baseline (F2–F3 vs. F0–F1)	3.80 [2.62–5.51]	<0.001
Age >40 years	3.16 [2.05–4.89]	<0.001
AST >100 IU at baseline	2.41 [1.63–3.56]	0.005
GGT >40 IU at baseline	2.77 [1.86–4.11]	<0.001

AST, aspartate aminotransferase; GGT, gamma glutamyl transpeptidase.
Age, AST and GGT were categorised by the best cut-off point according to the area under the ROC curve.

Table 4 | Constructed Models and baseline variables included in each model

Models	Variables at baseline
Model I	Fibrosis stage F2–F3 (vs. F0–F1) Age >40 years AST >100 IU GGT >40 IU
Model II	Age >40 years AST >100 IU GGT >40 IU
Model III	Age >40 years AST >100 IU Forns score

[95% CI] for the overall follow-up were calculated: 0.837 [0.696–0.944] (Model I); 0.841 [0.705–0.944] (Model II) and 0.839 [0.695–0.947] (Model III), respectively, which were higher than those for each variable alone. In addition, comparisons between multivariate models using C-Index were not significant ($P > 0.4$).

A simple score was then constructed by adding up to a constant the value of each variables' regression coefficient multiplied by 0 or 1, according to the cut-off points described above (Table 6).

As an example, the associated probability of developing liver cirrhosis after 5 years of follow-up in a 60 year-old patient with GGT of 100 IU and AST of 200 IU using Model II would be:

$$\text{Score: } -6.188 + 2.037 + 1.668 + 1.108 = -1.375$$

The probability is now derived from the formula:

$$\text{prob} = \frac{1}{1 + e^{-[-\text{score}]}}; \text{prob} = \frac{1}{1 + e^{-[-1.375]}} = 0.202 \quad (20.2\%)$$

The probability of cirrhosis in this individual would be 20% and 33% at 5 and 10 years of follow-up respectively. Using the same model, in a 35 year-old patient, with GGT <40 IU and AST <100 IU the probability of developing cirrhosis would be only 0.2% and 1.2% at 5 and 10 years of follow-up respectively.

When applying the constructed logistic model to estimate the 10-year cirrhosis probability, Kaplan–Meier curves showed a good discriminative value among risk groups. Indeed, using these models nonresponder patients could be stratified into different categories according to their risk of developing liver cirrhosis after 10 years of follow-up. According to models I and III, which are constructed with 4 different variables, patients could be stratified into low (<5%), intermediate (5–20%) and high risk groups (>20%). Model II, combining only 3 categorical variables, accurately stratified patients into a low (<5%) and a high risk group (≥5%) for cirrhosis (Figures 2–4).

When assessing the reproducibility of the model for the odds ratio estimates in the validation cohort (244 nonresponders), all models showed a good accuracy with AUC between 0.79 and 0.87 as is shown in Table 5.

Variables predicting liver-related events

During follow-up, 83 patients presented clinical events, including decompensation (n = 42) or HCC (n = 41). In the estimation group, a total of 26 patients developed

Table 5 | Assessment of the models in the estimation and validation cohorts

Model	Time-point at follow-up	Estimation cohort*				Validation cohort†	
		Fibrosis stage at baseline F2–F3 vs. F0–F1 (ref.) OR [95% CI]	Age >40 OR [95% CI]	GGT >40 OR [95% CI]	AST >100 OR [95% CI]	ROC AUC [95% CI]‡	ROC AUC [95% CI]
I	5 years	5.72 [2.40–13.61]	5.35 [1.55–18.49]	4.69 [1.54–14.28]	2.49 [1.10–5.63]	0.882 [0.821–0.942]	0.859 [0.806–0.911]
	10 years	2.72 [1.59–4.65]	3.68 [1.96–6.91]	5.17 [2.70–9.88]	1.61 [0.90–2.88]	0.825 [0.779–0.871]	0.853 [0.806–0.900]
II	5 years		7.67 [2.28–25.79]	5.30 [1.75–16.03]	3.03 [1.39–6.60]	0.837 [0.775–0.900]	0.769 [0.676–0.862]
	10 years		4.75 [2.59–8.73]	5.46 [2.93–10.16]	1.61 [0.93–2.79]	0.802 [0.758–0.847]	0.811 [0.756–0.867]
III			Forns		AST >100	ROC	ROC
	5 years	7.24 [2.88–18.24]	2.23 [1.61–3.09]		2.59 [1.10–6.15]	0.915 [0.881–0.949]	0.856 [0.770–0.942]
	10 years	2.85 [1.67–4.87]	1.72 [1.43–2.07]		1.91 [1.06–3.46]	0.797 [0.741–0.853]	0.871 [0.812–0.930]

* Multivariate logistic regression and ROC analysis of factors associated with progression to cirrhosis in nonresponder patients (Estimation cohort).

† Assessment of the models for the odds ratio estimates in the validation cohort.

‡ Calculated Harrell's C-Index [95% CI] for the overall follow-up were: 0.837 [0.696–0.944] (Model I); 0.841 [0.705–0.944] (Model II) and 0.839 [0.695–0.947] (Model III) respectively. C-index [95% CI] for Univariate models were: Fibrosis stage: 0.661 [0.521–0.777], Age >40: 0.645 [0.53–0.74], GGT >40: 0.641 [0.52–0.742], AST >100: 0.605 [0.467–0.72] and Forns: 0.702 [0.558–0.822].

Comparisons between multivariate models using C-Index were not significant ($P > 0.4$).

Table 6 | Regression coefficients used to construct the scores and calculate the individual probability of cirrhosis

Model	Time-point at follow-up	Constant (1)	Fibrosis stage at baseline F2–F3 vs. F0–F1		Age >40 years ≤40 (0) >40 (1)	GGT >40 IU ≤40 (0) >40 (1)	AST >100 IU ≤100 (0) >100 (1)
			F0–F1 (0)	F2–F3 (1)			
I	5 years	–6.535	1.744		1.676	1.545	0.913
	7 years	–5.009	1.471		1.222	1.159	0.645
	10 years	–4.554	1.000		1.301	1.642	0.479
II	5 years	–6.188	–		2.037	1.668	1.108
	7 years	–4.807	–		1.546	1.304	0.780
	10 years	–4.430	–		1.559	1.697	0.477
III			Fibrosis stage	Forns	AST >100 IU		
	5 years	–8.897	1.980	0.803	0.954		
	7 years	–6.351	1.566	0.537	0.750		
	10 years	–5.483	1.049	0.542	0.648		

clinical decompensation (20 ascites, 3 variceal bleeding, 1 hepatic encephalopathy, 1 SBP); all of them were nonresponders. HCC was diagnosed in 23 patients; two had previously achieved SVR but had bridging fibrosis at baseline (Table 1). Variables independently associated with the development of clinical decompensation or hepatocellular carcinoma were the same identified for

progression to cirrhosis [Tables S1 and S2 (A–B)]. Importantly, the constructed models showed high accuracy for predicting the probability of developing clinical decompensation, with AUCs of 0.84 (model I); 0.80 (model II) and 0.87 (model III) after 10 years of follow-up respectively. The latter data support the strength of these models to predict progression to cirrhosis.

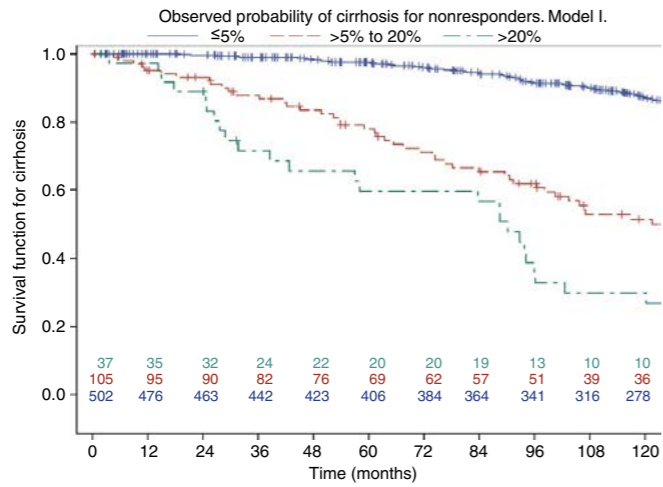


Figure 2 | Observed survival function for patients classified as having a predicted probability of cirrhosis of ≤5% or >5% to 20% or >20% at 10 years according to model I (Fibrosis stage 2–3 vs. 0–1, Age > or ≤40 years, AST > or ≤100 IU/L, GGT > or ≤40 IU/L). Log-rank $P < 0.001$ for all cases (Figures 2–4: Total number of nonresponders at risk at different time points may be lower than in Figure 1 due to some missing values in the model variables).

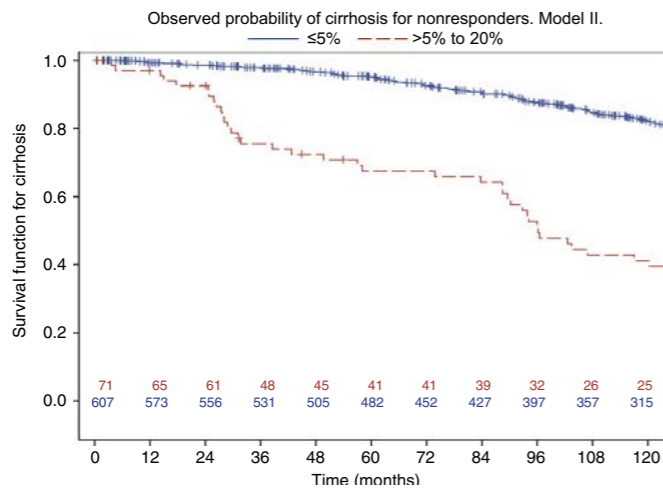


Figure 3 | Observed survival function for patients classified as having a predicted probability of cirrhosis at 10 years of ≤5% or >5% according to model II (Age > or ≤40 years, AST > or ≤100 IU/L, GGT > or ≤40 IU/L). Log-rank $P < 0.001$.

DISCUSSION

IFN-based therapies are being replaced by all-oral combinations, at least in those areas of the world in which these molecules are approved and affordable. In this setting, the correct identification of patients at risk of progression to cirrhosis, as well as those with a very low likelihood of progression, is very relevant. However, data on the natural history of patients with mild CHC are scarce, since large cohorts and long follow-up periods are required to assess clinical outcomes.

Evaluation of liver fibrosis is crucial in the assessment of chronic liver disease. However, liver biopsy is an

invasive procedure and its accuracy may be limited by sampling error and inter and intra-observer validation.¹⁵ Besides, liver biopsy cannot be repeated during follow-up to assess disease progression, as it may be associated with higher morbidity. In recent years, efforts have been made to develop non-invasive methods for fibrosis staging. Some of the surrogate markers of liver fibrosis have shown a good accuracy; however, data on the usefulness of such methods to predict clinical outcomes are scarce as most studies are transversal and others aim to predict liver-related events in patients who already present advanced liver disease.¹⁶

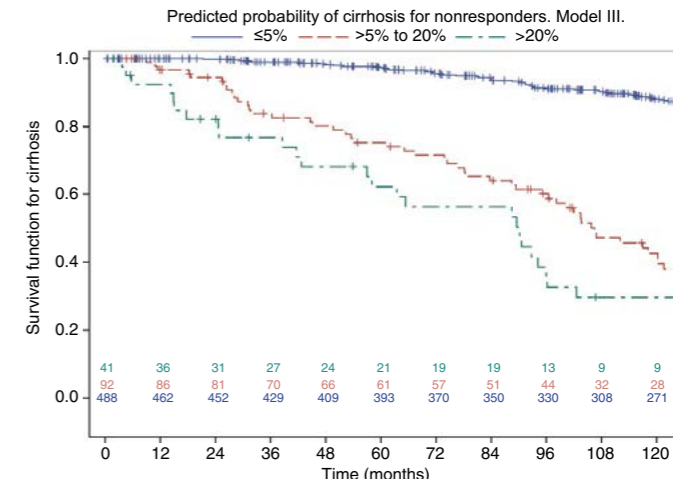


Figure 4 | Observed survival function for patients classified as having a predicted probability of cirrhosis at 10 years of ≤5% or >5% to 20% or >20% from model III (Fibrosis stage 2–3 vs. 0–1, Forns score, AST > or ≤100 IU/L). Log-rank $P < 0.001$.

The main aim of our study was to develop and validate a simple model to accurately predict individual probabilities to develop liver cirrhosis. We retrospectively assessed a large number of patients mainly with mild stages of fibrosis at baseline, who underwent anti-viral therapy and were prospectively followed up for a median of 12 years. As expected, patients who achieved an SVR had excellent outcomes, with a very low incidence of cirrhosis (<1% at 10 years) and no cases of clinical decompensation. In accordance to previous data,^{17, 18} the risk of HCC remained very low after SVR [two patients (0.33%), both with baseline bridging fibrosis]. On the contrary, the cumulative probability of developing cirrhosis during follow-up was remarkably high in nonresponders (7% at 5 years and 22% at 10 years), reinforcing the need of tools to accurately predict the risk of fibrosis progression. The clinical variables associated with the development of liver cirrhosis were the presence of significant fibrosis at baseline, older age, and high AST and GGT levels, which have been previously shown to be related to fibrosis progression in patients with CHC.^{19–21}

According to the more recent international guidelines, all patients with chronic hepatitis C infection should be referred and considered for anti-viral therapy. The appropriate drug combination should be chosen depending on HCV genotype and subtype, the severity of liver disease and the availability of the different therapies in each country. IFN-containing regimens have globally been replaced by all-oral, IFN-free therapies with DAAs, at least in those areas of the world where these regimens are approved and their cost is covered.²² Nevertheless, the huge economical differences between countries make IFN-free therapies not

affordable for all Health Care systems. In countries where the indication of DAAs may be restricted because of budget constraints, a careful selection of candidates at risk of disease progression is crucial.

Using baseline variables with an independent predictive value, we constructed three models to forecast individual probabilities for developing liver cirrhosis over time. Model I included AST, GGT, age and fibrosis stage, while model II was simplified by excluding the information provided by liver histology. Model III was generated by including well-known and validated non-invasive fibrosis scores. All three models were equally accurate at estimating the individual risk of progression to cirrhosis among nonresponders in the long-term. Moreover, the classification of nonresponder patients according to the associated baseline probability of developing cirrhosis obtained from the multivariate logistic model was discriminative in our sample throughout the follow-up period: the highest risk group had a probability of developing cirrhosis greater than 20% over 10 years, while the lowest risk group was associated with a very low probability of developing cirrhosis (<5%). The latter may be reassuring (both for doctors and patients) if these individuals are advised to defer therapy.

Figures for models I and III are almost identical as both take into account fibrosis stage either by histological assessment or by Forns index value (Figures 2 and 4). Model II, which is based only in three variables, was accurate at identifying those patients with a very lower risk of progression but did not discriminate between individuals with intermediate and high risk of cirrhosis development (Figure 3). Importantly, the assessment of the repro-

ducibility of the models in the validation cohort showed equally good results even in the long-term follow-up, thus strengthening the statistical power of the models.

Our study has several limitations. The first derives from the lack of paired biopsies in order to establish the diagnosis of cirrhosis, which would have provided further validation to our findings. Nevertheless, we believe that the established criteria for diagnosing liver cirrhosis were those used in routine clinical practice^{12, 13} and are very accurate. For those patients in whom the diagnosis relied on US, and in order to exclude inter-observation bias, the US images were recovered and blindly re-assessed by expert radiologists to confirm the diagnosis of cirrhosis. Nonetheless, the fact that the same variables of the models were also associated with clinical decompensation or HCC (outcomes not subjected to inconsistencies) strengthens the criteria used to diagnose cirrhosis in this cohort.

A second limitation is the lack of a baseline transient elastography (TE), which is widely used in Europe to assess the fibrosis stage.^{23, 24} However, the method was implemented in our Unit in 2005 and thus, the data was not available in most patients. If a baseline TE might improve the predictability of our current models needs to be assessed in future studies. Third, a selection bias cannot be excluded due to the retrospective nature of the study; our models would need further validation in a prospectively followed cohort.

Finally, in a few years from now and in a decreasing-cost scenario, anti-viral therapy might be offered to the patients even if they have a very low risk of cirrhosis after 10 years.

The strengths of our study are the large cohort of patients with a well-characterised disease and the fact that patients were followed in two large referral centres by an established protocol and the long follow-up period. An additional strength is that besides identifying patients at highest risk of progression of cirrhosis, our models are able to recognise those patients with a remarkably low risk of progression, thus facilitating clinical decisions in routine practice.

In conclusion, sustained virological response to interferon-based therapy in patients with noncirrhotic CHC

eliminates liver-related complications in the long term. Among patients with chronic hepatitis C, modelling based on simple laboratory and clinical data is helpful at identifying the individual risks of progression to cirrhosis and could be used in clinical practice to better allocate patients in treatment protocols.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Variables independently related to the development of clinical decompensation or HCC by Cox-regression analysis in nonresponders.

Table S2A. Multivariate logistic regression and ROC analysis of factors associated with clinical decompensation or HCC development in nonresponder patients.

Table S2B. Regression coefficients used to construct the scores and calculate the individual probability of cirrhosis.

AUTHORSHIP

Guarantor of the article: S. Lens.

Author contributions: All authors have contributed in the study design, its critical revision for important intellectual content; have given final approval of the version to be published, and agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the article. S. Lens, F. Torres and X. Forns: analysis and interpretation of the data, drafting the manuscript.

All authors approved the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declaration of personal interests: XF has acted as an advisor for Janssen, Abbvie and Gilead and has received unrestricted grant support from Janssen and MSD. JMST has acted as an advisor for MSD. SL has acted as an advisor for Janssen, MSD and Gilead. ZM has acted as an advisor for BMS. ML has acted as an advisor for Janssen, MSD and BMS. RS has acted as an advisor for Janssen, MSD and BMS. JAC has acted as an advisor for Janssen and MSD. The authors declare no other potential personal conflicts of interest.

Declaration of funding interests: Stella Martinez was granted by Fundación Banco Bilbao Vizcaya Argentaria (BBVA). XF received support in part by grants from Instituto de Salud Carlos III (PI11/01907), Ministerio de Economía y Competitividad, co-funded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional, Unión Europea, Una manera de hacer Europa. SL was supported by grants from Hospital Clinic and the Fundación BBVA. CIBEREHD is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

genotypes 2 and 3. *N Engl J Med* 2014; **370**: 1993–2001.

4. Sulkowski MS, Gardiner DF, Rodriguez-Torres M, *et al.* Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. *N Engl J Med* 2014; **370**: 211–21.

5. Lawitz E, Poordad FF, Pang PS, *et al.* Sofosbuvir and ledipasvir fixed-dose combination with and without ribavirin in treatment-naïve and previously treated patients with genotype 1 hepatitis C virus infection (LONESTAR): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet* 2013; **383**: 515–23.

6. Lawitz E, Sulkowski MS, Ghalib R, *et al.* Simeprevir plus sofosbuvir, with or without ribavirin, to treat chronic infection with hepatitis C virus genotype 1 in non-responders to pegylated interferon and ribavirin and treatment-naïve patients: the COSMOS randomised study. *Lancet* 2014; **384**: 1756–65.

7. Andreone P, Colombo MG, Enejosa JV, *et al.* ABT-450, ritonavir, ombitasvir, and dasabuvir achieves 97% and 100% sustained virologic response with or without ribavirin in treatment-experienced patients with HCV genotype 1b infection. *Gastroenterology* 2014; **147**: 359–65 e351.

8. Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002; **36**(5 Suppl. 1): S35–46.

9. Wiese M, Fischer J, Lobermann M, *et al.* Evaluation of liver disease progression in the German hepatitis C virus (1b)-contaminated anti-D cohort at 35 years after infection. *Hepatology* 2014; **59**: 49–57.

10. van der Meer AJ, Hansen BE, Fattovich G, *et al.* Reliable prediction

of clinical outcome in patients with chronic HCV infection and compensated advanced hepatic fibrosis: a validated model using objective and readily available clinical parameters. *Gut* 2014; **64**: 322–31.

11. The French METAVIR Cooperative Study Group. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1994; **20**(1 Pt 1): 15–20.

12. Gaiani S, Gramantieri L, Venturoli N, *et al.* What is the criterion for differentiating chronic hepatitis from compensated cirrhosis? A prospective study comparing ultrasonography and percutaneous liver biopsy. *J Hepatol* 1997; **27**: 979–85.

13. Aube C, Oberti F, Korali N, *et al.* Ultrasonographic diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *J Hepatol* 1999; **30**: 472–8.

14. Berzigotti A, Ashkenazi E, Reverter E, Abralde JG, Bosch J. Non-invasive diagnostic and prognostic evaluation of liver cirrhosis and portal hypertension. *Dis Markers* 2011; **31**: 129–38.

15. Regev A, Berho M, Jeffers LJ, *et al.* Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol* 2002; **97**: 2614–8.

16. Boursier J, Brochard C, Bertrais S, *et al.* Combination of blood tests for significant fibrosis and cirrhosis improves the assessment of liver-prognosis in chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; **40**: 178–88.

17. Yamashita N, Ohho A, Yamasaki A, *et al.* Hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients achieving a sustained virological response to

interferon: significance of lifelong periodic cancer screening for improving outcomes. *J Gastroenterol* 2014; **49**: 1504–13.

18. Rutter K, Stattermayer AF, Beinhardt S, *et al.* Successful anti-viral treatment improves survival of patients with advanced liver disease due to chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2015; **41**: 521–31.

19. Ghany MG, Lok AS, Everhart JE, *et al.* Predicting clinical and histologic outcomes based on standard laboratory tests in advanced chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2010; **138**: 136–46.

20. Sheth SG, Flamm SL, Gordon FD, Chopra S. AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *The American journal of gastroenterology* 1998; **93**: 44–8.

21. Giannini E, Botta F, Fasoli A, *et al.* Increased levels of gammaGT suggest the presence of bile duct lesions in patients with chronic hepatitis C: absence of influence of HCV genotype, HCV-RNA serum levels, and HGV infection on this histological damage. *Dig Dis Sci* 2001; **46**: 524–9.

22. Younossi Z, Henry L. Systematic review: patient-reported outcomes in chronic hepatitis C—the impact of liver disease and new treatment regimens. *Aliment Pharmacol Ther* 2015; **41**: 497–520.

23. Castera L, Forns X, Alberti A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol* 2008; **48**: 835–47.

24. Vergniol J, Boursier J, Coutzac C, *et al.* Evolution of noninvasive tests of liver fibrosis is associated with prognosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2014; **60**: 65–76.

REFERENCES

- Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, *et al.* Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001; **358**: 958–65.
- Pawlotsky JM, Aghemo A, Dusheiko G, *et al.* EASL Recommendation on treatment of hepatitis C 2015. *J Hepatol* 2015; **63**: 199–236.
- Zeuzem S, Dusheiko GM, Salupere R, *et al.* Sofosbuvir and ribavirin in HCV

Association Between Severe Portal Hypertension and Risk of Liver Decompensation in Patients With Hepatitis C, Regardless of Response to Antiviral Therapy



Sabela Lens,^{*,‡} Diego Rincón,^{‡,§} Montserrat García-Retortillo,^{*} Agustín Albillos,^{‡,||} Jose Luis Calleja,^{||} Rafael Bañares,^{‡,§} Juan González Abrales,^{*,#} Jaime Bosch,^{*,‡,#} Jose Maria Sanchez-Tapias,^{*,‡} Xavier Forns,^{*,‡} and Juan Carlos García-Pagán^{*,‡,#}

^{*}Liver Unit, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August-Pi-Sunyer, Barcelona, Spain; [‡]Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Spain; [§]Liver Unit, Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain; ^{||}Liver Unit, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain; ^{||}Liver Unit, Hospital Puerta del Hierro, IDIPHIM, Madrid, Spain; [#]Barcelona Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

BACKGROUND & AIMS: Hepatic venous pressure gradient (HVPG) is associated with a risk of liver events in patients with chronic hepatitis C. Antiviral therapies that lead to a sustained virologic response (SVR) reduce portal pressure and prevent liver disease progression. However, it is not clear to what extent the progression of hepatitis C is modified once patients develop cirrhosis with severe portal hypertension (CSPH) (HVPG ≥ 10 mm Hg). We assessed the effects of HVPG and SVR on the risk of liver decompensation, hepatocellular carcinoma, and/or death in patients with hepatitis C-related cirrhosis.

METHODS: We collected data from 100 patients with hepatitis C and compensated cirrhosis who underwent HVPG measurement 3 months or less before (baseline) and 24 weeks after therapy with pegylated interferon alfa-2a and ribavirin at 4 hospitals in Spain, from 2001 through 2009. SVR was defined as undetectable serum HCV RNA level 24 weeks after treatment ended. Clinical data were collected until death, liver transplantation, or December 2012 (median, 5 y; interquartile range, 1.4–7 y).

RESULTS: Seventy-four patients had CSPH at baseline and 35% of patients achieved an SVR. During the follow-up period, 19 patients developed liver decompensation (ascites, variceal bleeding, or encephalopathy). The actuarial probability values for liver decompensation at 1, 5, and 7 years were 3%, 19% and 22%, respectively. The baseline level of HVPG, but not SVR, was associated independently with the risk of liver decompensation.

CONCLUSIONS: Patients with CSPH, regardless of an SVR to therapy for hepatitis C, remain at risk for liver decompensation within the first 5 years after treatment; they should be monitored closely.

Keywords: HCV; Cirrhosis; HVPG; Treatment.

Chronic hepatitis C virus (HCV) infection is a common progressive liver disease that affects more than 170 million people worldwide and it is a major cause of death and liver transplantation. The main goal of viral clearance is to prevent disease progression. In this sense, several reports have linked sustained virologic response (SVR) to histologic improvement¹ and to a positive impact on clinical outcomes in patients with advanced liver disease, particularly in patients with cirrhosis.^{2,3}

In patients with compensated cirrhosis, measurement of hepatic venous pressure gradient (HVPG) accurately predicts the risk of developing portal hypertension-related complications.^{4,5} Indeed, an HVPG of 10 mm Hg or greater (clinically significant portal hypertension

[CSPH]) in patients with compensated cirrhosis is associated with a higher risk of clinical decompensation, development of hepatocellular carcinoma (HCC), and death during follow-up evaluation.^{4,6} In addition, HVPG

Abbreviations used in this paper: AVB, acute variceal bleeding; CI, confidence interval; CSPH, clinically significant portal hypertension; FHVP, free hepatic venous pressure; HCC, hepatocellular carcinoma; HCV, hepatitis C virus; HR, hazard ratio; HVPG, hepatic venous pressure gradient; HVPG-12w, HVPG measured 12 weeks after initiation of treatment; HVPG-FU24w, HVPG 24 weeks after end of treatment; IQR, interquartile range; LS, liver stiffness; LT, liver transplantation; SVR, sustained virologic response.

Most current article

© 2015 by the AGA Institute
1542-3565/\$36.00
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2015.04.013>

also can predict the long-term outcome of recurrent HCV infection after liver transplantation.⁷ HVPG is also a reliable marker for disease progression in chronic hepatitis C and it has been suggested to be a potential surrogate end point for patients undergoing antiviral therapy^{4,6,8} or other treatments for cirrhosis.

Some data suggest that antiviral therapy decreases HVPG even in patients with advanced cirrhosis, probably related to a decrease in necroinflammatory activity, which in the long term leads to fibrosis regression.⁹ However, data are limited to what extent a virologic cure will modify the risk of developing liver decompensation once patients already have cirrhosis with severe portal hypertension (CSPH: HVPG ≥ 10 mm Hg). This is especially relevant with the arrival of interferon-free regimens with a better safety profile and SVR rates higher than 90% in cirrhotic patients.¹⁰⁻¹² The number of patients with advanced cirrhosis and severe portal hypertension who will be treated will increase.

Our study aimed to assess, in a cohort of patients with HCV-related cirrhosis, the impact of HVPG and of achieving SVR on the risk of developing liver decompensation, HCC, and death in patients with HCV cirrhosis receiving antiviral therapy.

Patients and Methods

Patients

During the period from 2001 to 2009, an HVPG measurement within 3 months before starting antiviral therapy with pegylated interferon alfa-2a and ribavirin was performed in 100 patients with compensated cirrhosis caused by HCV infection in 4 Liver Units in

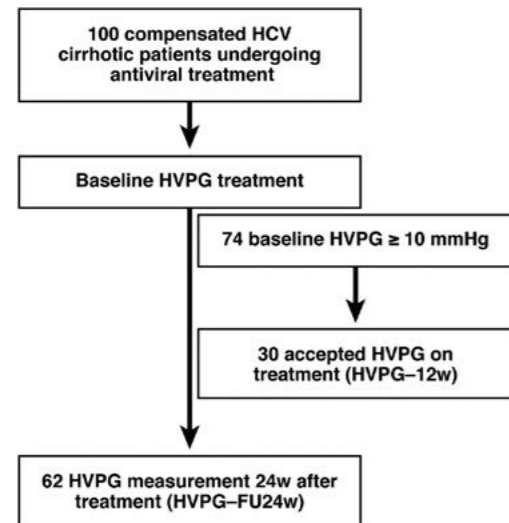


Figure 1. Study flow chart.

Spain (Figure 1). Cirrhosis was proven histologically in 24 patients (24%), and assessed clinically in the remaining patients (ultrasonographic evidence of liver cirrhosis,¹³ HVPG ≥ 6 mm Hg, or presence of esophageal varices). All patients were Child-Pugh A, none had portal vein thrombosis, hepatocellular carcinoma, or co-infection with hepatitis B virus or human immunodeficiency virus. Other causes of liver disease were excluded. A screening esophagogastroduodenoscopy was performed in all patients. The study was approved by the local ethics committee and all patients signed informed written consent.

Antiviral Treatment

All patients received combined treatment with pegylated interferon alfa-2a (180 ug/wk) and weight-based ribavirin (800–1200 mg/d), the standard of care at the time of the study design. SVR was defined as undetectable serum HCV RNA level at 24 weeks after discontinuation of antiviral treatment.

Hepatic Venous Pressure Gradient Measurement

HVPG was measured within 3 months before starting antiviral therapy and measured again 24 weeks after the end of treatment (HVPG-FU24w). In addition, in patients with baseline CSPH, an intermediate HVPG measurement was performed 12 weeks after initiating treatment to assess early changes in HVPG. Hemodynamic studies were performed after overnight fasting under light sedation with intravenous midazolam. Under local anesthesia, a venous introducer was placed in the right internal jugular vein using the Seldinger technique. Under fluoroscopy, a 7F balloon-tipped catheter (Edwards Lifesciences, Irvine, CA) was guided into the main right hepatic vein for measurements of wedged hepatic venous pressure and free hepatic venous pressure (FHVP). The adequate occlusion of the hepatic vein was checked by manual injection of a small amount of radiologic contrast medium. FHVP was measured in the right hepatic vein close to the inferior vena cava. The portal pressure gradient was measured as HVPG (the difference between wedged hepatic venous pressure and FHVP).

Follow-Up Period

Patients were followed up until death, liver transplantation (LT), or until December 2012; the development of clinical liver decompensation or HCC was assessed retrospectively. Clinical liver decompensation was defined as the occurrence of ascites, hepatic encephalopathy, or acute variceal bleeding (AVB) at any time during the follow-up evaluation.¹⁴⁻¹⁶ Until 2005, the diagnosis of hepatocellular carcinoma was made by biopsy or by imaging techniques.¹⁷ After 2005, the

criteria for HCC diagnosis were those defined in the current American Association for the Study of the Liver guidelines.¹⁸

Statistical Analyses

Continuous variables are reported as means ± SD, and categorical variables are reported as absolute and relative frequencies. Groups were compared using the *t* test or the Mann-Whitney test for continuous variables when appropriate, and the Fisher exact test was used for categorical variables. The survival function for the time to clinical decompensation was estimated by the Kaplan-Meier method. Survival distributions were compared using the log-rank test for univariate testing, and Cox proportional hazard models were used for the multivariate analyses and to estimate hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (95% CIs). Logistic regression models were used to study the predictors of SVR. Variables with 0.10 significance on univariate tests were included in the multivariate analysis. The analysis was performed with IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. (IBM Corp, Armonk, NY). Significance was established as a 2-sided *P* value of .05.

Results

Baseline Characteristics

Baseline characteristics of the study population are defined in Table 1. The mean age was 51 ± 8 years, most were male (74%), infected with genotype 1 (81%), with a mean viral load of 6 log₁₀ IU/mL, and 58% were treatment naive. The mean HVPG was 12.7 ± 5 mm Hg,

and 74% of patients had CSPH defined as HVPG of 10 mm Hg or greater. Thirty percent of patients had esophageal varices, all of them had CSPH. Of these, only 4% required β-blocker prophylaxis according to guidelines.¹⁶

Virologic Response to Antiviral Treatment and Baseline Factors Predicting Sustained Virologic Response

Thirty-five (35%) patients achieved SVR. As shown in Table 1, genotype 2 or 3 was more frequent among patients achieving SVR. At multivariate analysis, only genotype (2–3 vs 1–4) was an independent predictor of SVR (HR, 4.3; 95% CI, 1.3–14; *P* = .02). We found no statistical relationship between SVR achievement and baseline HVPG or the presence of CSPH. Indeed, 29 of 74 (39%) patients with CSPH achieved SVR.

Clinical Outcome and Factors Predicting Outcome

Patients were followed up for a median of 5.2 years after the end of antiviral treatment (interquartile range [IQR], 1.4–7.4). The development of clinical liver decompensation, HCC, LT, or death was assessed. Univariate and multivariate analyses were performed to disclose the factors associated with a higher risk of liver-related events.

Liver decompensation. In 19 patients, the first event during the follow-up period was liver decompensation, including ascites, AVB, or hepatic encephalopathy (Table 2). Only in 1 case did the event (ascites and spontaneous bacterial peritonitis) occur during antiviral

Table 1. Patient’s Characteristics of the Whole Cohort and According to SVR Achievement

	All (n = 100)	SVR (n = 35)	Non SVR (n = 65)	<i>P</i>
Male sex	74 (74%)	23 (65%)	51 (78%)	.23
Age, y	51 ± 8	52 ± 9	51 ± 8	.81
Genotype				.008
1–4	85 (85%)	25 (71%)	60 (92%)	
2–3	15 (15%)	10 (29%)	5 (8%)	
Naive	58 (58%)	22 (63%)	36 (55%)	.82
Esophageal varices	31 (31%)	14 (40%)	17 (26%)	.25
VL baseline log ₁₀	5.93 ± 0.7	5.7 ± 0.8	6 ± 0.6	.06
AST level, IU/L	102 (67–155)	105 (71–189)	90 (64–155)	.44
ALT level, IU/L	120 (84–174)	128 (99–181)	114 (76–167)	.17
GGT level, IU/L	76 (56–117)	71 (44–97)	76 (56–118)	.30
Bilirubin level, mg/dL	1.1 (0.8–1.3)	1 (0.8–1.2)	1.1 (0.8–1.3)	.15
Albumin level, g/L	42 ± 4	42 ± 4	42 ± 3.7	.95
Prothrombin time, %	84 ± 11	85 ± 12	84 ± 8	.51
Platelets, 10 ⁹ /L	110 (78–140)	105 (85–170)	111 (78–139)	.57
Child-Pugh score	5.7 ± 0.7	5.7 ± 0.6	5.7 ± 0.6	.65
Baseline HVPG, mm Hg	12.7 ± 5	12.9 ± 5	12.6 ± 5	.79
HVPG ≥ 10 mm Hg	74 (74%)	29 (83%)	45 (69%)	.15

NOTE. Quantitative variables are expressed as means ± SD or medians (IQR) according to normal distribution or not. Qualitative variables are expressed as n (%). Boldface indicates *P* < .05 or close to statistical significance. ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; GGT, γ-glutamyltransferase; VL, viral load.

Table 2. First Event During Follow-Up Evaluation

	All (n = 100)
Liver decompensation	19 ^a
Ascites	12
Variceal hemorrhage	6
Hepatic encephalopathy	1
HCC	15

^aOne patient developed ascites during antiviral treatment.

treatment (week 40). The aforementioned patient had an undetectable viral load since week 12 and, although treatment was interrupted at decompensation, he finally achieved SVR. Overall, the actuarial probability of developing a first episode of liver decompensation at 1, 5, and 7 years was 3%, 19%, and 22%, respectively.

Child-Pugh score, platelet count, the presence of esophageal varices and baseline HVPG were associated significantly with the probability of developing liver decompensation at univariate analysis, whereas SVR was not (Table 3). At multivariate analysis, including platelet count, Child-Pugh score, SVR, and baseline HVPG, only baseline HVPG (HR, 1.2; 95% CI, 1.1–1.6; *P* = .05) was disclosed as an independent predictor for liver decompensation. When stratifying patients by the HVPG value of 10 mm Hg (CSPH), a threshold value that has been shown previously to correlate with prognosis, the actuarial probability of liver decompensation at 1, 5, and 7 years was 4%, 25%, and 28%, in patients with CSPH, vs 0%, 0%, and 16% in patients without CSPH, respectively (Figure 2A). Of note, 5 patients achieving SVR developed liver decompensation: 3 patients developed ascites and 2 developed AVB; all 5 patients had CSPH at baseline (median HVPG, 12 mm Hg; range, 11–16 mm Hg) (Figure 2B). In 1 patient, liver decompensation was induced by antiviral treatment, in the remaining 4 patients we studied the presence of other co-factors that could be associated with continued liver damage and only found 1 patient who disclosed occasional cannabis consumption.¹⁹

Hepatocellular carcinoma. Eighteen patients developed HCC during a median follow-up period of 2.5 years

Table 3. Univariate and Multivariate Analyses of Variables Associated With the Development of Liver Decompensation

	Univariate HR (95% CI)	<i>P</i>	Multivariate HR (95% CI)	<i>P</i>
Platelet count	0.97 (0.94–0.99)	.02		
Child-Pugh score	3.3 (1.4–3.3)	.08		
Esophageal varices	5.1 (1.8–14.4)	.002		
SVR	0.6 (0.2–1.8)	.42		
Baseline HVPG	1.1 (1.03–1.2)	.007	1.2 (1.1–1.6)	.05
Baseline CSPH	7.5 (1–56)	.04		

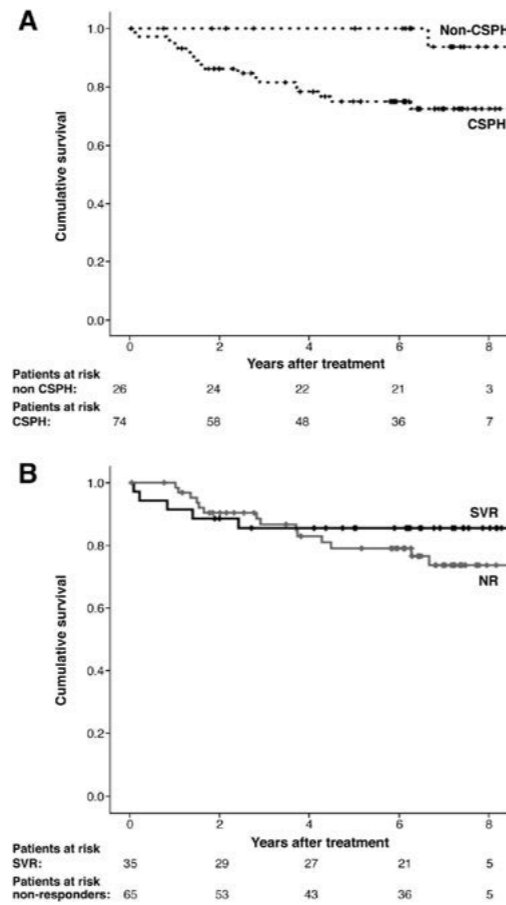


Figure 2. Kaplan-Meier plot for liver decompensation. (A) Patients at risk depending on the presence of CSPH at baseline (log-rank, 5.4; *P* = .02). (B) Patients at risk depending on the achievement of SVR (log-rank, 0.66; *P* = .41).

(IQR, 1.5–4 y) after the end of treatment. In 15 patients this was the first clinical event, whereas 3 patients had previous liver decompensation (Table 2). The actuarial probability of developing HCC was 2%, 18%, and 20% at 1, 5, and 7 years, respectively, after the end of treatment. Achieving SVR or not was not associated with HCC development. Indeed, 4 of 18 patients who presented with HCC had achieved SVR. HVPG at baseline was similar among patients who developed HCC (13.7 ± 5.4 mm Hg) and those who did not (12.5 ± 4.8 mm Hg; *P* = .36).

Liver transplantation-free survival. Twelve patients received a transplant and 9 patients died a median of 3.6 years (IQR, 2.5–5.8 y) after the end of treatment. All deaths occurred after HCC or liver decompensation. The actuarial probability of liver transplantation or death was 0%, 16%, and 22% at 1, 5, and 7 years, respectively.

Univariate and multivariate analysis of variables associated with LT-free survival are shown in Supplementary Table 1. At multivariate analysis including baseline HVPG and SVR, both variables were associated independently with LT-free survival. Seventeen of the 21 patients (80%) who died or received a transplant had CSPH at baseline, whereas this happened in only 4 of the patients without CSPH (all non-SVR). Similarly, only 1 patient with SVR had LT; this patient had CSPH at baseline and suffered an episode of variceal bleeding 2.4 months after the end of treatment.

When analyzing LT or death not related to HCC, only HVPG, but not SVR, was related to LT-free survival at multivariate analysis (HR, 1.17; 95% CI, 1.04–1.32; *P* = .008).

Effect of Antiviral Treatment on Hepatic Venous Pressure Gradient

Effect of 12 weeks of antiviral therapy on hepatic venous pressure gradient in patients with clinically significant portal hypertension at baseline. Thirty of 74 patients with baseline CSPH accepted a second hemodynamic study after 12 weeks of treatment (HVPG-12w) (Figure 1). There were no significant differences in baseline characteristics, rates of SVR, or baseline HVPG among patients with CSPH participating in this second hemodynamic evaluation or not (data not shown). In the whole group (n = 30), HVPG significantly decreased from 15.5 ± 4 to 14 ± 3 mm Hg (median decrease, 7.7%; *P* = .001). In 12 patients (40%), the HVPG-12w reduction was greater than 10%; these patients were those with a higher baseline HVPG (16.5 ± 3.5 vs 14.5 ± 4 mm Hg; *P* = .08), a higher baseline viral load (6.5 vs 5.8 log₁₀; *P* = .03), and a greater reduction in viral load at week 12 (-4.3 ± 2.2 vs -2.6 ± 2 log₁₀; *P* = .04). In addition, patients showing a greater than 10% decrease in HVPG also showed greater reductions in aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase levels than patients with HVPG levels decreasing less than 10% (102 ± 74 vs 49 ± 71; *P* = .06; and 75 ± 63 vs 29 ± 67; *P* = .07; respectively).

Although the number of patients with HVPG-12w is small, the rate of SVR was similar in patients with an HVPG reduction greater or lower/equal to 10% (33% vs 43%). Interestingly, in the 9 patients finally achieving SVR, the HVPG 24 weeks after the end of treatment was similar to HVPG-12w (12.9 ± 2.8 to 12.3 ± 3.6 mm Hg; *P* = .26). However, in patients not achieving SVR (n = 21), HVPG after treatment, significantly increased HVPG-12w (14.3 ± 3.5 to 15.7 ± 5.3 mm Hg; *P* = .005).

Effect on hepatic venous pressure gradient 24 weeks after end of antiviral treatment. Sixty-two patients participated in a new hemodynamic study 24 weeks after the last antiviral treatment dose (HVPG-FU24w). There were no differences in baseline characteristics or SVR rate between patients who had HVPG-FU24w study and those who did not (Supplementary Table 2). In this

group, 22 patients achieved SVR (35%). HVPG was reduced significantly in the SVR group (n = 22; from 11.7 ± 4 to 10 ± 4.5 mm Hg; median decrease of 14%; *P* = .005) but not in the non-SVR (n = 40; from 12.3 ± 5 to 11.9 ± 6 mm Hg; *P* = .25) (Figure 3). Forty-four of these patients had baseline CSPH. Achievement of HVPG-FU24w less than 10 mm Hg was higher in SVR patients (6 of 16; 37%) than in non-SVR patients (6 of 28; 21%), although the difference was not statistically significant (*P* = .3).

In this subgroup of patients who had HVPG-FU24w, 9 patients had liver decompensation. Interestingly, none of the 29 patients with a HVPG-FU24w less than 10 mm Hg, independently of achieving SVR (n = 12) or not (n = 17), presented with liver decompensation, whereas this happened in 9 of the 33 patients with HVPG-FU24w of 10 mm Hg or higher (1 SVR and 8 non-SVR) (*P* = .21).

Long-term effect of antiviral therapy on hepatic venous pressure gradient. In addition, 22 patients underwent an additional HVPG measurement a median of 5 years (IQR, 3–6 y) after the end of the antiviral treatment; patients with SVR (n = 8) showed a mean decrease of -5 ± 4.8 mm Hg from baseline (3 of them changing from CSPH to non-CSPH), although it did not reach statistical significance (*P* = .06). On the contrary, long-term HVPG of patients without SVR (n = 14) showed a mean increase of 3 ± 3.5 mm Hg from baseline (*P* = .09).

Discussion

Patients with chronic hepatitis C and advanced fibrosis are at high risk of developing liver decompensation or hepatocellular carcinoma. This risk has been shown to be related directly to the presence of an HVPG of 10 mm Hg or greater, or CSPH.^{4,6} By contrast, achievement of SVR after antiviral treatment has been associated with an improvement in prognosis. The aim of our study was to assess the role of portal hypertension, evaluated by HVPG measurements, as a predictor of

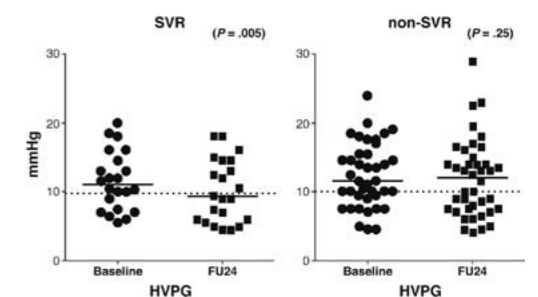


Figure 3. Comparison of HVPG change at baseline and 24 weeks after the end of treatment depending on treatment response (n = 62). Horizontal line, mean value; dotted line, HVPG = 10 mm Hg (CSPH). The significant effect on HVPG was observed in patients achieving SVR (n = 22; *P* = .005), but not in non-SVR (n = 40; *P* = .25).

long-term clinical outcomes in a large cohort of compensated Child A cirrhotic patients undergoing antiviral treatment.

It is important to take into account that in the current study, although patients were clinically compensated, 74% of the patients had CSPH at baseline.²⁰ In the era of interferon-free oral combinations, cirrhotic patients with more advanced liver disease (and more severe portal hypertension) in whom interferon-based therapy is contraindicated, will be treated with these therapies. However, the effect of viral suppression on long-term clinical outcomes in patients with cirrhosis and significant portal hypertension has yet to be determined. Hitherto, most studies have included very well compensated cirrhotic patients with, although not measured, a probably low degree of portal hypertension.²¹ Indeed, in the Turquoise-II study, evaluating an all-oral regimen for 12 to 24 weeks¹² in 380 Child A cirrhotic patients that showed response rates greater than 95%, HVPG was not evaluated but the median platelet count (as an indirect marker of portal hypertension) was 140,000/mm³, which clearly is higher than that of our cohort (113,000/mm³). In the other 2 interferon-free studies achieving SVR rates ranging between 82% and 100%, a lower number of patients with cirrhosis were included^{10,11} and less than 5% of these patients had platelet counts less than 90,000/mm³ (28% in our cohort). Preliminary data on a population of 108 decompensated cirrhotic patients treated with sofosbuvir and ledipasvir showed SVR rates of 86% to 90%. Although an improvement in liver function was shown after treatment, data on the degree of portal hypertension and of the long-term clinical outcome are lacking.²²

The results of our study show that baseline HVPG value before antiviral treatment is a strong predictor of liver decompensation on follow-up evaluation. HVPG proved to be superior to the presence of esophageal varices or platelet count when including them in the analysis. Indeed, CSPH already may be present in a large proportion of patients with no esophageal varices or normal platelet counts.^{23,24} All patients developing liver decompensation during follow-up evaluation had CSPH at baseline. On the contrary, neither HVPG nor SVR predicted the development of HCC during follow-up evaluation. In agreement with previous findings, achievement of SVR in patients with cirrhosis does not completely protect them from developing HCC in the long term.^{25,26}

Altogether, these data strengthen and confirm the major prognostic role of CSPH in patients with cirrhosis. Although viral clearance was associated with a significant reduction in HVPG, this effect, at least 24 weeks after the end of treatment, was mild and only one third of patients with a high-risk baseline situation with CSPH shifted to a condition of low risk for developing liver decompensation (HVPG < 10 mm Hg). The remaining patients, despite achieving SVR, would remain at risk of liver decompensation and should be monitored closely with biannual ultrasonography and

screening for esophageal varices and/or hemodynamic assessment.

It cannot be discarded that, at some point in the evolution of cirrhosis and despite achieving SVR, there is no return to a safe area for developing complications of portal hypertension. Specific features of extracellular matrix might explain the differences in fibrosis reversibility after SVR.²⁷ In that regard, studies in experimental models of CCl₄ murine cirrhosis have shown that despite stopping the insult, once severe cirrhosis has developed, fibrosis does not regress. Instead, a shift from a micronodular to a macronodular pattern of cirrhosis is seen.²⁸ Clearly, more human data on fibrosis regression and HVPG evolution in the short and long term after achieving SVR in patients with cirrhosis are required.

In addition, our observation in a small subset of our SVR patients of an additional reduction in HVPG over time (median, 5 years after antiviral treatment), may suggest that regression of advanced cirrhosis may be delayed, thus maintaining patients at risk for developing portal hypertension complications during an undetermined period of time after achieving SVR. It therefore is possible that measuring HVPG only as early as 24 months after the end of treatment may not completely reflect the potential beneficial effect of achieving SVR.

There were some limitations to take into account in our study. First, the retrospective nature of our study may have led to selection bias. Second, Transient Elastography (TE) was not implemented until 2004, therefore this additional information was not available in most patients. Several studies have reported good sensitivity and specificity for TE to define portal hypertension; nevertheless, even if high values of liver stiffness are strongly predictive of cirrhosis and of the presence of CSPH, the technique is not accurate enough to assess the severity of portal hypertension.¹³ Indeed, several studies have shown the presence of a "gray zone" in TE measurements, reinforcing the concept that HVPG remains an important tool among patients who cannot be allocated to a low-risk group or a high-risk group by noninvasive methods.²⁹ In addition, a control group of well-matched nontreated HCV cirrhotic patients was not available. However, the natural history of untreated patients with HCV cirrhosis is well known, with progressive liver deterioration and development of portal hypertension. We are aware that, unfortunately, measurement of portal pressure gradient is not available at all centers that manage HCV-related cirrhosis. Nevertheless, it is a safe technique, well tolerated,³⁰ and reproducible with less than a 5% to 10% daily variation,³¹ as well as less subject to clinical error; therefore it is a reliable marker of liver disease progression once portal hypertension has been established and it remains a useful tool in the management of chronic hepatitis C liver disease.

In conclusion, the results of the current study indicate that in patients with HCV cirrhosis undergoing antiviral therapy, the short and medium clinical outcome is influenced markedly by the severity of the disease as

evaluated by the presence of CSPH. Despite achieving SVR, those patients with baseline CSPH are still at risk of developing liver decompensation. These data will become even more important in the era of interferon-free regimens when higher rates of SVR will be achieved even in patients with advanced fibrosis and significant portal hypertension.

Supplementary Material

Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of *Clinical Gastroenterology and Hepatology* at www.cghjournal.org, and at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2015.04.013>.

References

- Poynard T, McHutchison J, Davis GL, et al. Impact of interferon alfa-2b and ribavirin on progression of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000;32:1131-1137.
- Bruno S, Battezzati PM, Bellati G, et al. Long-term beneficial effects in sustained responders to interferon-alfa therapy for chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001;34:748-755.
- Toccali F, Laghi V, Capurso L, et al. Long-term liver histology improvement in patients with chronic hepatitis C and sustained response to interferon. *J Viral Hepat* 2003;10:126-133.
- Ripoll C, Groszmann R, Garcia-Tsao G, et al. Hepatic venous pressure gradient predicts clinical decompensation in patients with compensated cirrhosis. *Gastroenterology* 2007;133:481-488.
- Wadhawan M, Dubey S, Sharma BC, et al. Hepatic venous pressure gradient in cirrhosis: correlation with the size of varices, bleeding, ascites, and child's status. *Dig Dis Sci* 2006;51:2264-2269.
- Ripoll C, Groszmann RJ, Garcia-Tsao G, et al. Hepatic venous pressure gradient predicts development of hepatocellular carcinoma independently of severity of cirrhosis. *J Hepatol* 2009;50:923-928.
- Blasco A, Forns X, Carrion JA, et al. Hepatic venous pressure gradient identifies patients at risk of severe hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Hepatology* 2006;43:492-499.
- Burroughs AK, Groszmann R, Bosch J, et al. Assessment of therapeutic benefit of antiviral therapy in chronic hepatitis C: is hepatic venous pressure gradient a better end point? *Gut* 2002;50:425-427.
- Rincon D, Ripoll C, Lo Iacono O, et al. Antiviral therapy decreases hepatic venous pressure gradient in patients with chronic hepatitis C and advanced fibrosis. *Am J Gastroenterol* 2006;101:2269-2274.
- Afdhal N, Zeuzem S, Kwo P, et al. Ledipasvir and sofosbuvir for untreated HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2014;370:1889-1898.
- Afdhal N, Reddy KR, Nelson DR, et al. Ledipasvir and sofosbuvir for previously treated HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2014;370:1483-1493.
- Poordad F, Hezode C, Trinh R, et al. ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with ribavirin for hepatitis C with cirrhosis. *N Engl J Med* 2014;370:1973-1982.
- Berzigotti A, Ashkenazi E, Reverter E, et al. Non-invasive diagnostic and prognostic evaluation of liver cirrhosis and portal hypertension. *Dis Markers* 2011;31:129-138.
- American Association for the Study of Liver Diseases, European Association for the Study of the Liver. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 practice guideline by the European Association for the Study of the Liver and the American Association for the Study of Liver Diseases. *J Hepatol* 2014;61:642-659.
- European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *J Hepatol* 2010;53:397-417.
- de Franchis R. Revising consensus in portal hypertension: report of the Baveno V consensus workshop on methodology of diagnosis and therapy in portal hypertension. *J Hepatol* 2010;53:762-768.
- Bruix J, Sherman M, Llovet JM, et al. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* 2001;35:421-430.
- Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005;42:1208-1236.
- Ishida JH, Peters MG, Jin C, et al. Influence of cannabis use on severity of hepatitis C disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:69-75.
- D'Amico G, Pasta L, Morabito A, et al. Competing risks and prognostic stages of cirrhosis: a 25-year inception cohort study of 494 patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2014;39:1180-1193.
- Lens S, Gambato M, Londono MC, et al. Interferon-free regimens in the liver-transplant setting. *Semin Liver Dis* 2014;34:58-71.
- Fliamm S, Everson G, Charlton M, et al. Ledipasvir/sofosbuvir with ribavirin for the treatment of HCV in patients with decompensated cirrhosis: preliminary results of a prospective, multicenter study. *Hepatology* 2014;60:320A.
- Qamar AA, Grace ND, Groszmann RJ, et al. Platelet count is not a predictor of the presence or development of gastroesophageal varices in cirrhosis. *Hepatology* 2008;47:153-159.
- Louie KS, Micallef JM, Pimenta JM, et al. Prevalence of thrombocytopenia among patients with chronic hepatitis C: a systematic review. *J Viral Hepat* 2011;18:1-7.
- Koh C, Heller T, Haynes-Williams V, et al. Long-term outcome of chronic hepatitis C after sustained virological response to interferon-based therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;37:887-894.
- Morgan RL, Baack B, Smith BD, et al. Eradication of hepatitis C virus infection and the development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of observational studies. *Ann Intern Med* 2013;158:329-337.
- Lee YA, Friedman SL. Reversal, maintenance or progression: what happens to the liver after a virologic cure of hepatitis C? *Antiviral Res* 2014;107C:23-30.
- Issa R, Zhou X, Constantinou CM, et al. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology* 2004;126:1795-1808.
- Llop E, Berzigotti A, Reig M, et al. Assessment of portal hypertension by transient elastography in patients with compensated cirrhosis and potentially resectable liver tumors. *J Hepatol* 2012;56:103-108.
- Casu S, Berzigotti A, Abraldes JG, et al. A prospective observational study on tolerance and satisfaction to hepatic haemodynamic procedures. *Liver Int* 2015;35:695-703.

31. Groszmann RJ, Garcia-Tsao G, Bosch J, et al. Beta-blockers to prevent gastroesophageal varices in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 2005;353:2254–2261.

Conflicts of interest
The authors disclose no conflicts.

Funding
CIBERehd is funded by the Instituto de Salud Carlos III, also funded by an unrestricted grant from Roche (X.F.). The study design, collection, analysis, and interpretation of the data and the writing of the report were independent from financial support.

Reprint requests

Address requests for reprints to: Juan Carlos García-Pagán, MD, PhD, Barcelona Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit, Hospital Clínic, Villarroel 170 Barcelona, 08036 Spain. e-mail: jcgarcia@clinic.ub.es; fax: (34) 932271779.

Supplementary Table 1. Cox Regression Analysis of Variables Associated With LT or Death (21 Events)

	Univariate		Multivariate	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Child–Pugh score	1.9 (0.8–4.2)	.11		
MELD score	1.1 (1–1.4)	.17		
Esophageal varices	2.3 (0.87–6)	.09		
SVR	0.2 (0.05–0.92)	.03	0.18 (0.04–0.8)	.023
Baseline HVPG	1.1 (0.99–1.16)	.09	1.1 (1–1.2)	.024

MELD, model for end-stage liver disease.

Supplementary Table 2. Differences Among Patients Who Accepted or Declined to Undergo a New HVPG Measurement 24 Weeks After Viral Treatment (HVPG-FU24w)

	Accepted (n = 62)	Declined (n = 38)	P
Male sex	46 (74%)	28 (73%)	1
Age, y	53 ± 9	50 ± 8	.68
Genotype 1 vs no 1	51 (82%)	30 (78%)	.79
Genotypes 1–4 vs 2–3	55 (89%)	30 (79%)	.24
Naive	35 (56%)	23 (60%)	.66
Log ₁₀ VL baseline	5.99 ± 0.7	5.8 ± 0.6	.21
Esophageal varices	17 (27%)	14 (37%)	.82
AST level, IU/L	120 ± 58	98 ± 66	.36
ALT level, IU/L	138 ± 61	95 ± 56	.22
GGT level, IU/L	91 ± 61	94 ± 57	.74
Bilirubin level, mg/dL	1 ± 0.4	0.7 ± 0.5	.15
Albumin level, g/L	42 ± 4	43 ± 3	.67
Prothrombin time, %	84 ± 10	93 ± 9	.15
Platelets, 10 ⁹ /L	131 ± 59	96 ± 48	.09
Child–Pugh score	5.7 ± 0.6	5.7 ± 0.8	.5
HVPG baseline	12.1 ± 4.5	13.8 ± 5.5	.15
HVPG ≥ 10	44 (71%)	30 (78%)	.63

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; GGT, γ-glutamyltransferase; VL, viral load.

Accepted Manuscript

Virologic, Clinical, and Immune Response Outcomes of Patients With Hepatitis C Virus-Associated Cryoglobulinemia Treated With Direct-acting Antivirals

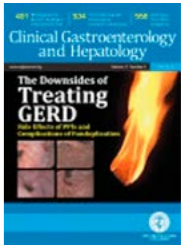
Martín Bonacci, Sabela Lens, María-Carlota Londoño, Zoe Mariño, María C. Cid, Manuel Ramos-Casals, Jose María Sánchez-Tapias, Xavier Forns, José Hernández-Rodríguez

PII: S1542-3565(16)30878-3
DOI: [10.1016/j.cgh.2016.09.158](https://doi.org/10.1016/j.cgh.2016.09.158)
Reference: YJCGH 54948

To appear in: *Clinical Gastroenterology and Hepatology*
Accepted Date: 19 September 2016

Please cite this article as: Bonacci M, Lens S, Londoño M-C, Mariño Z, Cid MC, Ramos-Casals M, Sánchez-Tapias JM, Forns X, Hernández-Rodríguez J, Virologic, Clinical, and Immune Response Outcomes of Patients With Hepatitis C Virus-Associated Cryoglobulinemia Treated With Direct-acting Antivirals, *Clinical Gastroenterology and Hepatology* (2016), doi: 10.1016/j.cgh.2016.09.158.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



Title: Virologic, Clinical, and Immune Response Outcomes of Patients With Hepatitis C Virus-Associated Cryoglobulinemia Treated With Direct-acting Antivirals

Anti-HCV treatment in cryoglobulinemic patients

Martín Bonacci^{1*}, Sabela Lens^{1*}, María-Carlota Londoño¹, Zoe Mariño¹, María C. Cid², Manuel Ramos-Casals³, Jose María Sánchez-Tapias¹, Xavier Forns¹, José Hernández-Rodríguez²

¹ Liver Unit, Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERehd, University of Barcelona, Barcelona, Spain

² Vasculitis Research Unit, Department of Autoimmune Diseases, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain

³ Department of Autoimmune Diseases, Hospital Clínic, Laboratory of Autoimmune Diseases Josep Font, IDIBAPS-CELLEX, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Corresponding author

Xavier Forns

Liver Unit, Hospital Clínic

C/Villarroel 170, 08036

Barcelona, Spain

xforns@clinic.ub.es

Conflict of interest

XF received unrestricted grant support from Abbvie and has acted as advisor for Abbvie, Janssen, and Gilead. SL has acted as advisor for Abbvie, Janssen, and Gilead. MCL has acted as advisor for MSD, Janssen, BMS and Gilead. ZM has acted as advisor for BMS. MB, JMST, MCC, MRC and JHR have nothing to declare.

Grant support

XF received support in part by Instituto de Salud Carlos III (PI15/00151), Ministerio de Economía y Competitividad, co-funded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional, Unión Europea, Una manera de hacer Europa and by Plan Estratégico de la Hepatitis C (Ministerio de Sanidad). XF also received a grant from Secretaria d'Universitats i Recerca del Departament

d'Economia i Coneixement (grant 2014_SGR_605) and by the Spanish Health Ministry (Plan Estratégico Nacional contra la hepatitis C). CIBERehd is funded by the Instituto de Salud Carlos III. MCC and JHR are supported by Ministerio de Economía y Competitividad (SAF 14/57708-R), co-funded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional, Unión Europea, Una manera de hacer Europa [Instituto de Salud Carlos III and Fondo Europeo de desarrollo regional (FEDER) (PIE 13/00033)].

Abbreviations: ACC, asymptomatic circulating cryoglobulins; ALT, alanine aminotransferase; BVAS.v3, Birmingham Vasculitis Activity Score version 3; C4, Complement 4 fraction; CH50, Total hemolytic complement fraction; CV, Cryoglobulinemic vasculitis; DAAs, Direct-acting antivirals; eGFR, glomerular filtration rate; HCV, Hepatitis C virus; HCV-CV, Hepatitis C associated cryoglobulinemic vasculitis; IFN, Interferon; RF, Rheumatoid Factor; RBV, Ribavirin; SOF, Sofosbuvir; SIM, Simeprevir; SVR, sustained virological response; SVR12, sustained virological response 12 weeks after end of therapy; TE, transient elastography; 3D regimen, Paritaprevir/Ritonavir, Ombitasvir, and Dasabuvir;

Electronic word count: 3998

Figures and Tables: 4 tables, 1 figure, 1 supplementary table.

Author contribution: MB, SL, XF and JHR have participated in the study design, analysis and interpretation of the data and drafting the manuscript. All authors have contributed to its critical revision for important intellectual content; have given final approval of the version to be published, and agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the article.

Abstract:

Background & Aims: Cryoglobulins (circulating immune complexes of polyclonal IgG, monoclonal IgM, and rheumatoid factor) are detected in the circulation of 40%–60% of patients with chronic hepatitis C virus infection and cryoglobulinemic vasculitis (CV) is observed in approximately 10% of patients. We aimed to assess the clinical and immune effects of direct-acting antiviral (DAA) treatment.

Methods: We performed a prospective study of 64 patients with HCV infection with circulating cryoglobulins receiving direct-acting anti-viral therapy at a single center in Barcelona, Spain from January 2014 through April 2016. Patients were classified as having CV (n=35) or asymptomatic circulating cryoglobulins (ACC, n=29). Clinical response was considered complete if a patient's Birmingham Vasculitis Activity Score (BVASv.3) was 0, or all affected organs improved 12 weeks after end of therapy. A complete immunological response (CIR) was defined as detection of no circulating cryoglobulins and normalized levels of complement and/or rheumatoid factor.

Results: Clinical manifestations of CV included purpura (65%), weakness (70%), arthralgia (31%), myalgia (20%), peripheral neuropathy (50%), and renal involvement (20%). At baseline, patients with CV had significantly higher levels of rheumatoid factor and lower levels of C4 complement than patients with ACC, whereas cryocrits were similar between groups (3.2% vs 2.6%). Overall, 60 patients (94%) had a sustained viral response 12 weeks after therapy (SVR12). Among patients with CV, the median BVASv.3 decreased from 9 (range, 2–31) to 3 (0–12) ($P<.001$). Twenty-five patients with CV (71%) achieved a complete clinical response. Immune-suppressive therapy was reduced for 4/13 patients and withdrawn for 6/13. Overall, 48% of patients achieved a CIR. A low baseline cryocrit level (below 2.7%) was the only factor associated with CIR (odds ratio, 9.8; 95% CI, 2.2–44; $P=.03$).

Conclusions: Viral eradication was associated with clinical improvement in most patients with CV. Markers of immune activation, including circulating cryoglobulins, persisted in 52% of patients with CV or ACC, despite SVR12. A longer follow-up period after viral eradication might be necessary to ensure a normal immune response.

KEY WORDS: cryoglobulinemic vasculitis, hepatitis C, DAA, antiviral therapy

Introduction

Approximately 180 million people worldwide are infected with the hepatitis C virus (HCV). Besides progression to cirrhosis and hepatocarcinoma, HCV patients are at risk of developing extrahepatic manifestations that include cryoglobulinemic vasculitis (CV). Indeed, HCV infection is now known to account for more than 90% of all the cases of CV^{1,2}. Circulating mixed cryoglobulins (immune complexes usually consisting of polyclonal IgG and monoclonal IgM with rheumatoid factor activity) are detected in 40-60% of patients with chronic HCV infection, although symptomatic vasculitis is observed only in around 10%³.

CV has recently been classified as a secondary systemic vasculitis and named as HCV-associated CV (HCV-CV)⁴. Main HCV-CV clinical manifestations include purpura, arthralgia, weakness, myalgia, polyneuropathy, glomerulonephritis and intestinal ischemia⁵. Among them, the presence of renal, intestinal, cardiac or central nervous system involvement confers a poor prognosis⁶.

As HCV-CV activity usually correlates with viremia, treatment should be focused on targeting the potential causal agent. Therefore, antiviral agents are the mainstay of therapy for secondary vasculitis⁷. Prednisone (0.5 to 1 mg/kg/day) may also be useful to control disease activity and depletion of B cells by Rituximab may be necessary in severe HCV-CV cases⁸. Despite its side effects and poor tolerance, the combination of rituximab plus Pegylated-Interferon (Peg-IFN)/ribavirin(RBV) compared with antiviral therapy alone has shown better short and long-term results in patients with HCV-CV^{9,10}.

The goals of antiviral treatment are to achieve sustained virological response (SVR), obtain clinical response and minimize the use of immunosuppressive therapy. Historically, the likelihood of attaining complete clinical response with Interferon (IFN)-based regimens was poor and usually followed by a high relapse rate¹¹. The addition of the first protease inhibitors (Telaprevir and Boceprevir) increased response rates to about 70%, but with a significant increase in side effects¹². Currently, the advent of direct-acting antivirals (DAAs) has provided higher SVR rates and lower toxicity burden to HCV-infected patients. Nevertheless, data on the clinical and immunological outcomes in HCV-CV patients are scarce due to the limited number of patients included in previous studies, sometimes the use of suboptimal antiviral regimens and inclusion of patients with moderate vasculitic activity^{13,14,15,16,17}.

The aim of this study was to analyze the virological, clinical and immunological outcomes of patients with HCV-CV or asymptomatic circulating cryoglobulins (ACC) treated with different DAA-based combinations.

Patients and methods

Patients

Prospective observational study of patients with chronic HCV infection and circulating cryoglobulins treated with DAA therapies between January 2014 and April 2016. Those who had detectable circulating cryoglobulins at least on two occasions were candidates to participate in the study. Patients were classified into 1) asymptomatic patients with circulating cryoglobulins (ACC) and 2) HCV-CV patients if they accomplished the definition described at the 2012 Chapel Hill updated consensus for the nomenclature of vasculitides⁴. In addition, only patients with at least 12 weeks of follow-up after antiviral treatment were included in the current analysis.

Exclusion criteria were: 1) Patients with HIV or active HBV infection; 2) Prior history of liver transplantation; 3) Coexistence of autoimmune diseases

The study was approved by the Ethical Committee of Hospital Clínic and was performed according to the Declaration of Helsinki.

Antiviral therapy

Different therapy combinations with the new licensed DAAs in Spain were used according to the EASL guidelines¹⁸ and inserted packages. Sustained virological response (SVR12) was defined as undetectable HCV-RNA levels 12 weeks after treatment cessation. Serum HCV RNA was quantified by real-time PCR assay (VERSANT 1.0, Siemens, lower limit of detection 15IU/mL). Data on all adverse events were prospectively collected during the follow-up.

Clinical assessment and immunological markers

Baseline clinical evaluation included demographic and laboratory data, involvement of organs affected by HCV-CV and the use of glucocorticoids or other immunosuppressive agents. Liver fibrosis was assessed by transient elastography (TE). Cirrhosis was diagnosed by liver biopsy, a TE value > 14 kPa¹⁹, the presence of esophageal varices or ultrasonographic signs of cirrhosis (nodular liver surface, splenomegaly, and/or ascites)²⁰.

Clinical features attributed to HCV-CV included general symptoms (fever, myalgia, arthralgia, weight loss ≥ 2 kg in the last 6 months), cutaneous signs, sicca syndrome, peripheral and central nervous system involvement and renal disease (defined when at least two of the following parameters were present: glomerular filtration rate (eGFR) < 60 ml/min/1.73m², hematuria and/or proteinuria > 0.3 g/24 hours, or when cryoglobulinemic membranoproliferative glomerulonephritis was confirmed in a kidney biopsy).

Disease activity was evaluated by using the Birmingham Vasculitis Activity Score version 3 (BVAS.v3), which has shown to be useful in different systemic vasculitides²¹ and it has previously demonstrated a good correlation with initial disease severity and response to treatment in HCV-CV patients²². Of note, BVAS.v3 is a clinical index of disease activity with a weighted score ranging from 0 to 63 points based on symptoms in separate organ systems.

Immunological markers included rheumatoid factor (RF), C4 complement fraction (C4) and 50% hemolytic complement activity (CH50). Circulating cryoglobulins were quantified from blood samples stored at 37°C for 30 minutes before serum separation. Such serum was later centrifuged at 37°C for 10 minutes and the resulting sample was incubated at 4°C for 7 days before cryoprecipitate examination.

All variables were determined at baseline and 12 weeks after antiviral treatment.

Study Endpoints

Primary endpoints of the study were: 1) rate of SVR12, 2) clinical response in HCV-CV patients and 3) immunological response in all patients.

Clinical response was complete when BVAS.v3 score =0 or if improvement of all affected organs. Complete renal response was defined by decrease in proteinuria to < 0.3 gr/24h, an improvement of at least 20% of eGFR when baseline value was < 60 ml/min/1.73 m² and hematuria resolution. Neuropathy improvement (paresthesia and motor deficit) was evaluated clinically by visual analogue scale and confirmed electrophysiologically when necessary. Partial clinical response was defined as BVAS.v3 $< 50\%$ of the baseline score or improvement in at least half of the involved organs from baseline^{13,23}. All other patients were clinical non-responders.

Immunological response was complete when circulating cryoglobulins became negative along with complement and/or RF normalization and partial when any improvement of immunological parameters was detected.

Secondary endpoints were: 1) immunosuppressant dose reduction or withdrawal in HCV-CV patients and 2) predictive factors associated to clinical or immunological response.

Statistical analysis

Continuous variables were reported as median and interquartile range (percentiles 25–75%) and categorical variables as absolute and relative frequencies. Groups were compared using the Mann–Whitney test for continuous variables and the Fisher’s exact test for the categorical ones. Wilcoxon signed rank test was used for the comparison between two paired samples. Logistic regression analysis was used to estimate the odds ratio [OR (95%CI)] of predictive factors associated with the clinical and immunological response. The analysis was performed with SPSS version 20 (SPSS Inc, Chicago, IL). Significance was established at a two-sided p-value ≤ 0.05 .

Results

Baseline characteristics

Approximately 700 chronic HCV-infected patients received DAA-based antiviral therapy in our center during the study period. Of those, a total of 64 HCV-infected patients had circulating cryoglobulins. The baseline characteristics of the study cohort are depicted in **Table 1**. Thirty-five patients (55%) accomplished the defined criteria of HCV-CV^{4,24}, while 29 patients (45%) had asymptomatic circulating cryoglobulins (ACC). A similar distribution of treatment-experienced patients and antiviral regimens was observed between the two groups. Ten patients (16%) received an IFN-based DAA combination (5 patients in each group) and the remaining 54 received IFN-free therapy. There were no differences in baseline characteristics between groups with IFN-based or IFN-free therapies.

Comparing biological baseline features between groups (**Table 1**), asymptomatic and vasculitic patients did not differ regarding laboratory parameters. Nevertheless, female sex was more frequent in HCV-CV patients (74% vs. 48%; $p=0.05$) and ACC patients had significantly higher TE values (17 vs. 11.7 kPa; $p=0.02$).

The main clinical manifestations in HCV-CV patients included purpura (65%), weakness (70%), peripheral neuropathy (50%), arthralgia (31%), myalgia(20%), and renal involvement (20%). Sixteen of the 18 (89%) patients with neuropathic symptoms had an electromyography confirming peripheral neuropathy (seven presented sensory polyneuropathy, five sensory-motor polyneuropathy, and four sensory-motor multiplex neuropathy). Among the seven

patients with renal involvement, five (71%) had a renal biopsy confirming a membranoproliferative glomerulonephritis. Regarding immunosuppressive therapy at the time of starting DAA agents, 13 (37%) HCV-CV patients were on glucocorticoid therapy. The main manifestation for being treated was purpura (n=6), severe peripheral neuropathy (n=4), renal (n=2) and intestinal involvement (n=1). Rituximab (375mg/m²/week x 4 weeks) was used in 3 subjects >6 months prior to DAAs due to cryoglobulinemic glomerulonephritis (n=2) and severe peripheral neuropathy (n=1) but none of the patients was on rituximab at the time of antiviral therapy. Plasma exchange was performed in one patient with renal involvement and neuropathy >12 months prior to DAAs.

All patients had type II cryoglobulins (usually polyclonal IgG/monoclonal IgM), except those with a cryocrit lower to 2% in whom immunoglobulin component could not be identified (37%). Overall, around 70% of patients showed decreased C4 fraction and CH50 activity and most patients in the CV group had a positive RF. HCV-CV patients showed significantly lower C4 and higher RF levels (p<0.05), and slightly higher cryoglobulins levels (3.2 vs. 2.6%, p=0.10). CH50 activity was similar in both groups (**Table 1**).

Antiviral therapy: efficacy and tolerance

In all, 60 (94%) patients achieved SVR12; no significant differences in SVR12 rates were observed between ACC and HCV-CV patients (93 and 94%, respectively). An overall improvement was observed for the main liver parameters (Table 2). Three patients relapsed at FU12 and one patient presented a breakthrough at week 4 of treatment; cirrhosis was present in 2 of the four patients with treatment failure.

Overall, antiviral treatment tolerance was excellent. Around 50% of patients referred no adverse events. Anemia was the most frequently reported adverse event (26.5%), followed by asthenia and headache. Only four patients treated with RBV needed erythropoietin due to a grade 3 anemia (hemoglobin < 8g/dl), whereas blood transfusion was not necessary in any case. No early discontinuation of antiviral therapy occurred. However, one (2.8%) HCV-CV cirrhotic patient died due to spontaneous bacterial peritonitis and multiorgan failure after end of treatment (**Table 3**).

Clinical response

The overall clinical response in HCV-CV patients was 86% (30/35). Purpura, myalgia, arthralgia and weakness resolved in 90% (28/32) of patients while 71% (5/7) of patients with renal involvement experienced complete recovery and neuropathic symptoms improved in 72%

(13/18). Two patients presenting Sicca syndrome and 1 with intestinal involvement were also asymptomatic at the end of the follow-up. Of note, although two HCV-CV patients did not clear the virus, one presented amelioration of symptoms (neuropathy) and the other achieved a complete clinical response (Meltzer triad: purpura, weakness, and arthralgia)²⁵.

When assessing clinical improvement by BVAS.v3, the score decreased significantly from a median of 9 [range 2-31] to 3 [0-12] points (p=0.001). Among the 25(71%) patients who experienced a complete clinical response (13 by BVAS.v3=0 and 12 by improvement of all affected organs), median BVAS.v3 decreased from 5 [2-31] to 0 [0-5] (p=0.001). In addition, in the five (14%) patients experiencing partial clinical response, BVAS.v3 score decreased from 12 [9-12] to 6 [1-6] (p= 0.06) (**Supplementary Table 1**).

When specifically analyzing the subgroup of patients with vasculitic nephropathy (n=7, median eGFR of 40ml/min), 100 % of patients accomplished viral eradication. Moreover, these excellent SVR rates were followed by complete renal response in 71% (5/7) of subjects with a significant improvement of eGFR [median= 40 to 54 ml/min/1.73m² p=0.03], decrease of proteinuria and disappearance of hematuria. These findings were also consistent with a significantly BVAS.v3 scored decrease from a median of 16 to 3 points (p=0.01).

Cirrhosis stage did not have an influence on the achievement of clinical response. Indeed, a total of 47% cirrhotic patients and 56% non-cirrhotic patients achieved a clinical response (p=0.7) and change in BVAS score did not differ between both groups.

Regarding immunosuppressive therapy, glucocorticoid doses could be reduced in 4/13 (30%) patients, and withdrawn in 6 (46%). Neither rituximab nor plasma exchange sessions were needed in any patient during the study period.

Immunological response

All immunological parameters improved in both groups 12 weeks after therapy. Circulating cryoglobulins became undetectable in 45% and 62% of patients in the HCV-CV and ACC group, respectively (**Table 2**). Among HCV-CV patients, 42%, 71% and 29% of patients presented normalization of C4, CH50, and RF levels, respectively. For the ACC patients, the figures were 33%, 41%, and 33%. Overall, 30 patients (48%) achieved a complete immunological response, 43% (15/35) of HCV-CV and 53% (15/29) ACC (p=0.20) (**Figure 1**). Despite failure to achieve SVR12, one patient achieved a complete clinical and immunological response after treatment with cryoglobulin negativization.

The relationship between clinical and immunological response among HCV-CV patients was assessed. Interestingly, the majority (73%) of immunological responders also presented clinical improvement, whereas immunological parameters normalized only in 37% of patients with clinical response (For detailed information on antiviral therapy and clinical response, see **Supplementary Table 1**).

Predictive factors of clinical and immunological response

We aimed to assess if there were any baseline predictors of clinical and immunological response. Among HCV-CV patients, we failed to find an association between clinical response and relevant variables such as treatment regimen and duration, cirrhosis, cryocrit levels or BVAS.v3 score which might be probably explained by the small number of clinical non-responders.

At the immunological level, the variables associated with complete immunological response for both, HCV-CV and ACC patients were: IFN-based therapy, antiviral treatment duration, baseline cryocrit and RF. Of note, patients treated for 24 weeks had a higher rate of cryocrit negativization (70% vs. 44%; p=0.05), C4 improvement (75% vs. 48%; p=0.05) and higher rate of complete immunological response [70% (14/20) vs. 37% (16/44); p=0.01] compared to those treated for 12 weeks. However, when a multivariate analysis was performed, only the presence of a baseline cryocrit <2.7% (median value) was independently associated to the achievement of complete immunological response (OR =9.8 [2.2-44], p=0.03) (**Table 4**).

Discussion

The landscape of antiviral therapy in HCV-infected patients has dramatically changed with the new DAAs¹⁸. However, few data are available regarding safety and efficacy of the new drugs in CV and particularly in patients with asymptomatic circulating cryoglobulins (ACC), which are at risk of developing CV. Recent studies in CV patients have included only patients under Sofosbuvir-based regimens^{13,14,17}. Therefore, a broader experience on different DAA combinations is needed to elucidate unresolved issues, particularly the efficacy of these regimens in achieving and maintaining clinical and immunological response.

The results of our study showed a greater immunological activation (higher circulating cryoglobulins, lower C4 and CH50 and raised RF) in HCV-CV patients compared to ACC. This finding is explained by a correlation between CV damage and the amount and structure of the

circulating cryoglobulins, particularly by the presence of RF, which can activate the complement cascade²⁶. Although these findings had been already described in HCV-CV patients²⁶, our data show an immunological activation in patients with ACC as well.

The goals of antiviral treatment in patients with HCV-CV are not only achieving SVR but also symptomatic response of CV and minimization of the use of immunosuppressive therapies. Antiviral treatment efficacy was high in both groups (94% SVR12) regardless of the type of antiviral regimen. Disappearance of purpura, arthralgia, myalgia, and weakness was reported in nearly 90% of CV subjects. BVAS.v3 score, a generic tool designed for all types of vasculitis, was used in order to assess the clinical disease status before and after HCV therapy. BVAS.v3 not only can anticipate disease damage but is also predictive of lower survival when the score is >8 points^{21,27}, which occurred in >50% (n=19) of the HCV-CV patients. Despite this high value, a complete clinical response rate of 71% was achieved, reinforced by an overall BVAS.v3 decrease to a median of 3 points. Although the rate of clinical response is similar to that reported in a recent study of Gragnani et al¹⁷; CV patients in our study showed higher baseline vasculitis activity disease, depicted by a mean BVAS.v3 score of 9 vs. 5.4 points¹⁷, respectively.

Kidney involvement has frequently been associated with unfavorable virological and clinical response in HCV-CV patients^{28,29}. However, all of our patients with vasculitic nephropathy achieved SVR12, and 71% also a complete clinical response, suggesting that vasculitic nephropathy would no longer be a pitfall for viral eradication with new DAAs.

This is the largest study showing that glucocorticoids could be either tapered or stopped in most patients after viral clearance with DAA agents, including those with CV nephropathy and neuropathy. Rituximab was not necessary for any of the HCV-CV patients. These excellent outcomes might suggest that immunosuppressive therapy from here onwards could be necessary only in those HCV-CV patients with immediate life-threatening situations.

The clinical response in HCV-CV patients was associated with an immunological improvement in almost all patients, but this response was complete in only 1/3 of them. The asymptomatic immunological activation in ACC patients also improved after therapy. However, some degree of immunological activation was still present in nearly 50% of patients at the end of follow-up. Similar results have been previously reported with both, IFN and DAAs regimens^{16,17,30}. Although a possible explanation of this finding might be that B-cell clonal expansion continues expanding in a virus-independent fashion, the presence of an overt B cell lymphoma was clinically excluded as well^{31,32}. These results suggest that clinical recovery occurs first after viral clearance, and immunological response seems to arise later, probably depending on the

time required for reversion of the B-lymphocyte clonal expansion producing immunological changes^{3,33}. Indeed, a longer treatment course which implies a longer virus-free period appears to favor an immunological response. In Gragnani study, the rate of complete immunological response increased slightly from 32% at week 12 to 39% at week 24, (although not all patients had been assessed at this time-point)¹⁷. Thus, a longer observational period would probably allow us to draw a stronger conclusion regarding immunological and clinical response.

In summary, this is a prospective and single-center study in which patients were homogeneously followed-up and it is the first study assessing the immunological impact of DAA-based therapy at SVR12 in a considerable number of patients with asymptomatic cryoglobulinemia, which are at risk of developing overt CV.

The results of our study show that SVR correlates with clinical and immunological improvement in most patients. Indeed, an abrupt decay of HCV-RNA with current DAAs is associated with a rapid control of clinical vasculitis manifestations, allowing reduction and cessation of traditional immunosuppressive therapy. A complete normalization of the immune activation status seems to take longer after HCV clearance. However, these promising results deserve further evaluation in larger series followed by a longer period of time.

Figure legends

Figure 1 Immunological Parameters in HCV-CV (Panel A) and ACC patients (Panel B) at baseline and 12 weeks after DAAs regimens.

***Author names in bold (Martin Bonacci and Sabela Lens) designate shared co-first authorship**

References

1. Ramos-Casals M, Stone JH, Cid MC BX. The cryoglobulinaemias. *Lancet* 2012;379:348–60.
2. Retamozo S, Brito-Zerón P, Bosch X, et al. Cryoglobulinemic disease. *Oncology (Williston Park)*. 2013;27:1098–1105, 1110–6.
3. Santer DM, Ma MM, Hockman D, et al. Enhanced Activation of Memory, but Not Naïve, B Cells in Chronic Hepatitis C Virus-Infected Patients with Cryoglobulinemia and Advanced Liver Fibrosis. *PLoS One* 2013 Jun 28;8(6):e68308.
4. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, et al. 2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum*. 2013 Jan;65(1):1-11.
5. Cacoub P, Comarmond C, Domont F, et al. Cryoglobulinemia Vasculitis. *Am. J. Med.* 2015;128:950–955.
6. Ferri C, Sebastiani M, Giuggioli D, et al. Mixed cryoglobulinemia: Demographic, clinical, and serologic features and survival in 231 patients. *Semin. Arthritis Rheum*. 2004;33:355–374.
7. Hernandez-Rodriguez J, Alba MA, Prieto-Gonzalez S, et al. Diagnosis and classification of polyarteritis nodosa. *J. Autoimmun.* 2014;48–49:84–89.
8. De Vita S, Quartuccio L, Isola M, et al. A randomized controlled trial of rituximab for the treatment of severe cryoglobulinemic vasculitis. *Arthritis Rheum*. 2012;64:843–853.
9. Saadoun D, Rigon MR, Sene D, et al. Rituximab plus Peg-interferon- α /ribavirin compared with Peg-interferon- α /ribavirin in hepatitis C-related mixed cryoglobulinemia. *Blood*. 2010 Jul 22;116(3):326-34.
10. Dammacco F, Tucci FA, Lauletta G, et al. Pegylated interferon- α , ribavirin, and rituximab combined therapy of hepatitis C virus – related mixed cryoglobulinemia : a long-term study. *Blood*. 2010 Jul 22;116(3):343-53..
11. Saadoun D, Resche-Rigon M, Thibault V, et al. Antiviral therapy for hepatitis C virus--associated mixed cryoglobulinemia vasculitis: a long-term follow-up study. *Arthritis*

- Rheum. 2006;54:3696–3706.
12. Saadoun D, Resche Rigon M, Pol S, et al. PegIFN α /ribavirin/protease inhibitor combination in severe hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia vasculitis. *J. Hepatol.* 2015;62:24–30.
 13. Saadoun D, Thibault V, Si Ahmed SN, et al. Sofosbuvir plus ribavirin for hepatitis C virus-associated cryoglobulinemia vasculitis: VASCUVALDIC study. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(10):1777–82.
 14. Sise ME, Bloom AK, Wisocky J, et al. Treatment of Hepatitis C Virus-Associated Mixed Cryoglobulinemia with Sofosbuvir-Based Direct-Acting Antiviral Agents. *Hepatology.* 2016 Feb;63(2):408–17.
 15. Makara M, Sulyok M, Csacsovski O, et al. Successful treatment of HCV-associated cryoglobulinemia with ombitasvir/paritaprevir/ritonavir, dasabuvir and ribavirin: A case report. *J. Clin. Virol.* 2015;72:66–68.
 16. Cornella SL, Stine JG, Kelly V, et al. Persistence of mixed cryoglobulinemia despite cure of hepatitis C with new oral antiviral therapy including direct-acting antiviral sofosbuvir: A case series. *Postgrad. Med.* 2015; 127: 413–7.
 17. Gragnani L, Visentini M, Fognani E, Urrar T, De Santis A, Petracchia L, Perez M, Ceccotti G, Colantuono S, Mitrevski M, Stasi C, Del Padre M, Monti M, Gianni E, Pulsoni A, Casato M Z AL. Prospective Study of Guideline-Tailored Therapy with Direct-Acting Antivirals for Hepatitis C Virus-Associated Mixed Cryoglobulinemia. *Hepatology.* 2016 Aug 2. doi: 10.1002/hep.28753.
 18. Pawlotsky JM, Aghemo A, Back D, et al, European Association for Study of Liver. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. *J Hepatol.* 2015; 63: 199–236
 19. Castera L, Fornis X, Alberti A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J. Hepatol.* 2008;48:835–847.
 20. Berzigotti A, Castera L. Update on ultrasound imaging of liver fibrosis. *J. Hepatol.* 2013;59:180–182.
 21. Mukhtyar C, Lee R, Brown D, et al. Modification and validation of the Birmingham Vasculitis Activity Score (version 3). *Ann. Rheum. Dis.* 2009;68:1827–1832.

22. Lamprecht P, Moosig F, Gause a., et al. Birmingham vasculitis activity score, disease extent index and complement factor C3c reflect disease activity best in hepatitis C virus-associated cryoglobulinemic vasculitis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2000;18:319–325.
23. Gragnani L, Fognani E, Piluso A, et al. Long-term effect of HCV eradication in patients with mixed cryoglobulinemia: A prospective, controlled, open-label, cohort study. *Hepatology* 2015;61:1145–1153.
24. Vita S De, Soldano F, Isola M, et al. Preliminary classification criteria for the cryoglobulinaemic vasculitis. *Ann. Rheum. Dis.* 2011;70:1183–1190.
25. Meltzer M, Franklin EC, Elias K, McCluskey RT CN. Cryoglobulinemia: a study of twenty-nine patients. I. IgG and IgM cryoglobulins and factors affecting cryoprecipitability. *Am. J. Med.* 1996;40:837–56.
26. Lauletta G, Russi S, Conteduca V, et al. Impact of Cryoglobulinemic Syndrome on the Outcome of Chronic Hepatitis C Virus Infection: A 15-Year Prospective Study. *Medicine (Baltimore).* 2013;92:245–256.
27. Suppiah R, Mukhtyar C, Flossmann O, et al. A cross-sectional study of the Birmingham vasculitis activity score version 3 in systemic vasculitis. *Rheumatology* 2011;50:899–905.
28. Landau DA, Scerra S, Sene D, et al. Causes and predictive factors of mortality in a cohort of patients with hepatitis C virus-related cryoglobulinemic vasculitis treated with antiviral therapy. *J Rheumatol* 2010;37:615–621.
29. Fabrizi F. Hepatitis C virus, cryoglobulinemia, and kidney: novel evidence. *Scientifica (Cairo).* 2012;2012:128382.
30. D'Amico E, Chincoli C, Cacciatore P, et al. Effects of combined antiviral therapy on asymptomatic mixed cryoglobulinemia in naive patients with chronic hepatitis C virus infection: A preliminary study. *Dig. Dis. Sci.* 2005;50:2344–2347.
31. Landau D-A, Saadoun D, Halfon P, et al. Relapse of hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia vasculitis in patients with sustained viral response. *Arthritis Rheum.* 2008;58:604–611.
32. Terrier B, Semoun O, Saadoun D, et al. Prognostic factors in patients with hepatitis C virus infection and systemic vasculitis. *Arthritis Rheum.* 2011;63:1748–1757.

33. Reyes-Avilés E, Kostadinova L, Rusterholtz A, et al. Presence of rheumatoid factor during chronic HCV infection is associated with expansion of mature activated memory B cells that are hypo-responsive to B-cell receptor stimulation and persist during the early stage of IFN free therapy. PLoS One 2015;10:1–16.

ACCEPTED MANUSCRIPT
Table 1. Baseline characteristics of the 64 patients included in the study.

Baseline parameters	All patients n=64	Patients with cryoglobulinemic vasculitis n=35	Asymptomatic patients with circulating cryoglobulins n=29	p
Age (years)	61(52-69)	61(53-70)	63(51-68)	0.96
Female sex n(%)	40(63)	26 (74)	14 (48)	0.05
Race n(%)				-
Caucasian	64(100)	35(100)	29(100)	
Clinical manifestations n(%)				
Purpura		23(66)		-
Arthralgia/arthritis		11(31)		
Weakness		25(71)		
Polyneuropathy		18(51)		
Renal involvement		7(20)		
Sicca syndrome		2(6)		
Abdominal involvement		1(3)		
Viral parameters				
HCV genotype, n(%)				0.29
1a	7 (11)	5 (14)	2 (7)	
1b2	53 (83)	28 (80)	25 (86)	
3	1	-	1(3.5)	
4	2	-	-	
Baseline HCV RNA(log ₁₀ IU/mL)	6.1 (5.5-6.4)	5.9 (5.5-6.5)	6.1 (5.4-6.3)	0.69
General laboratory				
ALT level (IU/mL)	68 (43-137)	64 (34-115)	79 (51-166)	0.09
Platelets(x10 ⁹ /L)	123 (81-172)	150 (84-183)	119 (75-155)	0.22
Creatinine(mg/dl)	0.71 (0.64-0.90)	0.78 (0.62-1.04)	0.7 (0.65-0.85)	0.26
Transient Elastography (kPa)	13.6 (9.7-27)	11.7 (7.5-20.9)	17 (12-34)	0.02
Cirrhosis n(%)	37 (57)	15 (44)	20 (69)	0.36
MELD score	7.5 (6-10)	7 (6-9)	9 (6-10)	0.00
Immunological parameters				
Cryocrit (%)	2.7 (1.3-5)	3.2 (1.5-5.7)	2.6 (1.2-3)	0.10
C4 (g/L)	0.08 (0.02-0.14)	0.02 (0.01-0.11)	0.09 (0.06-0.18)	0.02
CH50 IU/mL	13(11-28)	14(12-29)	12(10-26)	0.11
Rheumatoid Factor (IU/mL)	20 (10-97)	80 (10-200)	10 (10-20)	0.01
Treatment n(%)				
Naïve	26 (41)	13 (37)	13(45)	0.62
Null responder	38 (59)	22 (63)	16 (55)	
DAA Treatment regimens n (%)				0.60
3D	20 (31)	10 (29)	10 (34)	
SOF+LDV	18 (28)	10 (29)	8(28)	
SOF+SIM	4 (6)	2 (6)	2 (7)	
SIM+DAC	4 (6)	3 (8)	1 (3)	
SOF+DAC	3 (5)	2(6)	1(4)	
PegINF+DAAs	10 (16)	5 (14)	5 (17)	
Others**	5 (8)	3 (8)	2 (7)	
Use of RBV, n(%)	45(70)	24(69)	21(72)	0.62
Treatment duration 12/24w n(%)	44 (69)/20 (31)	23 (66)/12 (34)	21 (72)/8 (28)	0.56
Immunosuppressive therapy n(%)				
Corticosteroids		13(37)		
Rituximab		3(8)		

Continuous data are expressed as median (interquartile range).
 PegINF: Pegylated interferon; RBV, Ribavirin; SOF, Sofosbuvir; SIM, Simeprevir; DAC, Daclatasvir; 3D, Paritaprevir/Ritonavir/Ombitasvir/Dasabuvir ;LDV,Ledipasvir;
 ALT, Alaninaminotransferase; GGT, Gamma glutamil transpeptidase; MELD,Model for End-Stage Liver disease. ** Grazoprevir+Elbasvir(n=3), Faldaprevir+
 Deleobuvir(n=2)
 Local laboratory normal range : C4 complement fraction (C4) 0.110-1 g/L; 50% hemolytic complement activity (CH50) 28-60 IU/mL; Rheumatoid Factor (RF) <20
 IU/mL.

Table 2. Clinical, biological and immunological features before and after DAA therapy

Parameters	Cryoglobulinemic Vasculitis n=35			Asymptomatic patients n=29		
	Pretreatment	Follow-up	p	Pretreatment	Follow-up	p
SVR rate n(%)	-	33(94)	-	-	27(93)	-
Cryocrit (%)	3.2 (1.5-5.7)	0.5 (0-1.4)	0.01	2.6 (1.2-3)	0 (0-1.1)	0.01
Circulating cryoglobulins, n(%)	35(100)	19(55)	-	29(100)	11(38)	-
C4 complement fraction (g/L)	0.02 (0.01-0.11)	0.12(0.05-0.16)	0.01	0.09 (0.06-0.18)	0.12 (0.08-0.17)	0.02
Reduced C4 fraction n(%)	26(74)	15(43)	-	18(62)	12(41)	-
CH50 activity U/mL	14(12-29)	44(25-53)	0.01	12(10-26)	31(14-46)	0.01
Reduced CH50 activity n(%)	28(80)	8(22)	-	22(76)	13(45)	-
Rheumatoid factor level (IU/mL)	80 (10-200)	20(10-95)	0.01	10 (10-20)	10 (10-10)	0.04
Positive Rheumatoid factor n(%)	24(69)	17(49)	-	9(31)	6(20)	-
ALT level (IU/mL)	64 (34-115)	24(17-28)	0.01	79 (51-166)	20(16-27)	0.01
Platelets (x10 ⁹ /L)	123 (81-172)	159(107-229)	0.19	119 (75-155)	118(67-170)	0.98
MELD score	7 (6-9)	6(6-8.5)	0.24	9 (6-10)	8(6-10)	0.25
Creatinine level (mg/dl)	1.5 (1-1.7)	1.25 (1.1-2.1)	0.12	0.7 (0.65-0.85)	0.7 (0.62-.082)	0.86
eGFR(ml/min/1.73m ²)	90(53-90)	90(65-90)	0.20	90 (81-90)	90 (83-90)	0.46
Prednisone (mg/day)	10(5-30)	0 (0-3.7)	0.01	-	-	-
Complete clinical remission n(%)	-	25(71)	-	-	-	-
BVAS.v3 score	9 (4-12)	3 (0-6)	0.001	-	-	-
Clinical manifestations n(%)						
Purpura	23(65)	2(6)	0.01			
Arthralgia	11(31)	1(3)	0.01			
Weakness	25(70)	1(2)	0.01			
BVAS.v3 score	4(2-31)	0(0-6)	0.01			
Cryocrit (%)	3.9(2.2-6.2)	0.7(0-1.6)	0.01			
Polyneuropathy	18(50)	5(14)	0.01			
BVAS.v3 score	10.5(2-31)	3(0-12)	0.01			
Cryocrit (%)	5.6(1.2-10)	0.3(0-1.4)	0.04			
Renal involvement	7(20)	2(5)	0.02			
Hematuria >10 RBCs/hpf(n,%)	5(71)	2(25)	0.03			
Median eGFR(ml/min/1.73m ²)	40(31-44)	54(36-60)	0.03			
Proteinuria (g/l)	1.4(1.1-1.9)	0.17(0.9-1.8)	0.73			
Creatinine levels (mg/dl)	1.6(1-1.7)	1.27(1.1-2)	0.89			
BVAS.v3 score	16(2-31)	3(0-12)	0.03			
Cryocrit (%)	6(1.2-15.5)	0(0-1.3)	0.01			

SVR, Sustained virological response; CH50, 50% hemolytic complement activity (CH50); BVAS.v3, Birmingham Vasculitis Activity Score; eGFR, glomerular filtration rate.

* Continuous data are expressed as median (interquartile range) except BVAS.v3 score (median and range)

Table 3. Summary of adverse events during antiviral therapy.

Adverse Event*	HCV-CV patients (n=35)	ACC patients (n=29)
No Adverse Event	18 (51.4%)	18 (62%)
Anemia (Hb <10 g/dl)	11 (31.4%)	6 (21%)
Asthenia	1 (2.8%)	4 (13.8%)
Headache	2 (5.7%)	0
Pruritus	2 (5.7%)	0
Insomnia	1 (2.8%)	1 (3.4%)
Rash	1 (2.8%)	0
Infection	1 (2.8%)	0

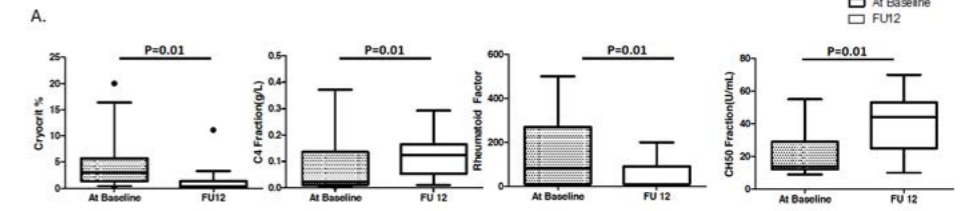
* Some patients had more than one adverse event.

Table 4. Baseline factors associated to the achievement of complete immunological response in the whole cohort.

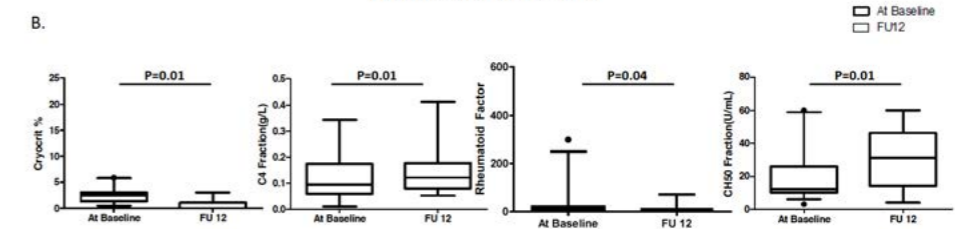
Variable	Univariate analysis* OR [CI 95%]	P value	Multivariate analysis OR [CI 95%]	P value
Cirrhosis	0.4 [0.15-1.1]	0.08		
IFN-based therapy	5.4 [1.01-27]	0.04		
24 vs 12 weeks	3.7 [1.2-11]	0.02		
Cryocrite (%) <2.7	6.6 [2.2-19]	<0.01	9.8 [2.2-44]	0.003
C4 (g/l)	265 [4-999]	0.09		
Rheumatoid factor levels	0.99 [0.98-0.99]	0.03		

Only variables with a p value <0.10 in univariate analysis are displayed.

Cryoglobulinemic Vasculitic Patients



Asymptomatic Patients



4. Discusión

Predicting the development of liver cirrhosis by simple modelling in patients with chronic hepatitis C.

Estudio 1:

El primer trabajo de esta tesis tiene como objetivo elaborar un modelo predictivo del desarrollo de cirrosis en una cohorte de pacientes con hepatitis crónica C no respondedores a tratamiento antiviral para poder identificar a aquellos pacientes con mayor (o menor) urgencia en recibir los nuevos antivirales orales.

La infección crónica por VHC es la principal causa de enfermedad hepática avanzada en el mundo y representa una gran carga para los sistemas de salud nacionales. La progresión de la enfermedad, no obstante, es variable. Tras 20 años de infección se estima una incidencia acumulada de cirrosis del 20% que puede llegar hasta el 45% a los 30 años según las series¹⁸. Sin embargo, las estimaciones sobre la progresión de la fibrosis dependen en gran medida del diseño del estudio, área geográfica y población seleccionada. En teoría, los estudios de seguimiento a largo plazo en grandes cohortes representativas de pacientes constituyen el escenario óptimo para la evaluación del curso natural de la infección crónica por VHC. Por ejemplo, el brote de origen iatrogénico de VHC en una cohorte de receptores de inmunoglobulina anti-D contaminada en Irlanda (1977-1978) y Alemania (1978-1979), ha proporcionado una valiosa información sobre el curso de la infección por VHC¹⁴⁸. A los 35 años de seguimiento, se ha reportado una incidencia de cirrosis hepática del 9.7% (67/718 pacientes) en esta cohorte, siendo superior entre los pacientes no respondedores al tratamiento antiviral (15.3%) y tan sólo del 6% en pacientes con RVS. Dado que los pacientes sin respuesta al tratamiento antiviral representan la población con mayor riesgo de progresión de la fibrosis (dada la ausencia de otras alternativas terapéuticas hasta la llegada de los agentes antivirales directos), ésta fue la población diana del estudio. En la era del interferón, las tasas de respuesta virológica se situaban en torno al 50% en los pacientes con genotipo 1 (el más frecuente en nuestro medio) y 4 mientras que en pacientes con genotipo 2 y 3 podía alcanzar hasta el 80%¹⁴⁹.

Para identificar aquellos factores asociados al desarrollo de cirrosis, se evaluaron 1289 pacientes con infección crónica por VHC y sin cirrosis, que habían recibido tratamiento antiviral basado en interferón entre 1990-2004 en dos centros de referencia (Hospital Clínic y Hospital del Mar, Barcelona). La presencia de cirrosis se excluyó mediante evaluación histológica y clínica. La presencia de otras comorbilidades hepáticas que pudieran contribuir a una fibrosis acelerada como coinfección VHB, hemocromatosis o hepatitis autoinmune fueron motivo de exclusión. Los pacientes fueron monitorizados según la práctica clínica convencional mediante análisis anual y, en caso de cirrosis, con análisis y ecografía semestral. El diagnóstico de cirrosis se estableció mediante la presencia de al menos uno de los siguientes criterios clínicos: estadio de fibrosis F4 en biopsia hepática, presencia de hipertensión portal (GPVH \geq 6 mmHg o varices esofágicas) y presencia de al menos 2 signos ecográficos sugestivos de cirrosis (contornos hepáticos nodulares, diámetro de la vena porta >12mm, esplenomegalia >12cm) en dos estudios de imagen consecutivos. La fecha de cirrosis se estableció en el primer momento en el que se detectó alguno de estos criterios.

En el momento de la inclusión en el estudio, la mayor parte de los pacientes presentaban fibrosis leve (F0-1 METAVIR en el 76% de los pacientes) e infección por el genotipo 1 (67%). Durante un periodo de seguimiento prolongado (mediana de 12 años y rango intercuartílico 9-16), 601 pacientes (46.6%) alcanzaron RVS tras un primer tratamiento antiviral (38%). Los 688 pacientes restantes fueron catalogados como pacientes no respondedores (53.4%).

En global, 207 pacientes desarrollaron cirrosis (16%), porcentaje similar al reportado en otros estudios³⁰. Tan sólo 13 (2.2%) de los pacientes con adquisición de RVS fueron clasificados como cirróticos durante el seguimiento, 7 con F3 basal y el resto con fibrosis leve. Por el contrario, la incidencia acumulada de cirrosis a los 5 y 10 años entre los pacientes no respondedores fue claramente superior, del 7% y 22% respectivamente.

Los datos resultantes de una muestra aleatoria que contenía 2/3 de los pacientes de la cohorte global (n=832) se usaron para la construcción de los modelos de progresión a cirrosis (cohorte de estimación) mientras que el 1/3 restante sirvió como cohorte de validación de dichos modelos predictivos (n=457).

En la cohorte de estimación (n=832), la probabilidad acumulada de desarrollar cirrosis a los 3, 5 y 7 años fue del 4%, 7% y 12% respectivamente en los no respondedores pero menos del 1% en los pacientes que se curaron tras el tratamiento antiviral. El análisis de las variables asociadas al desarrollo de cirrosis era de interés, por tanto, especialmente en el grupo de pacientes que habían fracasado al tratamiento (n=444). En este grupo, las variables clínicas asociadas al desarrollo

de cirrosis fueron la presencia de fibrosis significativa (\geq F2) basal, edad >40 años y AST y GGT elevadas (>100 y >40 UI/L, respectivamente). Datos reportados en la literatura avalan la asociación de estas variables con la progresión de la fibrosis en pacientes con infección crónica por VHC¹⁵⁰⁻¹⁵³.

La combinación de estas variables permitió la construcción de **tres modelos** con el objetivo de predecir el riesgo individual de desarrollar cirrosis. El primer modelo (I) incluyó las 4 variables (AST, GGT, edad y estadio de fibrosis) mientras que, al excluir el análisis histológico (no siempre disponible en la práctica clínica convencional) se obtuvo un segundo modelo (II) simplificado. Finalmente, se generó un tercer modelo (III) que incluyó el estadio de fibrosis basal, los niveles de AST y el índice de Forns como marcador no invasivo de fibrosis a su vez generado por la combinación de variables clínicas y bioquímicas (edad, colesterol, GGT y plaquetas).

Los tres modelos lograron una estimación del riesgo individual de desarrollar cirrosis similar (AUROC ~0.80-0.85) así como **estratificar a los pacientes en grupos de riesgo**. Se consideró un riesgo alto de cirrosis si éste era >20% a los 10 años, riesgo bajo si éste era inferior al 5% e intermedio si se situaba entre 5-20%. El hecho de no incluir la evaluación histológica en el modelo II limitó la discriminación entre pacientes con riesgo intermedio o alto de cirrosis pero fue igualmente eficaz en la detección de pacientes con bajo riesgo de progresión. Es relevante resaltar que la aplicabilidad de estos modelos para predecir cirrosis en la cohorte de validación fue similar (n=457).

Asimismo, conviene destacar que durante el periodo de seguimiento, 83 pacientes presentaron complicaciones derivadas de la cirrosis (42 de ellos descompensación clínica y 41 hepatocarcinoma). **Las mismas variables** clínicas y bioquímicas se asociaron de forma independiente al desarrollo de complicaciones derivadas de la cirrosis y los modelos previamente construidos mostraron una precisión similar con AUROCs entre 0.80 y 0.87. Este dato refuerza sin duda la solidez de los modelos para la predicción de cirrosis.

Entre las **limitaciones** del estudio destaca la ausencia de biopsias pareadas para confirmar el diagnóstico de cirrosis. No obstante, la progresión de la fibrosis es un proceso dinámico y la realización de biopsias seriadas no es clínica ni éticamente aceptable. Además, los criterios clínicos establecidos en el estudio para el diagnóstico de cirrosis son los usados de forma habitual en la práctica clínica^{154,155}. Para evitar un posible sesgo, expertos radiólogos evaluaron de forma ciega las imágenes de aquellos pacientes con diagnóstico ecográfico de cirrosis.

En relación a la evaluación del grado de fibrosis, la ausencia de datos de elastografía hepática puede considerarse otro factor limitante en el estudio. Sin embargo, la

elastografía no fue implementada en la práctica clínica de los centros hasta el año 2005 por lo que tratándose de una cohorte con un largo periodo de seguimiento, esta técnica no estaba disponible para la mayoría de los pacientes. Esta limitación deja abierta la cuestión de si la adición del valor de rigidez hepática medido por elastografía podría mejorar la capacidad predictiva de los modelos.

Por otro lado, desde un punto de vista metodológico, este estudio presenta ciertas características relevantes que otorgan mayor validez a los resultados. Se trata de una amplia cohorte de pacientes con infección crónica por VHC con una evaluación adecuada del grado de lesión hepática. Los pacientes fueron monitorizados en dos centros con amplia experiencia clínica en el manejo de pacientes con hepatitis C y seguidos durante un largo periodo de tiempo. Además de lograr identificar aquellos pacientes con mayor riesgo de cirrosis, los modelos derivados del estudio permitieron la identificación de aquellos pacientes con un riesgo mínimo de progresión con una elevada fiabilidad.

Se considera por tanto, que este sencillo modelo matemático basado en variables clínicas y de laboratorio podría ser útil en la práctica clínica diaria para la toma de decisiones relacionadas con el manejo clínico y tratamiento de los pacientes VHC.

Clinical Gastroenterology and Hepatology

Association between severe portal hypertension and risk of liver decompensation in patients with hepatitis C, regardless of response to antiviral therapy.

Estudio 2:

El segundo estudio que contiene esta tesis tiene como objetivo evaluar el impacto de la respuesta virológica sostenida (RVS) y las mediciones del gradiente de presión venosa hepática (GPVH) sobre la historia natural de los pacientes con cirrosis por VHC e hipertensión portal establecida.

Los pacientes con fibrosis avanzada, independientemente de la etiología de la enfermedad hepática, presentan riesgo de desarrollar descompensación o carcinoma hepatocelular. Diversos estudios han establecido una correlación directa entre el grado de hipertensión portal y el riesgo de presentar complicaciones derivadas de la cirrosis. Así pues, se ha establecido que el GPVH es un marcador subrogado de progresión de la enfermedad hepática. Presentar un GPVH igual o superior a 10 mmHg, definida como hipertensión portal clínicamente significativa, supone mayor riesgo de descompensación y cáncer de hígado^{88,95}. En una cohorte de 213 pacientes con cirrosis compensada sin varices, el GPVH, el valor de albúmina y la etiología vírica de la enfermedad hepática se asociaron al desarrollo de carcinoma hepatocelular. De hecho, presentar un GPVH igual o superior a 10mmHg supuso 6 veces más riesgo de desarrollar hepatocarcinoma. Asimismo, en esta población, el valor del MELD y del GPVH fueron los predictores de desarrollo de descompensación. Por otro lado, el 90% de los pacientes con GPVH inferior a 10 mmHg continuaban compensados tras un periodo de seguimiento de 4 años^{88,95}.

Por otro lado, la obtención de RVS tras el tratamiento antiviral se ha asociado a una reducción del desarrollo de complicaciones derivadas de la cirrosis^{156,157}, disminución de la mortalidad por todas las causas¹²⁷ y por tanto, a una mejoría en el pronóstico de estos pacientes.

Para evaluar el impacto tanto del tratamiento antiviral como de la medición del GPVH en la evolución de pacientes con cirrosis e hipertensión portal, se realizó un estudio retrospectivo multicéntrico en el que se evaluaron 100 pacientes con

cirrosis VHC y cateterismo hepático en los 3 meses previos al inicio del tratamiento antiviral con interferón pegilado alfa-2a y ribavirina entre 2001 y 2009. El diagnóstico de cirrosis fue realizado mediante histología (biopsia hepática con estadio fibrosis F4 en escala METAVIR) o evaluación clínica (GPVH igual o mayor a 6 mmHg, presencia de varices esofágicas, ecografía sugestiva de cirrosis). Todos los pacientes presentaban cirrosis compensada Child-Pugh A dado que en la era del interferón, la presencia de descompensación o disfunción hepatocelular era un criterio de exclusión para recibir tratamiento antiviral (debido a la pobre tolerancia clínica y alto riesgo de efectos adversos graves en estos pacientes¹⁴⁹). Todos los pacientes fueron sometidos a un estudio endoscópico previo para descartar la presencia de varices esofágicas.

Se analizaron los datos de 100 pacientes con GPVH pre-tratamiento. La edad media en la cohorte fue de 51±8 años, el 81% eran genotipo 1 y el 58% naïve a tratamiento antiviral. El valor medio de GPVH fue 12.7±5 mmHg, presentando CSPH (GPVH≥10mmHg) un 74% de la cohorte y varices esofágicas un 30% de los pacientes, todos ellos con GPVH≥10mmHg.

Un 35% de los pacientes obtuvo RVS al finalizar el tratamiento antiviral, siendo este porcentaje similar al descrito en otras cohortes de pacientes con cirrosis y genotipo 1¹⁵⁸. A diferencia de estudios previos¹⁵⁹, el grado de hipertensión portal no se relacionó de forma significativa con la obtención de RVS en nuestra cohorte; de hecho, el 39% de los pacientes lograron la curación virológica a pesar de presentar CSPH basal. En el análisis multivariado, el único factor predictivo de RVS fue el genotipo VHC, siendo mayor la respuesta virológica en pacientes con genotipo 2 o 3 (10/15) comparado con genotipo 1 o 4 (25/85).

Durante una media de seguimiento de 5 años tras el tratamiento antiviral, 19 pacientes presentaron descompensación clínica (ascitis, hemorragia por varices o encefalopatía) y 18 desarrollaron carcinoma hepatocelular (siendo éste el primer evento en 15 pacientes). Al analizar los factores predictivos asociados al desarrollo de descompensación clínica, se observó que la RVS no protegía de la descompensación en nuestra cohorte. De hecho, en un análisis multivariado que incluía la RVS, la puntuación de Child (CTP), el recuento plaquetario, la presencia de varices esofágicas y el valor de GPVH, sólo el GPVH se asoció de forma independiente al desarrollo de descompensación (HR 1.2 [1.1-1.6], p<0.05). La presencia de CSPH basal permitió diferenciar claramente dos grupos de riesgo de desarrollo de descompensación clínica con una probabilidad actuarial de descompensación a los 1, 5 y 7 años del 4%, 25% y 28% en caso de CSPH y tan sólo del 0%, 0% y 16% en ausencia de CSPH.

La obtención de RVS tampoco logró eliminar por completo el riesgo de desarrollar hepatocarcinoma, como ya ha sido reportado en otros estudios¹⁶⁰. En nuestro estudio

no detectamos una asociación significativa entre la presencia de CSPH y el desarrollo de carcinoma hepatocelular probablemente debido al escaso número de eventos.

Es importante remarcar que tanto la RVS como el GPVH fueron factores predictivos asociados a la supervivencia libre de trasplante. Sin embargo, al eliminar la mortalidad asociada al carcinoma hepatocelular, de nuevo sólo el GPVH se relacionó con la supervivencia: 17 de los 21 pacientes (80%) que fueron sometidos a trasplante hepático o murieron, presentaban CSPH en la evaluación basal.

Sin duda, uno de los aspectos más novedosos de este estudio fue la posibilidad de analizar el impacto del tratamiento antiviral sobre las mediciones del gradiente de presión portal. La cohorte de pacientes de este estudio supuso una ocasión única para realizar un análisis del cambio de GPVH intra-tratamiento (pacientes con cateterismo a las 12 semanas de iniciar el tratamiento con PegIFN y RBV) y post-tratamiento (al menos 24 semanas tras el fin de la terapia antiviral).

De los 74 pacientes con CSPH basal, 30 aceptaron realizar un nuevo cateterismo a las 12 semanas del tratamiento. Conviene remarcar que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre aquellos que aceptaron o rechazaron la realización del estudio hemodinámico intra-tratamiento. En este grupo de pacientes se objetivó un descenso global del valor del GPVH (descenso medio del 7.7% con respecto al valor basal), probablemente asociado a una disminución de la actividad necroinflamatoria. De hecho, aquellos pacientes cuyo descenso fue superior al 10% se caracterizaban por presentar un mayor GPVH basal, mayor carga viral basal, pero también mayor reducción de viremia a las 12 semanas. Cabe destacar que la reducción del GPVH se mantuvo sólo en aquellos pacientes que finalmente alcanzaron la RVS mientras que los pacientes no respondedores presentaron un nuevo incremento del GPVH al suspender el tratamiento.

En relación al efecto del tratamiento a las 24 semanas de su finalización, se obtuvieron datos en un total de 62 pacientes. Tampoco en esta ocasión se hallaron diferencias entre los que aceptaron el estudio hemodinámico post-tratamiento y los que no. Como era de esperar, aquellos pacientes que lograron RVS presentaron una reducción mayor del GPVH al finalizar el tratamiento que los no respondedores, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, tan sólo un 37.5% presentaron una reducción del GPVH por debajo de 10 mmHg. Ninguno de los pacientes con GPVH <10mmHg al finalizar el tratamiento presentó descompensación clínica durante el periodo de seguimiento del estudio mientras que un 27% de los que persistieron con CSPH, independientemente de la adquisición de RVS o no, presentaron descompensación.

Este hallazgo es uno de los más relevantes del estudio pues alerta de la importancia de seguir monitorizando de forma estrecha a aquellos pacientes con per-

sistencia de valores de GPVH igual o por encima de 10mmHg tras la adquisición de la curación virológica. Como se ha comentado, esta información es de especial relevancia con la llegada de las combinaciones libres de interferón ya que un mayor número de cirróticos con hipertensión portal o incluso descompensados, serán candidatos a recibir tratamiento antiviral desconociéndose todavía la historia natural de estos pacientes.

Hasta la fecha, los datos de un ensayo clínico destinado a evaluar la eficacia, seguridad e impacto clínico de una combinación libre de interferón en pacientes con CSPH se han presentado únicamente como comunicación a congreso ¹⁶¹. En este estudio, 37 pacientes recibieron la combinación de sofosbuvir y ribavirina durante 48 semanas y fueron sometidos a un cateterismo en los meses previos al inicio del tratamiento y en el momento de finalizarlo. La tasa de RVS fue de un 72% pues se trata de una combinación actualmente no recomendada para pacientes con genotipo 1. Un 38% y un 24% de los pacientes con GPVH ≥ 12 mmHg presentaron una reducción del 10% y del 20% del valor basal del gradiente respectivamente, pero ningún paciente presentó un GPVH por debajo de 12 mmHg al finalizar el tratamiento.

Un estudio publicado recientemente ha reportado datos hemodinámicos pre y post-tratamiento de 100 pacientes tratados eficazmente con antivirales directos sin interferón en la práctica clínica real ¹⁶². Entre los pacientes con CSPH basal (n=41) en este estudio, se refleja una reducción del 10% del valor basal de GPVH en un 63% de los pacientes tras la adquisición de RVS pero tan sólo un 24% lograron un GPVH <10mmHg. Entre las limitaciones del estudio cabe destacar que no todos los pacientes presentaban cirrosis, tan sólo hay 41 pacientes con CSPH (actualmente el colectivo en el que existen menos datos) y que el tiempo entre el fin del tratamiento y el cateterismo post-tratamiento no fue homogéneo.

De estos datos se puede concluir que los tratamientos libres de interferón logran tasas de curación altas también en los pacientes con cirrosis e hipertensión portal clínicamente significativa. No obstante, la obtención de RVS no logra reducir el GPVH por debajo del umbral considerado de riesgo para presentar complicaciones derivadas de la cirrosis en un porcentaje elevado de pacientes. En este contexto, la recomendación actual es monitorizar de cerca a estos pacientes tras el tratamiento y a pesar de la adquisición de RVS durante un período de tiempo indefinido. Serán necesarios más estudios con seguimiento clínico prolongado para poder establecer la historia natural de estos pacientes y poder identificar aquellos factores asociados a un mejor pronóstico.

Asimismo, la asociación temporal será imprescindible para poder analizar el efecto de la RVS sobre el GPVH a largo plazo. En nuestro estudio, aquellos pacientes

que fueron sometidos a un nuevo cateterismo a criterio médico varios años tras la adquisición de RVS (mediana de 5 años tras la finalización del tratamiento antiviral) presentaron un mayor descenso del GPVH, lo que sugiere que inicialmente la reducción del GPVH a las 24 semanas del fin del tratamiento antiviral únicamente refleja la desaparición del proceso inflamatorio asociado a la replicación viral, mientras que la regresión de la fibrosis (si se produce) es un proceso que requiere más tiempo.

Conviene resaltar algunos **aspectos positivos** del estudio que se ha presentado. Por un lado, la obtención de datos de la evolución del GPVH durante y tras el tratamiento antiviral. Por otro lado, el largo de período de seguimiento, que ha permitido establecer conclusiones sólidas acerca de la evolución clínica de estos pacientes.

Entre las **limitaciones** cabe destacar, como ya se ha comentado previamente, que es posible que la medición del GPVH tan sólo 24 semanas tras la finalización del tratamiento no refleje por completo el efecto beneficioso de la adquisición de RVS. El valor de elastografía hepática (ET) no se encontraba disponible en la mayor parte de los pacientes pues se trata de una cohorte antigua. Aunque varios estudios han reportado que la ET es una técnica con una buena sensibilidad y especificidad para estimar la presencia de CSPH, existe una "zona gris" en la que los pacientes no pueden ser clasificados con seguridad en una categoría u otra. En el estudio de Mandorfer y colaboradores ¹⁶², el cambio relativo del valor de ET (basal-final expresado en %) demostró ser una herramienta útil para predecir o descartar la presencia de CSPH al finalizar el tratamiento, no obstante se observó una reducción de la capacidad predictiva en aquellos pacientes con mayor hipertensión portal (≥ 12 mmHg). Asimismo, los puntos de corte descritos deberán ser validados en estudios posteriores por lo que hasta la fecha, no se dispone de suficiente información para usar la ET como técnica no invasiva para estimar los cambios en GPVH.

Clinical Gastroenterology and Hepatology

Virological, clinical and immunological outcomes of patients with hepatitis C virus-associated cryoglobulinemia treated with direct-acting antivirals.

Estudio 3:

Por último, en el tercer estudio de la tesis se evalúa de forma prospectiva la respuesta virológica, clínica e inmunológica de una cohorte de pacientes con crioglobulinemia mixta (con o sin vasculitis) antes y después del tratamiento antiviral basado en agentes antivirales directos (DAAs).

Se incluyeron en el estudio todos los pacientes tratados con DAAs entre Enero/2014 y Abril/2016 con al menos dos determinaciones de criocrito positivo. Desde un punto de vista metodológico, los pacientes se clasificaron en función de la presencia de sintomatología clínica o no como 1) crioglobulinemia mixta asintomática (*asymptomatic circulating cryoglobulins* o ACC) o 2) vasculitis crioglobulinémica asociada al VHC (VC) según los criterios de Chapel Hill⁴⁷. En los pacientes con VC se determinó, además, la puntuación Birmingham Vasculitis Activity Score versión 3 (BVAS.v3)^{48,163}. La respuesta clínica completa se definió como BVAS.v3=0 o mejoría de todos los órganos afectados tras el tratamiento. En caso de reducción de BVAS.v3 por debajo del 50% del valor basal o mejoría de al menos la mitad de los órganos, la respuesta clínica se consideró parcial. Por otro lado, la respuesta inmunológica se consideró completa sólo en caso de negativización del criocrito y normalización de los niveles de C4 o de factor reumatoideo (FR) tras el tratamiento.

De un total de 700 pacientes con hepatitis C que recibieron tratamiento antiviral con DAAs en el periodo del estudio, 64 pacientes cumplieron los criterios de inclusión, 29 (45%) asintomáticos (ACC) y 35 (55%) con vasculitis (VC). Este es el primer estudio que reporta los datos de eficacia y seguridad de combinaciones no basadas en sofosbuvir en pacientes con crioglobulinemia^{145,146}. Además, diez pacientes recibieron combinaciones antivirales basadas en interferón, 5 en cada grupo. Todos los pacientes fueron evaluados a nivel basal y 12 semanas tras la finalización del tratamiento antiviral. En cuanto a las características basales, no hubo diferencias en los parámetros de laboratorio, el tipo de tratamiento antiviral o respuesta

previa al tratamiento entre ambos grupos. El valor mediano de elastografía hepática fue mayor entre los pacientes con ACC, ya que en este grupo el criterio de priorización del tratamiento se basaba únicamente en el grado de severidad de la enfermedad hepática.

Entre los pacientes con VC, la frecuencia de las principales manifestaciones clínicas fueron similares a las reportadas en estudios previos. Sin embargo, la puntuación mediana de BVAS.v3 al inicio del tratamiento fue claramente superior al reportado por otro estudio reciente similar¹⁴⁶ (9 vs 5.4 puntos), lo que sugiere que, en global, los pacientes de este estudio presentaban una mayor afectación desde el punto de vista de la vasculitis. Las principales manifestaciones fueron púrpura (65%), debilidad (70%), neuropatía periférica (50%), artralgia (31%), mialgia y afectación renal (20% en cada caso). En 5 de los 7 pacientes con afectación renal existía confirmación histopatológica de glomerulonefritis membranoproliferativa. Trece pacientes (37%) recibían tratamiento con corticoides en el momento de iniciar el tratamiento. Tres pacientes habían recibido rituximab y un paciente plasmaféresis, pero en ambos casos más de 6-12 meses antes de iniciar el tratamiento antiviral (pudiéndose descartar la influencia del tratamiento inmunomodulador en la respuesta inmunológica).

A pesar de la presencia de crioglobulinas circulantes en ambos grupos, los pacientes con CV presentaban mayor grado de "activación inmune" (niveles mayores de criocrito y FR y más bajos de C4 y CH50) en comparación a los pacientes ACC. Estudios previos han asociado el nivel de crioglobulinas circulantes y de FR a una mayor activación de la cascada del complemento, en parte responsable del daño histológico propio de la vasculitis¹⁶⁴ pero hasta la fecha existen pocos datos sobre el grado de activación inmune en los pacientes ACC, si ésta se asocia a mayor riesgo de manifestar una VC y cuál es el impacto del tratamiento antiviral a nivel inmunológico.

Los datos de este estudio demuestran, en primer lugar, una **alta tasa de eficacia virológica global** (94%) y similar en ambos grupos. El perfil de seguridad fue excelente, pues aunque la mitad de los pacientes presentaron algún efecto adverso durante el tratamiento, éstos fueron leves. La anemia fue el efecto secundario más frecuente, 4 pacientes recibieron EPO pero ninguno precisó transfusión sanguínea.

Entre los pacientes con VC (n=35), la tasa de **respuesta clínica** fue del 86%. El 90% de los pacientes con púrpura, artralgia y debilidad presentaron remisión completa de la sintomatología. Cinco de los 7 pacientes presentaron resolución de la afectación renal (70%) y 13 (72%) de la neuropática. Conviene resaltar que a pesar de no lograr RVS, un paciente presentó una respuesta clínica completa y otro parcial. La mejoría clínica se cuantificó con la puntuación de BVAS.v3 obje-

tivándose una mejoría de 9 [rango 2-31] a 3 [0-12] 12 semanas tras finalizar el tratamiento antiviral.

En cuanto a la **respuesta inmunológica**, todos los parámetros inmunológicos mejoraron en ambos grupos tras la finalización del tratamiento antiviral. Un 45% de los pacientes ACC y un 62% de los pacientes con VC presentaron negativización del criocrito. En global, un 48% de los pacientes se consideraron respondedores completos desde un punto de vista inmunológico (43% de los ACC y 53% de los VC; $p=0.20$), incluido un paciente que presentó una recaída tras la finalización del tratamiento antiviral.

Es importante destacar que no se encontró una relación clara entre la obtención de respuesta clínica e inmunológica entre los pacientes con VC. De hecho, a pesar de que la mayoría de los respondedores inmunológicos (73%) también presentaron respuesta clínica, los parámetros inmunológicos se normalizaron sólo en el 37% de los pacientes con respuesta clínica.

Finalmente, otro de los objetivos de este estudio fue determinar si existían parámetros basales que permitieran anticipar la obtención de respuesta clínica o inmunológica. Entre los pacientes con VC, no logramos identificar ninguna variable independiente asociada a la obtención de respuesta clínica tras el tratamiento antiviral, probablemente debido al escaso número de no respondedores. En la cohorte global (ACC y VC) sin embargo, la presencia de un criocrito $<2.7\%$ (valor mediano de la población del estudio) fue el único factor que de forma estadísticamente significativa se asoció a la obtención de respuesta inmunológica completa en el análisis multivariado (OR =9.8 [2.2-44], $p=0.03$).

Entre las fortalezas de este estudio, conviene destacar varios aspectos desde un **punto de vista metodológico**:

- Éste es el mayor estudio que evalúa el impacto inmunológico del tratamiento antiviral con DAAs en pacientes asintomáticos con crioglobulinas circulantes.
- Es el primer estudio en el que se han usado combinaciones de DAAs no basadas en sofosbuvir.
- La puntuación BVAS.v3, un índice clínico de actividad de la enfermedad cuya puntuación ponderada va de 0-63 puntos, ha sido usado de forma genérica para evaluar la severidad de las manifestaciones clínicas en las vasculitis, asociándose a una menor supervivencia la presencia de una puntuación de >8 puntos. Los resultados de este estudio y el de Gragnani *et al*¹⁴⁶, apoyan la utilidad de esta puntuación para evaluar la afectación clínica de la VC asociada al

VHC antes y después del tratamiento antiviral con DAAs. Conviene resaltar que no se han objetivado diferencias en cuanto a respuesta clínica y/o respuesta virológica en este estudio entre aquellos con puntuación de BVAS.v3 por encima o por debajo de 8 puntos.

- Con otro estudio publicado recientemente¹⁴⁵, este estudio reúne el mayor número de pacientes con afectación renal y VC tratados con DAAs. La afectación renal se evaluó minuciosamente, definiéndose en caso de presentar al menos dos de los siguientes parámetros: tasa de filtrado glomerular (eGFR) $<60\text{ml}/\text{min}/1.73\text{m}^2$, hematuria y/o proteinuria $>0.3\text{ g}/24\text{h}$ o biopsia renal confirmatoria de la presencia de glomerulonefritis membranoproliferativa. La respuesta al tratamiento se consideró completa en caso de mejoría de al menos un 20% del eGFR, descenso de proteinuria a $<0.3\text{ g}/24\text{h}$ y resolución de la hematuria.
- Finalmente, en este estudio se demuestra que el tratamiento antiviral basado en DAAs logra la disminución de dosis o suspensión del tratamiento con glucocorticoides, incluso en pacientes con nefropatía y neuropatía. Durante el período del estudio, ningún paciente precisó rituximab u otros fármacos inmunosupresores. Estos datos sugieren que el uso de fármacos inmunosupresores podría quedar reservado de forma coadyuvante únicamente para aquellos pacientes con afectación orgánica grave.

Finalmente, se presentan algunas de las **limitaciones** de este estudio. La principal es la duración del período de seguimiento (12 semanas tras la finalización del tratamiento). No se puede descartar que la sintomatología asociada a algunas manifestaciones clínicas de la VC, como la afectación renal o la neuropática, precisen de un mayor período libre de viremia para mejorar. A pesar de haber eliminado el agente etiológico, queda todavía por determinar el impacto a medio-largo plazo de la presencia de crioglobulinas circulantes (55% de pacientes VC y 38% de ACC). Asimismo, tampoco se puede descartar que a pesar de una respuesta clínica o inmunológica completa, algunos pacientes puedan presentar nuevos brotes de la enfermedad en un futuro y/o necesiten tratamiento con inmunomoduladores. Por este motivo, para extraer conclusiones sólidas serán necesarios más estudios con un mayor período de seguimiento. La cohorte de este estudio, sigue monitorizada desde un punto de vista clínico e inmunológico en vista de poder dar respuesta a estas preguntas en un futuro.

5. Conclusiones

- 1- La identificación de aquellos pacientes con mayor riesgo de progresión de la hepatitis C es relevante para priorizar la indicación de tratamiento antiviral. Se estima que alrededor de un 20-30% de los pacientes con infección crónica por VHC desarrollan cirrosis 15-30 años tras la infección. No obstante, debido a la lenta velocidad de progresión de la enfermedad, son necesarias amplias cohortes de pacientes con fibrosis leve, monitorizados durante un largo periodo de tiempo.
- 2- La combinación de simples variables clínicas (fibrosis, edad, GGT y AST) permite predecir el riesgo individual de desarrollar cirrosis a medio plazo y, por tanto, identificar aquellos pacientes con mayor (y menor) riesgo de progresión. En un contexto de restricciones para la administración de tratamientos libres de interferón, la identificación correcta de pacientes con hepatitis C y escaso riesgo de progresión es esencial para médicos y pacientes.
- 3- Los pacientes con cirrosis por VHC e hipertensión portal presentan un riesgo elevado de desarrollar descompensación hepática o carcinoma hepatocelular. Aquellos pacientes con hipertensión portal clínicamente significativa (definida por la presencia de un GPVH \geq 10 mmHg) representan el grupo de mayor riesgo.
- 4- A pesar de que la obtención de RVS se asocia a una disminución del GPVH 24 semanas tras la finalización de tratamiento antiviral, este descenso es leve y tan sólo un porcentaje reducido de pacientes logran una disminución del GPVH por debajo del umbral de 10 mmHg.
- 5- A pesar de la obtención de respuesta virológica, el riesgo de descompensación hepática persiste en aquellos pacientes con hipertensión portal clínicamente significativa. El gradiente de presión portal basal, y no la obtención de RVS, es el factor pronóstico más importante asociado al desarrollo de descompensación. Estos datos refuerzan la necesidad de una monitorización estrecha de los pacientes con hipertensión portal clínicamente significativa a pesar de la adquisición de RVS.
- 6- Las combinaciones de DAAs son altamente eficaces y seguras en pacientes con crioglobulinemia mixta asociada al VHC. La obtención de una RVS se asocia significativamente a una respuesta clínica e inmunológica en pacientes que reciben tratamiento con DAAs, lo que permite la disminución o incluso suspensión de los tratamientos inmunosupresores.
- 7- No obstante, a pesar de la obtención de RVS, existe una proporción de pacientes en los que persisten crioglobulinas circulantes y, por tanto, la activación inmune. Se requieren estudios con un mayor periodo de seguimiento para establecer el impacto clínico de este hallazgo y su durabilidad.

6. Bibliografía

1. Lindenbach, B. D. *et al.* Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**, 623–6 (2005).
2. Dahari, H. *et al.* Second hepatitis C replication compartment indicated by viral dynamics during liver transplantation. *J. Hepatol.* **42**, 491–498 (2005).
3. Ramirez, S. *et al.* Hepatitis C Virus Compartmentalization and Infection Recurrence after Liver Transplantation. *Am. J. Transplant.* **9**, 1591–1601 (2009).
4. Koutsoudakis, G., Forns, X. & Pérez-del-Pulgar, S. Biología molecular aplicada del virus de la hepatitis C. *Gastroenterol. Hepatol.* **36**, 280–293 (2013).
5. Jirasko, V. *et al.* Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly. *J. Biol. Chem.* **283**, 28546–62 (2008).
6. Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J., Gorbalenya, A. E. & Rice, C. M. The NS5A Protein of Hepatitis C Virus Is a Zinc Metalloprotein. *J. Biol. Chem.* **279**, 48576–48587 (2004).
7. Blight, K. J. *et al.* Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* **290**, 1972–4 (2000).
8. Pietschmann, T., Lohmann, V., Rutter, G., Kurpanek, K. & Bartenschlager, R. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J. Virol.* **75**, 1252–64 (2001).
9. Hughes, M., Griffin, S. & Harris, M. Domain III of NS5A contributes to both RNA replication and assembly of hepatitis C virus particles. *J. Gen. Virol.* **90**, 1329–1334 (2009).
10. Lavanchy, D. *et al.* EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. *J. Hepatol.* **63**, 199–236 (2015).
11. Duffy, S., Shackelton, L. A. & Holmes, E. C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 267–276 (2008).
12. Quer, J. *et al.* High-resolution hepatitis C virus subtyping using NS5B deep sequencing and phylogeny, an alternative to current methods. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 219–26 (2015).
13. Razavi, H. *et al.* The present and future disease burden of hepatitis C virus (HCV) infection with today's treatment paradigm. *J. Viral Hepat.* **21 Suppl 1**, 34–59 (2014).
14. García-Fulgueiras, A. *et al.* Hepatitis C and hepatitis B-related mortality in Spain. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **21**, 895–901 (2009).
15. Bruguera, M. & Forns, X. Hepatitis C en España. *Med. Clin. (Barc).* **127**, 113–117 (2006).
16. World Health Organization (WHO). Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis c infection (update). 138 (2016). doi:10.1186/1471-2334-13-288
17. Mohd Hanafiah, K., Groeger, J., Flaxman, A. D. & Wiersma, S. T. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* **57**, 1333–42 (2013).
18. Afdhal, N. H. The natural history of hepatitis C. *Semin. Liver Dis.* **24 Suppl 2**, 3–8 (2004).
19. Gerlach, J. T. *et al.* Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology* **125**, 80–88 (2003).
20. Marcellin, P., Asselah, T. & Boyer, N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology* **36**, ajhep0360s47 (2002).
21. Westin, J. *et al.* Moderate alcohol intake increases fibrosis progression in untreated patients with hepatitis C virus infection. *J. Viral Hepat.* **9**, 235–241 (2002).
22. Negro, F. *et al.* Hemochromatosis gene mutations in chronic hepatitis C patients with and without liver siderosis. *J. Med. Virol.* **60**, 21–7 (2000).
23. Leandro, G. *et al.* Relationship between steatosis, inflammation, and fibrosis in chronic hepatitis C: a meta-analysis of individual patient data. *Gastroenterology* **130**, 1636–42 (2006).
24. Kramer, J. R. *et al.* Effect of Human Immunodeficiency Virus and Antiretrovirals on Outcomes of Hepatitis C: A Systematic Review From an Epidemiologic Perspective. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **5**, 1321–1328.e7 (2007).
25. Pineda, J. A. *et al.* HIV coinfection shortens the survival of patients with hepatitis C virus-related decompensated cirrhosis. *Hepatology* **41**, 779–789 (2005).

26. Alberti, A. *et al.* The interaction between hepatitis B virus and hepatitis C virus in acute and chronic liver disease. *J. Hepatol.* **22**, 38–41 (1995).
27. Thein, H.-H., Yi, Q., Dore, G. J. & Krahn, M. D. Natural history of hepatitis C virus infection in HIV-infected individuals and the impact of HIV in the era of highly active antiretroviral therapy: a meta-analysis. *AIDS* **22**, 1979–91 (2008).
28. Tong, M. J., el-Farra, N. S., Reikes, A. R. & Co, R. L. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N. Engl. J. Med.* **332**, 1463–6 (1995).
29. Thein, H.-H., Yi, Q., Dore, G. J. & Krahn, M. D. Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: A meta-analysis and meta-regression. *Hepatology* **48**, 418–431 (2008).
30. Wiese, M. *et al.* Evaluation of liver disease progression in the German hepatitis C virus (1b)-contaminated anti-D cohort at 35 years after infection. *Hepatology* **59**, 49–57 (2014).
31. Schuppan, D. *et al.* Liver cirrhosis. *Lancet (London, England)* **371**, 838–51 (2008).
32. Tsochatzis, E. A., Bosch, J. & Burroughs, A. K. Liver cirrhosis. *Lancet* **383**, 1749–1761 (2014).
33. de Franchis, R. *et al.* Expanding consensus in portal hypertension: Report of the Baveno VI Consensus Workshop: Stratifying risk and individualizing care for portal hypertension. *J. Hepatol.* **63**, 743–52 (2015).
34. D’Amico, G. *et al.* Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: A systematic review of 118 studies. *J. Hepatol.* **44**, 217–231 (2006).
35. El-Serag, H. B. Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States. *Hepatology* **36**, S74–S83 (2002).
36. Forner, A., Llovet, J. M. & Bruix, J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* **379**, 1245–1255 (2012).
37. Santi, V. *et al.* Semiannual surveillance is superior to annual surveillance for the detection of early hepatocellular carcinoma and patient survival. *J. Hepatol.* **53**, 291–297 (2010).
38. Cacoub, P. *et al.* Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C virus infection.
39. Sene D, Ghillani-Dalbin P, Thibault V, Guis L, Musset L, Duhaut P, Poynard T, Piette JC, C. P. Longterm course of mixed cryoglobulinemia in patients infected with hepatitis C virus. *J Rheumatol* **31**, 2199–206 (2004).
40. Ramos-Casals, M., Stone, J. H., Cid, M. C. & Bosch, X. The cryoglobulinaemias. *Lancet* **379**, 348–360 (2012).
41. Adinolfi, L. E. *et al.* Epidemiology, clinical spectrum and prognostic value of mixed cryoglobulinaemia in hepatitis C virus patients: a prospective study. *Ital. J. Gastroenterol.* **28**, 1–9 (1996).
42. Ferri, C. *et al.* Association between hepatitis C virus and mixed cryoglobulinemia [see comment]. *Clin. Exp. Rheumatol.* **9**, 621–4
43. Cacoub, P., Comarmond, C., Domont, F., Savey, L. & Saadoun, D. Cryoglobulinemia Vasculitis. *Am. J. Med.* **128**, 950–955 (2015).
44. Rosa, D. *et al.* Activation of naïve B lymphocytes via CD81, a pathogenetic mechanism for hepatitis C virus-associated B lymphocyte disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 18544–18549 (2005).
45. Meltzer, M. & Franklin, E. C. Cryoglobulinemia—a study of twenty-nine patients. I. IgG and IgM cryoglobulins and factors affecting cryoprecipitability. *Am. J. Med.* **40**, 828–36 (1966).
46. Retamozo, S., Brito-Zerón, P. & Ramos-Casals, M. Tratamiento de la vasculitis crioglobulinémica asociada a infección por el virus de la hepatitis C. *Med. Clin. (Barc).* **144**, 410–417 (2015).
47. Jettette, J. C. *et al.* 2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Revmatol.* **20**, 5–15 (2012).
48. Mukhtyar, C. *et al.* Modification and validation of the Birmingham Vasculitis Activity Score (version 3). *Ann. Rheum. Dis.* **68**, 1827–32 (2009).
49. Mihäilä, R.-G. Hepatitis C virus - associated B cell non-Hodgkin’s lymphoma. *World J. Gastroenterol.* **22**, 6214–23 (2016).
50. Agnello, V., Zhang, Q. X., Abel, G. & Knight, G. B. The association of hepatitis C virus infection with monoclonal rheumatoid factors bearing the WA cross-idiotype: implications for the etiopathogenesis and therapy of mixed cryoglobulinemia. *Clin. Exp. Rheumatol.* S101-4
51. Zignego, A. L., Gragnani, L., Giannini, C. & Laffi, G. The hepatitis C virus infection as a systemic disease. *Intern. Emerg. Med.* **7 Suppl 3**, S201-8 (2012).
52. Cacoub, P. *et al.* Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C virus infection. *Ther. Adv. Infect. Dis.* **3**, 3–14 (2016).
53. Landau, D.-A. *et al.* Relapse of hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia vasculitis in patients with sustained viral response. *Arthritis Rheum.* **58**, 604–11 (2008).
54. La Mura, V. *et al.* Antiviral therapy after complete response to chemotherapy could be efficacious in HCV-positive non-Hodgkin’s lymphoma. *J. Hepatol.* **49**, 557–63 (2008).
55. Terrier, B. *et al.* Efficacy and tolerability of rituximab with or without PEGylated interferon alfa-2b plus ribavirin in severe hepatitis C virus-related vasculitis: A long-term followup study of thirty-two patients. *Arthritis Rheum.* **60**, 2531–2540 (2009).
56. Cacoub, P. *et al.* Dermatological side effects of hepatitis C and its treatment: Patient management in the era of direct-acting antivirals. *J. Hepatol.* **xxx**, 1–9 (2011).
57. Sneller, M. C., Hu, Z. & Langford, C. A. A randomized controlled trial of rituximab following failure of antiviral therapy for hepatitis C virus-associated cryoglobulinemic vasculitis. *Arthritis Rheum.* **64**, 835–42 (2012).
58. De Vita, S. *et al.* A randomized controlled trial of rituximab for the treatment of severe cryoglobulinemic vasculitis. *Arthritis Rheum.* **64**, 843–53 (2012).
59. Lee, Y. A., Wallace, M. C. & Friedman, S. L. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut* **64**, 830–41 (2015).
60. Friedman, S. L. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. doi:10.1053/j.gastro.2008.03.003
61. Trautwein, C., Friedman, S. L., Schuppan, D. & Pinzani, M. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *J. Hepatol.* **62**, S15–S24 (2015).
62. Wallace, M., Friedman, S. & Mann, D. Emerging and Disease-Specific Mechanisms of Hepatic Stellate Cell Activation. *Semin. Liver Dis.* **35**, 107–118 (2015).
63. Melton, A. C., Datta, A. & Yee, H. F. [Ca²⁺]_i-independent contractile force generation by rat hepatic stellate cells in response to endothelin-1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **290**, G7-13 (2006).
64. Pinzani, M. *et al.* Fat-storing cells as liver-specific pericytes. Spatial dynamics of agonist-stimulated intracellular calcium transients. *J. Clin. Invest.* **90**, 642–6 (1992).
65. Theise, N. D. Liver biopsy assessment in chronic viral hepatitis: a personal, practical approach. *Mod. Pathol.* **20 Suppl 1**, S3-14 (2007).
66. Bedossa, P. & Poynard, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *Hepatology* **24**, 289–293 (1996).
67. Ishak, K. G. Chronic hepatitis: morphology and nomenclature. *Mod. Pathol.* **7**, 690–713 (1994).
68. Knodell, R. G. *et al.* Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* **1**, 431–5
69. Scheuer, P. J. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J. Hepatol.* **13**, 372–4 (1991).
70. Sebastiani, G., Gkouvatsos, K. & Pantopoulos, K. Chronic hepatitis C and liver fibrosis. *World J. Gastroenterol.* **20**, 11033–53 (2014).
71. Colloredo, G. *et al.* Impact of liver biopsy size on histological evaluation of chronic viral hepatitis: the smaller the sample, the milder the disease. *J. Hepatol.* **39**, 239–244 (2003).
72. Rousselet, M.-C. *et al.* Sources of variability in histological scoring of chronic viral hepatitis. *Hepatology* **41**, 257–264 (2005).
73. Castera, L. Noninvasive methods to assess liver disease in patients with hepatitis B or C. *Gastroenterology*

- 142**, 1293–1302.e4 (2012).
74. Imbert-Bismut, F. *et al.* Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet (London, England)* **357**, 1069–75 (2001).
 75. Parkes, J. *et al.* Enhanced Liver Fibrosis (ELF) test accurately identifies liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *J. Viral Hepat.* **18**, 23–31 (2011).
 76. Wai, C.-T. *et al.* A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **38**, 518–26 (2003).
 77. Sterling, R. K. *et al.* Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* **43**, 1317–25 (2006).
 78. Forns, X. *et al.* Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* **36**, 986–92 (2002).
 79. Carrión, J. a. [Utility of Fibroscan in the evaluation of liver fibrosis]. *Gastroenterol. Hepatol.* **32**, 415–23 (2011).
 80. Castera, L., Forns, X. & Alberti, A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J. Hepatol.* **48**, 835–847 (2008).
 81. Myers, R. P. *et al.* Feasibility and diagnostic performance of the FibroScan XL probe for liver stiffness measurement in overweight and obese patients. *Hepatology* **55**, 199–208 (2012).
 82. Coco, B. *et al.* Transient elastography: a new surrogate marker of liver fibrosis influenced by major changes of transaminases. *J. Viral Hepat.* **14**, 360–369 (2007).
 83. Foucher, J. *et al.* Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut* **55**, 403–8 (2006).
 84. Nightingale, K. *et al.* Acoustic radiation force impulse imaging: in vivo demonstration of clinical feasibility. *Ultrasound Med. Biol.* **28**, 227–35 (2002).
 85. Muthupillai, R. *et al.* Magnetic resonance elastography by direct visualization of propagating acoustic strain waves. *Science* **269**, 1854–7 (1995).
 86. Yepes-Barreto, I., Rincón-Rodríguez, D., De La Vega Catalina-Rodríguez, M., Ripoll-Noiseux, C. & Bañares-Cañizares, R. Gastroenterología y Hepatología Aspectos técnicos de la hemodinámica hepática y la biopsia hepática transyugular Technical features of liver hemodynamics and transjugular liver biopsy. *Gastroenterol. Hepatol.* **34**, 116–123 (2010).
 87. Bosch, J. *et al.* The management of portal hypertension: Rational basis, available treatments and future options. *J. Hepatol.* **48**, S68–S92 (2008).
 88. Ripoll, C. *et al.* Hepatic venous pressure gradient predicts clinical decompensation in patients with compensated cirrhosis. *Gastroenterology* **133**, 481–8 (2007).
 89. Garcia-Tsao, G. & Bosch, J. Management of Varices and Variceal Hemorrhage in Cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* **362**, 823–832 (2010).
 90. de Franchis, R. Revising consensus in portal hypertension: report of the Baveno V consensus workshop on methodology of diagnosis and therapy in portal hypertension. *J. Hepatol.* **53**, 762–8 (2010).
 91. Groszmann, R. J. *et al.* Beta-Blockers to Prevent Gastroesophageal Varices in Patients with Cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2254–2261 (2005).
 92. D’Amico, G. *et al.* Hepatic Vein Pressure Gradient Reduction and Prevention of Variceal Bleeding in Cirrhosis: A Systematic Review. *Gastroenterology* **131**, 1611–1624 (2006).
 93. Merkel, C. *et al.* The Hemodynamic Response to Medical Treatment of Portal Hypertension as a Predictor of Clinical Effectiveness in the Primary Prophylaxis of Variceal Bleeding in Cirrhosis. *Hepatology* **32**, 930–934 (2000).
 94. Bosch, J. *et al.* [Portal hypertension: Recommendations for evaluation and treatment: Consensus document sponsored by the Spanish Association for the Study of the Liver (AEEH) and the Biomedical Research Network Center for Liver and Digestive Diseases(CIBERehd)]. *Gastroenterol. Hepatol.* **35**, 421–50 (2012).
 95. Ripoll, C. *et al.* Hepatic venous pressure gradient predicts development of hepatocellular carcinoma independently of severity of cirrhosis. *J. Hepatol.* **50**, 923–8 (2009).
 96. Vizzutti, F. *et al.* Liver stiffness measurement predicts severe portal hypertension in patients with HCV-related cirrhosis. *Hepatology* **45**, 1290–1297 (2007).
 97. BUREAU, C. *et al.* Transient elastography accurately predicts presence of significant portal hypertension in patients with chronic liver disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **27**, 1261–1268 (2008).
 98. Llop, E. *et al.* Assessment of portal hypertension by transient elastography in patients with compensated cirrhosis and potentially resectable liver tumors. *J. Hepatol.* **56**, 103–108 (2012).
 99. Castéra, L. *et al.* Early detection in routine clinical practice of cirrhosis and oesophageal varices in chronic hepatitis C: comparison of transient elastography (FibroScan) with standard laboratory tests and non-invasive scores. *J. Hepatol.* **50**, 59–68 (2009).
 100. Pearlman, B. L. & Traub, N. Sustained virologic response to antiviral therapy for chronic hepatitis C virus infection: a cure and so much more. *Clin. Infect. Dis.* **52**, 889–900 (2011).
 101. Bacon, B. R. *et al.* Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1207–17 (2011).
 102. Jacobson, I. M. *et al.* Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2405–16 (2011).
 103. Poordad, F. *et al.* Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1195–206 (2011).
 104. Zeuzem, S. *et al.* Telaprevir for Retreatment of HCV Infection. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2417–2428 (2011).
 105. Pawlotsky, J.-M. New hepatitis C therapies: the toolbox, strategies, and challenges. *Gastroenterology* **146**, 1176–92 (2014).
 106. Lawitz, E. *et al.* Simeprevir plus sofosbuvir, with or without ribavirin, to treat chronic infection with hepatitis C virus genotype 1 in non-responders to pegylated interferon and ribavirin and treatment-naïve patients: the COSMOS randomised study. *Lancet (London, England)* **384**, 1756–65 (2014).
 107. Sulkowski, M. S. *et al.* CLINICAL—LIVER Effectiveness of Simeprevir Plus Sofosbuvir, With or Without Ribavirin, in Real-World Patients With HCV Genotype 1 Infection. (2016). doi:10.1053/j.gastro.2015.10.013
 108. Sulkowski, M. S. *et al.* Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. *N. Engl. J. Med.* **370**, 211–21 (2014).
 109. Lawitz, E. *et al.* Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1878–87 (2013).
 110. Afdhal, N. *et al.* Ledipasvir and sofosbuvir for untreated HCV genotype 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1889–98 (2014).
 111. Afdhal, N. *et al.* Ledipasvir and sofosbuvir for previously treated HCV genotype 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1483–93 (2014).
 112. Kowdley, K. V *et al.* Ledipasvir and sofosbuvir for 8 or 12 weeks for chronic HCV without cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1879–88 (2014).
 113. Reddy, K. R. *et al.* Ledipasvir and sofosbuvir in patients with genotype 1 hepatitis C virus infection and compensated cirrhosis: An integrated safety and efficacy analysis. *Hepatology* **62**, 79–86 (2015).
 114. Ferenci, P. *et al.* ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with or without ribavirin for HCV. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1983–92 (2014).
 115. Poordad, F. *et al.* ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with ribavirin for hepatitis C with cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1973–82 (2014).
 116. Feld, J. J. *et al.* Sustained virologic response of 100% in HCV genotype 1b patients with cirrhosis receiving ombitasvir/paritaprevir/r and dasabuvir for 12 weeks. *J. Hepatol.* **64**, 301–7 (2016).
 117. Terrault, N. A. *et al.* Effectiveness of Ledipasvir-Sofosbuvir Combination in Patients With Hepatitis C Virus Infection and Factors Associated of Sustained Virologic Response. *Gastroenterology* (2016). doi:10.1053/j.gastro.2016.08.004

118. El Kassas, M., Elbaz, T., Abd El Latif, Y. & Esmat, G. Elbasvir and grazoprevir for Chronic Hepatitis C Genotypes 1 and 4. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* (2016). doi:10.1080/17512433.2016.1233813
119. Gane, E. J. *et al.* Efficacy of the Combination of Sofosbuvir, Velpatasvir, and the NS3/4A Protease Inhibitor GS-9857 in Treatment-Naïve or Previously Treated Patients with Hepatitis C Virus Genotype 1 or 3 Infections. *Gastroenterology* (2016). doi:10.1053/j.gastro.2016.05.021
120. Feld, J. J. *et al.* Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 1, 2, 4, 5, and 6 Infection. *N. Engl. J. Med.* **373**, 2599–2607 (2015).
121. Foster, G. R. *et al.* Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 2 and 3 Infection. *N. Engl. J. Med.* **373**, 2608–17 (2015).
122. Foster, G. R. *et al.* Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 2&3 Infection. *N. Engl. J. Med.* **373**, 2599–2607 (2015).
123. Nelson, D. R. *et al.* All-oral 12-week treatment with daclatasvir plus sofosbuvir in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection: ALLY-3 phase III study. *Hepatology* **61**, 1127–1135 (2015).
124. Leroy, V. *et al.* Daclatasvir, sofosbuvir, and ribavirin for hepatitis C virus genotype 3 and advanced liver disease: A randomized phase III study (ALLY-3+). *Hepatology* **63**, 1430–1441 (2016).
125. Asselah, T. *et al.* Ombitasvir, paritaprevir, and ritonavir plus ribavirin in adults with hepatitis C virus genotype 4 infection and cirrhosis (AGATE-I): a multicentre, phase 3, randomised open-label trial. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* (2016). doi:10.1016/S2468-1253(16)30001-2
126. Buti, M. *et al.* Simeprevir plus Sofosbuvir for Hepatitis C Virus Genotype 4 Infection: A Phase 3, Open-Label Study. *J. Hepatol.* **64**, S220–S221 (2016).
127. Meer, A. J. Van Der, Heathcote, E. J. & Janssen, H. L. A. Association Between Sustained Virological and Advanced Hepatic Fibrosis. (2013).
128. Manns, M. P. *et al.* Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet (London, England)* **358**, 958–65 (2001).
129. Poynard, T. *et al.* Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **122**, 1303–13 (2002).
130. Balart, L. A. *et al.* Peginterferon α -2a plus ribavirin in Latino and Non-Latino Whites with HCV genotype 1: Histologic outcomes and tolerability from the LATINO Study. *Am. J. Gastroenterol.* **105**, 2177–85 (2010).
131. D'Ambrosio, R. *et al.* The diagnostic accuracy of Fibroscan for cirrhosis is influenced by liver morphometry in HCV patients with a sustained virological response. *J. Hepatol.* **59**, 251–6 (2013).
132. Issa, R. *et al.* Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: Evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking☆. *Gastroenterology* **126**, 1795–1808 (2004).
133. Lee, Y. A. & Friedman, S. L. Reversal, maintenance or progression: What happens to the liver after a virologic cure of hepatitis C? doi:10.1016/j.antiviral.2014.03.012
134. Karlmark, K. R. *et al.* Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1 + monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology* **50**, 261–274 (2009).
135. Elsharkawy, A. M., Oakley, F. & Mann, D. A. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis* **10**, 927–939 (2005).
136. Troeger, J. S. *et al.* Deactivation of Hepatic Stellate Cells During Liver Fibrosis Resolution in Mice. *Gastroenterology* **143**, 1073–1083.e22 (2012).
137. Poynard, T. *et al.* Slow regression of liver fibrosis presumed by repeated biomarkers after virological cure in patients with chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* **59**, 675–83 (2013).
138. Roberts, S. *et al.* Effect of sustained viral response on hepatic venous pressure gradient in hepatitis C-related cirrhosis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **5**, 932–7 (2007).
139. Negro, F. Steatosis and insulin resistance in response to treatment of chronic hepatitis C. *J. Viral Hepat.* **19**, 42–47 (2012).
140. Morgan, R. L. *et al.* Eradication of Hepatitis C Virus Infection and the Development of Hepatocellular Carcinoma. *Ann. Intern. Med.* **158**, 329 (2013).
141. Saadoun, D. *et al.* Rituximab plus Peg-interferon-alpha/ribavirin compared with Peg-interferon-alpha/ribavirin in hepatitis C-related mixed cryoglobulinemia. *Blood* **116**, 326–34–5 (2010).
142. Gragnani, L. *et al.* Long-term effect of HCV eradication in patients with mixed cryoglobulinemia: A prospective, controlled, open-label, cohort study. *Hepatology* **61**, 1145–1153 (2015).
143. Saadoun, D. *et al.* PegIFN α /ribavirin/protease inhibitor combination in severe hepatitis C virus-Associated mixed cryoglobulinemia vasculitis. *J. Hepatol.* **62**, 24–30 (2015).
144. Saadoun, D. *et al.* Sofosbuvir plus ribavirin for hepatitis C virus-associated cryoglobulinaemia vasculitis: VASCUVALDIC study. *Ann. Rheum. Dis.* 1–6 (2015). doi:10.1136/annrheumdis-2015-208339
145. Sise, M. E. *et al.* Treatment of hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia with direct-acting antiviral agents. *Hepatology* **63**, 408–417 (2016).
146. Gragnani, L. *et al.* Prospective study of guideline-tailored therapy with direct-acting antivirals for hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia. *Hepatology* **0**, 1–10 (2016).
147. Rincon, D. *et al.* Antiviral therapy decreases hepatic venous pressure gradient in patients with chronic hepatitis C and advanced fibrosis. *Am. J. Gastroenterol.* **101**, 2269–74 (2006).
148. Wiese, M. *et al.* Evaluation of liver disease progression in the German hepatitis C virus (1b)-contaminated anti-D cohort at 35 years after infection. *Hepatology* **59**, 49–57 (2014).
149. Lavanchy, D. *et al.* EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* **55**, 245–264 (2011).
150. Ghany, M. G. *et al.* Predicting clinical and histologic outcomes based on standard laboratory tests in advanced chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **138**, 136–46 (2010).
151. Sheth, S. G., Flamm, S. L., Gordon, F. D. & Chopra, S. AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am. J. Gastroenterol.* **93**, 44–8 (1998).
152. Giannini, E. *et al.* Increased levels of gammaGT suggest the presence of bile duct lesions in patients with chronic hepatitis C: absence of influence of HCV genotype, HCV-RNA serum levels, and HGV infection on this histological damage. *Dig. Dis. Sci.* **46**, 524–9 (2001).
153. Zeremski, M. *et al.* Fibrosis Progression in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J. Infect. Dis.* (2016). doi:10.1093/infdis/jiw332
154. Gaiani, S. *et al.* What is the criterion for differentiating chronic hepatitis from compensated cirrhosis? A prospective study comparing ultrasonography and percutaneous liver biopsy. *J. Hepatol.* **27**, 979–85 (1997).
155. Aubé, C. *et al.* Ultrasonographic diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *J. Hepatol.* **30**, 472–8 (1999).
156. Bruno, S. *et al.* Sustained virological response to interferon-alpha is associated with improved outcome in HCV-related cirrhosis: a retrospective study. *Hepatology* **45**, 579–87 (2007).
157. Cardoso, A.-C. *et al.* Impact of peginterferon and ribavirin therapy on hepatocellular carcinoma: incidence and survival in hepatitis C patients with advanced fibrosis. *J. Hepatol.* **52**, 652–7 (2010).
158. Fernández-Rodríguez, C. M. *et al.* Peginterferon plus ribavirin and sustained virological response in HCV-related cirrhosis: outcomes and factors predicting response. *Am. J. Gastroenterol.* **105**, 2164–72; quiz 2173 (2010).
159. Reiberger, T. *et al.* Portal pressure predicts outcome and safety of antiviral therapy in cirrhotic patients with hepatitis C virus infection. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **9**, 602–8.e1 (2011).
160. El-Serag, H. B., Kanwal, F., Richardson, P. & Kramer, J. Risk of hepatocellular carcinoma after sustained virological response in Veterans with hepatitis C virus infection. *Hepatology* **64**, 130–7 (2016).
161. Afdhal, N. *et al.* Effect of long term viral suppression with sofosbuvir + ribavirin on hepatic venous pressure gradient in HCV-infected patients with cirrhosis and portal hypertension. *J. Hepatol.* **62**, S269–S270 (2015).

162. Mandorfer, M. *et al.* Sustained virologic response to interferon-free therapies ameliorates HCV-induced portal hypertension. *J. Hepatol. Mandorfer J. Hepatol.* **65**, 692–699 (2016).
163. Lamprecht, P., Moosig, F., Gause, A., Herlyn, K. & Gross, W. L. Birmingham vasculitis activity score, disease extent index and complement factor C3c reflect disease activity best in hepatitis C virus-associated cryoglobulinemic vasculitis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **18**, 319–25
164. Lauletta, G. *et al.* Impact of cryoglobulinemic syndrome on the outcome of chronic hepatitis C virus infection: A 15-year prospective study. *Med. (United States)* **92**, 245–256 (2013).

7. Agradecimientos

A Xavi, por tu paciencia, generosidad y gran acogida en el grupo desde el principio. Gracias por haberme facilitado crecer tanto en poco tiempo y por enseñarme a ser mejor desde un punto de vista profesional y desde un punto de vista personal con el ejemplo diario. Para mí ha sido y es un honor trabajar a tu lado.

A Juan Carlos y a Martín por su gran ayuda.

Al todo el grupo de hepatitis, porque el engranaje hace que funcione tan bien. Pero especialmente a Zoe y a Marta, por hacerme sentir como en casa y sacarme esas sonrisas en los momentos en que sonreír era lo último en la lista de tareas pendientes del día.

A mis incondicionales, Fátima, Roci y Ana. Porque la distancia es corta cuando hay lazos tan estrechos.

Pero sobre todo, a mi familia.

A mi padre, porque si he llegado hasta aquí es por él (*"It's been a long day, without you my friend; but I'll tell you all about it when I see you again"*).

A mi madre, porque es la fortaleza que da ejemplo aunque no lo crea, porque me inspira aunque no lo sepa.

A mi compañero incondicional, a ti Jose, porque este trabajo no hubiera sido posible sin tu ayuda y tu optimismo, sin tu serenidad y tu cariño.

A Mauro, porque sus sonrisas y abrazos hacen que cada día recuerde lo que de verdad importa en esta vida.

