



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Programa de doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Barcelona

TESIS DOCTORAL

Caracterización molecular del perfil de resistencias del virus de la hepatitis C después del fallo terapéutico a antivirales de acción directa mediante secuenciación masiva

Tesis para optar al grado de doctor de

Qian Chen

Directores de la Tesis

Dr. Josep Quer Sivila

Dra. Celia Perales Viejo

Dr. Josep Gregori i Font

Laboratorio de Enfermedades Hepáticas - Hepatitis Víricas

Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR)

Barcelona, 2018

ABREVIACIONES

ADN: Ácido desoxirribonucleico
AK: Adenosina quinasa
ALT: Alanina aminotransferasa
ARN: Ácido ribonucleico
ASV: Asunaprevir
BOC: Boceprevir
CCD: *Charge Coupled Device*
CLDN1: Claudina-1
CHC: Carcinoma hepatocelular
DAA: Antiviral de acción directa
DC-SIGN: *Dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin*
DCV: Daclatasvir
DSV: Dasabuvir
EBR: Elbasvir
EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico
eIF2A: *Eukaryotic translation initiation factor 2A*
EphA2: *Ephrin type-A receptor 2*
FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos
GLE: Glecaprevir
GTP: Guanosina-5'-trifosfato
GZR: Grazoprevir
HVR-1 y 2: Región hipervariable 1 y 2
ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de Virus
IFN: Interferón
IFNAR-1: *Interferon-alpha/beta receptor alpha chain*
IFNAR-2: *Interferon-alpha/beta receptor beta chain*
IMPDH: Inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa
IP: Inhibidor de la proteasa
IRES: Sitio interno de entrada al ribosoma
IRF-3: Factor 3 regulador de IFN
IRF-9: Factor 9 regulador de IFN
ISG: Gen estimulado por IFN
ISGF3: Gen de factor 3 estimulado por IFN
ISRE: Elemento de respuesta estimulado por IFN
Jak1: *Janus-activated Kinase 1*

LCS: Secuencia de baja complejidad

LD: Gota lipídica

LDL: Lipoproteína de baja densidad

LDLR: Receptor de lipoproteína de baja densidad

LDV: Ledipasvir

L-SIGN: *Liver/lymph node cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin*

LVP: Lipoviropartícula

MID: *Multiplex IDentifier*

MW: *Membranous web*

NGS: *Next-Generation Sequencing*

NI: Inhibidor análogo de nucleós(t)ido

NNI: Inhibidor no-nucleos(t)ídico

NK: *Natural killer*

NPC1L1: *Niemann-Pick C1-like 1*

NTR: Región no traducida

OAS: 2'-5' oligoadenilato sintetasa

OCLN: Ocludina

OMS: Organización Mundial de la Salud

OMV: Ombitasvir

ORF: Marco de lectura abierta

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PEACH: Plan Estratégico Nacional para el Abordaje de la Hepatitis C

PEG: Polietilenglicol

PIB: Pibrentasvir

PKR: Proteína quinasa R

PTV: Paritaprevir

RAP: Polimorfismo asociado a resistencia

RAS: Sustitución asociada a resistencia

RBV: Ribavirina

RDP: ribavirina-5'-difosfato

RdRp: Polimerasa dependiente de ácido ribonucleico

RE: Retículo endoplasmático

RMP: ribavirina-5'-monofosfato

RT: Retrotranscripción

RTP: ribavirina-5'-trifosfato

RVS: Respuesta virológica sostenida

SMV: Simeprevir

SOF: Sofosbuvir

SP: Peptidasa señal

SPP: Peptidasa de péptido señal

SR-B1: *Scavenger receptor B1*

STAT-1: *Signal transducer and activator of transcription 1*

STAT-2: *Signal transducer and activator of transcription 2*

TfR1: Receptor de la transferrina 1

Th1: Células T reguladoras de tipo 1

TLV: Telaprevir

TNAI: *Total Nucleic Acid Isolation*

Tyk2: Tirosina quinasa 2

UDPS: Pirosecuenciación ultra-profunda

VEL: Velpatasvir

VHC: Virus de la hepatitis C

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad

VOX: Voxilaprevir

VPV: Vaniprevir

ÍNDICE

Abreviaciones	3
Índice	9
Summary	13
Resumen	15
1. Introducción	17
1.1. Virus de la hepatitis C (VHC).....	19
1.1.1. Genoma viral	19
1.1.2. Ciclo viral	21
1.1.3. Diversidad genética	23
1.1.3.1. Variabilidad intergenómica. Genotipos y subtipos	23
1.1.3.2. Variabilidad intragenómica. Cuasiespecies virales.....	25
1.2. Estrategias antivirales contra la hepatitis C crónica.....	26
1.2.1. Interferón alfa (IFN- α)	27
1.2.2. Ribavirina (RBV).....	28
1.2.3. Interferón-pegilado (Peg-IFN) con RBV	28
1.2.4. Agentes antivirales de acción directa (DAAs).....	29
1.2.4.1. Sustituciones asociadas a resistencia (RASs).....	32
1.3. Aplicaciones de la secuenciación masiva en virología	33
2. Objetivos	35
3. Materiales y Métodos	39
3.1. Pacientes	41
3.2. Diagnóstico del subtipo del VHC	41
3.3. Extracción del ARN viral	41
3.4. Retrotranscripción y amplificación del genoma viral.....	41
3.4.1. RT-PCR	41
3.4.2. Nested-PCR.....	45
3.4.2.1. Análisis y purificación de los fragmentos amplificados por Nested-PCR	51
3.5. Secuenciación de los amplicones por UDPS (<i>Ultra-Deep Pyrosequencing</i>)	51
3.5.1. Secuenciación con plataforma GS-454 Junior	52
3.5.1.1. Preparación de la librería	52
3.5.1.2. Secuenciación de la librería.....	53
3.5.2. Secuenciación con plataforma Illumina MiSeq	54
3.5.2.1. Preparación de la librería	54
3.5.2.2. Secuenciación de la librería.....	54

3.6. Algoritmo para el análisis de datos	55
3.7. Establecimiento de la cohorte de estudio.....	56
3.8. Análisis de las Sustituciones Asociadas a Resistencia (RASs)	56
4. Resultados	59
4.1. Características clínicas de la cohorte de estudio	61
4.1.1. Distribución de los subtipos virales en el fallo terapéutico	61
4.1.2. Distribución de los tratamientos en el fallo terapéutico	62
4.2. Características virológicas de la cohorte de estudio	63
4.3. Selección de RASs en los diferentes subtipos	65
4.4. Prevalencia de las RASs en los diferentes tratamientos	66
4.5. Perfil cuantitativo de la distribución de RASs según el régimen terapéutico	72
4.6. Prevalencia de combinaciones de RASs en los diferentes tratamientos	73
4.7. Frecuencia de los haplotipos con combinaciones de RASs en la población viral.....	75
4.8. Prevalencia de RASs en regiones genómicas no inhibidas	80
4.9. Polimorfismos asociados a resistencia (RAPs) en el fallo terapéutico	80
5. Discusión	83
6. Conclusiones.....	91
7. Líneas de futuro.....	95
8. Bibliografía.....	99
Anexo.....	115

Summary

Chronic hepatitis C infection is considered as a major public health issue worldwide due to its linkage to the development of advanced liver diseases and hepatocellular carcinoma. Currently, the availability of highly efficient and well-tolerated antiviral therapies based on combinations of direct acting antivirals (DAAs) has provided sustained virological response (SVR) in nearly 95% of patients. Despite the excellent efficacy of DAAs, still a non-negligible percentage of patients do not achieve virological cure. At treatment failure, resistance-associated substitutions (RASs) are usually selected at high frequencies in the viral population. While selection of RASs has an important role in treatment failure, the clinical impact of RASs and its relevance in retreatment still remain unknown. Few real-life data on RASs testing are available, mainly performed by Sanger sequencing. In this PhD Thesis, we have performed a RASs analysis in a cohort of 220 patients who experienced treatment failure to several DAA combinations using next generation sequencing. In our analysis, the RASs profile that emerge after each DAA-based treatment was subtype-specific, which strongly suggests the use of subtype-specific primers to avoid amplification bias. Also, several high prevalent RASs combinations were characterized, suggesting the importance of their detection before retreatment due to their high level of resistance. Moreover, attending to the high occurrence of extra-target RASs detected, testing all genomic regions for RASs analysis is strongly recommended for treatment decision making. In summary, the high prevalence of RASs at treatment failure, the high amount of minority RASs and the combination of RASs at the same genome, reinforce the importance of RASs analysis before retreatment using ultra-deep sequencing in order to maximize SVR. The outcome of patients who undergo retreatment should be also analysed in order to characterize clinically meaningful RASs.

Resumen

La infección crónica por el virus de la hepatitis C constituye un problema de salud pública a nivel mundial por su contribución al desarrollo de enfermedades hepáticas avanzadas y carcinoma hepatocelular. Actualmente, gracias a la disponibilidad de terapias antivirales altamente eficaces y bien toleradas basadas en combinaciones de antivirales de acción directa (DAAs) se han logrado tasas de respuesta virológica sostenida (RVS) en el 95% de los pacientes. A pesar de la excelente eficacia de los DAAs, sigue habiendo un porcentaje considerable de pacientes que no alcanzan la curación virológica. Tras el fallo terapéutico, es frecuente observar la selección de sustituciones asociadas a resistencia (RASs) a frecuencias altas en la población viral. Mientras que la selección de RASs tiene un papel importante en el fracaso terapéutico, el impacto clínico de las RASs, así como su relevancia en el retratamiento sigue siendo una cuestión abierta. Hoy en día, se disponen de pocos estudios en vida real sobre RASs, estando la mayoría basados en secuenciación Sanger. En la presente Tesis Doctoral, se ha realizado un estudio de resistencias de una cohorte de 220 pacientes con fracaso terapéutico a combinaciones de DAAs mediante secuenciación masiva. En los resultados obtenidos, se observaron patrones de resistencia específicos de subtipo viral tras el fallo a combinaciones de DAAs, lo cual realza la importancia del uso de cebadores específicos de subtipo para evitar sesgos en la amplificación. Se caracterizaron varias combinaciones de RASs altamente prevalentes, sugiriendo la importancia de su detección antes del retratamiento por los elevados niveles de resistencia que confieren. Además, considerando la prevalencia de las RASs en las regiones que mapean fuera de las regiones frente a las que van dirigidos los antivirales de acción directa, es recomendable analizar todas las regiones terapéuticas para decidir el tratamiento de rescate. En resumen, la alta prevalencia de RASs tras el fallo terapéutico, la gran cantidad de RASs minoritarias y las combinaciones de RASs en el mismo genoma, reafirman la importancia de su análisis antes del retratamiento usando secuenciación masiva ultra profunda para maximizar las tasas de RVS. Sería de gran interés conocer los resultados de aquellos pacientes sometidos a retratamiento para caracterizar las RASs clínicamente significativas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Virus de la hepatitis C (VHC)

La infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC) es una causa importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Fue descrito por primera vez en 1989 por Qui-Lim Choo¹ como agente causante de hepatitis crónica no-A, no-B asociado a transfusión de sangre o a terapias basadas en el uso de productos derivados de plasma^{2,3}. Globalmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en torno a 71 millones de personas están infectadas crónicamente por el VHC.

En la mayoría de los casos, el VHC se transmite por vía parenteral a través de transfusiones de sangre y productos derivados sin analizar, durante prácticas nosocomiales debido a la inadecuada esterilización de los utensilios médicos o por el uso compartido de jeringuillas en el consumo de drogas inyectables⁴. La transmisión sexual es poco frecuente, aunque el riesgo aumenta cuando es de carácter homosexual entre hombres infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)⁵. El riesgo de transmisión vertical es de un 5% y se eleva hasta un 20% en madres co-infectadas por VIH⁶. Otros procedimientos como el tatuaje, el *piercing* o la acupuntura también constituyen posibles vías de transmisión⁷.

La infección aguda por VHC suele ser asintomática y raramente cursa con manifestaciones patológicas graves. La eliminación espontánea del virus ocurre entre un 15%-45% de los pacientes infectados y está relacionada con factores virales, polimorfismos genéticos del huésped, la etnia, la edad, el género y la existencia de otras comorbilidades como la infección por VIH^{8,9}. Entre un 55%-85% de pacientes evolucionarán hacia una hepatitis C crónica que se caracteriza por la persistencia de la viremia 6 meses después de la infección aguda. Una vez establecida la infección crónica, entre un 10%-20% de pacientes desarrollarán cirrosis hepática en un periodo aproximado de 20 años^{10,11}. El riesgo anual de carcinoma hepatocelular (CHC) y descompensación hepática en pacientes cirróticos es de 1%-5% y 3%-6%, respectivamente¹². Después de un episodio de descompensación, la mortalidad es de entre un 15%-20% en el primer año^{13,14}. El estadio terminal de la hepatitis C crónica es una de las indicaciones más comunes de trasplante hepático en países desarrollados. La infección crónica por VHC también se asocia con manifestaciones extra-hepáticas como diabetes tipo II, linfoma no-Hodgkin de células B, patologías cardiovasculares y enfermedades autoinmunes¹⁵⁻¹⁸. Aproximadamente, unas 400.000 personas mueren cada año por patologías asociadas a la infección por VHC según los últimos datos de la OMS.

1.1.1. Genoma viral

El VHC pertenece al género Hepacivirus de la familia Flaviviridae¹⁹. Es un virus hepatotrópico con envuelta, de morfología pleomorfa con un diámetro que oscila entre 45 nm – 75 nm²⁰. Su genoma está constituido por una molécula de ARN de cadena simple con polaridad positiva de aproximadamente

9.6 kilobases que contiene un único marco de lectura (ORF, *Open Reading Frame*) flanqueado por dos regiones no traducidas (NTR, *Non Translated Region*) con estructuras secundarias altamente conservadas en los extremos 5' y 3'²¹. En el extremo 5' se encuentran las señales de replicación y el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES, *Internal Ribosomal Entry Site*) de tipo III^{22,23}. Este único marco de lectura codifica para una poliproteína precursora que es procesada por proteasas celulares y virales dando lugar a tres proteínas estructurales (core, E1 y E2) y siete proteínas no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS5A y NS5B)^{24,25} (Figura 1) (Tabla 1).

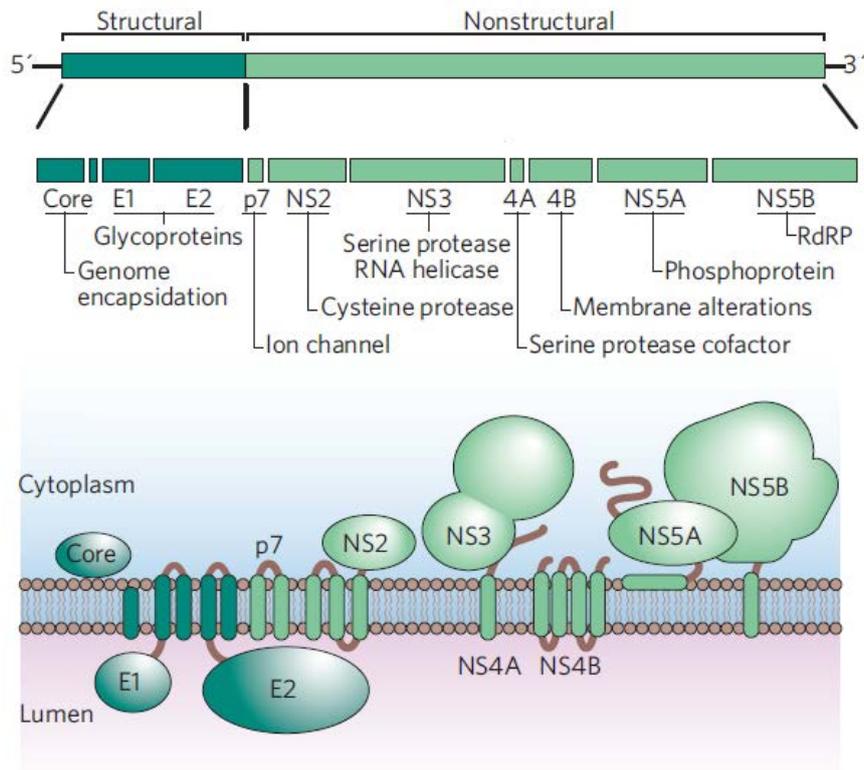


Figura 1. Estructura del genoma del VHC y funciones de las proteínas virales (Adaptado de Lindenbach y Rice, 2005)

Tabla 1. Características y funciones de las proteínas virales del VHC

	Proteína	Aminoácidos	Peso molecular (kd)	Funciones
Proteínas estructurales	Core	191	23	Formación de la cápside. Interacciona con proteínas implicadas en vías de señalización celular y promueve la patogénesis de daños hepáticos
	E1	192	35	Glicoproteína transmembrana de tipo I de la envuelta vírica. Forma heterodímeros con E2
	E2	363	70	Glicoproteína transmembrana de tipo I de la envuelta vírica. Contiene regiones hipervariables reconocidas por anticuerpos neutralizantes. Forma heterodímeros con E1

Proteínas no estructurales	p7	67	7	Viroproteína. Actúa como canal iónico implicada en el ensamblaje y secreción de las partículas víricas
	NS2	217	21	Cisteína-proteasa. Forma dímeros asociados a membrana. Junto con NS3 cataliza el corte NS2/NS3
	NS3	631	70	Serina-proteasa y NTPasa/ARN helicasa. Forma uniones no covalentes con NS4A y procesa cortes en los sitios NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A y NS5A/NS5B. La helicasa está implicada en la replicación del virus
	NS4A	54	4	Cofactor de NS3. Se une al dominio serina-proteasa de la NS3 para formar la proteasa NS3/4A
	NS4B	261	27	Induce la formación de la red de membranas y facilita la formación del complejo replicativo
	NS5A	447*	56	Fosfoproteína asociada a membrana. Modula la replicación, ensamblaje y secreción de partículas virales
	NS5B	591	66	Polimerasa dependiente de ARN

*El genotipo 2 contiene una inserción de 20 aminoácidos en el dominio III de la proteína NS5A.

1.1.2. Ciclo viral

El VHC circula en sangre en forma de lipovirpartículas (LVPs) por su asociación con lipoproteínas de baja densidad (LDL, *low-density lipoprotein*), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, *very low-density lipoprotein*) y apolipoproteínas como apoE, apoB, apoA1, apoC1, apoC2 y apoC3²⁶⁻²⁸. Esta estructura de LVP permite que las glicoproteínas de la envuelta vírica no sean reconocidas por parte de los anticuerpos neutralizantes²⁹. Las LVPs cruzan el endotelio fenestrado de las sinusoides hepáticas y llegan hasta el espacio de Disse, donde entran en contacto con los receptores localizados en la membrana basolateral de los hepatocitos. La llegada de las LVPs al espacio de Disse está facilitada por el reconocimiento de las partículas virales por parte de los receptores L-SIGN (*liver/lymph node cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin*) y DC-SIGN (*dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin*) expresados en el endotelio sinusoidal y células dendríticas³⁰, respectivamente. Aparte de los hepatocitos, el VHC también tiene la capacidad de infectar otros tipos celulares como linfocitos B, linfocitos T, monocitos y células dendríticas³¹.

Entrada celular

El reconocimiento inicial de las LVPs está mediado por el proteoglicano heparán sulfato (sindecan-1 y sindecan-4) y los receptores de LDL (LDLR, *low-density lipoprotein receptor*) mediante interacciones de baja afinidad^{32,33}. Después de este reconocimiento inicial, las glicoproteínas E1 y E2 interaccionan de manera específica con factores de entrada celular como SR-B1 (*Scavenger receptor B1*)³⁴, tetraspanina CD81³⁵ y las proteínas de uniones estrechas claudina-1 (CLDN1)³⁶ y ocludina (OCLN)³⁷. Otros receptores

celulares como EGFR (*epidermal growth factor receptor*), EphA2 (*ephrin type-A receptor 2*), NPC1L1 (*Niemann-Pick C1-like 1*), TfR1 (*transferrin receptor 1*), CD63 y Cadherina-E también han sido descritos como cofactores involucrados en la entrada del virus³⁸⁻⁴².

Síntesis y procesamiento de la poliproteína

La internalización del virus está mediada por un proceso de endocitosis dependiente de clatrina⁴³. La acidificación del lumen del endosoma induce la fusión de la envuelta vírica con la membrana endosómica y la desintegración de la nucleocápside, permitiendo de esta manera la liberación del genoma viral al citoplasma⁴⁴. El ARN viral se traduce a una poliproteína que es procesada para dar lugar a diez proteínas virales. La peptidasa señal (SP, *signal peptidase*) de la célula es la responsable de catalizar el corte entre core/E1, E1/E2, E2/p7 y p7/NS2⁴⁵. En cuanto a las proteínas no estructurales, la proteasa NS2-NS3 procesa el corte NS2/NS3 mientras que el complejo formado por NS3-NS4A corta en los sitios NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A y NS5A/NS5B⁴⁶⁻⁴⁸.

Replicación viral

Una vez procesadas, las proteínas virales se anclan a la membrana del retículo endoplasmático (RE). Para proteger el proceso replicativo de procedimientos de degradación como la autofagia, la NS4B induce reordenamientos de las membranas del RE para crear un microambiente aislado del citoplasma conocido como “membranous web” (MW) o red de membranas, que se caracteriza por la formación de vesículas de doble membrana (DMVs, *double-membrane vesicles*) de unos 150 nm que albergan la replicación viral^{49,50}. Las proteínas NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B constituyen la maquinaria replicativa para dar lugar a un ARN intermediario de polaridad negativa que servirá como molde para la producción de nuevas copias de ARN de polaridad positiva⁵¹. Estas nuevas copias pueden ser traducidas para generar proteínas víricas, actuar como molde para la replicación o ser encapsidadas para formar partículas infecciosas.

Ensamblaje y secreción

El ensamblaje y la secreción de los nuevos viriones está estrechamente relacionado con el proceso de la síntesis lipídica. La proteína core, que se encuentra anclada en la bicapa lipídica del RE, es procesada por una peptidasa de péptido señal (SPP, *signal peptide peptidase*) y liberada al citoplasma en su forma madura⁵², donde se asocia con las gotas lipídicas o “*lipid droplet*” (LDs) para evitar su degradación^{53,54}. Estas LDs son orgánulos de depósito de triglicéridos y ésteres de colesterol que reclutan las proteínas core situándolas cerca del complejo replicativo⁵⁵. Con la colaboración de otras proteínas no estructurales como p7, NS2 y NS5A⁵⁶⁻⁵⁸, la proteína core capta el ARN genómico recién sintetizado mediante su dominio de unión a ARN y se homo-oligomeriza para formar la nucleocápside⁵⁹. Esta nucleocápside se invagina hacia el lumen del RE adquiriendo de esta forma la envuelta lipídica con las glicoproteínas E1 y E2. Una vez dentro del lumen, se asocia con las partículas precursoras de VLDL y

apolipoproteínas para formar las LVPs maduras⁶⁰. Finalmente, estas LPVs son secretadas al compartimento extracelular vía secreción celular usando la misma ruta de síntesis de las VLDLs^{61,62}.

1.1.3. Diversidad genética

Los mecanismos principales de variabilidad genética son la mutación, la recombinación y el reordenamiento génico en genomas segmentados⁶³. Debido a la baja fidelidad de las polimerasas dependientes de ARN (RdRp) y la ausencia de actividad correctora mediada por exonucleasas 3'-5', el VHC presenta una alta variabilidad genética por la acumulación de mutaciones después de cada ciclo replicativo⁶⁴. La alta tasa de mutación, junto con la presión selectiva, la recombinación y la deriva genética, han dado lugar a dos niveles de heterogeneidad genética: intergenómica e intragenómica^{65,66}.

1.1.3.1. Variabilidad intergenómica. Genotipos y subtipos

Según la última actualización del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, *International Committee on Taxonomy of Viruses*), se han definido 7 genotipos y 86 subtipos confirmados mediante análisis filogenéticos de genomas virales completos^{67,68} (Figura 2). Las diferencias a nivel de nucleótidos son del 30% entre genotipos y del 15% - 20% entre subtipos⁶⁹. Los diferentes genotipos y subtipos difieren en su respuesta al tratamiento, pronóstico y epidemiología.

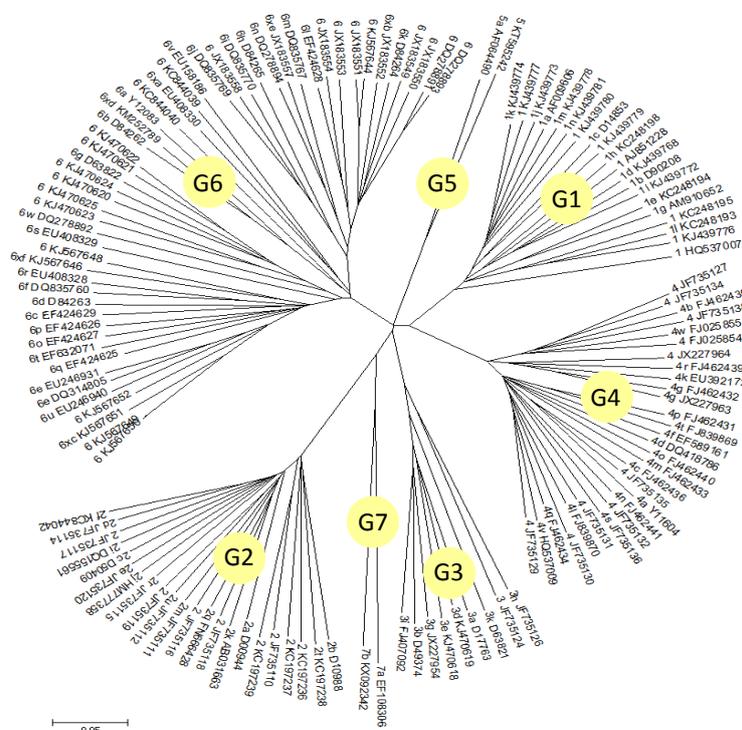


Figura 2. Representación filogenética de la distancia genética entre los genotipos y subtipos del VHC (Modificado de *International Committee on Taxonomy of Viruses* <https://talk.ictvonline.org/>)

El genotipo 1 (G1) y el genotipo 3 (G3) son los más frecuentemente representados constituyendo el 46.2% y el 30.1% de todas las infecciones, respectivamente. En cuanto al resto de genotipos, los genotipos 2 (G2), 4 (G4) y 6 (G6) suman un total de 22.8% de los casos mientras que las infecciones por genotipo 5 (G5) constituyen el 1% de los casos restantes^{70,71}. El VHC de G1 tiene una distribución mundial con una mayor prevalencia del subtipo 1a en América y del subtipo 1b en Europa⁷². Hay estudios que asocian la distribución global del VHC G1 con la diseminación de sangre infectada antes del descubrimiento del virus⁷³. El G2 predomina en África Occidental y en algunas regiones de América del Sur por el comercio transatlántico de esclavos entre los siglos XVI y XIX⁷⁴. El G3 se encuentra mayoritariamente en el Este y Sudeste asiático y se ha descrito una elevada tasa de transmisión del subtipo 3a entre usuarios de droga intravenosa⁷⁵. El G4 es endémico en África Central, Oriente Medio y especialmente Egipto, donde la alta prevalencia del subtipo 4a se debe a las inyecciones inseguras durante las campañas de vacunación contra la esquistosomiasis⁷⁶. El G5 se observa casi de manera exclusiva en Sudáfrica, el G6 se concentra mayoritariamente en el Sudeste Asiático⁷², mientras que el genotipo 7 (G7), originario de la República Democrática del Congo, es el linaje descubierto más recientemente con un total de 7 pacientes reportados hasta la fecha⁷⁷⁻⁷⁹ (Figura 3).

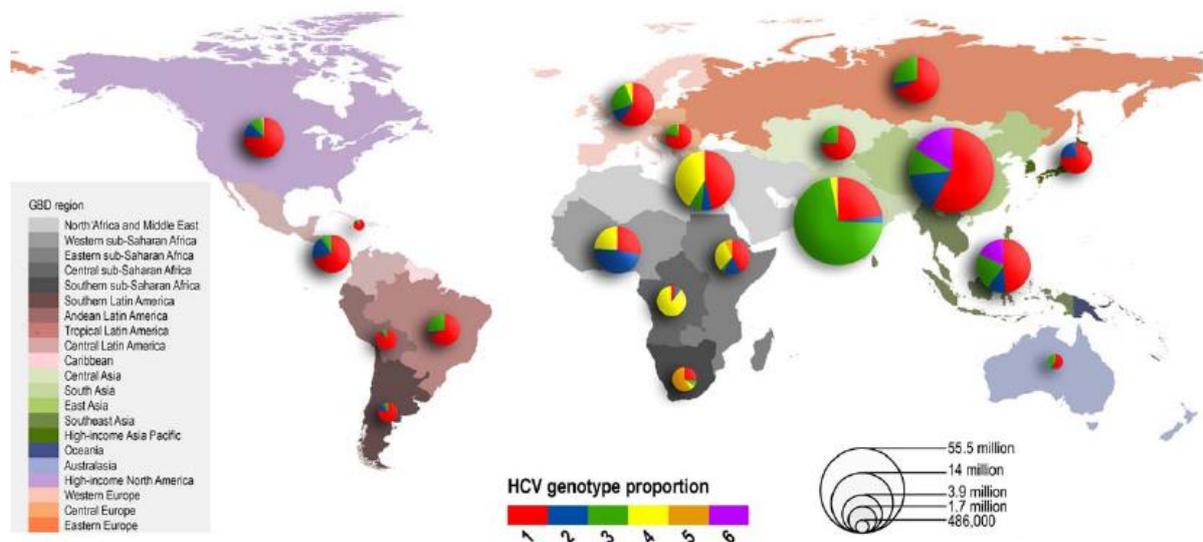


Figura 3. Distribución y prevalencia de los genotipos 1-6 del VHC a nivel mundial (Messina *et al.*, 2015)

Diversos estudios han demostrado una correlación entre el genotipo viral y las complicaciones asociadas a la infección, así como la respuesta al tratamiento. En cuanto a la evolución de la enfermedad, se ha descrito que la infección por G3a está asociada a un riesgo más alto de esteatosis hepática y a una rápida progresión a fibrosis⁸⁰⁻⁸², mientras que el G1b se asocia con un mayor riesgo de CHC⁸³. El genotipo viral también se considera un factor predictor importante en la respuesta a tratamientos antivirales. Los pacientes infectados con G2 y G3 responden mejor a terapias basadas en

interferón alfa (IFN- α) que los pacientes infectados con G1 y G4. Además, la recidiva de la viremia durante las dos primeras semanas de tratamiento con IFN- α es significativamente más frecuente en pacientes infectados con G1 y G4 que en aquellos infectados con G3^{84,85}. Resultados similares también se han observado en regímenes basados en interferón pegilado (Peg-IFN) más ribavirina (RBV). Los pacientes infectados con G1 necesitan 48 semanas de tratamiento para alcanzar las mismas tasas de curación que los pacientes G2 y G3 tratados durante 24 semanas⁸⁶. En el caso de las terapias basadas en antivirales de acción directa (DAAs), las guías clínicas han establecido distintas pautas de tratamiento en función del genotipo/subtipo del virus⁸⁷.

1.1.3.2. Variabilidad intragenómica. Cuasiespecies virales

La continua generación de variantes en un individuo infectado confiere al VHC una gran capacidad adaptativa con la adquisición de nuevas características genotípicas y fenotípicas que otorgan al virus una ganancia de eficacia biológica o *fitness*, que se define como la capacidad replicativa de un virus en un ambiente determinado. Se estima que la tasa de mutación *in vivo* del VHC es de $2,5 \times 10^{-4}$ sustituciones/ciclo replicativo mientras que la tasa de fijación de mutaciones está en torno a $1,5 \times 10^{-3}$ sustituciones/ciclo replicativo/año⁸⁸⁻⁹⁰. Sin embargo, la tasa de error difiere a lo largo del genoma. La mayor tasa de mutación se encuentra en las regiones hipervariables 1 y 2 (HVR-1 y HVR-2) de la proteína de la envuelta E2 con una homología de menos del 50% entre diferentes secuencias aisladas⁹¹. Las regiones más conservadas del genoma son las regiones 5' y 3' por su implicación en procesos virales esenciales como la transcripción y traducción. De hecho, la región 5' es la región más conservada con una homología superior al 90% entre secuencias distantes⁹². La región core, que codifica para las proteínas de la cápside, también está altamente conservada con una homología entre el 81% - 88%⁹³. En un individuo infectado, se producen en torno a 10^{12} partículas virales al día con una vida media de 2-3 horas⁹⁴. Esta elevada cinética de replicación y mutabilidad da lugar a una distribución de variantes denominada cuasiespecie, que se define como una población viral formada por un conjunto de mutantes cada uno de ellos distinto de los demás, pero estrechamente relacionados entre sí^{95,96}. La cuasiespecie como conjunto constituye una unidad de selección sujeta a una continua variación genética, competición y selección siguiendo los principios evolutivos de Darwin^{97,98}.

Una estructura de cuasiespecies está formada por un espectro de mutantes dominado por una secuencia máster que es aquella que se encuentra en mayor frecuencia por su mayor capacidad replicativa o *fitness*^{99,100}. Dentro de la población viral, también podemos definir una secuencia consenso que está representada por el nucleótido más frecuente en cada posición. Esta secuencia consenso puede diferir de la secuencia máster y puede estar o no representada dentro del espectro de variantes¹⁰¹.

La cuasiespecie viral actúa como un reservorio que alberga un amplio espectro de variantes que otorgan al virus una gran capacidad adaptativa^{102,103}. Por ejemplo, la continua generación y selección de variantes resistentes a anticuerpos neutralizantes y a células T citotóxicas, son los principales responsables de la persistencia vírica y falta de inmunidad protectora frente a reinfecciones a pesar de tener una serología positiva¹⁰⁴. Se ha visto que los pacientes que evolucionan a hepatitis crónica presentan más diversidad en la región HVR-1 que los pacientes con hepatitis auto-limitada¹⁰⁵. Este mismo fenómeno también se ha observado entre pacientes tratados con Peg-IFN, donde los pacientes respondedores presentan una complejidad más reducida que los no-respondedores¹⁰⁶. Asimismo, la emergencia de variantes no susceptibles a tratamientos antivirales en las regiones terapéuticas es considerada como la mayor causa de fallo terapéutico a DAAs¹⁰⁷. Esta estructura de cuasiespecies también representa el mayor impedimento para el desarrollo de una vacuna preventiva eficaz.

La distribución en cuasiespecies refleja un equilibrio entre la preservación de información genética esencial y la continua generación y selección de mutantes que confieren una ganancia de eficacia biológica al virus. Para contrarrestar esta capacidad adaptativa, una de las aproximaciones terapéuticas actuales consiste en incrementar la mutabilidad del virus por encima de la tasa de error máxima tolerable. A partir de este límite, el virus pierde la información esencial para su supervivencia y entra en catástrofe de error por la acumulación de mutaciones^{108,109}. Esta estrategia se denomina mutagénesis letal o extinción de virus por exceso de mutaciones y surge como un mecanismo alternativo y complementario a estrategias terapéuticas convencionales basadas en inhibidores de proteínas virales^{110,111}.

1.2. Estrategias antivirales contra la hepatitis C crónica

La curación de la infección crónica por el VHC se define como la adquisición de una respuesta virológica sostenida (RVS), que se define como la negativización de la viremia en las pruebas serológicas 12 semanas después de la finalización del tratamiento antiviral. La RVS es un indicador de la curación virológica y se asocia con una mejora de la calidad de vida, una menor incidencia y atenuación de las patologías hepáticas asociadas, así como una reducción de la mortalidad tanto por causas hepáticas como extra-hepáticas^{112,113}.

1.2.1. Interferón alfa (IFN- α)

Los IFNs son glicoproteínas de la superfamilia de las citoquinas que secretan las células del huésped en respuesta a agentes patógenos y células tumorales¹¹⁴. Se clasifican en tres grandes tipos (tipo I, II, III) en función del receptor con el que interactúan¹¹⁵. La producción de IFN de tipo I es un componente esencial de la respuesta inmune innata que induce un estado antiviral de las células y activa la apoptosis de las células infectadas¹¹⁶.

Mecanismos de acción del IFN- α

El IFN- α pertenece al IFN de tipo I por su unión al complejo receptor formado por IFNAR-1 (*Interferon-alpha/beta receptor alpha chain*) e IFNAR-2 (*Interferon-alpha/beta receptor beta chain*)¹¹⁷. Esta interacción ligando-receptor activa las quinasas Jak1 (*Janus-activated Kinase 1*) y Tyk2 (*Tyrosine kinase 2*), que a su vez fosforilan y activan los factores de transcripción STAT1 (*Signal transducer and activator of transcription 1*) y STAT2 (*Signal transducer and activator of transcription 2*). Las proteínas STAT1 y STAT2 fosforiladas se heterodimerizan y se asocian con la IRF-9 (*Interferon regulatory factor 9*) para formar el complejo ISGF3 (*IFN-stimulated gene factor 3*), que se une a los ISRE (*IFN-stimulated response element*) situados en la región promotora y activa la transcripción de los ISGs (*interferon-stimulated genes*) que codifican para proteínas efectoras involucradas en procesos antivirales¹¹⁸⁻¹²⁰. Utilizando sistemas de replicación *in vitro* del VHC basados en replicones se ha descrito que la administración exógena de IFN- α induce la expresión de ISGs como PKR (*protein kinase R*) y 2'-5' OAS (*2'-5' oligoadenylate synthetase*) que bloquean la síntesis de proteínas virales y la replicación viral^{121,122}. Además de esta actividad antiviral directa, el IFN- α también actúa como inmunomodulador regulando la actividad efectora de las células NK (*Natural Killer*), de las células dendríticas y de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ con el fin de eliminar las células infectadas¹²³.

Respuesta a tratamientos basados en IFN- α

En 1986 se realizó el primer ensayo clínico con IFN- α recombinante en 10 pacientes infectados con lo que en ese momento se conocía como hepatitis post-transfusional no-A, no-B. Se observó una disminución significativa de los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) en 8 pacientes y una mejora en la histología hepática en 3 pacientes biopsiados al final del tratamiento¹²⁴. De esta primera cohorte, 5 pacientes alcanzaron la RVS¹²⁵.

La Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, *Food and Drug Administration*) aprobó en 1991 el uso de la IFN- α para el tratamiento de la infección crónica por VHC. Las tasas de RVS fueron del 2% y del 9% para pacientes G1 tratados 24 y 48 semanas, respectivamente. En el caso de los pacientes G2 y G3, las tasas de RVS fueron del 16% para pacientes tratados 24 semanas y del 30% después de 48 semanas de tratamiento^{126,127}.

1.2.2. Ribavirina (RBV)

La ribavirina o 1-β-D-ribofuranosil-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamida, es un análogo de purinas con actividad antiviral de amplio espectro que actúa tanto sobre virus ADN como ARN¹²⁸. A nivel celular, la ribavirina es fosforilada por quinasas celulares, como la adenosina quinasa (AK), generando las formas activas ribavirina-5'-monofosfato (RMP), ribavirina-5'-difosfato (RDP) y ribavirina-5'-trifosfato (RTP)¹²⁹.

Mecanismos de acción de la ribavirina

La ribavirina presenta múltiples mecanismos de acción contra los virus ARN. Entre ellos se encuentran: 1) Inhibición de la actividad replicativa de la RdRp por la incorporación de RTP a la cadena de RNA^{130,131}; 2) Bloqueo de la síntesis de ARN por agotamiento de la guanosina-5'-trifosfato (GTP) debido a la inhibición de la enzima IMPDH (*Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*) por parte de la RMP¹³²; 3) Estimulación de las células T reguladoras e inducción de su diferenciación hacia células T reguladoras de tipo I (Th1)^{133,134}; 4) Incremento de la tasa de error y extinción del virus mediante mutagénesis letal^{135,136}.

Aunque se desconoce el mecanismo antiviral más relevante de la RBV en el tratamiento de las infecciones víricas, en el caso del VHC, varios estudios han demostrado su efecto inhibitorio y mutagénico tanto en sistemas de replicones como en pacientes crónicamente infectados¹³⁷⁻¹⁴³. Además, la RBV también actúa de manera sinérgica junto con el IFN, potenciando las vías de señalización y expresión de los ISGs^{144,145}.

Respuesta a tratamientos basados en IFN-α más RBV

En 1991 se publicó el primer estudio sobre el uso de la RBV como agente antiviral para tratar a los pacientes infectados con el VHC¹⁴⁶. Sin embargo, se demostró que la RBV en monoterapia no aportaba beneficios en cuanto a la reducción de la carga viral, aunque sí mejoraba los niveles de ALT en los pacientes tratados^{147,148}. A finales de los años 90, se aprobó la combinación de IFN-α más RBV como terapia estándar para tratar la hepatitis C. Las tasas de RVS con este régimen terapéutico fueron del 17% y 29% en pacientes G1 tratados 24 y 48 semanas, respectivamente. En el caso de los pacientes G2 y G3, alrededor de 62% de los pacientes alcanzaron la RVS, independientemente de la duración del tratamiento^{126,127}.

1.2.3. Interferón-pegilado (Peg-IFN) con RBV

La pegilación consiste en unir covalentemente cadenas de polietilenglicol (PEG) con moléculas de IFN-α. Esta formulación, aprobada en el 2001, mejoró considerablemente la estabilidad y la vida media en circulación del IFN-α, permitiendo de esta manera un efecto antivírico más prolongado y una dosificación menos frecuente¹⁴⁹. Existen dos formas de Peg-IFN en función de la masa molecular de su PEG: Peg-IFNα-2a (PEGASYS, Roche) de 40 kDa y Peg-IFNα-2b (PEG-Intron, Merck) de 12 kDa^{150,151}. En

combinación con RBV, las tasas de RVS fueron del 46% en pacientes G1 y del 76% en G2 y G3 con Peg-IFN α -2a; y del 42% en G1 y 82% en G2 y G3 con Peg-IFN α -2b^{152,153}.

1.2.4. Agentes antivirales de acción directa (DAAs)

Los DAAs son fármacos basados en moléculas que actúan inhibiendo proteínas virales implicadas en el ciclo replicativo del virus. En el caso del VHC, distinguimos tres clases de inhibidores en función de la proteína no estructural contra la cual van dirigidos¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ (Tabla 2).

Clases de inhibidores

Las diferentes clases de inhibidores difieren principalmente en su diana de acción, barrera genética y cobertura genotípica¹⁵⁷. La barrera genética es un parámetro que determina la probabilidad de aparición de virus resistentes durante el tratamiento y representa un factor importante que condiciona la potencia del inhibidor^{158,159}.

- Inhibidores de la proteasa NS3/4A

Los inhibidores de la proteasa NS3/4A (IP) interaccionan con el dominio de unión al sustrato de la proteasa impidiendo el procesamiento de la poliproteína. En función de los residuos con los que interactúa y la variabilidad del dominio de unión, la cobertura genotípica y la barrera genética pueden variar considerablemente entre los diferentes inhibidores¹⁶⁰⁻¹⁶². Además de esta actividad antiviral directa, la inhibición de la NS3 también contribuye a la eliminación del virus mediante la restauración del sistema inmune inespecífico y las vías de señalización del IFN mediada por la activación de IRF-3 (*interferón regulatory factor 3*)^{163,164}. Todos los IPs terminan con el sufijo “-previr”.

- Inhibidores de la proteína NS5A

La proteína NS5A presenta tres dominios (D1–D3) separados por secuencias de baja complejidad (LCS, *low-complexity sequences*)¹⁶⁵. El dominio I es imprescindible para la replicación mientras que los dominios II y III intervienen en el ensamblaje de las partículas víricas^{166,167}. Los inhibidores de la NS5A actúan sobre el dominio I bloqueando la formación del complejo replicativo^{168,169}. Igual que los IPs, el espectro genotípico y la barrera genética de los diferentes inhibidores varía en función de los residuos con los que interactúa y la homología de este dominio entre los diferentes genotipos¹⁷⁰. Además, la inhibición de la NS5A también favorece el restablecimiento de la producción de IFN^{171,172}. Asimismo, el bloqueo de la NS5A también desencadena la inhibición de la eIF2A (*Eukaryotic translation initiation factor 2A*) e impide la traducción de la poliproteína¹⁷³. Los inhibidores de NS5A terminan en “-asvir”.

- Inhibidores de la polimerasa NS5B

Dentro de esta familia se distinguen dos tipos de inhibidores en función de su mecanismo de acción: los inhibidores análogos de nucleós(t)idos (NI) y los inhibidores no-nucleos(t)ídicos (NNI)¹⁷⁴. Los NIs imitan el sustrato natural de la polimerasa y se incorporan en la cadena de ARN en síntesis impidiendo la unión del siguiente nucleós(t)ido¹⁷⁵. Debido a la alta homología del centro activo de la polimerasa entre los diferentes genotipos, los NIs tienen una cobertura pangénica y una barrera de resistencia alta¹⁷⁶. Los NNIs son moléculas que se unen a dominios alostéricos de la polimerasa causando cambios conformacionales que impiden la formación del complejo de elongación^{177,178}. Se han caracterizado hasta cuatro dominios que permiten la unión simultánea de diferentes NNIs^{179,180}. Debido a la elevada variabilidad de estos dominios alostéricos, los NNIs presentan una cobertura genotípica limitada y una baja barrera genética comparados con los NIs^{176,181}. Todos los inhibidores de RdRp acaban en “-buvir”.

Tabla 2. Antivirales de acción directa (DAAs) aprobados para el tratamiento de la infección crónica por VHC

Clase de Inhibidor	Generación	Compuesto	Abreviatura	Mecanismo de acción	Barrera genética	Potencia
Inhibidor de la NS3	Primera	Boceprevir* (MK-3034)	BOC	Ketamida lineal	Baja	Alta
		Telaprevir* (VX-950)	TLV	Ketamida lineal	Baja	Alta
		Simeprevir (TMC-435)	SMV	Macrocíclico	Baja	Alta
		Asunaprevir (BMS-650032)	ASV	Péptido acíclico	Baja	Alta
		Paritaprevir (ABT-450)	PTV	Macrocíclico	Baja	Alta
		Vaniprevir (MK-7009)	VPV	Macrocíclico	Baja	Alta
	Segunda	Grazoprevir (MK-5172)	GZR	Macrocíclico	Alta	Alta
		Glecaprevir (ABT-493)	GLE	Macrocíclico	Alta	Alta
		Voxilaprevir (GS-9857)	VOX	Macrocíclico	Alta	Alta
Inhibidor de la NS5A	Primera	Daclatasvir (BMS-790052)	DCV	Dominio I	Baja	Muy alta
		Ledipasvir (GS-5885)	LDV	Dominio I	Baja	Muy alta
		Ombitasvir (ABT-267)	OMV	Dominio I	Baja	Muy alta
	Segunda	Elbasvir (MK-8742)	EBR	Dominio I	Media	Muy alta
		Velpatasvir (GS-5816)	VEL	Dominio I	Media	Muy alta
		Pibrentasvir (ABT-530)	PIB	Dominio I	Media	Muy alta
Inhibidor de la NS5B	NI	Sofosbuvir (GS-7977)	SOF	Centro activo	Alta	Alta
	NNI	Dasabuvir (ABT-333)	DSV	Dominio "palma"	Baja	Media

Adaptada de Sorbo *et al.*, 2018; Spengler, 2018; EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018.

* Fármacos retirados del mercado

Respuesta a tratamientos basados en DAAs

En el 2011 se aprobaron los dos primeros DAAs (boceprevir y telaprevir) para el tratamiento de pacientes infectados con VHC G1. Ambos inhibidores mostraron un potente efecto antiviral con una reducción de la carga viral de hasta cuatro logaritmos en los pacientes tratados. Sin embargo, estos pacientes requerían la co-administración con Peg-IFN y RBV ya que, en monoterapia, era frecuente el rebrote virológico pocos días después del inicio del tratamiento y en la mayoría de los casos se observó una selección de mutaciones de resistencia^{182,183}. Con la triple terapia IP+Peg-IFN+RBV, se consiguió reducir considerablemente la aparición de mutaciones de resistencia alcanzándose tasas de RVS de

aproximadamente el 75% en pacientes G1 no tratados con anterioridad (pacientes *naive*)^{184,185}. En el 2014, con la aprobación de simeprevir y sofosbuvir, las tasas de RVS en combinación con Peg-IFN+RBV fueron del 80% y 89% en pacientes G1b *naive*, respectivamente^{186,187}. Seguidamente, con las sucesivas aprobaciones de inhibidores de diferentes clases, los regímenes de tratamiento actuales basados en combinaciones de DAAs libres de IFN han logrado en promedio tasas de RVS >95% en diferentes cohortes de pacientes¹⁸⁸⁻¹⁹⁹ (Tabla 3). Los factores que influyen en la tasa de RVS son: régimen terapéutico, genotipo/subtipo del VHC, grado de cirrosis, nivel de descompensación, polimorfismos genéticos, características farmacocinéticas, historial de tratamiento, co-morbilidades y la emergencia de sustituciones asociadas a resistencia (RASs) durante el tratamiento.

Tabla 3. Combinaciones de DAAs libres de IFN aprobadas para el tratamiento del VHC.

Marca comercial	Genérico			Genotipo aprobado
	NS3	NS5A	NS5B	
Sovaldi® + Olysio®	Simeprevir		Sofosbuvir	G1, G4
Daklinza™ + Sovaldi®		Daclatasvir	Sofosbuvir	G1, G3
Harvoni®		Ledipasvir	Sofosbuvir	G1, G4, G5, G6
Viekirax Pak™	Paritaprevir	Ombitasvir	Dasabuvir	G1
Technivie™	Paritaprevir	Ombitasvir		G4
Zepatier™	Grazoprevir	Elbasvir		G1, G4
Maviret®	Glecaprevir	Pibrentasvir		Pangenotípico
Epclusa®		Velpatasvir	Sofosbuvir	Pangenotípico
Vosevi®	Voxilaprevir	Velpatasvir	Sofosbuvir	Pangenotípico

1.2.4.1. Sustituciones asociadas a resistencia (RASs)

Las RASs son cambios puntuales de aminoácidos respecto a la secuencia de referencia en la proteína diana que confieren una susceptibilidad reducida a los DAAs y comprometen la eficacia de los tratamientos antivirales²⁰⁰⁻²⁰². Debido a la alta variabilidad genética del VHC, las RASs pueden estar tanto en la población basal antes del tratamiento como variantes naturales o como variantes adquiridas durante el tratamiento antiviral²⁰³⁻²⁰⁶. En la mayoría de los casos, las RASs suelen existir como poblaciones minoritarias dentro de la cuasiespecie por su reducido *fitness* comparado con las variantes *wild-type*, que predominan como la población mayoritaria²⁰⁶⁻²⁰⁹. Debido a la presión selectiva ejercida por los DAAs, las variantes sensibles disminuyen rápidamente, mientras que las RASs se seleccionan positivamente y se expanden dentro de la cuasiespecie por la adquisición de mutaciones compensatorias o asociadas a *fitness* que otorgan ventaja replicativa a estas RASs²¹⁰⁻²¹². En el fallo terapéutico, la observación clínica más frecuente es la recaída virológica o *relapse*, definida como ARN indetectable al final del tratamiento antiviral pero seguida de un rebrote de la viremia tras la suspensión de la presión inhibitoria²¹³.

La presencia de RASs en la cuasiespecie no implica necesariamente fallo terapéutico. El fracaso terapéutico está relacionado con la potencia del régimen terapéutico y su barrera genética (definida como el número de RASs necesarias para provocar fallo terapéutico), el nivel de resistencia de cada RASs y la capacidad replicativa de estas variantes resistentes.

La detección de las RASs se basa principalmente en dos métodos: secuenciación poblacional o Sanger y secuenciación masiva o NGS (*Next-Generation Sequencing*). Una de las limitaciones de la secuenciación Sanger es que solo es capaz de detectar de manera fiable variantes observadas a una frecuencia superior al 15%-20% en la población viral²¹⁴. Sin embargo, la secuenciación masiva muestra una extraordinaria sensibilidad que permite la detección del espectro de variantes genéticas hasta un nivel de frecuencia de entre el 0,1%-1% en la población viral^{215,216}. Hoy en día, la secuenciación Sanger es el método elegido por la mayoría de los estudios de resistencias, aunque existe controversia sobre la importancia clínica de las variantes minoritarias y su papel en el fallo virológico.

1.3. Aplicaciones de la secuenciación masiva en virología

El desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva ha supuesto un cambio revolucionario en el campo de la genómica, ya que permite generar millones de secuencias en una sola carrera, reduciendo considerablemente el coste por nucleótido secuenciado^{217,218}. El uso de la secuenciación masiva resulta especialmente prometedor en el terreno de la virología y tiene aplicaciones importantes en aspectos generales como: 1) Identificación y caracterización de nuevas especies virales y su asociación con patologías nuevas o existentes²¹⁹; 2) Caracterizar la composición de viomas en un nicho determinado²²⁰; 3) Analizar la distribución epidemiológica de los virus en la población general y las diferentes cepas existentes mediante estudios filogenéticos⁶⁸; 4) Entender la biología genética de los virus, así como su evolución, diversidad, transmisión, patogénesis e impacto sobre la progresión de las enfermedades²²¹; 5) Estudiar el tropismo de los virus e identificar los reservorios y mecanismos de patogenicidad²²².

En la práctica clínica, la secuenciación masiva es una herramienta potente en la detección de variantes minoritarias resistentes presentes en la población viral, así como el impacto de éstas en el tratamiento antiviral o en su transmisión^{223,224}. Sin embargo, a pesar de las ventajas de la secuenciación masiva, una de las limitaciones de estas plataformas consiste en la gran cantidad de información obtenida y el requerimiento de algoritmos bioinformáticos para el procesamiento de los datos generados.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral consiste en determinar la prevalencia de sustituciones asociadas a resistencia (RASs) en las regiones diana NS3, NS5A y NS5B tras el fracaso terapéutico a antivirales de acción directa (DAAs) en pacientes infectados con el VHC.

Los objetivos específicos fueron:

1. Determinar las RASs seleccionadas tras el fallo terapéutico y caracterizar el perfil de emergencia de RASs según los diferentes regímenes terapéuticos.
2. Analizar la distribución específica de RASs según los diferentes subtipos virales analizados.
3. Describir las combinaciones de RASs más prevalentes en el fallo terapéutico.
4. Estudiar posibles nuevas sustituciones asociadas a resistencia.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Pacientes

Para el presente estudio se analizaron un total de 409 muestras de suero de pacientes mayores de edad crónicamente infectados por el VHC, procedentes de 39 hospitales y laboratorios asistenciales de 11 Comunidades Autónomas de España pertenecientes al Plan Estratégico Nacional para el Abordaje de la Hepatitis C (PEACH), durante los años 2015 a 2017. Para cada paciente se solicitaron una serie de datos clínicos como el número de historia clínica, grado de fibrosis, subtipo del VHC, tiempo estimado de la infección, fecha de extracción de la muestra, carga viral en el momento de la extracción e historial de tratamiento con antivirales contra VHC (régimen terapéutico, duración, fecha de inicio/finalización y tipo de respuesta al tratamiento). Toda la información disponible, tanto virológica como clínica, se grabó en una base de datos anonimizada para su posterior análisis. Asimismo, todas las muestras de suero fueron codificadas y almacenadas a -80°C.

3.2. Diagnóstico del subtipo del VHC

Debido a la enorme variabilidad del VHC, los cebadores que van a ser usados para cualquier estudio son clave para evitar sesgos y que se amplifique una subpoblación que no sea representativa de la población viral que está infectando al paciente. Por ello, el estudio de resistencias requiere del uso de cebadores específicos de subtipo para la amplificación de las regiones de interés. Para escoger estos cebadores, el primer paso fue realizar el subtipado de alta resolución en la Unidad de Patología Hepática del Departamento de Bioquímica y Microbiología del Hospital Universitario Vall d'Hebrón²²⁵ de todas las muestras para identificar el subtipo del VHC y descartar la infección por más de un subtipo a la vez.

3.3. Extracción del ARN viral

El ARN viral fue extraído a partir de muestras de suero mediante extracción automática usando *Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit* (AmpliPrep system; Roche Diagnostics, West Sussex, United) o extracción manual con *QIAamp viral RNA mini kit* (Qiagen, Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4. Retrotranscripción y amplificación del genoma viral

3.4.1. RT-PCR

En función del resultado obtenido del subtipado, se escogieron los correspondientes cebadores previamente diseñados y validados en nuestro laboratorio para la amplificación de las regiones de interés²²⁶. Para la reacción de retrotranscripción y amplificación se usó el kit *Transcriptor One Step*

reverse RT-PCR kit (Roche Applied Science, Basel, Switzerland). Se amplificó la región proteasa de NS3 desde la posición 3384 a la 4027 (Tabla 4), la región de NS5A desde la posición 6111 a la 6882 (Tabla 5), y la región NS5B en dos fragmentos, NS5B-1 desde la posición 7945 a la 8652 (Tabla 6) y NS5B-2 desde la posición 7977 a la 9372 (Tabla 7).

Tabla 4. Cebadores específicos de subtipo usados para la retrotranscripción y amplificación de la región NS3

NS3				
Subtipo	Sentido	Cebador	Secuencia (5'-3')	Posición ¹
1a	Fw	NS3u1a3391	AGCTCGGAGTGYACCACTCCRT	3391-3414
	Rv	NS3d1a4004	GGGAGGGATCAGTGAGCATGGA	4004-3984
1b	Fw	NS3u1b3394	TTGARGGGCAGGGGTGGCGRCT	3394-3415
	Rv	NS3d1b4007	TGTCTGCGGTACRCCGGRGG	4007-3987
1l	Fw	NS3u1l3391	GCATGGTCAGCAAGGGRTGGAGRYT	3391-3415
	Rv	NS3d1l4004	TTGAGGCACAGCYGGTGGTCT	4004-3984
2a	Fw	NS3u2a3387	GATGGCTACACCTCYAAGGGGTGGA	3387-3411
	Rv	NS3d2a4007	GGTCTGGGGCACAGCYGGTGG	4007-3987
2c	Fw	NS3u2c3384	GCTGATGGATAYACCTCYAARGGTTGGA	3384-3411
	Rv	NS3d2c4007	GGTCTGGGGCACAGCTGGAGG	4007-3987
2i	Fw	NS3u2i3391	GCTACACCTCCAARGGGTGGAGAC	3391-3414
	Rv	NS3d2i4004	CTGRGGCACYGCTGGGGGYGT	4004-3984
2j	Fw	NS3u2j3423	CCSATCACCGCTTAYGCTCARCA	3423-3446
	Rv	NS3d2j4023	AGTACCCACAYTGRTAGGTCTGG	4023-4001
2k	Fw	NS3u2k3426	ATCACCGCTTATGCCCAGCAGA	3426-3447
	Rv	NS3d2k4014	ACCTGGTARGTCTGAGGYACAGC	4014-3992
2q	Fw	NS3u2q3387	GATGRKTACACCTCCAAGGGRTGGA	3387-3411
	Rv	NS3d2q4016	CACCTGATAGGTCTGGGGCAC	4016-3996
3a	Fw	NS3u3a3387	GATGAYTATCGGGAGATGGGTTGGC	3387-3411
	Rv	NS3d3a4004	CTGTGGRACRGCAGGAGGAGTTGAAT	4004-3979
3b	Fw	NS3u3b3391	ATTACAAGACGATGGGGTGGCGCC	3391-3414
	Rv	NS3d3b4022	GTATCCTACCTGGTAGGACTCTGG	4022-3999
3k	Fw	NS3u3k3391	ATTACCGCTCCATGGGGTGGAG	3391-3412
	Rv	NS3d3k4003	TGCGGCACTGCTGGTGGAGTT	4003-3983
4a	Fw	NS3u4a3391	CAGAAACATCMAAGGGGTGGAGACT	3391-3415
	Rv	NS3d4a4004	CTGRGGCACYGCDGGGGGTGT	4004-3984
4d	Fw	NS3u4d3391	CGCACRCYATRAAGGGGTGGA	3391-3411
	Rv	NS3d4d4004	CTGGGGCACGGCAGGAGGAGT	4004-3984
5a	Fw	NS3u5a3425	TATCACCGCTATGCGCAGCAGA	3425-3447
	Rv	NS3d5a4027	TGGAGGTGYCCCACTTGAAC	4027-4007

¹ Posición en el genoma del VHC según Kuiken *et al.*, 2009.

Tabla 5. Cebadores específicos de subtipo usados para la retrotranscripción y amplificación de la región NS5A

NS5A				
Subtipo	Sentido	Cebador	Secuencia (5'-3')	Posición ¹
1a	Fw	NS5Au1a6234	AGCTCGGAGTGYACCACTCCRT	6234-6255
	Rv	NS5Ad1a6879	GGGAGGGATCAGTGAGCATGGA	6879-6858
1b	Fw	NS5Au1b6234	AAYGAGGACTGCTCCACGCCAT	6234-6255
	Rv	NS5Ad1b6879	GGGAGGGGTCTGGTGTGAGCAT	6879-6861
1l	Fw	NS5Au1l6234	AATGAAGACTGCTCCACCCCT	6234-6255
	Rv	NS5Ad1l6879	GGGARGGGTCTGTVAGCATTGA	6879-6858
2a	Fw	NS5Au2a6234	ACTGAGGACTGCCCATCCCAT	6234-6255
	Rv	NS5Ad2a6880	TGGGAYGGATCTGTAGCATGGA	6880-6858
2c	Fw	5Au2c6111	TCCAGAGGDAACYAYGTCGCC	6111-6132
	Rv	5Ad2c6670	ACHCRTCACCCARGAGAARAAC	6724-6700
2i	Fw	5Au2i6234	AGCGARGACTAYCCSGTCCCAT	6234-6255
	Rv	5Ad2i6879	GRGATGGGTCTGTAGCATGGA	6879-6858
2j	Fw	NS5Au2j6118	GGAACCACGTCGCCCGA	6118-6135
	Rv	NS5Ad2j6799	GAGTTGAGRCCACGCTRAACGA	6799-6777
2k	Fw	NS5Au2k6234	ACCGARGACTGCCWRTYCCAT	6234-6255
	Rv	NS5Ad2k6879	GGGATGGGTCTGTCAGCATRGA	6879-6558
2q	Fw	NS5Au2q6229	GGATYACTGAGGATTGYCCCAT	6229-6250
	Rv	NS5Ad2q6878	GGACGGGACTGTAGCATGGA	6878-6858
3a	Fw	NS5Au3a6230	GATCAATGAAGACTACCCAAGYCCTT	6230-6255
	Rv	NS5Ad3a6874	GGGTCTCTCAACATCGAGGTCA	6874-6853
3b	Fw	NS5Au3b6227	GTGGATCAACGAGGACTATCCAAGT	6227-6251
	Rv	NS5Ad3b6879	GAGCAGGATCTCGAACATCGA	6879-6858
3k	Fw	NS5Au3k6237	GAAGACTATCCCACTCCTTGCG	6237-6261
	Rv	NS5Ad3k6879	GCGATGGATCTTGCARCATTGAGG	6879-6856
4a	Fw	NS5Au4a6230	GATCAATGAAGATTGYTCCACYCCAT	6230-6255
	Rv	NS5Ad4a6879	GTGATGGGTCTGTCARCATGGA	6879-6858
4d	Fw	NS5Au4d6234	AACGAGGACTGCTCTACTCCTT	6234-6255
	Rv	NS5Ad4d6879	GAGATGGATCTGTCAGCATAGA	6879-6858
5a	Fw	NS5Au5a6231	ATCGGYGARGACTAYTCCACGCC	6231-6253
	Rv	NS5Ad5a6879	GCRGGRATCAGTGAGCATGGA	6879-6856

¹ Posición en el genoma del VHC según Kuiken *et al.*, 2009.

Tabla 6. Cebadores específicos de subtipo usados para la retrotranscripción y amplificación de la región NS5B-1

NS5B-1				
Subtipo	Sentido	Cebador	Secuencia (5'-3')	Posición ¹
1a	Fw	5Bu1a7952	CCACATCAACTCCGTGTGG	7952-7970
	Rv	NS5Bd1a8648	GGGRGCGGAGTACCTGGT	8648-8631
1b	Fw	5Bu1b7952	CCACATCCRCTCCGTGTGG	7952-7970
	Rv	NS5Bd1b8650	GGGGGGGCAGAGTACCTAGT	8650-8631
1l	Fw	5Bu1l7952	CCACATCARATCTGTGTGGCAAG	7952-7974
	Rv	5Bd1l8648	GGGCCGAATACCTGGTCATA	8646-8627
2a	Fw	5Bu2a7952	CCACATCAAGTCCGTGTGG	7952-7970
	Rv	NS5Bd2a8652	CAGGAGGGGCAGARTACCTGGT	8652-8631

Materiales y métodos

2c	Fw	5Bu2c7952	CCACATCAAGTCCGTGTGGRAG	7952-7973
	Rv	5Bd2c8643	CRGAGTACCTGGTCATVGCCTG	8643-8622
2i	Fw	5Bu2i7952	CCACATCAAGTCCGTGTGG	7952-7970
	Rv	5Bd2i8648	AGGGGGCGGARTACCTGGT	8648-8631
2j	Fw	5Bu2j7945	CCRTTAACCACATCMAGTCCGTGTG	7945-7969
	Rv	NS5Bd2j8626	GCCTCCGTGAAGACTCTCAGGTT	8626-8604
2k	Fw	5Bu2k7952	CCACATCAAGTCCGTGTGGRARGA	7952-7970
	Rv	NS5Bd2k8651	GGGGGGGAGCGGAATAYCTGGT	8651-8631
2q	Fw	5Bu2q7952	CCACATCAAGTCCGTGTGGGA	7952-7972
	Rv	NS5Bd2q8649	GAGGGGGCGGARTATCTGGTCA	8649-8629
3a	Fw	5Bu3a7952	CCAGATCCGCTCCGTCTGG	7952-7970
	Rv	NS5Bd3a8652	CGGGTGGAGCAGAATACCTGGT	8652-8631
3b	Fw	5Bu3b7952	CCAGATCCGCTCCGTCTGG	7952-7970
	Rv	NS5Bd3b8652	CGGGAGGGGCGAGAATATCTGGT	8652-8631
3k	Fw	5Bu3k7952	CCATATCAACTCCGTATGGGAGGA	7952-7975
	Rv	NS5Bd3k8644	GCTGAGTACCTGGTCATAGCTTC	8644-8622
4a	Fw	5Bu4a7952	CCACATCARCTCCGTGTGG	7952-7970
	Rv	NS5Bd4a8650	GGGGGAGCCGAGTAYCTCGT	8650-8631
4d	Fw	5Bu4d7952	CCACATCAACTCCGTGTGG	7952-7970
	Rv	NS5Bd4d8649	GGGGGGCTGAGTACCTCGT	8649-8631
5a	Fw	5Bu5a7953	CACATMRAGGGYGTGTGGCAAGAC	7953-7976
	Rv	NS5Bd5a8648	GGGAGCRGAGTACCTGGTCAT	8648-8628

¹ Posición en el genoma del VHC según Kuiken *et al.*, 2009.

Tabla 7. Cebadores específicos de subtipo usados para la retrotranscripción y amplificación de la región NS5B-2

NS5B-2				
Subtipo	Sentido	Cebador	Secuencia (5'-3')	Posición ¹
1a	Fw	NS5Bu1a7977	CTTCTGGAAGACAGTGAACACCAATA	7977-8003
	Rv	NS5Bd1a9372	GGTTGGGGAGGAGGTAGATGCCT	9372-9350
1b	Fw	NS5Bu1b7976	CTTGCTGGAAGACACTGARACACCAATT	7976-8003
	Rv	NS5Bd1b9372	GGTTGGGGAGCAGGTAGATGCCT	9372-9350
3a	Fw	NS5Bu3a7976	CTTGCTGGAAGACACYACAACCTCAATT	7976-8003
	Rv	NS5Bd3a9372	GWGCTGGCAGGAGATAGATGCCT	9372-9350
4d	Fw	NS5Bu4d7982	GGAAGACAACACTACCCCATC	7982-8003
	Rv	NS5Bd4d9372	GAGCRGGCAGCAGGTAGATGCCT	9372-9350

¹ Posición en el genoma del VHC según Kuiken *et al.*, 2009.

Para la RT-PCR se utilizaron las siguientes condiciones de reacción (Tabla 8) y programa de amplificación (Tabla 9):

Tabla 8. Condiciones de la RT-PCR para cada reacción de amplificación

Reactivo	Volumen (μl)
H ₂ O	28,5
Buffer 10x	10
Primer Fw	1,5
Primer RV	1,5
DMSO (5%)	2,5
Polimerasa	1
RNA	5

Tabla 9. Programa de RT-PCR usado para la amplificación

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min:seg)	Ciclos
Retrotranscripción	50	30:00	1
Inicio	94	07:00	1
Desnaturalización	94	00:10	35
<i>Annealing</i>	X ¹	00:30	
Elongación	68	00:45 ² /02:00 ³	
Elongación final	68	07:00	1
Conservación	4	∞	1

¹ Todos los cebadores usados para la RT-PCR tienen una temperatura de *annealing* de 55°C. ² Tiempo de elongación para la amplificación de los amplicones NS3, NS5A y NS5B-1. ³ Tiempo de elongación para la amplificación del amplicón NS5B-2.

3.4.2. Nested-PCR

Para incrementar la especificidad y el rendimiento de los fragmentos deseados, se realizó una segunda amplificación usando como secuencia molde el producto de la amplificación de la RT-PCR. La metodología de secuenciación utilizada, permite tamaños de secuencia máximos de 600 nucleótidos (incluyendo los adaptadores). Por ello, se utilizaron cebadores para fragmentos de tamaños no superiores a 500 nucleótidos. Se amplificó un amplicón para NS3, uno para NS5A, dos para NS5B-1 (p18 y p19) y tres para NS5B-2 (p20, p21 y p22) con los cebadores específicos de subtipo correspondientes (Tablas 10, 11, 12 y 13).

Tabla 10. Cebadores específicos de subtipo usados para la Nested-PCR de la región NS3

NS3					
Subtipo	Sentido	Cebador	Secuencia (5'-3') ¹	Posición ²	T°C ³
1a	Fw	13u1a3490	GTTGTAACGACGCGCCAGTGGGACAAAAACARGTG GAGGGT	3490-3512	55
	Rv	13d1a3982	CACAGGAAACAGCTATGACCGAGTTGTCYGTGAACACC GGGGACC	3982-3958	

Material es y métodos

1b	Fw	13u1b3490	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTGGGACAATAACCAGGTC</u> GAGGGG	3490-3512	57
	Rv	13d1b3982	CACAGGAAACAGCTATGACCGARTTGTCTGTAAGACC GGRGACC	3982-3958	
1l	Fw	13u1l3490	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTGRGACAAAAACCAGGTG</u> GAGGG	3490-3511	55
	Rv	13d1l3982	CACAGGAAACAGCTATGACCGAATTRTCASTGAAGACT GGGGAC	3982-3959	
2a	Fw	13u2a3490	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTGYGACARGACAGAACAG</u> GCCGGG	3490-3512	55
	Rv	13d2a3982	CACAGGAAACAGCTATGACCCGTGTGTCACTRAAGGTG GGAGACC	3982-3958	
2c	Fw	13u2c3490	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTGYGACAAGACRGAMCAG</u> GCTGGG	3490-3512	55
	Rv	13d2c3982	CACAGGAAACAGCTATGACCCGTGTGTCACTRAAGYTT GGAGACC	3982-3958	
2i	Fw	13u2i3490	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTGC GACAAGACGGAGCAA</u> GCCGGC	3490-3512	55
	Rv	13d2i3982	CACAGGAAACAGCTATGACCCRTTRTCGGTGAAGCTG GGGGACC	3982-3958	
2j	Fw	13u2j3501	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTGAGTGTGCCGGRGARGT</u> CCAAGT	3501-3523	55
	Rv	13d2j4023	CACAGGAAACAGCTATGACCCAGTACCCACACTGRTAGG TCTGG	4023-4001	
2k	Fw	13u2k3504	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTCAAGCTGGRGARATCCA</u> GGTCTT	3504-3527	50
	Rv	13d2k3982	CACAGGAAACAGCTATGACCCGTTRTCAGTRAAGTTG GGGGAYCT	3982-3957	
2q	Fw	13u2q3482	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTGACGGGSCGYGATAAGA</u> CYGA	3482-3502	50
	Rv	13d2q3982	CACAGGAAACAGCTATGACCCGTGTGTCACTRAAGTTG GGGGAC	3982-3959	
3a	Fw	13u3a3490	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTGGGAYAAGAAYGTGGTG</u> ACCGGT	3490-3512	54
	Rv	13d3a3982	CACAGGAAACAGCTATGACCGAATTGTCACTRAAGTTG TGGAGACC	3982-3958	
3b	Fw	13u3b3490	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTGGGATAAAAACGTGGTG</u> ACTGGT	3490-3512	55
	Rv	13d3b3982	CACAGGAAACAGCTATGACCGAATTGTCACTRAAGTTG GGAGACC	3982-3952	
3k	Fw	13u3k3501	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTATCRTCACYGGGAGATC</u> CAGGT	3501-3523	55
	Rv	13d3k3981	CACAGGAAACAGCTATGACCGAATTGTCACTRAAGTTG RGGGGATCT	3982-3957	
4a	Fw	13u4a3490	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTGGGACACCAATGARAATT</u> GTGGT	3490-3512	51
	Rv	13d4a3982	CACAGGAAACAGCTATGACCGARTTGTCTGTAAGACT GGTGATC	3982-3958	
4d	Fw	13u4d3490	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTGAGACACCAACGAGAAC</u> TGCGGT	3490-3512	54
	Rv	13d4d3982	CACAGGAAACAGCTATGACCGAATTGTCACTRAAGTTG GGRGACC	3982-3958	
5a	Fw	13u5a3490	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTGGGACAAAAATGAAGCC</u> GAGGG	3490-3511	55
	Rv	13d5a3982	CACAGGAAACAGCTATGACCCGTGTGTCACTRAAGTTG GGYGAGC	3982-3958	

¹ Todos los cebadores usados para la Nested-PCR llevan incorporados la secuencia universal M13 (secuencia subrayada). ² Posición en el genoma del VHC según Kuiken *et al.*, 2009. ³ Temperatura de *annealing* usada para la PCR.

Tabla 11. Cebadores específicos de subtipo usados para la Nested-PCR de la región NS5A

NS5A					
Subtipo	Sentido	Cebador	Secuencia (5'-3') ¹	Posición ²	T ^o C ³
1a	Fw	13u1a6299	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTGGTGCTGAGCGAYTTTAAGACCTGGCT</u>	6299-6325	56
	Rv	13d1a6735	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCTATGYAGGCGACCCCGTCCA</u>	6735-6715	
1b	Fw	13u1b6299	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTGGTGTTGACTGAYTTCAAGACCTGGCT</u>	6299-6325	54
	Rv	13d1b6735	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCTGTGCARCCGYACCCCRCTCCA</u>	6735-6715	
1l	Fw	13u1l6299	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTAGTGCTGRGCGACTTYAAAAGGTGG</u>	6299-6323	55
	Rv	13d1l6735	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCTGTGTARRCGACCCCGTCRA</u>	6735-6715	
2a	Fw	13u2a6299	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTCATCYTRACAGACTTYAAAAAYTGCT</u>	6299-6325	50
	Rv	13d2a6735	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCTRTGGATYTGCACTCCGTCCA</u>	6735-6715	
2c	Fw	13u2c6250	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTCCCCTGCTCYRGCTCRTGGCT</u>	6250-6271	55
	Rv	13d2c6670	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCACHCCTCCACCCARGAGAARAAC</u>	6724-6700	
2i	Fw	13u2i6299	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTCATYCTGACRGACTTCAAAAAYTGTT</u>	6299-6325	55
	Rv	13d2i6735	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCTRTGGATCTGCACACCGTCCA</u>	6735-6715	
2j	Fw	13u2j6267	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTGGCTTCGCGAYVYATGGGACTG</u>	6267-6289	51
	Rv	13d2j6718	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCTCCACCCAGGAGAAAAACTCAGG</u>	6718-6696	
2k	Fw	13u2k6274	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTCGACATATGGGACTGGRYCTGYA</u>	6274-6297	50
	Rv	13d2k6719	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCATCCACCCAGGAGAAGAACTCYG</u>	6719-6697	
2q	Fw	13u2q6299	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTCATTCTGACCGATTTAAGAACTGGCT</u>	6299-6325	50
	Rv	13d2q6736	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCTGTGGATTTGACCCCRCTCYA</u>	6736-6715	
3a	Fw	13u3a6299	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTGGTGYTGTCYGACTTCAAGACATGGCT</u>	6299-6325	56
	Rv	13d3a6735	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCGGTGGAGTCTACCCCRCTCCA</u>	6735-6715	
3b	Fw	13u3b6299	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTAGTACTCAGTGACTTCAAAACCTGGCT</u>	6299-6325	55
	Rv	13d3b6735	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCGGTGGAGCCTACCCCGTCCA</u>	6735-6715	
3k	Fw	13u3k6307	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTCTGACTTCAAGCTRTGGCTTGGRG</u>	6307-6330	55
	Rv	13d3k6727	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCCTCACCCRTCAAGCTCRGTGAA</u>	6727-6705	
4a	Fw	13u4a6299	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTCGTGCTGAGTGACTTCAAGACGTGGCT</u>	6299-6325	52
	Rv	13d4a6735	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCGGTGTAGYCTGAYGCCGTCYA</u>	6735-6715	
4d	Fw	13u4d6299	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTCGTA CTGAGTGACTTTAAAACGTGGCT</u>	6299-6325	56
	Rv	13d4d6735	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCGATGGAGCCTGACGCCATCCA</u>	6735-6715	

Materiales y métodos

5a	Fw	13u5a6299	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGT</u> GGCACTGACAGACTTCAAAGCCT	6299-6321	55
	Rv	13d5a6735	CACAGGAAACAGCTATGACCGGTGAATCCTCACGCCRTCCA	6735-6715	

¹ Todos los cebadores usados para la Nested-PCR llevan incorporados la secuencia universal M13 (secuencia subrayada). ² Posición en el genoma del VHC según Kuiken *et al.*, 2009. ³ Temperatura de *annealing* usada para la PCR.

Tabla 12. Cebadores específicos de subtipo usados para la Nested-PCR de los dos amplicones (p18 y p19) de la región NS5B-1

NS5B-1 (p18)					
Subtipo	Sentido	Cebador	Secuencia (5'-3') ¹	Posición ²	T ^o C ³
1a	Fw	13u1a7952	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGT</u> CCACATCAACTCCGTGTGG	7952-7970	51
	Rv	13d1a8389	CACAGGAAACAGCTATGACCCCRACATAAAGCCTCTCRGTGAG	8389-8367	
1b	Fw	13u1b7952	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGT</u> CCACATCCRCTCCGTGTGG	7952-7970	53
	Rv	13d1b8389	CACAGGAAACAGCTATGACCCCGATRTAAAGCCGCTCTGTGAG	8389-8367	
1l	Fw	13u1l7952	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGT</u> CCACATCARATCTGTGTGGCAAG	7952-7974	55
	Rv	13d1l8389	CACAGGAAACAGCTATGACCCCGACGTAAAGCCTCTCYGTGA	8389-8368	
2a	Fw	13u2a7952	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGT</u> CCACATCAAGTCCGTGTGG	7952-7970	50
	Rv	13d2a8389	CACAGGAAACAGCTATGACCCCYACGTAAAGTCTCTCAGTCAG	8389-8367	
2c	Fw	13u2c7952	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGT</u> CCACATCAAGTCCGTGTGGRAG	7952-7973	50
	Rv	13d2c8315	CACAGGAAACAGCTATGACCCGACTCYTCRGTCTGATGTCYCTC	8315-8291	
2i	Fw	13u2i7952	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGT</u> CCACATCAAGTCCGTGTGG	7952-7970	55
	Rv	13d2i8389	CACAGGAAACAGCTATGACCCCCACGTATAGCCTCTCAGTTAG	8389-8367	
2j	Fw	13u2j7945	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGT</u> CCRTTAACACATCMAGTCCGTGTG	7945-7969	51
	Rv	13d2j8389	CACAGGAAACAGCTATGACCCCCACGTARAGYCTCTCAGTGAG	8389-8367	
2k	Fw	13u2k7952	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGT</u> CCACATCAAGTCCGTGTGGRARGA	7952-7975	50
	Rv	13d2k8389	CACAGGAAACAGCTATGACCCCCGCCYACGTAAAGTCTYTCAGTTA	8393-8368	
2q	Fw	13u2q7952	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGT</u> CCACATCAAGTCCGTGTGGGA	7952-7972	50
	Rv	13d2q8391	CACAGGAAACAGCTATGACCCGCCTACGTAGAGYCTCTCAGTTART	8391-8366	
3a	Fw	13u3a7952	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGT</u> CCAGATCCGCTCCGTCTGG	7952-7970	55
	Rv	13d3a8389	CACAGGAAACAGCTATGACCCCGCAGTAAAGCCGCTCCGTGAG	8389-8367	
3b	Fw	13u3b7952	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGT</u> CCAGATCCGCTCCGTCTGG	7952-7970	55
	Rv	13d3b8389	CACAGGAAACAGCTATGACCCCGATGTACAGCCGCTCCGTGAG	8389-8367	
3k	Fw	13u3k7952	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGT</u> GTTGTAAAACGACGGCCAGT	7952-7975	50
	Rv	13d3k8388	CACAGGAAACAGCTATGACCCACAGTAAAGCCGCTCCGTGAG	8388-8367	

4a	Fw	13u4a7952	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTCCACATCARCTCCGTGTGG</u>	7952-7970	51
	Rv	13d4a8389	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCCCCACRTAGAGTCTYTCTGTGAG</u>	8389-8367	
4d	Fw	13u4d7952	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTCCACATCAACTCCGTGTGG</u>	7952-7970	51
	Rv	13d4d8389	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCCCCACGTAGAGTCTCTCTGTGAG</u>	8389-8367	
5a	Fw	13u5a7953	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTCCACATMRAGGGYGTGTGGCAAGAC</u>	7953-7976	55
	Rv	13d5a8389	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCCCCACAGTAYAGGCGYGGGTGAG</u>	8389-8367	
NS5B-1 (p19)					
Subtipo	Sentido	Cebador	Secuencia (5'-3') ¹	Posición ²	T ^o C ³
1a	Fw	13u1a8142	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTAAGCTCCCYCTGGCCGTGATGGG</u>	8142-8164	53
	Rv	13d1a8584	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCCCKSACTTTCACAGATAACGAC</u>	8584-8562	
1b	Fw	13u1b8142	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTACCCTTCTCAGGCCGTGATGGG</u>	8142-8164	56
	Rv	13d1b8584	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCCCGCTYTCACAGATAACGAC</u>	8584-8562	
1l	Fw	13u1l8142	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTAAACTYCCCATTGCCGTGATGGG</u>	8142-8164	55
	Rv	13d1l8584	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCCCYCRCTCTCACAGATRACGAC</u>	8584-8562	
2a	Fw	13u2a8142	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTAAGCTTCTCAGGCCGTGATGGG</u>	8142-8164	50
	Rv	13d2a8584	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCCCTGGCTTCTGAGATGACWAC</u>	8584-8562	
2c	Fw	13u2c8119	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTTGGCCCTYATGACATWACACARAAGC</u>	8119-8145	50
	Rv	13d2c8613	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCTCTCAGGTTYCGCTCRTCYTCC</u>	8613-8591	
2i	Fw	13u2i8142	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTAARCTCCCYCAGGCRGTAATGGG</u>	8142-8164	55
	Rv	13d2i8584	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCCCTGRCTCTCTGAGATGACGAC</u>	8584-8562	
2j	Fw	13u2j8142	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTAAACTYCCCAGGCRGTGATGGG</u>	8142-8164	55
	Rv	13d2j8626	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCGCTCCGTGAAGACTCTCAGGTT</u>	8626-8604	
2k	Fw	13u2k8142	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTAAGCTACCCAGGCAGTRATGG</u>	8142-8163	50
	Rv	13d2k8587	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCGCTCCYGRCTCTCTGARATGACTAC</u>	8587-8562	
2q	Fw	13u2q8139	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTCAGAAGCTACCCARGCAGTAAT</u>	8139-8161	50
	Rv	13d2q8584	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCCCTGACTTCTGAGATGACYACCA</u>	8584-8560	
3a	Fw	13u3a8142	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTAAGTTGTCAATTGMGACGATGGG</u>	8142-8164	51
	Rv	13d3a8584	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCCCATCTCTCRGCCACCACRAC</u>	8584-8562	
3b	Fw	13u3b8142	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTAAGTTGTCAATCGCAACGATGGG</u>	8142-8162	55
	Rv	13d3b8584	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCCGCAACTTTCAGATATCACCAC</u>	8584-8562	
3k	Fw	13u3k8141	<u>GTTGTA AACGACGGCCAGTGAAGTTGCCCRGYGCARTAATGGG</u>	8141-8162	50

Materiales y métodos

	Rv	13d3k8584	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCCCTGCACTCTCAGCAATYACGAC</u>	8584-8562	
4a	Fw	13u4a8142	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGTMAACTACCTRAGGCCGTGATGGG</u>	8142-8164	55
	Rv	13d4a8584	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCCCGTCTCAGCGATRACGAC</u>	8584-8562	
4d	Fw	13u4d8142	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGTCAACTTTCTCTGGCCGTGATGGG</u>	8142-8164	55
	Rv	13d4d8584	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCCCATCGCTTTCAGCGATAACGAC</u>	8584-8562	
5a	Fw	13u5a8142	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGTAAACTGCCRACAGCCCTTATGGG</u>	8142-8164	55
	Rv	13d5a8584	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCTGGCTCTCGCAGATGGCCACAA</u>	8581-8560	

¹ Todos los cebadores usados para la Nested-PCR llevan incorporados la secuencia universal M13 (secuencia subrayada). ² Posición en el genoma del VHC según Kuiken *et al.*, 2009. ³ Temperatura de *annealing* usada para la PCR.

Tabla 13. Cebadores específicos de subtipo usados para la Nested-PCR de los tres amplicones (p20, p21 y p22) de la región NS5B-2

NS5B-2 (p20)					
Subtipo	Sentido	Cebador	Secuencia (5'-3') ¹	Posición ²	T ^o C ³
1a	Fw	13u1a8494	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGTAGGCCRRGCAGCCTGTCGAG</u>	8494-8514	48
	Rv	13d1a8878	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCATCAGTATCATYCTCGCCA</u>	8878-8859	
1b	Fw	13u1b8494	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGTAGGCCWCTGCRGCCTGTCGAG</u>	8494-8514	48
	Rv	13d1b8878	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCATCAGRATCATCCTTGCCA</u>	8878-8859	
NS5B-2 (p21)					
Subtipo	Sentido	Cebador	Secuencia (5'-3') ¹	Posición ²	T ^o C ³
1a	Fw	13u1a8787	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGTGCGTGGGAGACAGCAAGACACACT</u>	8787-8810	48
	Rv	13d1a9190	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCACTGCCARTTGAAGAGGTA</u>	9190-9171	
1b	Fw	13u1b8787	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGTGCGTGGGAGACAGCTAGACACACT</u>	8787-8810	48
	Rv	13d1b9190	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCACTGCCAGTTGAAGAGGTA</u>	9190-9171	
NS5B-2 (p22)					
Subtipo	Sentido	Cebador	Secuencia (5'-3') ¹	Posición ²	T ^o C ³
1a	Fw	13u1a9032	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGTACTCTCCAGGTGAAATCAATAGGG</u>	9032-9055	51
	Rv	NS5BM13d1a9348	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCCCTGCAGCAAGCAGGAGTA</u>	9348-9328	
1b	Fw	13u1b9032	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGTACTCTCCAGGTGARATCAATAGGG</u>	9032-9055	50
	Rv	NS5BM13d1b9348	<u>CACAGGAAACAGCTATGACCCCTACRGAAGTAGGAGTA</u>	9348-9328	

¹ Todos los cebadores usados para la Nested-PCR llevan incorporados la secuencia universal M13 (secuencia subrayada). ² Posición en el genoma del VHC según Kuiken *et al.*, 2009. ³ Temperatura de *annealing* usada para la PCR.

Para la Nested-PCR se usó el kit *FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack* (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) con las siguientes condiciones de reacción (Tabla 14) y programa de amplificación (Tabla 15):

Tabla 14. Condiciones de la Nested-PCR para cada reacción de amplificación

Reactivo	Volumen (μ l)
H ₂ O	33
Buffer 10x	5
Primer Fw	1,5
Primer RV	1,5
dNTPs	1
DMSO (5%)	2,5
Polimerasa	0,5
cDNA	5

Tabla 15. Programa de Nested-PCR usado para la amplificación

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min:seg)	Ciclos
Inicio	94	04:00	1
Desnaturalización	94	00:30	40
<i>Annealing</i>	X ¹	00:30	
Elongación	72	00:50	
Elongación final	72	07:00	1
Conservación	4	∞	1

¹ La temperatura de *annealing* para cada reacción de amplificación se ajustó en función de los cebadores usados, tal y como se indican en las tablas 10, 11, 12 y 13.

3.4.2.1. Análisis y purificación de los fragmentos amplificados por Nested-PCR

Tanto los productos amplificados como los controles negativos realizados en paralelo durante cada reacción de PCR, fueron posteriormente analizados por electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con SYBR-SAFE (Invitrogen Molecular Probes). Se usó el marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) y se recortaron las bandas específicas de cada fragmento. Para la purificación de las bandas recortadas se utilizó el kit *QIAquick gel extraction kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5. Secuenciación de los amplicones por UDPS (*Ultra-Deep Pyrosequencing*)

Para la secuenciación de los fragmentos amplificados se usó la plataforma GS-454 Junior (Roche, Branford, CT, USA) o la plataforma Illumina MiSeq System (Illumina, San Diego, CA).

3.5.1. Secuenciación con plataforma GS-454 Junior

Para la plataforma GS-454 Junior se usaron los GS Junior Titanium Series Kits (Roche, Branford, CT, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5.1.1. Preparación de la librería

PCR-MID

En cada carrera de secuenciación se mezclaron todos los amplicones. Con el fin de identificar las secuencias que provienen de pacientes diferentes, se realizó una MID-PCR a partir de los amplicones de la Nested-PCR sin purificar con cebadores de fusión universal M13 (TIB Molbiol, Berlin, Germany) que llevan incorporadas secuencias identificativas MID (*Multiplex Identifier*), además de los adaptadores correspondientes a la plataforma de secuenciación GS-Junior situados en los extremos 5' y 3'. Para la MID-PCR se usó el kit *FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack* (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) con las siguientes condiciones de reacción (Tabla 16) y programa de amplificación (Tabla 17):

Tabla 16. Condiciones de la MID-PCR para cada reacción de amplificación

Reactivo	Volumen (μl)
H ₂ O	34
Buffer 10x	5
Primer Fw (20μM)	1
Primer RV (20μM)	1
dNTPs	1
DMSO (5%)	2,5
Polimerasa	0,5
cDNA	5

Tabla 17. Programa de MID-PCR usado para la amplificación

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min:seg)	Ciclos
Inicio	94	04:00	1
Desnaturalización	94	00:30	
<i>Annealing</i>	60 ¹	00:30	15
Elongación	72	01:00	
Elongación final	72	07:00	1
Conservación	4	∞	1

¹ Todos los cebadores de fusión usados para la MID-PCR tienen una temperatura de *annealing* de 60°C.

Análisis y purificación de los amplicones

Para el análisis y purificación de los amplicones de la MID-PCR se siguió el mismo protocolo descrito en el apartado 3.4.2.1.

Cuantificación y control de calidad de los amplicones purificados

Los fragmentos purificados se cuantificaron con PicoGreen dsDNA Quantitation Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se analizó su calidad mediante BioAnalyzer DNA 1000 LabChip (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

Normalización de los amplicones

Para que todos los amplicones estén representados equimolarmente dentro la librería, se normalizaron a la misma concentración de 10^9 moléculas/ μl diluyendo en tampón EB (10 mM Tris-HCl, pH 8-8,5) (Qiagen, Valencia, CA, USA). De cada amplicón a secuenciar se cogieron 10 μl de muestra y se añadieron al pool de la librería. Este pool se volvió a diluir con EB (10 mM Tris-HCl, pH 8-8,5) a una concentración de 2×10^6 moléculas/ μl .

PCR en emulsión (emPCR)

Para la PCR en emulsión se utilizaron 2 μl del *pool* de la librería de 2×10^6 moléculas/ μl . Los adaptadores situados en los extremos de cada amplicón sirven como secuencias de hibridación que unen los amplicones a las esferas de captura o *beads* y permiten su posterior amplificación y secuenciación. Estas esferas se emulsionan con los reactivos de amplificación en una micela de agua y aceite de manera que cada esfera queda aislada de los demás formando un microrreactor que permite la amplificación clonal del amplicón unido.

3.5.1.2. Secuenciación de la librería

Las esferas con los amplicones unidos se transfieren a una placa de secuenciación (*PicoTiterPlate*) que sirve como dispositivo de soporte para la lectura de las señales de secuenciación. Todos los amplicones se secuencian en paralelo y por cada incorporación de nucleótido complementario a la cadena molde unida a la esfera se emite una señal lumínica que es captada por la cámara CCD (*Charge Coupled Device*) del secuenciador. En cada carrera se secuenciaron 12 amplicones.

3.5.2. Secuenciación con plataforma Illumina MiSeq

Para la secuenciación con la plataforma MiSeq System se usaron los MiSeq Reagent kit v3 (Modo 2 x 300pb con 600 ciclos) (Illumina, San Diego, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5.2.1. Preparación de la librería

Cuantificación y control de calidad de los amplicones purificados

Los amplicones purificados de la Nested-PCR se cuantificaron por Qubit dsDNA Assay kit (ThermoFisher Scientific). El análisis de calidad se realizó con BioAnalyzer DNA 1000 LabChip (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

Normalización de los amplicones

Los amplicones de la región NS3 se normalizaron a una concentración de 1×10^{10} moléculas/ μl y el resto de los amplicones a una concentración de 4×10^9 moléculas/ μl , diluyendo en tampón EB (10 mM Tris-HCl, pH 8-8,5) (Qiagen, Valencia, CA, USA). Para cada *pool* se añadió 20 μl de muestra por amplicón.

Purificación y cuantificación de cada *pool* de muestra

Cada *pool* fue purificado con Ampure Beads Agentcourt AMPure XP (Beckman Coulter Inc., Danvers, MA, USA) o Kappa Pure Beads (Kapa Biosystems, Roche) y cuantificado mediante Qubit dsDNA Assay kit (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ligación de los adaptadores

Cada *pool* se sometió a una ligación de los adaptadores SeqCap Adapter Kit A/B (Nimblegen) con el fin de unir estas secuencias de índices a los amplicones para su posterior identificación. Para cada *pool* se le asignó un índice.

3.5.2.2. Secuenciación de la librería

Para la librería final se cogieron 8 μl de cada *pool* y se cuantificó por LightCycler 480 (Kapa Library Quantification kit). Para obtener una densidad de *clúster* de 900K/ mm^2 , la librería fue ajustada a una concentración de 15 pM. El control de la secuencia conocida PhiX (Phix control v3) fue también ajustado a la misma concentración que la librería y ambos fueron mezclados a una proporción de 16% de PhiX. Todo el volumen de la librería+PhiX se cargó en el cartucho de reactivos correspondiente para su posterior transferencia a la placa de secuenciación (*Flow Cell*), donde los amplicones se unen a la placa mediante su secuencia de adaptador. Durante la secuenciación en paralelo de las copias, la

cámara capta señales de luz generada por cada reacción de incorporación de nucleótido. En cada carrera de MiSeq se secuenciaron entre 96-108 amplicones.

3.6. Algoritmo para el análisis de datos

Para el análisis y procesamiento de datos generados por GS-454 Junior (454 fasta) y MiSeq System (FastQ) se usaron los programas R²²⁷, Bioconductor²²⁸ y la librería Biostrings²²⁹ siguiendo unos criterios para garantizar la integridad y la calidad de las secuencias (Figura 4). Para los archivos FastQ, se realizó un control de calidad añadido donde se excluyeron las secuencias con un valor *phred* inferior a Q30. Para el solapamiento por FLASH de los extremos de las lecturas R1 y R2 se estableció un solapamiento mínimo de 20 pb con un máximo de 10% de diferencias permitidas. Todas las secuencias obtenidas (tanto secuencias de nucleótidos como de aminoácidos) se enfrentaron con las secuencias de referencia correspondientes obtenidas tras colapsar secuencias depositadas en la base de datos de Los Alamos siguiendo el procedimiento descrito²²⁶. Tras el análisis, se generó un informe con todas las sustituciones individuales y los haplotipos caracterizados. Para el presente estudio se estableció el filtro del 1% para reportar tanto los haplotipos como las sustituciones de aminoácidos individuales.

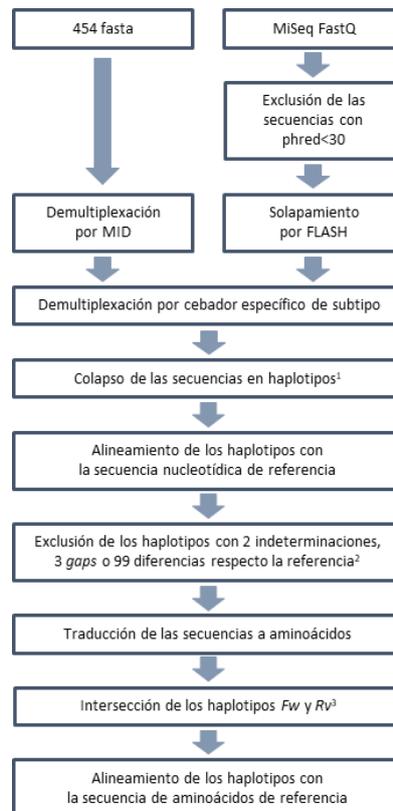


Figura 4. Algoritmo de los procedimientos de análisis y criterios de exclusión usados para la detección de sustituciones de aminoácidos. ¹Los haplotipos con frecuencia inferior a 0,1% son descartados. ²Las indeterminaciones y gaps aceptados son reparados según el nucleótido del haplotipo dominante. ³Los haplotipos con frecuencia inferior a 0,2% son descartados.

3.7. Establecimiento de la cohorte de estudio

Para definir la cohorte de estudio, se establecieron 3 criterios de inclusión para las muestras procesadas: 1) Disponer de la información del régimen terapéutico al que ha fallado el paciente. 2) Tener los cuatro amplicones (NS3, NS5A, NS5B-1 p18 y NS5B-1 p19) secuenciados. 3) Tener una cobertura superior a 10.000 secuencias para cada uno de los amplicones secuenciados. Los pacientes que no cumplieron estos requisitos quedaron excluidos del estudio. Finalmente, se estableció una cohorte de estudio de 220 pacientes con fallo terapéutico a DAAs (Figura 5).

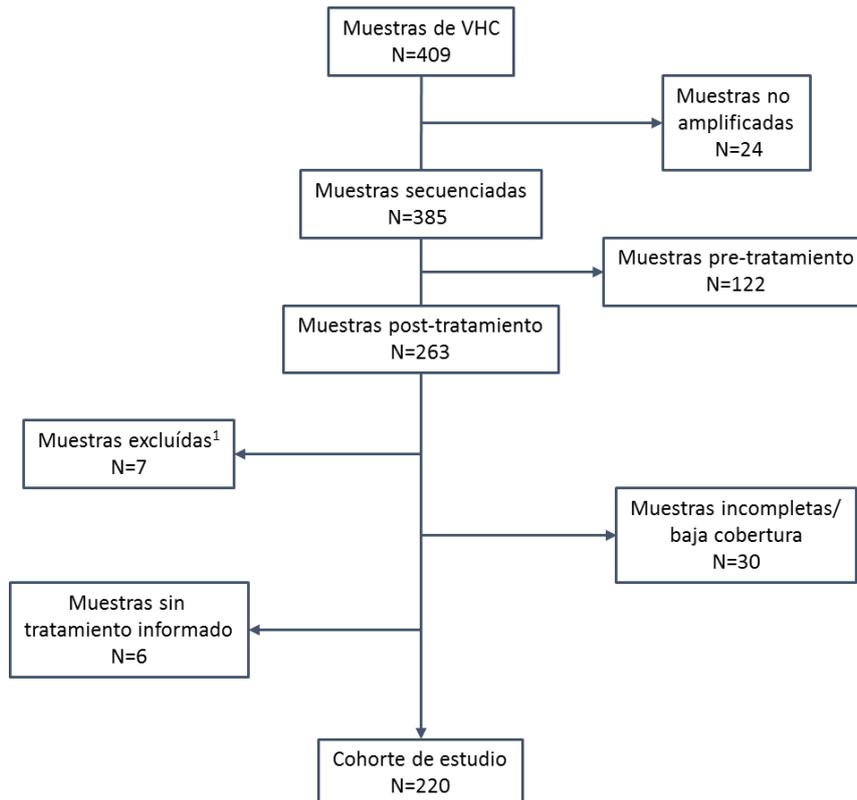


Figura 5. Criterios de inclusión y exclusión de la cohorte de estudio. ¹ Se excluyeron del estudio 4 muestras de procedencia extranjera, 2 muestras de ensayo clínico y 1 muestra por falta de consentimiento.

3.8. Análisis de las Sustituciones Asociadas a Resistencia (RASs)

Para el análisis de las resistencias de los pacientes de esta cohorte, se han considerado las RASs, descritas en la literatura como sustituciones asociadas a fallo terapéutico *in vivo* o sustituciones con susceptibilidad reducida a los DAAs en sistemas de replicones *in vitro* (Tabla 18).

Tabla 18. RASs consideradas para el análisis de resistencias con susceptibilidad reducida a las correspondientes familias de inhibidores para los diferentes genotipos y subtipos.

Inhibidores	Posición	Genotipo/subtipo						
		G1a	G1b	G2	G3	G4	G5	G6
NS3	36	V36A/C/I/G/L/M	V36A/C/I/G/L/M					
	41	Q41R	Q41R					
	43	F43L	F43I/S/V					
	54	T54A/S	T54A/C/G/S					
	55	V55A/I	V55/A					
	56	Y56H	Y56H/L	Y56H		Y56H		Y56H
	80	Q80H/K/L/R	Q80H/K/L/R					L80K/Q
	107	V107I	V107I					
	122	S122G/R	S122A/D/G/I/N/R/T					S122T
	132	I132V						
	155	R155G/I/K/M/S/T/W	R155C/G/I/K/M/Q/S/T/W					
	156	A156S/T/V	A156G/F/S/T/V					
	158	V158I	V158I					
	168	D168A/C/E/F/G/H/I/K/L/N/S/T/V/Y	D168A/C/E/F/G/H/I/K/L/N/T/V/Y		Q168R	D168V		D168E/Y
	170	I/V170F/T/V	I/V170A/L/T					I170V
	175		M175L					
	NS5A	24	K24G/N/R		T24A			
26		K26E						
28		M28A/G/T/S/V	L28M/T	L/F28M/V/S	M28T	L28M/S/V	L28I	F28L
29			P29S					
30		Q30C/D/E/G/H/I/K/L/R/S/T/Y	R30G/H/P/Q	L30H/S	A30K/S	L30H/S		
31		L31I/F/M/P/V	L31F/I/M/V	L31M/V	L31I/F/M/V	L31I/M	L31F/V	L31M/V
32		P32L/S	P32F/L/S					P32L/S
38		S38F						
58		H58D/L/R	P58D/S			T58P/S		T58A/N/S
62			Q/E62D					
92		A92K/T	A92K	C92R				
93		Y93C/F/H/L/N/R/S/T/W	Y93C/H/N/S	Y93H	Y93H	Y93H/R		
NS5B (NI)		159	L159F	L159F	L159F	L159F		
	282	S282T/R	S282T	S282T	S282T	S282T	S282T	
	320	L320I/F/V						
	321	V321A			V321A			
	314	L314H						
NS5B (NNI)	316	C316Y	C316H/N/Y/W					
	368		S368T					
	411		N411S					
	414	M414I/T/V	M414I/T/V					
	445		C445F/Y					
	446	E446K/Q						
	448	Y448C/H	Y448C/H					
	451	C451R						
	553	A553T	A553V					
	554	G554S	G554S					
	555	Y555H						
	556	S556G/R	S556G/R					
	557	G557R						
	558	G558R	G558R					
	559	D559G/N	D559G/N					
561	Y561H/N							

Adaptada de Lontok *et al.*, 2015; Sarrazin *et al.*, 2016; EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016.

4. RESULTADOS

4.1. Características clínicas de la cohorte de estudio

Los resultados de esta Tesis Doctoral forman parte de un proyecto multicéntrico a nivel nacional donde se ha planteado el análisis mediante secuenciación masiva de una cohorte de muestras de suero de 220 pacientes que no han respondido a tratamientos antivirales con DAAs. Los datos clínicos de los pacientes de la cohorte de estudio se encuentran recogidos en el anexo 1.

4.1.1. Distribución de los subtipos virales en el fallo terapéutico

En primer lugar, se analizó el subtipo del virus mediante secuenciación masiva de alta resolución siguiendo el método descrito²²⁵. La determinación del subtipo viral nos permitió escoger cebadores específicos de subtipo para amplificar las regiones de interés. Recientemente se ha desarrollado en el laboratorio un método de secuenciación masiva para el análisis de sustituciones asociadas a resistencia²²⁶ basado en el diseño de oligonucleótidos capaces de discriminar entre subtipos del virus que nos ha permitido el análisis en profundidad de subpoblaciones virales que serían difíciles de amplificar utilizando oligonucleótidos no optimizados.

En la distribución de subtipos dentro de nuestra cohorte de estudio (N=220), el G1 fue el más predominante representando un total de 62,7% de los pacientes analizados (22,7% G1a, 39,5% G1b y 0,5% G1l), seguido por pacientes infectados con VHC G3a y G4d que representan una prevalencia del 21,4% y 12,3%, respectivamente. En el 3,6% de pacientes restantes el virus circulante correspondió al G2 (G2c, G2i y G2j) junto con cuatro casos de infecciones mixtas (G1b+G1a / G4a+G1b / G4d+G1b / G4d+G3a) (Figura 6).

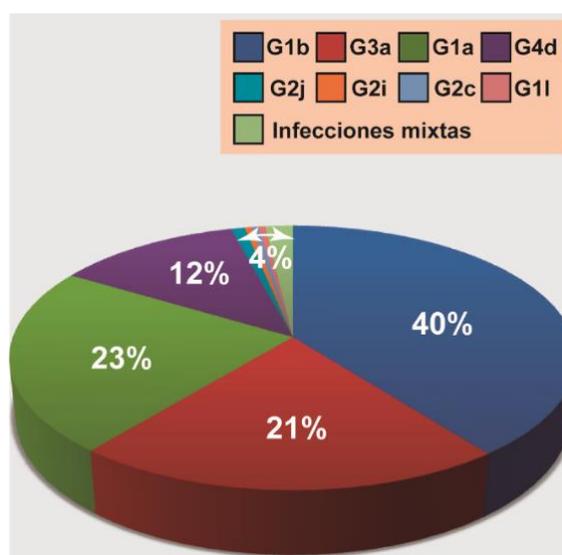


Figura 6. Distribución de los subtipos de la cohorte de estudio en el fallo terapéutico (N=220). Número de pacientes correspondientes a cada subtipo: G1a (N=50); G1b (N=87); G1l (N=1); G2c (N=1); G2i (N=1); G2j (N=2); G3a (N=47); G4d (N=27); infecciones mixtas (N=4).

4.1.2. Distribución de los tratamientos en el fallo terapéutico

La distribución de los tratamientos a los que han fallado los pacientes dentro de nuestra cohorte se subdividió en aquellos regímenes que incorporaban IFN y en aquellos basados únicamente en DAAs. El 97% de los pacientes analizados fueron tratados con regímenes terapéuticos libres de IFN, mientras que el 3% restante recibieron tratamientos basados en IFN en combinación con SMV, DCV o SOF más RBV. Dada la importancia actual del SOF en las combinaciones terapéuticas basadas en DAAs, la cohorte se subdividió en tratamientos basados o no basados en SOF (Tabla 19). El 79,1% de los pacientes recibieron regímenes antivirales con SOF, dentro de los cuales el 40% incluyó además LDV, el 17,8% fueron en combinación con SMV y el 15,9% con DCV. Las combinaciones libres de SOF más prevalentes correspondieron a los regímenes PTV/r+OMV+DSV (régimen 3D) y PTV/r+OMV (régimen 2D), prescritas a un 9.1% y 6% de los pacientes, respectivamente. El 52,3% de los pacientes de la cohorte recibieron tratamientos en combinación con RBV (Figura 7).

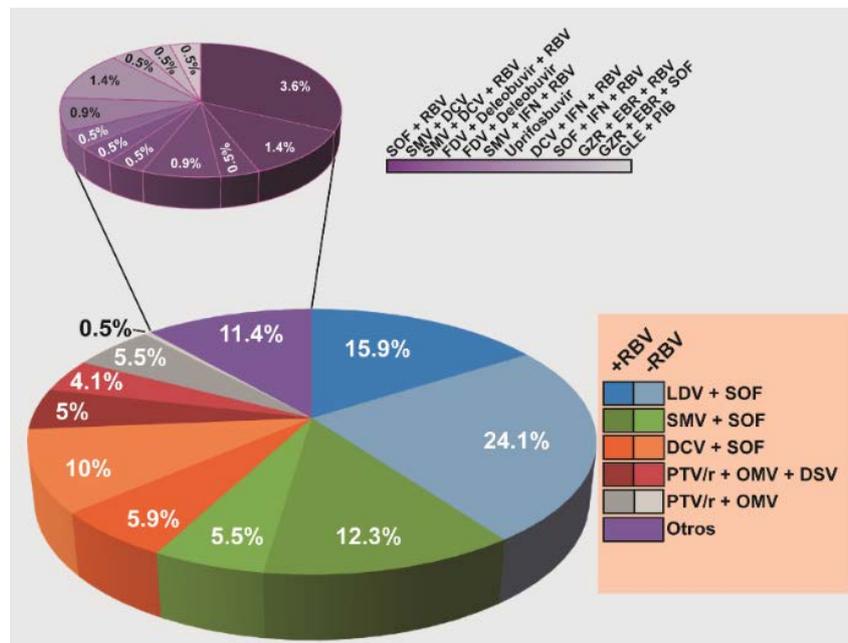


Figura 7. Distribución de los regímenes terapéuticos en la cohorte de estudio. Número de pacientes correspondientes a cada grupo de tratamiento: LDV+SOE (N=88); SMV+SOE (N=39); DCV+SOE (N=35); PTV/r+OMV+DSV (N=20); PTV/r+OMV (N=13); Otros tratamientos (N=25).

Tabla 19. Distribución de los pacientes de la cohorte de estudio según el subtipo del VHC, régimen terapéutico recibido y el uso de la RBV

		Subtipos						
		G1b	G1a	G3a	G4d	Otros	Mixtas	
Tratamientos basados en SOF	LDV + SOF (+RBV/-RBV)	12/23	7/21	4/5	10/3	1 ^(a) / 0	1 ^(e) / 1 ^(f)	35/53
	SMV + SOF (+RBV/-RBV)	18/10	4/2	-	3/1	-	1 ^(g) / 0	26/13
	DCV + SOF (+RBV/-RBV)	2/4	0/2	11/16	-	-	-	13/22
	SOF + RBV	3	-	3	-	2 ^(b)	-	8
	SOF + IFN + RBV	-	-	2	-	1 ^(c)	-	3
	GZR + EBR + SOF	-	-	1	-	-	-	1
Tratamientos no basados en SOF	PTV + OMV + DSV (+RBV/-RBV)	4/3	6/4	1/2	-	-	-	11/9
	PTV + OMV (+RBV/-RBV)	-	1/1	2/0	8/0	-	1 ^(h) / 0	12/1
	SMV + DCV (+RBV/-RBV)	0/2	1/0	-	0/1	-	-	1/3
	DCV + IFN + RBV	2	-	-	-	-	-	2
	SMV + IFN + RBV	-	1	-	-	-	-	1
	GZR + EBR + RBV	-	-	-	1	-	-	1
	FDV + Deleobuvir (+RBV/-RBV)	2/1	-	-	-	-	-	2/1
	Uprifosbuvir	-	-	-	-	1 ^(d)	-	1
	GLE + PIB	1	-	-	-	-	-	1
	TOTAL (+RBV/-RBV)	43/44	20/30	23/24	22/5	4/1	3/1	220

(a) G1i; (b) G2i; (c) G2j; (d) G2c; (e) G4d (69,3%) + G1b (30,6%); (f) G4a (98,5%) + G1b (1,5%); (g) G1b (80%) + G1a (19,9%); (h) G4d (96,7%) + G3a (3,3%).

4.2. Características virológicas de la cohorte de estudio

La selección de mutantes resistentes a DAAs es uno de los problemas actuales para el control de enfermedades virales entre las que se incluyen las infecciones por el VHC. Para analizar la relación entre la presencia de RAS y la falta de respuesta a las combinaciones de DAAs se ha llevado a cabo la secuenciación masiva de las tres regiones diana frente a las que van dirigidos los DAAs (NS3, NS5A y NS5B). Para visualizar la frecuencia (porcentaje de secuencias que incluyen la mutación dentro del número de secuencias totales) a la que hemos encontrado cada RAS en la cuasi-especie viral se ha construido un Heat Map de frecuencias definidas por colores. Se han caracterizado un total de 90 RASs diferentes (33 en la región NS3, 48 en la región NS5A y 9 en la región NS5B) que corresponden a un total de 551 sustituciones que se encuentran a frecuencias superiores al 1% (Figura 8). El 69,6% de las RASs caracterizadas se han detectado a frecuencias superiores al 90%, mientras que el 5,8% y el 5,6% de las RASs se encontraban a una frecuencia entre el 50%-90% y el 20%-50%, respectivamente. Cerca del 19% de los pacientes presentaban frecuencias de RASs entre 1%-20%.

Considerando las tres regiones genómicas, en el 88,6% de los pacientes hemos detectado al menos una RAS, mientras que en el resto de pacientes (11,4%) no se detectaron RASs en el momento del análisis. El número promedio de RASs seleccionadas por paciente fue de 2,1 para pacientes infectados con VHC G1a, 3,4 RASs para los infectados con VHC G1b, y 1,2 y 2,6 RASs para pacientes infectados con VHC G3a y G4d, respectivamente.

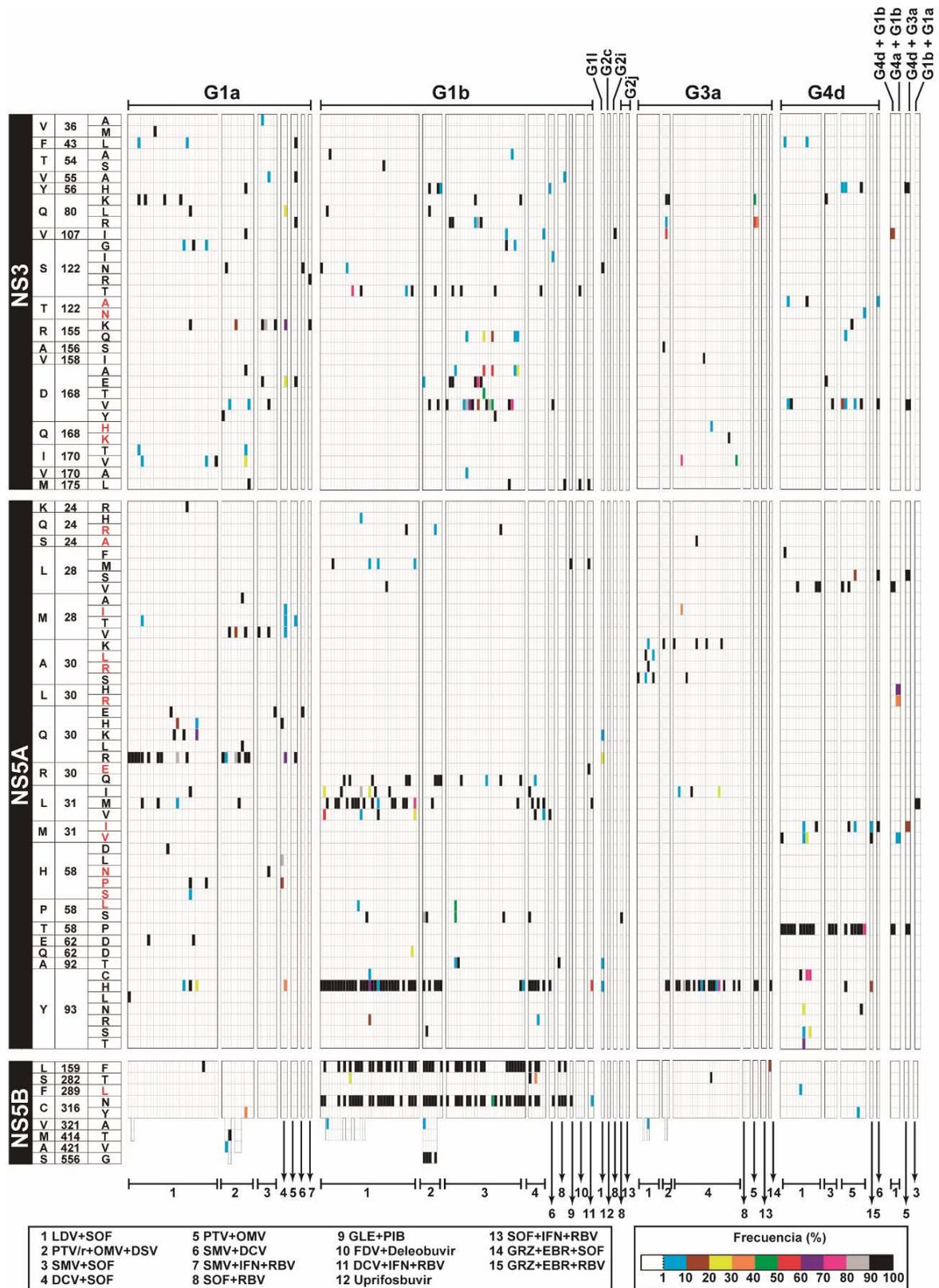


Figura 8. Heat map de RASs totales caracterizadas en las tres regiones genómicas en la cohorte de estudio. Cada columna vertical representa a un paciente de la cohorte, agrupada por subtipo y tratamiento. Cada fila representa una posición asociada con resistencia descrita en la literatura. La frecuencia de cada RAS dentro de la población viral está codificada por color según la leyenda. Las sustituciones en rojo indican cambios de aminoácido descritos como RASs para un aminoácido de referencia diferente al indicado en la izquierda.

4.3. Selección de RASs en los diferentes subtipos

Las RASs más prevalentes asociadas a cada subtipo independientemente del tratamiento utilizado fueron Q30R para pacientes infectados con VHC G1a; L31M, Y93H, L159F y C316N en pacientes infectados con VHC G1b; Y93H en aquellos infectados con VHC G3a y T58P en los infectados con VHC G4d (Figura 8). Para analizar en detalle el tipo de RAS que son exclusivas de un subtipo viral concreto y cuales por el contrario se comparten entre diferentes subtipos, se construyeron diagramas de Venn para cada una de las regiones estudiadas (Figura 9). En este análisis se incluyeron únicamente las RASs seleccionadas en más de un paciente y los subtipos que seleccionaron más de una RAS. Las infecciones mixtas se excluyeron del estudio. Se han realizado dos tipos de comparaciones: 1) considerando la posición y el aminoácido que confiere la resistencia a los DAAs (Figura 9A), y 2) considerando únicamente la posición donde encontramos el cambio de aminoácido (Figura 9B).

En la primera comparación las únicas RASs compartidas entre todos los subtipos fueron la 80K en la región NS3, la 93H en NS5A y la 159F en NS5B. Tanto 93H como 159F han sido previamente descritas para los subtipos que las seleccionaron en nuestra cohorte, mientras que 80K, solo ha sido descrita para G1a y G1b. Asimismo, todos los subtipos seleccionaron RASs únicas para cada una de las tres regiones genómicas, con la excepción de G1I en la región NS5A y G3a en la región NS5B. También se observó que los subtipos pertenecientes a un mismo genotipo comparten más RASs en las regiones NS3 y NS5A en comparación con los subtipos de genotipos distintos (Figura 9A). En total, se han caracterizado 32 RASs en NS3, 34 RASs en NS5A y 8 RASs en NS5B.

Para profundizar en las posiciones de RASs específicas de subtipo en el fallo terapéutico, se analizó la distribución de RASs considerando solo las posiciones de los aminoácidos en las respectivas regiones diana. Bajo este criterio, se caracterizaron un total de 14 posiciones de RASs para la región NS3, 8 para la NS5A y 7 para la NS5B. Se describieron posiciones de RASs específicas de subtipo tanto en la región NS3 como en la NS5B. Sin embargo, ningún subtipo seleccionó posiciones específicas de RASs en la región NS5A (Figura 9B). En cuanto a las posiciones compartidas entre subtipos, la posición 168 se estableció junto con la 80 como posiciones de RASs compartidas por todos los subtipos en la región NS3, igual que la posición 93 y 159 en la región NS5A y NS5B, respectivamente.

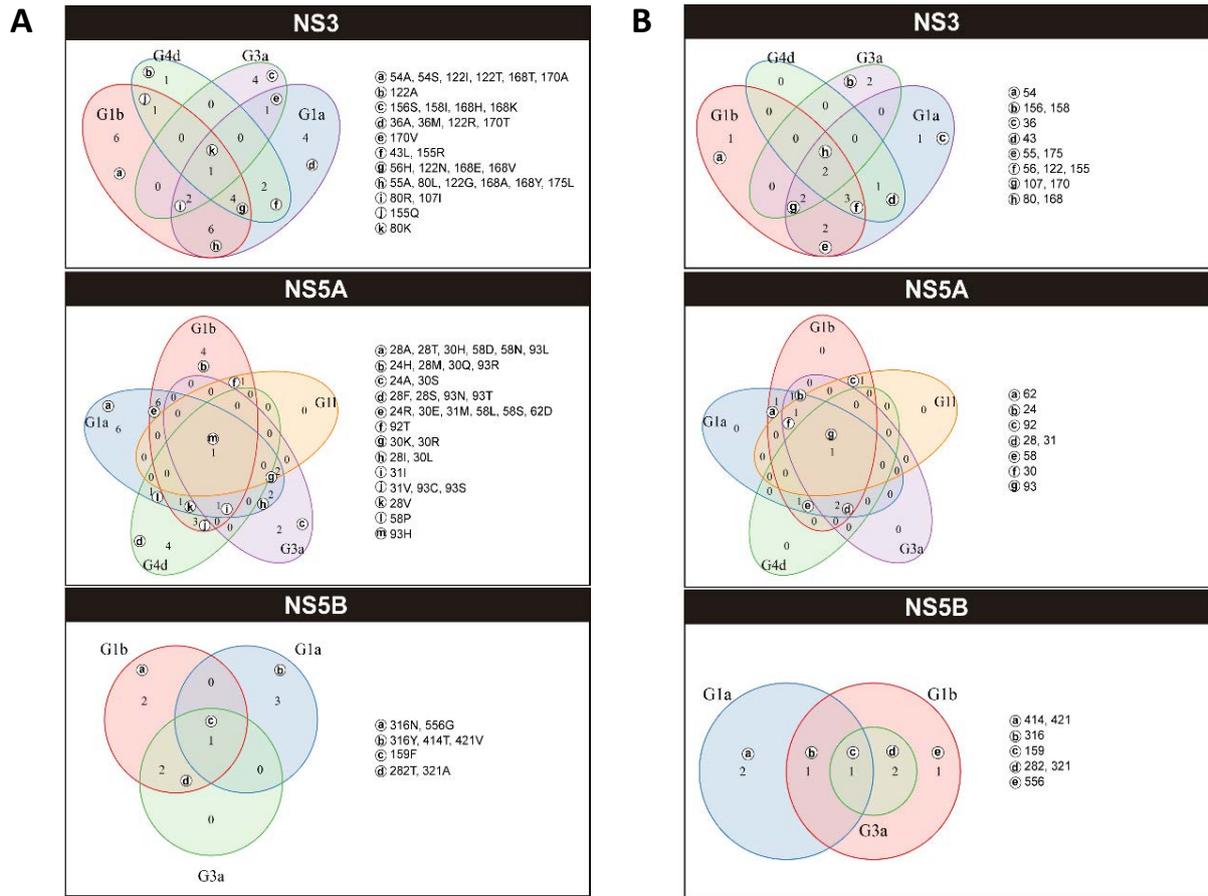


Figura 9. Distribución de RASs entre los diferentes subtipos en las regiones NS3, NS5A y NS5B. El número indicado en las áreas no solapadas de las elipses representa el número de RASs específicas seleccionadas en cada subtipo. El número indicado en las áreas solapadas representa el número de RASs compartidas entre diferentes subtipos. (A) Distribución de RASs considerando solo la sustitución mutante detectada en el momento del análisis. (B) Distribución de posiciones de RASs considerando solo la posición del aminoácido en la proteína diana.

4.4. Prevalencia de las RASs en los diferentes tratamientos

4.4.1. Ledipasvir (LDV) con sofosbuvir (SOF)

El 35,7% de los pacientes G1a (N=28) seleccionaron la Q30R como la RAS más prevalente en la región NS5A, seguido de Q30K (10,7%). En pacientes G1b (N=35), las RASs detectadas con mayor prevalencia fueron L31M (42,9%), Y93H (88,6%) en la región NS5A y L159F (51,4%), C316N (60%) en la región NS5B. Otras RASs observadas en la posición 31 como L31I (17,1%) y L31V (11,4%), se detectaron siempre combinadas con la Y93H en la región NS5A. La RAS S282T, que confiere un alto nivel de resistencia a sofosbuvir *in vitro*, se detectó en un paciente infectado con VHC de G1b asociada con las sustituciones L159F y C316N (Figura 10).

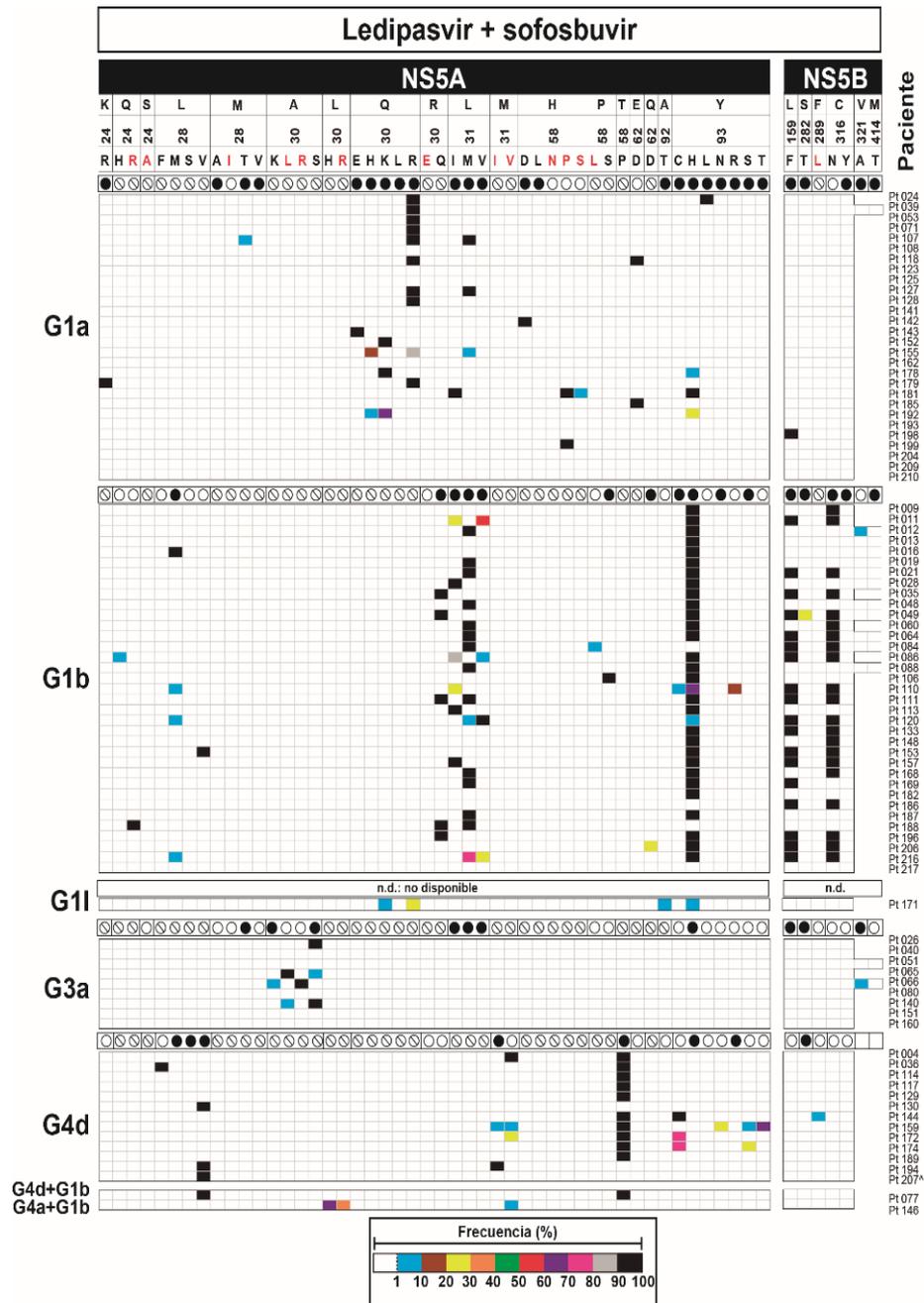


Figura 10. Heat map de RASs seleccionadas tras el fallo terapéutico a ledipasvir y sofosbuvir (N=88). Número de pacientes correspondientes a cada subtipo: G1a (N=28); G1b (N=35); G1l (N=1); G3a (N=9); G4d (N=13); infecciones mixtas (N=2). La frecuencia de cada RAS dentro de la población viral está codificada por color según la leyenda. Las sustituciones en rojo indican cambios de aminoácido descritas como RASs con aminoácido de referencia diferente al indicado en la fila superior. Para cada subtipo en concreto, el círculo negro indica las RASs descritas para el subtipo correspondiente; el círculo blanco indica las RASs no descritas para el subtipo considerado; el círculo con raya indica casos en los que el aminoácido de referencia descrito para el subtipo difiere al aminoácido indicado en el encabezado.

Para pacientes G3a (N=9), las RASs se observaron exclusivamente en la posición 30 siendo A30S la más prevalente al ser detectada en un 33,3% de los pacientes. En pacientes G4d (N=13), la RAS más prevalente fue la T58P (76,9%). El 23,1% de los pacientes G4d seleccionaron la Y93C, aunque esta RAS solo está descrita para G1 y se desconoce si confiere resistencia para G4d (Figura 10).

La mayoría de las RASs observadas tras el fallo a LDV+SOF se detectaron en la región NS5A. La selección de RASs en la región NS5B se observó casi de manera exclusiva en pacientes G1b. Tras el fracaso terapéutico al mismo tratamiento, cada subtipo seleccionó RASs en posiciones específicas. El tiempo medio de muestreo fue de 21 semanas (dato calculado a partir de 56/88 pacientes).

4.4.2. Daclatasvir (DCV) con sofosbuvir (SOF)

Las RASs más prevalentes caracterizadas en pacientes G1b (N=6) fueron Y93H (88,6%) y L31M (50%) en la región NS5A. En la región NS5B, la combinación L159F+C316N se detectó en un 50% de los pacientes. Todos los pacientes que seleccionaron la combinación L159F+C316N, también mostraron RASs en la posición 31 y 93 de la NS5A (Figura 11). Tras el fallo a DCV+SOF, dos pacientes seleccionaron la S282T, que se observó siempre en combinación con L159F+C316N en NS5B e Y93H en NS5A. Para G3a (N=27), el 63% de los pacientes seleccionaron la Y93H, seguido de A30K (14,8%) y L31I (11,1%). Curiosamente, la A30K nunca apareció simultáneamente con la Y93H en los pacientes infectados con VHC G3a. En la región NS5B, solo se detectó un paciente con la S282T en combinación con Y93H en la región NS5A (Figura 11). El tiempo medio de muestreo fue de 30 semanas (dato calculado a partir de 18/35 pacientes).

El perfil de RASs seleccionadas fue similar en pacientes infectados con VHC de G1b tanto en el fracaso terapéutico con la combinación LDV+SOF como DCV+SOF. Sin embargo, para G3a se observó una alta prevalencia de la mutación Y93H en tras el fallo terapéutico con DCV+SOF, pero no se reportó ningún caso en el fallo terapéutico con LDV+SOF. Esta observación sugiere que la emergencia de RAS no es solamente específica de subtipo sino también depende del tratamiento utilizado.

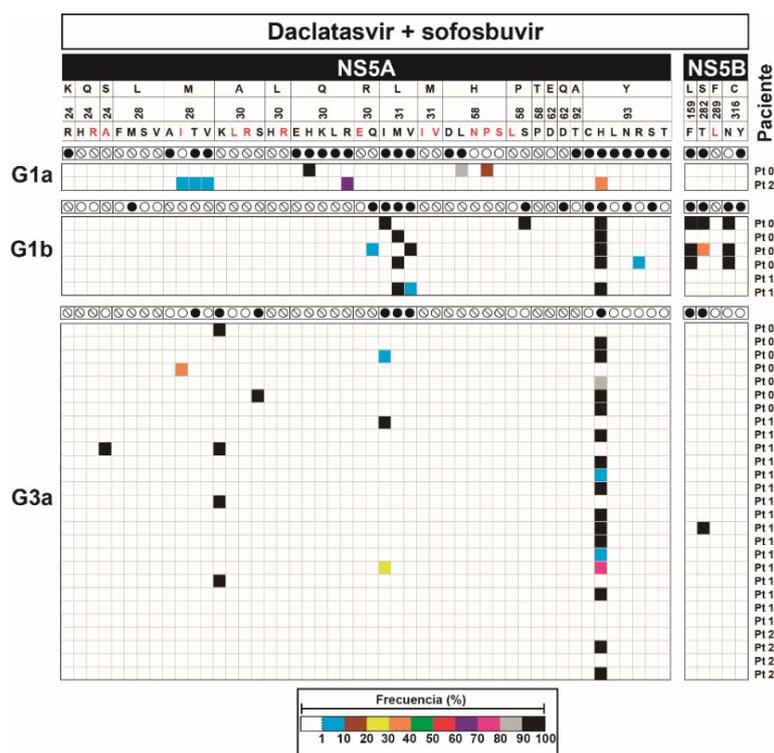


Figura 11 Heat map de RASs seleccionadas tras el fallo terapéutico a daclatasvir y sofosbuvir (N=35). Número de pacientes correspondientes a cada subtipo: G1a (N=2); G1b (N=6); G3a (N=27). La frecuencia de cada RAS dentro de la población viral está codificada por color según la leyenda. Las sustituciones en rojo indican cambios de aminoácido descritos como RASs con aminoácido de referencia diferente al indicado en la fila superior. Para cada subtipo en concreto, el círculo negro indica las RASs descritas para el subtipo correspondiente; el círculo blanco indica las RASs no descritas para el subtipo considerado; el círculo con raya indica casos en los que el aminoácido de referencia descrito para el subtipo difiere del aminoácido indicado en el encabezado.

4.4.3. Simeprevir (SMV) con sofosbuvir (SOF)

Las resistencias detectadas con mayor prevalencia en pacientes G1a (N=6) en la región NS3 fueron la R155K (50%) y la D168E/V (33,3%), que también se observó en un 50% de los pacientes G4d (N=4). En el caso de los pacientes G1b (N=28), el 71,4% de los pacientes seleccionaron RASs en la posición 168 de la NS3. La Q80K/R y la R155Q también fueron altamente prevalentes detectadas en el 21,4% y 17,9% de los pacientes, respectivamente. Todos los pacientes G1b que seleccionaron Q80R o R155Q, tenían también RASs en la posición 168 (Figura 12). Asimismo, en la posición 155, los pacientes G1a tendieron a seleccionar la R155K mientras que en los pacientes G1b solo se observó la R155Q, sugiriendo la emergencia diferencial de RASs entre los diferentes subtipos en una misma posición de aminoácido. En la región NS5B, el 57,1% y el 64,3% de los pacientes tenían la L159F y C316N, respectivamente, en el momento del análisis. La selección de RASs en la región NS5B después del fallo terapéutico a SMV+SOF se observó únicamente en pacientes G1b (Figura 12). El tiempo medio de muestreo fue de 31 semanas (dato calculado a partir de 23/39 pacientes).

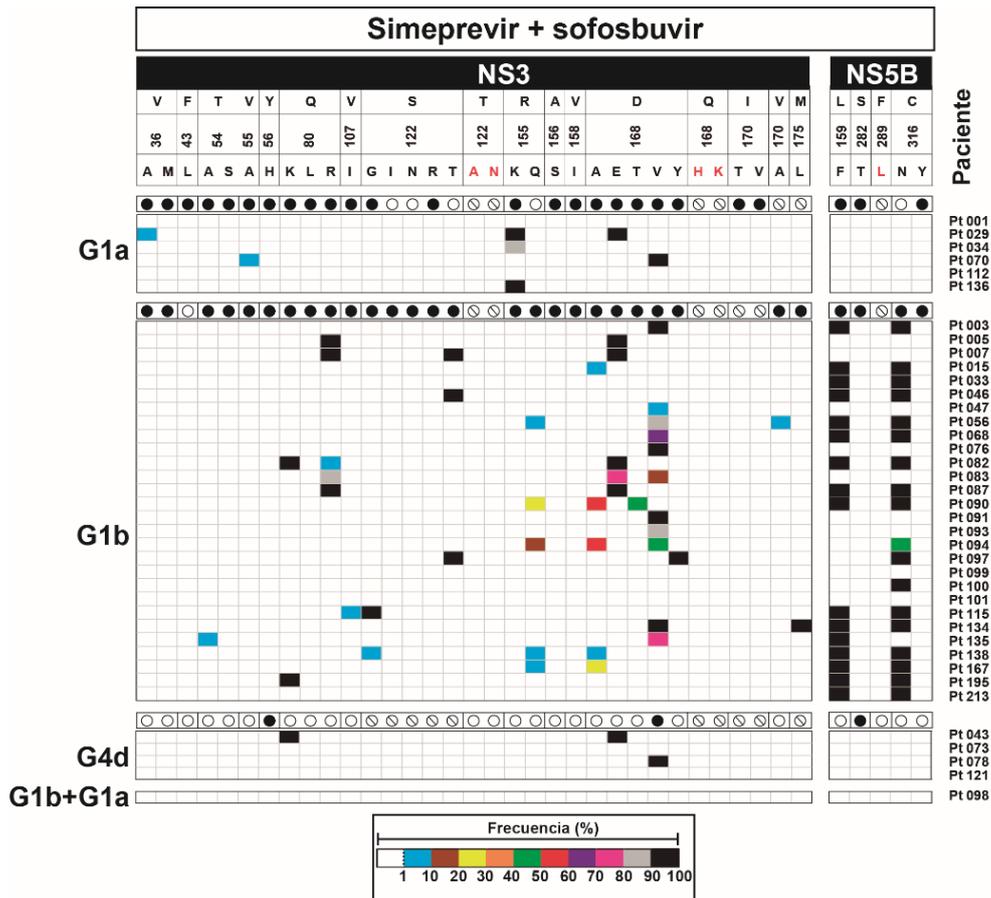


Figura 12. Heat map de RASs seleccionadas tras el fallo terapéutico a simeprevir y sofosbuvir (N=39). Número de pacientes correspondientes a cada subtipo: G1a (N=6); G1b (N=28); G4d (N=4); infecciones mixtas (N=1). La frecuencia de cada RAS dentro de la población viral está codificada por color según la leyenda. Las sustituciones en rojo indican cambios de aminoácido descritos como RASs con aminoácido de referencia diferente al indicado en la fila superior. Para cada subtipo en concreto, el círculo negro indica las RASs descritas para el subtipo correspondiente; el círculo blanco indica las RASs no descritas para el subtipo considerado; el círculo con raya indica casos en los que el aminoácido de referencia descrita para el subtipo difiere al aminoácido indicado en el encabezado.

4.5. Perfil cuantitativo de la distribución de RASs según el régimen terapéutico

Se cuantificó el número y las combinaciones de RASs seleccionadas en cada subtipo en los diferentes tratamientos, así como su distribución entre las diferentes regiones genómicas presionadas por el régimen terapéutico correspondiente (Figura 14).

Tras el fallo terapéutico a regímenes basados en SOF, los pacientes G1b mostraron perfiles de resistencia más complejos seguido de los perfiles de G1a, G4d y G3a. Independientemente del tratamiento, el G3a fue el subtipo con menos categorías de combinaciones observadas. Tras el fracaso terapéutico con LDV+SOF, el G1b mostró un total de 13 categorías de combinaciones diferentes comparado con los 6 en G1a, 5 en G4d y 4 en G3a. Asimismo, los pacientes G1b también mostraron más RASs en comparación con los otros subtipos en todos los regímenes terapéuticos.

Independientemente del régimen terapéutico, más del 50% de los pacientes G1b mostraron en el momento del análisis RASs en todas las regiones genómicas presionadas por el tratamiento antiviral administrado. Sin embargo, la mayoría de los pacientes G1a, G3a y G4d seleccionaron RASs en solo una de las dos regiones terapéuticas. En el caso de G1a, la selección de RASs en la región NS5B solo se detectó tras el fallo al régimen 3D.

Una de las observaciones más interesantes de este apartado, es la ausencia de RASs en las regiones diana en un porcentaje de pacientes, siendo los subtipos G1a y G3a quienes mostraron el mayor número de pacientes libres de RASs, seguido de G4d. En el caso de los pacientes G1b, el mayor número de pacientes sin RASs se detectó tras el fallo terapéutico a DCV+SOF, mientras que no se observó ningún caso en el fallo a PTV/r+OMV+DSV.

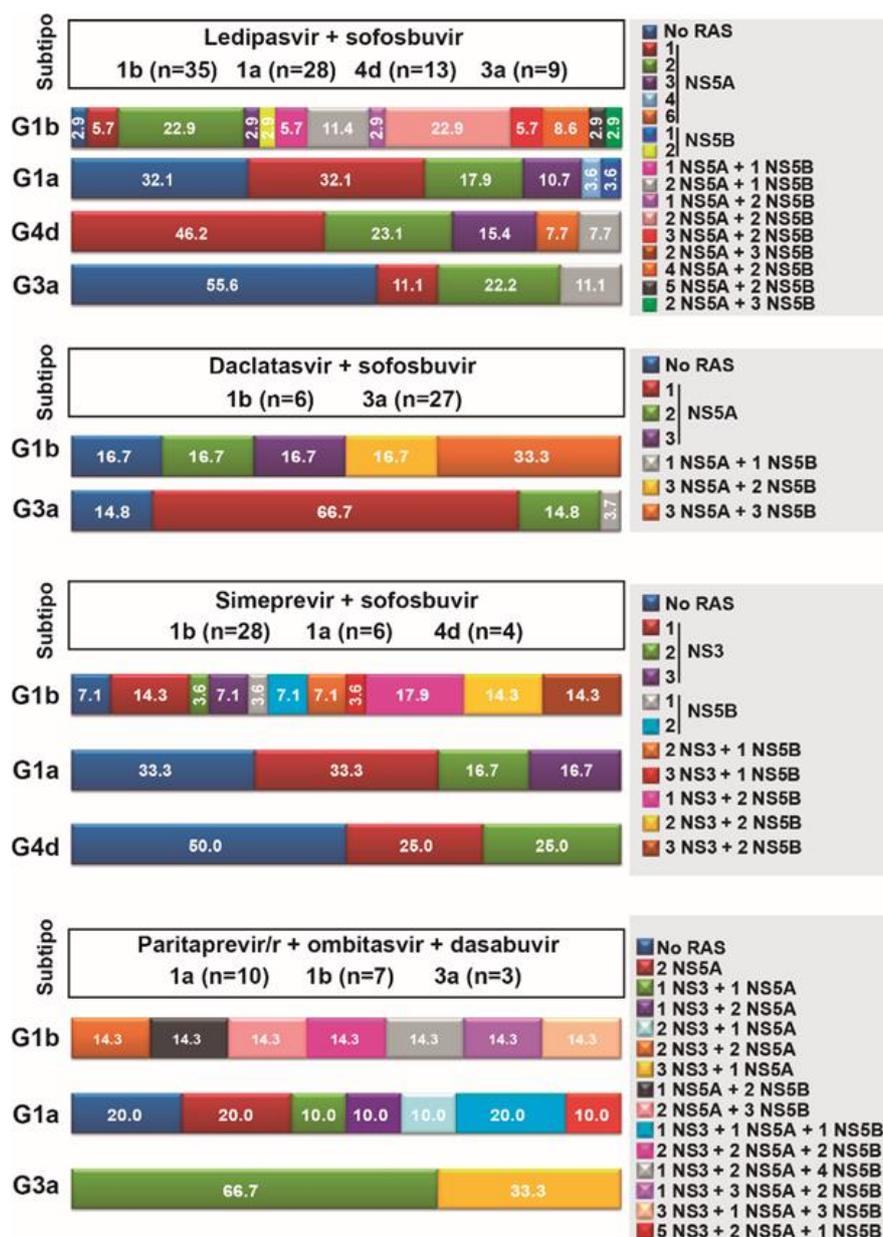


Figura 14. Porcentaje de pacientes con diferentes combinaciones numéricas y distribuciones de RASs entre las regiones dianas según el subtipo y el tratamiento administrado. El porcentaje indica el número de pacientes con la combinación de RASs correspondiente indicada en la leyenda.

4.6. Prevalencia de combinaciones de RASs en los diferentes tratamientos

Se analizaron las combinaciones de RASs más prevalentes entre los pacientes G1b tras el fallo terapéutico a los cuatro tratamientos principales: LDV+SOF, DCV+SOF, SMV+SOF y PTV/r+OMV+DSV. Varias de las combinaciones de RASs altamente prevalentes se encontraron en virus circulantes de pacientes que no han respondido a LDV+SOF y a DCV+SOF. En la región NS5A, la asociación entre las posiciones 31 y 93 fue la más prevalente siendo la combinación L31M+Y93H la más predominantemente detectada en un 37,1% y 50% de los pacientes con fallo terapéutico a LDV+SOF y

DCV+SOF, respectivamente (Figura 15). En NS5B, para ambos tratamientos, la combinación L159F+C316N se detectó en casi la mitad de los pacientes. En cuanto a las asociaciones de RASs entre los genes diana NS5A y NS5B, la combinación L31I/M/V+Y93H+L159F+C316N fue la más prevalente en el fallo tanto a LDV+SOF como a DCV+SOF. Además, tras el fracaso a LDV+SOF y DCV+SOF, un porcentaje similar de pacientes seleccionaron la R30Q+Y93H (Figura 15).

Las combinaciones Q80R+D168E y R155Q+D168A en la región NS3 y la L159F+C316N en la región NS5B fueron las RASs más prevalentes detectadas tras el fallo a SMV+SOF (Figura 16A). Similar a lo que hemos descrito previamente en el fallo terapéutico a LDV/DCV+SOF, más de la mitad de los pacientes seleccionaron la combinación L159F+C316N. Considerando ambas regiones terapéuticas, la combinación D168V+L159F+C316N se estableció como la más prevalente al detectarse en un 14,3% de los pacientes tras el fracaso terapéutico a SMV+SOF (Figura 16A).

En el caso de fracasos terapéuticos a la combinación PTV/r+OMV+DSV que incluye las tres regiones genómicas diana, las combinaciones más prevalentes fueron: Y56H+D168V en NS3, R30Q+Y93H en NS5A y L159F+C316N+S556G en NS5B (Figura 16B). A diferencia de LDV/DCV+SOF, no se observó ningún caso de asociación de RASs en las posiciones 31 y 93 en la NS5A. Asimismo, la combinación quintuple Y56H+D168V+Y93H+L159F+C316N, se seleccionó en un 28,6% como la combinación más prevalente con las tres dianas terapéuticas implicadas (Figura 16B).

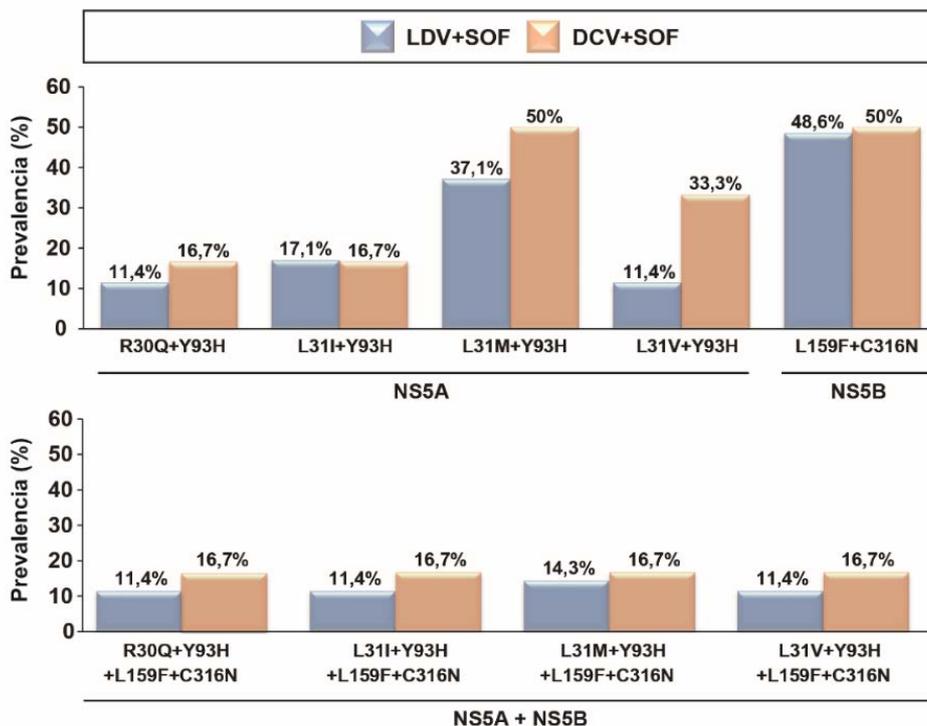


Figura 15. Porcentaje de pacientes G1b con combinaciones de RASs tras el fallo terapéutico a LDV+SOF (N=35) y DCV+SOF (N=6).

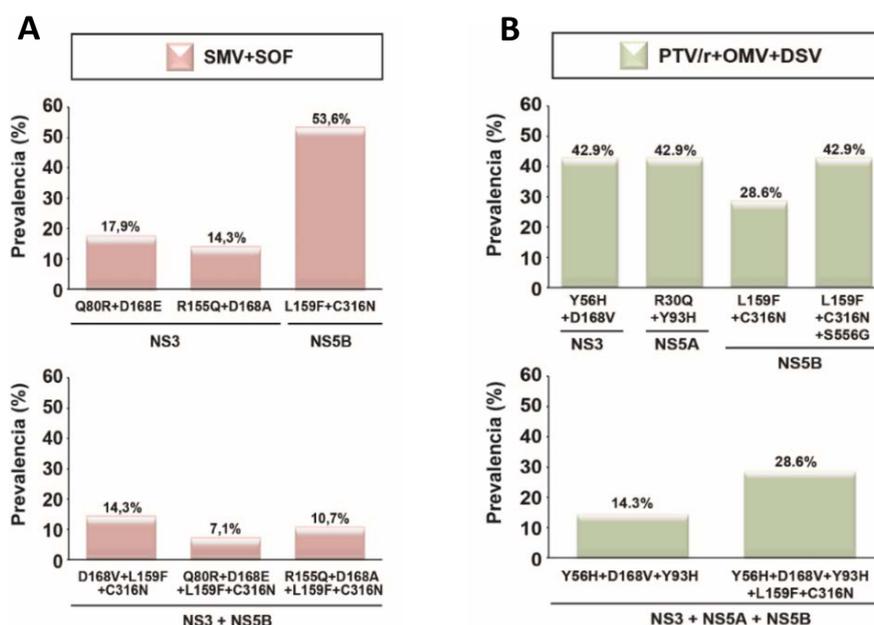


Figura 16. Porcentaje de pacientes G1b con combinaciones de RASs tras el fallo terapéutico a: A) SMV+SOF (N=28) y B) PTV/r+OMV+DSV (N=7).

4.7. Frecuencia de los haplotipos con combinaciones de RASs en la población viral

Para cuantificar el número de genomas que albergan las combinaciones de RASs descritas en las figuras 15 y 16, se examinó la frecuencia de los haplotipos correspondientes dentro la población viral de cada paciente.

El 75% de los pacientes infectados con VHC de G1b que experimentaron fracaso terapéutico a LDV/DCV+SOF seleccionaron la combinación L31M+Y93H a una frecuencia superior al 90%. La combinación L31I+Y93H, se detectó también a frecuencias dominantes en el 71% de los pacientes. En cambio, la L31V+Y93H mostró frecuencias intermedias entre 2,2%-58,8% en todos los pacientes con esta combinación. En cuanto a la combinación R30Q+Y93H, que apareció siempre a frecuencias superiores al 99% en todos los pacientes con fallo a LDV+SOF, se observó a una frecuencia inferior al 2% en un paciente tras el fallo a DCV+SOF (Tabla 20). Tras el fallo terapéutico a SMV+SOF, la combinación Q80R+D168E fue detectado a frecuencias superiores al 80% en todos los pacientes G1b excepto un caso. Sin embargo, la combinación R155Q+D168A se detectó siempre a una frecuencia por debajo del 20% (Tabla 21). Respecto a las combinaciones seleccionadas en los pacientes con fallo al régimen 3D, ambas combinaciones (Y56H+D168V y R30Q+Y93H) fueron detectadas a una frecuencia superior al 97%, excepto en un paciente (Tabla 22). Todas las combinaciones de RASs descritas en la región NS5B tenían una frecuencia superior al 90%, independientemente del régimen terapéutico al que fallaron (Tablas 21, 22 y 23).

En total, se describieron doce casos de combinaciones de RASs con frecuencia por debajo del 20%, siendo dos de ellos con frecuencias por debajo del 1% (Tablas 20 y 23).

Tabla 20. Frecuencia de RASs individuales y combinaciones de RASs en la región NS5A tras el fracaso terapéutico a LDV+SOF y DCV+SOF.

		NS5A								
	Paciente	R30Q (%)	L31I (%)	L31M (%)	L31V (%)	Y93H (%)	R30Q+Y93H (%)	L31I+Y93H (%)	L31M+Y93H (%)	L31V+Y93H (%)
	011	-	21,6	-	58,8	100	-	21,6	-	58,8
	012	-	-	100	-	100	-	-	100	-
	019	-	-	100	-	100	-	-	100	-
	021	-	-	100	-	100	-	-	100	-
	028	-	100	-	-	100	-	100	-	-
	035	100	-	-	-	99,7	99,7	-	-	-
	048	-	-	100	-	98,1	-	-	98,1	-
	049	100	-	-	-	100	100	-	-	-
	060	-	-	99,6	-	94,8	-	-	89,3	-
	064	-	-	100	-	100	-	-	100	-
LDV+SOF	086	-	89,7	-	2,2	100	-	89,7	-	2,2
	088	-	-	100	-	98,7	-	-	98,7	-
	110	-	22,7	-	-	68	-	13,1	-	-
	111	100	-	100	-	100	100	-	100	-
	113	-	100	-	-	100	-	100	-	-
	120	-	-	1,1	97,3	4,2	-	-	0,42	2,91
	157	-	100	-	-	100	-	100	-	-
	168	-	-	100	-	98	-	-	98	-
	169	-	-	100	-	100	-	-	100	-
	187	-	-	100	-	100	-	-	100	-
	196	100	-	-	-	100	100	-	-	-
	216	-	-	72,4	27,6	100	-	-	72,4	27,6
	Paciente	R30Q (%)	L31I (%)	L31M (%)	L31V (%)	Y93H (%)	R30Q+Y93H (%)	L31I+Y93H (%)	L31M+Y93H (%)	L31V+Y93H (%)
DCV+SOF	055	-	100	-	-	100	-	100	-	-
	063	-	-	100	-	100	-	-	100	-
	067	1,37	-	-	98,6	97,1	1,37	-	-	88,3
	069	-	-	99	-	94,5	-	-	89,9	-
	147	-	-	93,1	6,9	100	-	-	93,1	6,9

Para definir la frecuencia de las combinaciones de RASs dentro de la población viral, casos en los que una de las dos RASs tenía una frecuencia del 100%, la frecuencia del haplotipo se estableció a la misma frecuencia que la RAS de menor frecuencia. Para los casos en los que ninguna de las dos RASs estaban al 100%, para reportar la frecuencia de la combinación se sumó la frecuencia de todos los haplotipos portadores de la combinación.

Tabla 21. Frecuencia de RASs individuales y combinaciones de RASs en la región NS5B tras el fracaso terapéutico a LDV+SOF y DCV+SOF.

		NS5B		
	Paciente	L159F (%)	C316N (%)	L159F+C316N (%)
LDV+SOF	011	100	100	100
	021	100	100	100
	035	99,5	99,2	≈ 99
	049	99,5	99,4	≈ 99
	064	99,3	99,3	≈ 99
	084	100	99,5	99,5
	086	100	100	100
	110	99,5	98,2	≈ 98
	111	99,3	99	≈ 99
	120	100	100	100
	133	99,6	99,6	≈ 99
	153	99,4	99,5	≈ 99
	157	99,5	100	99,5
	186	99,4	99,6	≈ 99
	196	99,6	100	99,6
	206	99,5	100	99,5
	216	99,5	100	99,5
DCV+SOF	Paciente	L159F (%)	C316N (%)	L159F+C316N (%)
	055	100	100	100
	067	100	100	100
	069	99,5	100	99,5

En la región NS5B, para definir la frecuencia de las combinaciones de RASs dentro de la población viral, casos en los que una de las dos RASs tenía una frecuencia del 100%, la frecuencia del haplotipo se estableció a la misma frecuencia que la RAS de menor frecuencia. Para pacientes en los que ninguna RAS individual estaba a una frecuencia del 100%, se estableció un valor estimado de la frecuencia debido a que las RASs se secuenciaron en amplicones distintos.

Tabla 22. Frecuencia RASs individuales y combinaciones de RASs en la región NS3 y NS5B tras el fracaso terapéutico a SMV+SOF.

		SMV+SOF			
	Paciente	Q80R (%)	D168E (%)	Q80R+D168E (%)	
NS3	005	99,4	100	99,4	
	007	100	100	100	
	082	6,6	100	6,6	
	083	82,1	80	82,1	
	087	100	100	100	
		Paciente	R155Q (%)	D168A (%)	R155Q+D168A (%)
	090	29,3	51,5	19,8	
	094	14,9	57,7	10,4	
	138	1,5	1,5	1,5	
	167	3,8	21,3	2,5	
NS5B		Paciente	L159F (%)	C316N (%)	L159F+C316N (%)
	003	100	99,4	99,4	
	015	100	99,1	99,1	
	033	100	100	100	
	046	99,3	100	99,3	
	056	100	99,6	99,6	
	068	99,4	99,5	≈ 99	
	082	100	100	100	
	087	99,6	100	99,6	
	090	98,7	99,6	≈ 98	
	115	99,5	100	99,5	
	134	99,2	98,9	≈ 98	
	138	94,6	99,4	≈ 94	
	167	99,5	100	99,5	
	195	99,5	100	99,5	
	213	99,4	100	99,4	

Para definir la frecuencia de los haplotipos portadores de combinaciones de RASs dentro de la población viral, casos en los que una de las dos RASs tenía una frecuencia del 100%, la frecuencia del haplotipo se estableció a la misma frecuencia que la RAS de menor frecuencia. Para las combinaciones en la región NS3, casos en los que ninguna de las dos RASs estaban al 100%, para reportar la frecuencia de la combinación se sumó la frecuencia de todos los haplotipos portadores de la combinación. Para las combinaciones en la región NS5B, para pacientes en los que ninguna RAS individual estaba a una frecuencia del 100%, se estableció un valor estimado de la frecuencia debido a que las RASs se secuenciaron en amplicones distintos.

Tabla 23. Frecuencia RASs individuales y combinaciones de RASs en las tres regiones dianas tras el fracaso terapéutico a PTV/r+OMV+DSV.

		PTV/r+OMV+DSV				
NS3	Paciente	Y56H (%)	D168V (%)	Y56H+D168V (%)		
	044	97,7	100	97,7		
	122	100	100	100		
	161	3,9	3,7	0,66		
NS5A	Paciente	R30Q (%)	Y93H (%)	R30Q+Y93H (%)		
	105	100	100	100		
	122	100	100	100		
	161	100	100	100		
NS5B	Paciente	L159F (%)	C316N (%)	S556G (%)	L159F+C316N (%)*	L159F+C316N+S556G (%)*
	017	100	99,5	100	-	99,5
	018	99,6	99,1	100	-	≈ 99
	044	99,3	100	99,1	-	≈ 99
	089	99,4	99,6	-	≈ 99	-
	161	100	100	-	100	-

Para las combinaciones en la región NS3 y NS5A, casos en los que una de las dos RASs tenía una frecuencia del 100%, la frecuencia del haplotipo se estableció a la misma frecuencia que la RAS de menor frecuencia. Casos en los que ninguna de las dos RASs estaban al 100%, para reportar la frecuencia de la combinación se sumó la frecuencia de todos los haplotipos portadores de la combinación. Para las combinaciones en la región NS5B, casos en los que una o dos RASs estaban al 100%, la frecuencia del haplotipo se estableció a la misma frecuencia que la RAS de menor frecuencia. Para pacientes en los que ninguna RAS individual estaba a una frecuencia del 100%, se estableció un valor estimado de la frecuencia debido a que las RASs se secuenciaron en amplicones distintos.

4.8. Prevalencia de RASs en regiones genómicas no inhibidas

Se analizó la prevalencia de las RASs detectadas en el fallo terapéutico en las regiones que mapean fuera de las regiones diana presionadas por la combinación terapéutica administrada (región *extra-target*). Tras el fallo terapéutico a LDV+SOF, DCV+SOF y SMV+SOF, el 83% (73/88), 85,7% (30/35) y 82,1% (32/39) de los pacientes tratados seleccionaron al menos una RAS en una de las regiones genómicas presionadas, respectivamente. Entre ellos, el 30% (22/73), 16,7% (5/30) y 37,5% (12/32) de los pacientes mostraron también RASs en las regiones *extra-target* correspondientes (Figura 17). Globalmente, el 25% (22/88), 14,3% (5/35) y 30,8% (12/39) de los pacientes mostraron tanto RASs en la región diana como en la región *extra-target* tras el fracaso terapéutico a LDV+SOF, DCV+SOF y SMV+SOF, respectivamente.

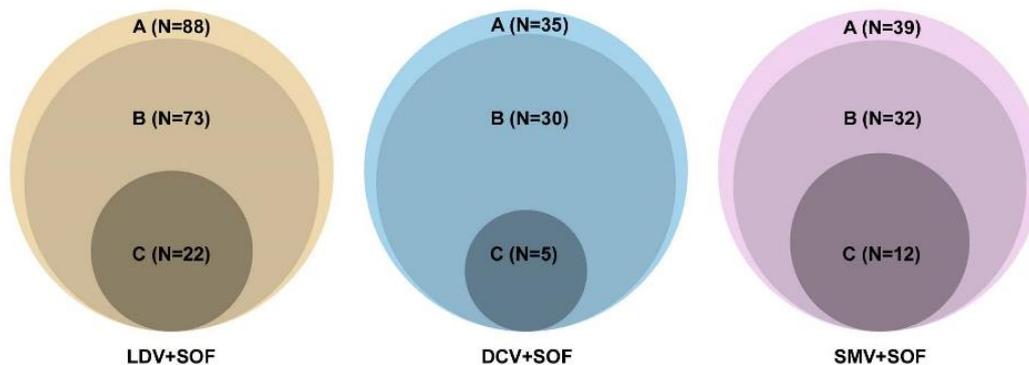


Figura 17. Prevalencia de pacientes con RASs en las regiones diana y en las regiones *extra-target* tras el fracaso terapéutico al régimen indicado en la parte inferior de cada diagrama. A) Número total de pacientes tratados con el régimen terapéutico correspondiente. B) Número de pacientes con al menos una RAS en una de las dos regiones dianas. C) Número de pacientes con al menos una RAS tanto en regiones diana como en regiones *extra-target*.

4.9. Polimorfismos asociados a resistencia (RAPs) en el fallo terapéutico

Durante el análisis de RASs, se observaron cambios de aminoácidos en posiciones de RAS no descritas en la literatura como mutaciones asociadas a resistencia y que en el presente trabajo se les denomina polimorfismos asociados a resistencia (RAPs). Los más destacados fueron las sustituciones Y56F, V170I y V132I en NS3 para G1b, la A30V en NS5A para G3a y la S282G en NS5B para G1a y G1b. Asimismo, varias sustituciones en la posición 62 de la región NS5A se observaron muy frecuentemente entre los pacientes G1b y G3a. En NS5B, se caracterizó la L314P como RAP compartida entre los pacientes G1a, G1b y G3a. La gran mayoría de los RAPs caracterizados en la región NS3 y NS5A se detectaron a altas frecuencias, mientras que los RAPs en la región NS5B se detectaron casi de manera exclusiva a frecuencias entre el 1%-10% (Figura 18).

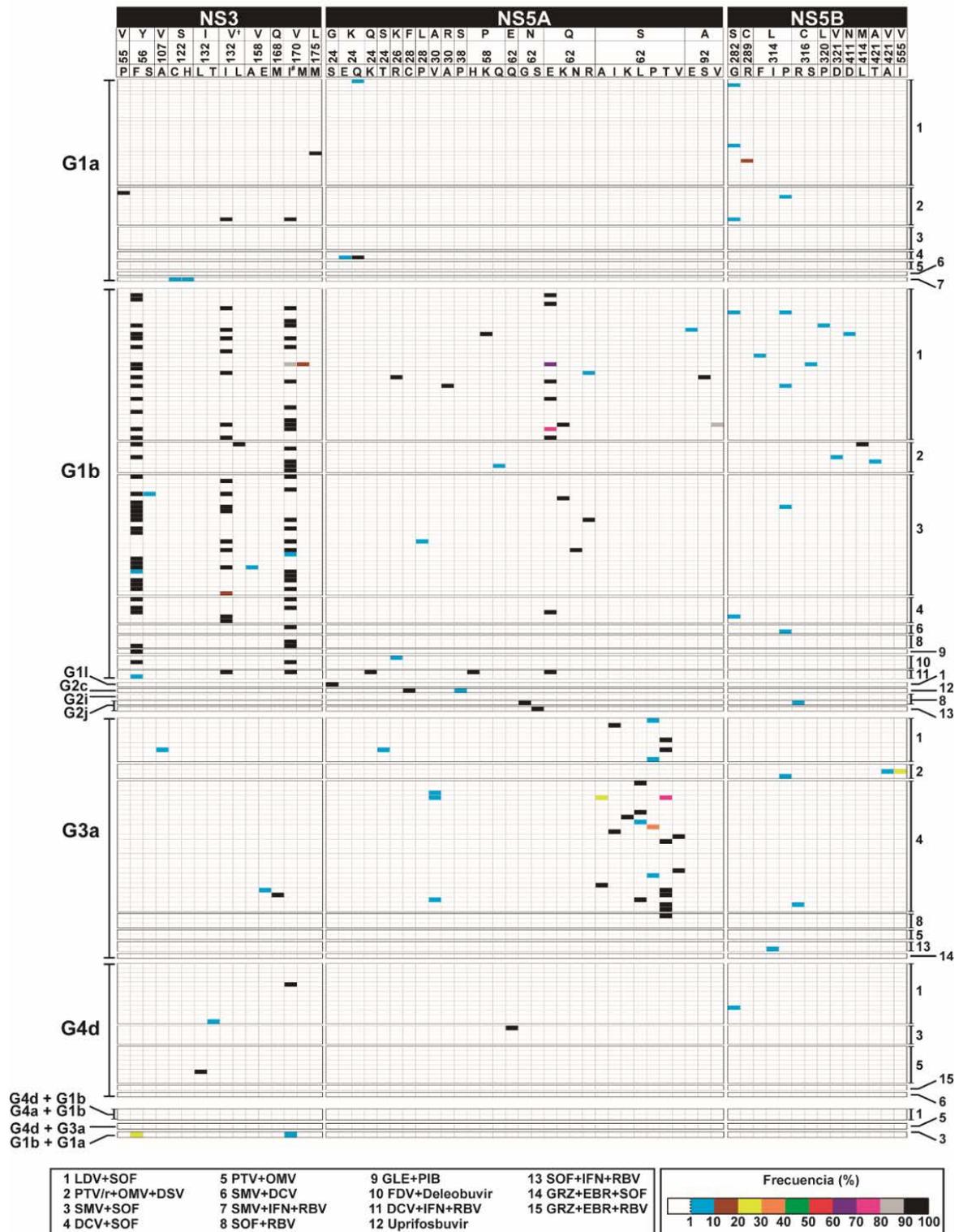


Figura 18. Polimorfismos asociados a resistencia (RAPs) caracterizados en la cohorte de estudio. Cada línea horizontal representa a un paciente de la cohorte, agrupada por subtipo y tratamiento. La frecuencia de cada RAP dentro de la población viral está codificada por color según la leyenda. † Para la posición 132, la isoleucina (I) está establecida como aminoácido de referencia para G1a. # Para la posición 170, la isoleucina (I) también se considera como aminoácido de referencia para G1a y G1b. * Para la posición 62, tanto el ácido glutámico (E) como la glutamina (Q) se consideran como aminoácidos de referencia para G1b.

5. DISCUSIÓN

La infección crónica por el VHC es la principal causa de hepatopatías crónicas, carcinoma hepatocelular primario y trasplante hepático a nivel mundial y supone una carga importante para la salud pública¹⁴. Según datos de la OMS, cerca de 400.000 personas mueren cada año por causas atribuidas al VHC. El desarrollo de los DAAs ha supuesto un cambio radical en el manejo de las infecciones por el VHC por su eficacia, seguridad y buena tolerancia en comparación con las terapias convencionales basadas en IFN. Hoy en día, se han conseguido tasas de RVS superiores al 95% en la práctica clínica real gracias a la disponibilidad de un amplio arsenal de regímenes terapéuticos libres de IFN basados en combinaciones de DAAs¹⁹⁷. Sin embargo, a pesar del éxito alcanzado con las pautas actuales, sigue habiendo una proporción de pacientes que no logran la curación virológica. El fracaso terapéutico suele ir acompañado de la emergencia de RASs con susceptibilidad reducida a los DAAs que impactan negativamente en la respuesta al tratamiento. Mientras la selección de variantes resistentes tiene un papel fundamental en el fallo terapéutico, la importancia clínica de las RASs sigue siendo una cuestión de debate, aunque el análisis de RASs en pacientes que han fallado a DAAs está actualmente recomendado antes del tratamiento de rescate, especialmente cuando la terapia incluyó un inhibidor de NS5A²³⁰.

Recientemente, se han publicado estudios similares de resistencia con cohortes amplias destacando un trabajo de un grupo italiano con 200 pacientes²³¹ y un trabajo de colaboración a nivel europeo en el que se recopilaron 626 pacientes²³². En ambos estudios la detección de RASs se llevó a cabo mediante secuenciación Sanger. Esta técnica resulta ineficaz para la detección de mutaciones minoritarias, puesto que solo puede detectar variantes cuando están a frecuencias iguales o superiores al 15%-20% unido a la limitación de no poder identificar si dos RASs están vinculadas en el mismo genoma viral.

En esta Tesis Doctoral se analizó el patrón de RASs tanto individualmente como en combinación tras el fracaso terapéutico a varias combinaciones de DAAs de una cohorte de 220 pacientes infectados con el VHC. Hasta nuestro conocimiento, este es el primer trabajo en el campo de la caracterización de RASs con una cohorte de ámbito nacional utilizando la secuenciación masiva como técnica de análisis.

La distribución de los subtipos de la cohorte estudiada fue similar a la prevalencia de subtipos en la población general crónicamente infectada por el VHC con la excepción del G3, donde el porcentaje de pacientes fue considerablemente más alto en el fallo terapéutico respecto a la población general (21% vs 9%)²³³. Esta observación sugiere que los pacientes infectados con VHC de G3 podrían responder peor al tratamiento en comparación con otros subtipos, coincidiendo con la baja tasa de RVS reportada en pacientes con VHC de G3^{234,235}.

Una de las observaciones a destacar es la falta de concordancia entre el genotipo asignado originalmente y el obtenido mediante secuenciación masiva de alta resolución previo al análisis de

RASs. De los 100 pacientes (45,5% de la cohorte completa) que fueron genotipados en los hospitales de procedencia, el 7% (7/100) fueron mal clasificados, al estar 6 de ellos infectados con VHC de G3a [y no como G4 (3 casos) y G1 (3 casos) previamente reportados], y un séptimo paciente con VHC G1a originalmente asignado como G4. Una posibilidad a tener en cuenta es que la elección de un régimen terapéutico subóptimo según las guías clínicas internacionales⁸⁷ debido al mal subtipado inicial sea la causa de un mayor fracaso terapéutico en pacientes G3 en nuestra cohorte. Esta observación constata la importancia de subtipar correctamente el VHC de cada paciente antes de prescribir el tratamiento antiviral.

Analizando las RASs seleccionadas en la cohorte completa se obtuvieron patrones de resistencias específicos de subtipo viral. Para cada subtipo, se caracterizaron varias RASs que son específicas del subtipo viral independientemente del tratamiento utilizado. Esta selección específica de RASs podría estar relacionada con la barrera genética a la resistencia (número y tipo de cambios nucleotídicos necesarios para la aparición de una sustitución a nivel de aminoácido) específica para cada subtipo, que contribuye de manera diferente al desarrollo de RASs ante un mismo régimen terapéutico^{236,237}. No obstante, también se observaron diferentes perfiles de RASs para un mismo subtipo cuando el fallo terapéutico tuvo lugar con diferentes inhibidores de la misma familia, sugiriendo que la emergencia de RASs también se asocia al inhibidor usado en cada caso. Esta emergencia de RASs en posiciones específicas se correlaciona con el mecanismo de acción o dominios de unión de cada inhibidor^{161,179}. A pesar de la resistencia cruzada que confieren las RASs a diferentes inhibidores de la misma familia en los estudios *in vitro*^{200,213}, conocer el perfil de RASs asociado a cada inhibidor podría facilitar el diseño de estrategias de retratamiento más idóneas para cada paciente con el fin de maximizar la tasas de RVS.

El número de RASs observadas en el fallo terapéutico a una misma combinación de DAAs es superior para VHC de G1b en comparación con otros subtipos, independientemente del régimen terapéutico administrado. Asimismo, el G1b también es el subtipo con menos pacientes que no mostraron ninguna RAS en el momento del análisis. Esta observación sugiere que los pacientes con VHC G1b requieren seleccionar un mayor número de RASs para poder inducir fallo terapéutico en comparación con otros subtipos. Además del elevado número de RASs observadas en el fallo, los pacientes con VHC de G1b también son los que mostraron más RASs en la región NS5B. La alta prevalencia de la combinación L159F+C316N en los pacientes con VHC de G1b coincide con los resultados reportados en otros estudios similares^{232,238}. En los sistemas de replicones, la mutación L159F se ha asociado a una reducción de la capacidad replicativa que se recupera en combinación con la C316N, sugiriendo que C316N podría actuar como una mutación compensatoria. Esta observación justifica la selección conjunta de la combinación L159F+C316N especialmente en pacientes infectados con VHC de G1b, donde la selección de múltiples RASs tras el fallo terapéutico puede conferir una pérdida de fitness del

virus que sería restablecida en parte gracias a mutaciones compensatorias. En nuestra cohorte, la sustitución por excelencia a SOF S282T, se detectó en un 2,3% (n=4) de los pacientes tratados con régimen terapéutico basado en SOF, de los cuales tres pacientes tienen VHC de G1b y uno con VHC de G3a. La selección de la mutación S282T *in vivo* no es muy frecuente ya que supone una reducción dramática del *fitness* vírico como se ha determinado en estudios *in vitro* y también porque requiere una transversión (AGC a ACC) para dar lugar al aminoácido treonina a partir de la serina^{158,175,239,240}. De los cuatro casos reportados, tres pacientes fueron tratados con DCV+SOF y uno con LDV+SOF. En nuestra cohorte de pacientes con VHC de G1b, la sustitución S282T fue detectada siempre acompañada de las RASs L159F y C316N, reafirmando que estas dos RASs podrían actuar como mutaciones compensatorias para restaurar la pérdida de *fitness* inducida por S282T²⁴¹. También se describió un caso de S282T en un paciente con VHC de G3a que aparece sin ninguna otra RASs descrita en la región NS5B, en concordancia con un trabajo reciente²⁴². Esto sugiere que G3a tolera la presencia de S282T sin suponer una caída de *fitness*, puesto que se observa como variante dominante en la población viral. Estos resultados explicarían que el porcentaje de pacientes G3a fuese considerablemente más alto en el fallo terapéutico respecto a la población general (21% vs 9%). Es importante destacar que todos los pacientes que seleccionaron la S282T, tenían además la Y93H a una frecuencia superior al 90% en la región NS5A, lo cual puede dificultar la terapia de rescate al tener RASs altamente resistentes en las regiones NS5A y NS5B.

En cuanto al perfil numérico de las RASs en los subtipos no 1b, el elevado número de pacientes con VHC de G1a que fallan al tratamiento antiviral sin seleccionar RASs comparado con los pacientes con VHC de G1b sugiere que el G1a presenta un mayor grado de resistencia a nivel basal. En el caso de los pacientes con VHC de G3a tratados con LDV+SOF, la ausencia de RASs en el fallo terapéutico se correlaciona con la reducida actividad inhibitoria que muestra LDV frente a G3a²⁴³. El fallo virológico sin selección de RASs puede ser debido a varios factores como la poca adherencia al tratamiento, una respuesta inmunitaria deficiente por parte del huésped o que haya transcurrido demasiado tiempo desde el fin del tratamiento hasta el análisis de la muestra, teniendo en cuenta que las RASs seleccionadas en la región NS3 tienden a desaparecer en pocos meses²⁴⁴. Sin embargo, estudios previos han demostrado el papel del *fitness* viral en el fallo terapéutico sin selección de RASs, lo que sugiere que el fallo terapéutico en estos subtipos puede estar asociado a un elevado *fitness* a nivel basal^{245,246}.

Además de las RASs individuales caracterizadas en los diferentes regímenes terapéuticos, se han descrito varias combinaciones de RASs altamente prevalentes para pacientes infectados con VHC de G1b. Para algunas de ellas se ha caracterizado *in vitro* el nivel de resistencia que confieren comparado con cada una de ellas individualmente. Por ejemplo, tras el fallo terapéutico a LDV+SOF y DCV+SOF, se observó una alta prevalencia de las combinaciones L31M+Y93H y L31V+Y93H que se ha descrito que

confieren 4227 y 5425 veces más resistencia a DCV en comparación con el amplicón *wildtype*, respectivamente. Aunque el nivel de resistencia que confieren estas combinaciones de RASs para LDV se desconoce, la alta prevalencia de estas combinaciones en pacientes infectados con VHC de G1b tras el fallo a LDV+SOF sugiere que podrían conferir más nivel de resistencia que las RAS individuales. En la región NS3, las combinaciones Q80R+D168E e Y56H+D168V confieren 418 y 2472 veces más resistencia a SMV y PTV respecto a las RASs individuales, respectivamente. La gran mayoría de las combinaciones reportadas se han encontrado a frecuencias dominantes en la población viral excepto la combinación R155Q+D168A, que se detectó a una frecuencia inferior al 20%. Esta observación sugiere que la combinación de estas dos RASs en una misma secuencia podría disminuir el *fitness* vírico. Una de las observaciones a destacar en cuanto a las combinaciones de RASs, es la combinación A30K+Y93H para G3a que confiere 10.000 veces más resistencia comparado con las secuencias *wildtype*. Sin embargo, estudios previos han mostrado que en VHC de G3a que albergaban esta combinación, una de las dos RASs se encontraba a una frecuencia inferior al 15%, sugiriendo que esta combinación puede que no sea viable *in vivo*²⁴⁷. Curiosamente, en nuestro estudio la A30K y la Y93H parecen ser RASs mutuamente excluyentes que no se detectaron juntas nunca. Esta observación puede ser debido a que, en el momento del análisis de resistencias, las secuencias que contienen las dos RASs ya habían desaparecido de la población viral. Estas observaciones sugieren que sería recomendable monitorizar las frecuencias de las RASs hasta que estén indetectables en la población viral antes de empezar el tratamiento por el alto nivel de resistencias que pueden conferir. De aquí la importancia de la secuenciación masiva por su sensibilidad capaz de reportar variantes con frecuencias hasta del 1% y porque permite estudiar si dos RASs están asociadas en un mismo genoma²¹⁵.

Tras el fallo terapéutico, una de las aproximaciones terapéuticas en el momento de plantear las estrategias de retratamiento consiste en cambiar de región diana en caso de selección de mutaciones de resistencia. Sin embargo, en las regiones no presionadas, también puede haber RASs a nivel basal como variantes naturales que aparecen como consecuencia de la alta variabilidad del VHC o RASs seleccionadas en un tratamiento previo. En nuestro análisis se observó que un porcentaje considerable de pacientes albergaban mutaciones tanto en la región presionada por el antiviral administrado como en la región *extra-target*. La alta prevalencia de las RASs *extra-target* detectadas en nuestro estudio recomienda secuenciar las tres regiones genómicas para el estudio de las resistencias, independientemente de la combinación de DAAs usada.

En nuestra cohorte, cerca del 89% de los pacientes presentaban al menos una RAS en el momento del análisis, sugiriendo la alta prevalencia de las mismas en el fallo terapéutico. Un 19% de las RASs totales caracterizadas tenían una frecuencia por debajo del 20%. Las guías clínicas solo consideran relevantes las RASs con frecuencia por encima del 15% a pesar de que no hay evidencias clínicas que descartan la importancia de las RASs minoritarias^{87,213}. Sin embargo, se ha descrito casos de fallo terapéutico

asociado a la selección de variantes de baja frecuencia, que contribuyen a la población dominante^{248,249}.

A diferencia de los resultados reportados en Dietz *et al.*, 2018 mediante secuenciación Sanger²³², en nuestro estudio se detectaron un mayor número de RASs en el fallo terapéutico tanto para G1b como G1a en la región NS5A. Esta diferencia podría ser debido al umbral de detección establecida en cada estudio.

Además de las RASs documentadas en la literatura, se han caracterizado múltiples sustituciones no reportadas previamente como variantes resistentes pero que sí afectan a posiciones de RAS. Aunque no se ha podido determinar los niveles de resistencia para todos, algunas de las sustituciones reportadas se han incluido en la nueva guía clínica de la EASL⁸⁷ como RAS, sugiriendo que cualquier sustitución detectada en una posición de resistencia debería de ser valorada.

Los resultados globales de esta Tesis Doctoral corroboran la importancia del subtipado del VHC circulante en el paciente antes de iniciar cualquier tratamiento, así como el análisis del perfil de resistencias especialmente en aquellos pacientes que han fallado a terapias con DAAs y que deben ser retratados. Aunque no disponemos de la información clínica del número de pacientes que han conseguido una RVS después del tratamiento de rescate atendiendo a los perfiles de RASs analizados en esta Tesis Doctoral, el análisis de resistencias sin duda ha aportado información clínica relevante para plantear estas estrategias de retratamiento. La alta prevalencia de RASs en pacientes *naïve* a tratamientos con DAAs sugiere que este análisis también sería deseable incluso antes de iniciar el primer tratamiento con DAAs^{250,251}. Aunque las guías clínicas no lo exigen actualmente dada la eficacia de los tratamientos, la relevancia epidemiológica de las RASs a nivel mundial determinará si estos análisis serán o no necesarios en el futuro.

6. CONCLUSIONES

1. El patrón de emergencia de RASs en pacientes infectados con el VHC tras el fallo terapéutico a combinaciones de DAAs es específico para cada subtipo viral, incluso ante un mismo régimen terapéutico. Este comportamiento diferencial entre los diferentes subtipos refuerza la importancia del uso de cebadores específicos de subtipo para el estudio de las RASs.
2. La alta prevalencia de las combinaciones de RASs y el grado de resistencia que confieren, medido frente al virus *wildtype*, realzan la necesidad de su caracterización antes de implementar un nuevo tratamiento, para minimizar la selección de variantes multiresistentes.
3. El elevado número de pacientes con RASs que mapean fuera de la región diana, sugiere que es necesario analizar las tres regiones relevantes (NS3, NS5A y NS5B) independientemente del tratamiento administrado.
4. Los virus de subtipo 1b suelen ser más susceptibles a un tratamiento antiviral que los virus de subtipo 1a ya que necesitan adquirir un mayor número de mutaciones para alcanzar el fenotipo de resistencia.
5. Teniendo en cuenta el elevado porcentaje de RASs con frecuencias por debajo del 20% en las poblaciones víricas, es recomendable el uso de la secuenciación masiva para su detección y su monitorización, para constatar su desaparición antes de iniciar un nuevo tratamiento.

7. LÍNEAS DE FUTURO

A partir de los resultados obtenidos de este trabajo, sería de gran interés disponer de los resultados de los pacientes retratados considerando el estudio de resistencias para conocer la trascendencia de las RASs en el tratamiento con nuevas combinaciones de DAAs y el impacto de las RASs con frecuencia por debajo del 15% en la curación de la infección. También sería interesante comparar los resultados de RASs tras el fallo terapéutico con su muestra basal para caracterizar la importancia de las RASs basales en el tratamiento.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Choo, Q. L. *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359–62 (1989).
2. Alter, H. J. *et al.* Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet (London, England)* **2**, 838–41 (1975).
3. Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., Alter, H. J. & Holland, P. V. Transfusion-Associated Hepatitis Not Due to Viral Hepatitis Type A or B. *N. Engl. J. Med.* **292**, 767–770 (1975).
4. Dustin, L. B., Bartolini, B., Capobianchi, M. R. & Pistello, M. Hepatitis C virus: life cycle in cells, infection and host response, and analysis of molecular markers influencing the outcome of infection and response to therapy. *Clinical Microbiology and Infection* **22**, 826–832 (2016).
5. Platt, L. *et al.* Prevalence and burden of HCV co-infection in people living with HIV: a global systematic review and meta-analysis. *Lancet. Infect. Dis.* **16**, 797–808 (2016).
6. Yeung, L., King, S. M. & Roberts, E. A. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Hepatology* **34**, 223–229 (2001).
7. Tohme, R. A. & Holmberg, S. D. Transmission of Hepatitis C Virus Infection Through Tattooing and Piercing: A Critical Review. *Clin. Infect. Dis.* **54**, 1167–1178 (2012).
8. Thomas, D. L. *et al.* Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* **461**, 798–801 (2009).
9. Grebely, J. *et al.* The effects of female sex, viral genotype, and IL28B genotype on spontaneous clearance of acute hepatitis C virus infection. *Hepatology* **59**, 109–120 (2014).
10. Seeff, L. B. *et al.* Long-Term Mortality after Transfusion-Associated Non-A, Non-B Hepatitis. *N. Engl. J. Med.* **327**, 1906–1911 (1992).
11. 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).
12. Pekow, J. R., Bhan, A. K., Zheng, H. & Chung, R. T. Hepatic steatosis is associated with increased frequency of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C-related cirrhosis. *Cancer* **109**, 2490–6 (2007).
13. 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).
14. Perz, J. F., Armstrong, G. L., Farrington, L. A., Hutin, Y. J. F. & Bell, B. P. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J. Hepatol.* **45**, 529–538 (2006).
15. Adinolfi, L. E. *et al.* Chronic HCV infection is a risk factor of ischemic stroke. *Atherosclerosis* **231**, 22–26 (2013).
16. Balik, I., Yilmaz, N., Turkcapar, N. & Yasa, H. Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* **30**, 584–584 (1999).
17. Carrier, P. *et al.* HCV-associated B-cell non-Hodgkin lymphomas and new direct antiviral agents. *Liver Int.* **35**, 2222–2227 (2015).
18. Kondo, Y. *et al.* HCV Infection Enhances Th17 Commitment, Which Could Affect the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *PLoS One* **9**, e98521 (2014).
19. King, A. M. Q. *et al.* Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and

- Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2018). *Arch. Virol.* (2018). doi:10.1007/s00705-018-3847-1
20. Gastaminza, P. *et al.* Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture. *J. Virol.* **84**, 10999–1009 (2010).
 21. Choo, Q. L. *et al.* Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 2451–5 (1991).
 22. Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N. & Bartenschlager, R. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J. Virol.* **75**, 12047–57 (2001).
 23. Honda, M., Beard, M. R., Ping, L. H. & Lemon, S. M. A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J. Virol.* **73**, 1165–74 (1999).
 24. Moradpour, D. & Penin, F. Hepatitis C Virus Proteins: From Structure to Function. in 113–142 (2013). doi:10.1007/978-3-642-27340-7_5
 25. Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* **436**, 933–8 (2005).
 26. André, P. *et al.* Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J. Virol.* **76**, 6919–28 (2002).
 27. Chang, K.-S., Jiang, J., Cai, Z. & Luo, G. Human Apolipoprotein E Is Required for Infectivity and Production of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *J. Virol.* **81**, 13783–13793 (2007).
 28. Meunier, J.-C. *et al.* Apolipoprotein c1 association with hepatitis C virus. *J. Virol.* **82**, 9647–56 (2008).
 29. Catanese, M. T. *et al.* Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 9505–9510 (2013).
 30. Cormier, E. G. *et al.* L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 14067–72 (2004).
 31. Kondo, Y. & Shimosegawa, T. Direct effects of hepatitis C virus on the lymphoid cells. *World J. Gastroenterol.* **19**, 7889 (2013).
 32. Barth, H. *et al.* Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *J. Virol.* **80**, 10579–90 (2006).
 33. Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B. & Zhang, Q. X. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 12766–71 (1999).
 34. Scarselli, E. *et al.* The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* **21**, 5017–25 (2002).
 35. Pileri, P. *et al.* Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**, 938–41 (1998).
 36. Evans, M. J. *et al.* Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**, 801–5 (2007).
 37. Benedicto, I. *et al.* The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection. *J. Virol.* **83**, 8012–20 (2009).
 38. Lupberger, J. *et al.* EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible

- targets for antiviral therapy. *Nat. Med.* **17**, 589–95 (2011).
39. Sainz, B. *et al.* Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat. Med.* **18**, 281–285 (2012).
 40. Martin, D. N. & Uprichard, S. L. Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 10777–82 (2013).
 41. Park, J. H. *et al.* Discovery of Cellular Proteins Required for the Early Steps of HCV Infection Using Integrative Genomics. *PLoS One* **8**, e60333 (2013).
 42. Li, Q. *et al.* Hepatitis C virus depends on E-cadherin as an entry factor and regulates its expression in epithelial-to-mesenchymal transition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 7620–7625 (2016).
 43. Blanchard, E. *et al.* Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* **80**, 6964–72 (2006).
 44. Meertens, L., Bertaux, C. & Dragic, T. Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J. Virol.* **80**, 11571–8 (2006).
 45. Hijikata, M., Kato, N., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M. & Shimotohno, K. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 5547–51 (1991).
 46. Grakoui, A., McCourt, D. W., Wychowski, C., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J. Virol.* **67**, 2832–43 (1993).
 47. Lorenz, I. C., Marcotrigiano, J., Dentzer, T. G. & Rice, C. M. Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* **442**, 831–5 (2006).
 48. Wölk, B. *et al.* Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J. Virol.* **74**, 2293–304 (2000).
 49. Egger, D. *et al.* Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J. Virol.* **76**, 5974–84 (2002).
 50. Romero-Brey, I. *et al.* Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog.* **8**, e1003056 (2012).
 51. Dubuisson, J. & Cosset, F.-L. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle – An update. *J. Hepatol.* **61**, S3–S13 (2014).
 52. Okamoto, K. *et al.* Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. *J. Virol.* **82**, 8349–61 (2008).
 53. Miyanari, Y. *et al.* The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1089–97 (2007).
 54. Boulant, S. *et al.* Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J. Biol. Chem.* **281**, 22236–47 (2006).
 55. McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G. & Martoglio, B. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J.* **21**, 3980–8 (2002).

56. Gentsch, J. *et al.* hepatitis c Virus p7 is critical for capsid assembly and envelopment. *PLoS Pathog.* **9**, e1003355 (2013).
57. Jirasko, V. *et al.* Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS Pathog.* **6**, e1001233 (2010).
58. Appel, N. *et al.* Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog.* **4**, e1000035 (2008).
59. MATSUMOTO, M., HWANG, S. B., JENG, K.-S., ZHU, N. & LAI, M. M. C. Homotypic Interaction and Multimerization of Hepatitis C Virus Core Protein. *Virology* **218**, 43–51 (1996).
60. Counihan, N. A., Rawlinson, S. M. & Lindenbach, B. D. Trafficking of hepatitis C virus core protein during virus particle assembly. *PLoS Pathog.* **7**, e1002302 (2011).
61. Huang, H. *et al.* Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5848–53 (2007).
62. Coller, K. E. *et al.* Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion. *PLoS Pathog.* **8**, e1002466 (2012).
63. Andino, R. & Domingo, E. Viral quasispecies. *Virology* **479–480**, 46–51 (2015).
64. Bartenschlager, R. & Lohmann, V. Replication of hepatitis C virus. *J. Gen. Virol.* **81**, 1631–1648 (2000).
65. Timm, J. & Roggendorf, M. Sequence diversity of hepatitis C virus: implications for immune control and therapy. *World J. Gastroenterol.* **13**, 4808–17 (2007).
66. Preciado, M. V. *et al.* Hepatitis C virus molecular evolution: Transmission, disease progression and antiviral therapy. *World J. Gastroenterol.* **20**, 15992 (2014).
67. Simmonds, P. *et al.* A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* **19**, 1321–4 (1994).
68. Smith, D. B. *et al.* Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* **59**, 318–27 (2014).
69. Simmonds, P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus - 15 years on. *J. Gen. Virol.* **85**, 3173–3188 (2004).
70. 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).
71. Messina, J. P. *et al.* Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **61**, 77–87 (2015).
72. Gower, E., Estes, C., Blach, S., Razavi-Shearer, K. & Razavi, H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* **61**, S45–S57 (2014).
73. Magiorkinis, G. *et al.* The global spread of hepatitis C virus 1a and 1b: a phylodynamic and phylogeographic analysis. *PLoS Med.* **6**, e1000198 (2009).
74. Markov, P. V *et al.* Colonial history and contemporary transmission shape the genetic diversity of hepatitis C virus genotype 2 in Amsterdam. *J. Virol.* **86**, 7677–87 (2012).
75. Morice, Y. *et al.* Molecular epidemiology of hepatitis C virus subtype 3a in injecting drug users.

- J. Med. Virol.* **78**, 1296–1303 (2006).
76. Frank, C. *et al.* The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet (London, England)* **355**, 887–91 (2000).
77. Murphy, D. G. *et al.* Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1102–12 (2007).
78. Murphy, D. G. *et al.* Hepatitis C Virus Genotype 7, a New Genotype Originating from Central Africa. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 967–972 (2015).
79. Salmona, M. *et al.* First next-generation sequencing full-genome characterization of a hepatitis C virus genotype 7 divergent subtype. *Clin. Microbiol. Infect.* **22**, 947.e1-947.e8 (2016).
80. Rubbia-Brandt, L. *et al.* Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J. Hepatol.* **33**, 106–15 (2000).
81. Probst, A. *et al.* Role of hepatitis C virus genotype 3 in liver fibrosis progression--a systematic review and meta-analysis. *J. Viral Hepat.* **18**, 745–59 (2011).
82. Kanwal, F., Kramer, J. R., Ilyas, J., Duan, Z. & El-Serag, H. B. HCV genotype 3 is associated with an increased risk of cirrhosis and hepatocellular cancer in a national sample of U.S. Veterans with HCV. *Hepatology* **60**, 98–105 (2014).
83. Bruno, S. *et al.* Hepatitis C virus genotype 1b as a major risk factor associated with hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: A seventeen-year prospective cohort study. *Hepatology* **46**, 1350–1356 (2007).
84. Pawlotsky, J.-M. Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clin. Liver Dis.* **7**, 45–66 (2003).
85. Neumann, A. U. *et al.* Differences in Viral Dynamics between Genotypes 1 and 2 of Hepatitis C Virus. *J. Infect. Dis.* **182**, 28–35 (2000).
86. Hadziyannis, S. J. *et al.* Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann. Intern. Med.* **140**, 346–55 (2004).
87. Pawlotsky, J.-M. *et al.* EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. *J. Hepatol.* (2018). doi:10.1016/j.jhep.2018.03.026
88. Ribeiro, R. M. *et al.* Quantifying the diversification of hepatitis C virus (HCV) during primary infection: estimates of the in vivo mutation rate. *PLoS Pathog.* **8**, e1002881 (2012).
89. Okamoto, H. *et al.* Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* **190**, 894–9 (1992).
90. Quer, J. *et al.* Effect of bottlenecking on evolution of the nonstructural protein 3 gene of hepatitis C virus during sexually transmitted acute resolving infection. *J. Virol.* **79**, 15131–41 (2005).
91. Smith, D. B. Evolution of the hypervariable region of hepatitis C virus. *J. Viral Hepat.* **6 Suppl 1**, 41–6 (1999).
92. Bukh, J., Purcell, R. H. & Miller, R. H. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4942–6 (1992).
93. Simmonds, P. *et al.* Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in

- the core, E1 and NS-5 regions. *J. Gen. Virol.* **75 (Pt 5)**, 1053–61 (1994).
94. Neumann, A. U. *et al.* Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* **282**, 103–7 (1998).
95. Domingo, E., Sheldon, J. & Perales, C. Viral Quasispecies Evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 159–216 (2012).
96. Martell, M. *et al.* Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J. Virol.* **66**, 3225–9 (1992).
97. Domingo, E. & Schuster, P. Quasispecies theory has come of age, and regular updates of the concept of mutation. Introduction. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **392**, ix–xi (2016).
98. Bukh, J. The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. *J. Hepatol.* **65**, S2–S21 (2016).
99. Domingo, E. & Holland, J. J. RNA VIRUS MUTATIONS AND FITNESS FOR SURVIVAL. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 151–178 (1997).
100. Vignuzzi, M., Stone, J. K., Arnold, J. J., Cameron, C. E. & Andino, R. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* **439**, 344–8 (2006).
101. Domingo, E. & Schuster, P. What Is a Quasispecies? Historical Origins and Current Scope. in *Current topics in microbiology and immunology* **392**, 1–22 (2015).
102. Domingo, E. Quasispecies and the implications for virus persistence and escape. *Clin. Diagn. Virol.* **10**, 97–101 (1998).
103. Domingo, E. & Perales, C. Quasispecies and virus. *Eur. Biophys. J.* **47**, 443–457 (2018).
104. Farci, P., Bukh, J. & Purcell, R. H. The quasispecies of hepatitis C virus and the host immune response. *Springer Semin. Immunopathol.* **19**, 5–26 (1997).
105. Farci, P. *et al.* The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* **288**, 339–44 (2000).
106. Chambers, T. J. *et al.* Quasispecies heterogeneity within the E1/E2 region as a pretreatment variable during pegylated interferon therapy of chronic hepatitis C virus infection. *J. Virol.* **79**, 3071–83 (2005).
107. Pawlotsky, J. M. Hepatitis C virus population dynamics during infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **299**, 261–84 (2006).
108. Domingo, E., Escarmís, C., Lázaro, E. & Manrubia, S. C. Quasispecies dynamics and RNA virus extinction. *Virus Res.* **107**, 129–139 (2005).
109. Perales, C. & Domingo, E. Antiviral Strategies Based on Lethal Mutagenesis and Error Threshold. in *Current topics in microbiology and immunology* **392**, 323–339 (2015).
110. Perales, C., Martín, V. & Domingo, E. Lethal mutagenesis of viruses. *Curr. Opin. Virol.* **1**, 419–422 (2011).
111. Perales, C., Irazo, J., Manrubia, S. C. & Domingo, E. The impact of quasispecies dynamics on the use of therapeutics. *Trends Microbiol.* **20**, 595–603 (2012).
112. Maylin, S. *et al.* Eradication of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic

- hepatitis C. *Gastroenterology* **135**, 821–9 (2008).
113. van der Meer, A. J. *et al.* Association between sustained virological response and all-cause mortality among patients with chronic hepatitis C and advanced hepatic fibrosis. *JAMA* **308**, 2584–93 (2012).
 114. ISAACS, A. & LINDENMANN, J. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* **147**, 258–67 (1957).
 115. Pestka, S., Krause, C. D. & Walter, M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* **202**, 8–32 (2004).
 116. Stetson, D. B. & Medzhitov, R. Type I interferons in host defense. *Immunity* **25**, 373–81 (2006).
 117. Mogensen, K. E., Lewerenz, M., Reboul, J., Lutfalla, G. & Uzé, G. The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *J. Interferon Cytokine Res.* **19**, 1069–98 (1999).
 118. Darnell, J. E., Kerr, I. M. & Stark, G. R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415–21 (1994).
 119. Gale, M. & Foy, E. M. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* **436**, 939–45 (2005).
 120. Schoggins, J. W. & Rice, C. M. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr. Opin. Virol.* **1**, 519–525 (2011).
 121. Wang, C. *et al.* Alpha interferon induces distinct translational control programs to suppress hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* **77**, 3898–912 (2003).
 122. Guo, J.-T., Sohn, J. A., Zhu, Q. & Seeger, C. Mechanism of the interferon alpha response against hepatitis C virus replicons. *Virology* **325**, 71–81 (2004).
 123. Heim, M. H. & Thimme, R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *J. Hepatol.* **61**, S14–S25 (2014).
 124. Hoofnagle, J. H. *et al.* Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N. Engl. J. Med.* **315**, 1575–8 (1986).
 125. Lau, D. T. *et al.* 10-Year follow-up after interferon-alpha therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology* **28**, 1121–7 (1998).
 126. McHutchison, J. G. *et al.* Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1485–92 (1998).
 127. Poynard, T. *et al.* Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet (London, England)* **352**, 1426–32 (1998).
 128. Müller, W. E., Maidhof, A., Taschner, H. & Zahn, R. K. Virazole (1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide; a cytostatic agent. *Biochem. Pharmacol.* **26**, 1071–5 (1977).
 129. Balzarini, J. *et al.* Eicar (5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide). A novel potent inhibitor of inosinate dehydrogenase activity and guanylate biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **268**, 24591–8 (1993).
 130. Maag, D., Castro, C., Hong, Z. & Cameron, C. E. Hepatitis C virus RNA-dependent RNA

- polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. *J. Biol. Chem.* **276**, 46094–8 (2001).
131. Vo, N. V., Young, K.-C. & Lai, M. M. C. Mutagenic and Inhibitory Effects of Ribavirin on Hepatitis C Virus RNA Polymerase †. *Biochemistry* **42**, 10462–10471 (2003).
 132. Sintchak, M. D. & Nimmesgern, E. The structure of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors. *Immunopharmacology* **47**, 163–84 (2000).
 133. Tam, R. C. *et al.* Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile. *J. Hepatol.* **30**, 376–82 (1999).
 134. Cramp, M. E. *et al.* Hepatitis C virus-specific T-cell reactivity during interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **118**, 346–55 (2000).
 135. Crotty, S. *et al.* The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat. Med.* **6**, 1375–1379 (2000).
 136. Graci, J. D. & Cameron, C. E. Therapeutically targeting RNA viruses via lethal mutagenesis. *Future Virol.* **3**, 553–566 (2008).
 137. Dixit, N. M., Layden-Almer, J. E., Layden, T. J. & Perelson, A. S. Modelling how ribavirin improves interferon response rates in hepatitis C virus infection. *Nature* **432**, 922–4 (2004).
 138. Contreras, A. M. *et al.* Viral RNA mutations are region specific and increased by ribavirin in a full-length hepatitis C virus replication system. *J. Virol.* **76**, 8505–17 (2002).
 139. Ortega-Prieto, A. M. *et al.* Extinction of Hepatitis C Virus by Ribavirin in Hepatoma Cells Involves Lethal Mutagenesis. *PLoS One* **8**, e71039 (2013).
 140. Asahina, Y. *et al.* Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* **43**, 623–9 (2005).
 141. Lutchman, G. *et al.* Mutation Rate of the Hepatitis C Virus NS5B in Patients Undergoing Treatment With Ribavirin Monotherapy. *Gastroenterology* **132**, 1757–1766 (2007).
 142. Cuevas, J. M., González-Candelas, F., Moya, A. & Sanjuán, R. Effect of ribavirin on the mutation rate and spectrum of hepatitis C virus in vivo. *J. Virol.* **83**, 5760–4 (2009).
 143. Dietz, J. *et al.* Deep Sequencing Reveals Mutagenic Effects of Ribavirin during Monotherapy of Hepatitis C Virus Genotype 1-Infected Patients. *J. Virol.* **87**, 6172–6181 (2013).
 144. Liu, W.-L. *et al.* Ribavirin up-regulates the activity of double-stranded RNA-activated protein kinase and enhances the action of interferon-alpha against hepatitis C virus. *J. Infect. Dis.* **196**, 425–34 (2007).
 145. Feld, J. J. *et al.* Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: Identifying molecular pathways for treatment response. *Hepatology* **46**, 1548–63 (2007).
 146. Reichard, O., Andersson, J., Schvarcz, R. & Weiland, O. Ribavirin treatment for chronic hepatitis C. *Lancet (London, England)* **337**, 1058–61 (1991).
 147. Di Bisceglie, A. M. *et al.* Ribavirin as therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med.* **123**, 897–903 (1995).
 148. Dusheiko, G. *et al.* Ribavirin treatment for patients with chronic hepatitis C: results of a placebo-controlled study. *J. Hepatol.* **25**, 591–8 (1996).
 149. Kozlowski, A., Charles, S. A. & Harris, J. M. Development of pegylated interferons for the

- treatment of chronic hepatitis C. *BioDrugs* **15**, 419–29 (2001).
150. Bailon, P. *et al.* Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon alpha-2a for the treatment of hepatitis C. *Bioconjug. Chem.* **12**, 195–202
 151. Grace, M. *et al.* Structural and Biologic Characterization of Pegylated Recombinant IFN- α 2b. *J. Interf. Cytokine Res.* **21**, 1103–1115 (2001).
 152. Fried, M. W. *et al.* Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* **347**, 975–82 (2002).
 153. 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).
 154. Pawlotsky, J.-M., Chevaliez, S. & McHutchison, J. G. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology* **132**, 1979–98 (2007).
 155. Soriano, V., Peters, M. G. & Zeuzem, S. New therapies for hepatitis C virus infection. *Clin. Infect. Dis.* **48**, 313–20 (2009).
 156. Scheel, T. K. H. & Rice, C. M. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat. Med.* **19**, 837–49 (2013).
 157. Li, G. & De Clercq, E. Current therapy for chronic hepatitis C: The role of direct-acting antivirals. *Antiviral Res.* **142**, 83–122 (2017).
 158. Lubber, A. D. Genetic barriers to resistance and impact on clinical response. *MedGenMed* **7**, 69 (2005).
 159. Götte, M. The distinct contributions of fitness and genetic barrier to the development of antiviral drug resistance. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 644–650 (2012).
 160. Romano, K. P. *et al.* The Molecular Basis of Drug Resistance against Hepatitis C Virus NS3/4A Protease Inhibitors. *PLoS Pathog.* **8**, e1002832 (2012).
 161. Cento, V. *et al.* HCV genotypes are differently prone to the development of resistance to linear and macrocyclic protease inhibitors. *PLoS One* **7**, e39652 (2012).
 162. Romano, K. P., Ali, A., Royer, W. E. & Schiffer, C. A. Drug resistance against HCV NS3/4A inhibitors is defined by the balance of substrate recognition versus inhibitor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 20986–91 (2010).
 163. Meylan, E. *et al.* Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**, 1167–72 (2005).
 164. Li, K. *et al.* Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2992–7 (2005).
 165. 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**, 48576–87 (2004).
 166. Love, R. A., Brodsky, O., Hickey, M. J., Wells, P. A. & Cronin, C. N. Crystal structure of a novel dimeric form of NS5A domain I protein from hepatitis C virus. *J. Virol.* **83**, 4395–403 (2009).
 167. Hwang, J. *et al.* Hepatitis C virus nonstructural protein 5A: biochemical characterization of a novel structural class of RNA-binding proteins. *J. Virol.* **84**, 12480–91 (2010).

168. McGivern, D. R. *et al.* Kinetic analyses reveal potent and early blockade of hepatitis C virus assembly by NS5A inhibitors. *Gastroenterology* **147**, 453–62.e7 (2014).
169. Gao, M. Antiviral activity and resistance of HCV NS5A replication complex inhibitors. *Curr. Opin. Virol.* **3**, 514–520 (2013).
170. Pawlotsky, J.-M. NS5A inhibitors in the treatment of hepatitis C. *J. Hepatol.* **59**, 375–82 (2013).
171. Kumthip, K. *et al.* Hepatitis C Virus NS5A Disrupts STAT1 Phosphorylation and Suppresses Type I Interferon Signaling. *J. Virol.* **86**, 8581–8591 (2012).
172. Chowdhury, J. B., Kim, H., Ray, R. & Ray, R. B. Hepatitis C Virus NS5A Protein Modulates IRF-7-Mediated Interferon- α Signaling. *J. Interf. Cytokine Res.* **34**, 16–21 (2014).
173. Wohnsland, A., Hofmann, W. P. & Sarrazin, C. Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 23–38 (2007).
174. Gerber, L., Welzel, T. M. & Zeuzem, S. New therapeutic strategies in HCV: polymerase inhibitors. *Liver Int.* **33 Suppl 1**, 85–92 (2013).
175. Lam, A. M. *et al.* Genotype and subtype profiling of PSI-7977 as a nucleotide inhibitor of hepatitis C virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 3359–68 (2012).
176. McCown, M. F. *et al.* The Hepatitis C Virus Replicon Presents a Higher Barrier to Resistance to Nucleoside Analogs than to Nonnucleoside Polymerase or Protease Inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1604–1612 (2008).
177. Koch, U. & Narjes, F. Allosteric inhibition of the hepatitis C virus NS5B RNA dependent RNA polymerase. *Infect. Disord. Drug Targets* **6**, 31–41 (2006).
178. Mosley, R. T. *et al.* Structure of hepatitis C virus polymerase in complex with primer-template RNA. *J. Virol.* **86**, 6503–11 (2012).
179. Soriano, V. *et al.* Hepatitis C therapy with HCV NS5B polymerase inhibitors. *Expert Opin. Pharmacother.* **14**, 1161–1170 (2013).
180. Lesburg, C. A. *et al.* Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 937–43 (1999).
181. Beaulieu, P. L. Non-nucleoside inhibitors of the HCV NS5B polymerase: progress in the discovery and development of novel agents for the treatment of HCV infections. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **8**, 614–34 (2007).
182. Sarrazin, C. *et al.* Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. *Gastroenterology* **132**, 1767–77 (2007).
183. Svarovskaia, E. S., Martin, R., McHutchison, J. G., Miller, M. D. & Mo, H. Abundant drug-resistant NS3 mutants detected by deep sequencing in hepatitis C virus-infected patients undergoing NS3 protease inhibitor monotherapy. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 3267–74 (2012).
184. Poordad, F. *et al.* Boceprevir for Untreated Chronic HCV Genotype 1 Infection. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1195–1206 (2011).
185. Jacobson, I. M. *et al.* Telaprevir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Virus Infection. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2405–2416 (2011).
186. Lawitz, E. & Gane, E. J. Sofosbuvir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Infection. *N. Engl. J. Med.* **369**, 678–679 (2013).

187. Jacobson, I. M. *et al.* Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a plus ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-1): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **384**, 403–413 (2014).
188. 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).
189. Poordad, F. *et al.* ABT-450/r–Ombitasvir and Dasabuvir with Ribavirin for Hepatitis C with Cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1973–1982 (2014).
190. Mariño, Z. *et al.* High efficacy of Sofosbuvir plus Simeprevir in a large cohort of Spanish cirrhotic patients infected with genotypes 1 and 4. *Liver Int.* **37**, 1823–1832 (2017).
191. Lawitz, E. *et al.* Sofosbuvir-velpatasvir-voxilaprevir with or without ribavirin in direct-acting antiviral-experienced patients with genotype 1 hepatitis C virus. *Hepatology* **65**, 1803–1809 (2017).
192. Kwo, P. Y. *et al.* Glecaprevir and pibrentasvir yield high response rates in patients with HCV genotype 1–6 without cirrhosis. *J. Hepatol.* **67**, 263–271 (2017).
193. Jacobson, I. M. *et al.* Safety and Efficacy of Elbasvir/Grazoprevir in Patients With Hepatitis C Virus Infection and Compensated Cirrhosis: An Integrated Analysis. *Gastroenterology* **152**, 1372–1382.e2 (2017).
194. Ioannou, G. N. *et al.* Effectiveness of Sofosbuvir, Ledipasvir/Sofosbuvir, or Paritaprevir/Ritonavir/Ombitasvir and Dasabuvir Regimens for Treatment of Patients With Hepatitis C in the Veterans Affairs National Health Care System. *Gastroenterology* **151**, 457–471.e5 (2016).
195. Fox, D. S., McGinnis, J. J., Tonnu-Mihara, I. Q. & McCombs, J. S. Comparative treatment effectiveness of direct acting antiviral regimens for hepatitis C: Data from the Veterans administration. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **32**, 1136–1142 (2017).
196. Crespo, J. *et al.* Real-World Effectiveness and Safety of Oral Combination Antiviral Therapy for Hepatitis C Virus Genotype 4 Infection. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **15**, 945–949.e1 (2017).
197. Spengler, U. Direct antiviral agents (DAAs) - A new age in the treatment of hepatitis C virus infection. *Pharmacol. Ther.* **183**, 118–126 (2018).
198. Calleja, J. L. *et al.* Effectiveness, safety and clinical outcomes of direct-acting antiviral therapy in HCV genotype 1 infection: Results from a Spanish real-world cohort. *J. Hepatol.* **66**, 1138–1148 (2017).
199. 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).
200. Lontok, E. *et al.* Hepatitis C virus drug resistance-associated substitutions: State of the art summary. *Hepatology* **62**, 1623–1632 (2015).
201. Sarrazin, C. The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice. *J. Hepatol.* **64**, 486–504 (2016).
202. Sorbo, M. C. *et al.* Hepatitis C virus drug resistance associated substitutions and their clinical relevance: Update 2018. *Drug Resist. Updat.* **37**, 17–39 (2018).
203. Le Pogam, S. *et al.* Existence of hepatitis C virus NS5B variants naturally resistant to non-nucleoside, but not to nucleoside, polymerase inhibitors among untreated patients. *J.*

- Antimicrob. Chemother.* **61**, 1205–16 (2008).
204. Bartels, D. J. *et al.* Natural prevalence of hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to NS3.4A protease inhibitors in treatment-naïve subjects. *J. Infect. Dis.* **198**, 800–7 (2008).
205. Kuntzen, T. *et al.* Naturally occurring dominant resistance mutations to hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naïve patients. *Hepatology* **48**, 1769–78 (2008).
206. Cubero, M. *et al.* Naturally occurring NS3-protease-inhibitor resistant mutant A156T in the liver of an untreated chronic hepatitis C patient. *Virology* **370**, 237–245 (2008).
207. Ruíz-Jarabo, C. M. *et al.* Duration and fitness dependence of quasispecies memory. *J. Mol. Biol.* **315**, 285–96 (2002).
208. Shimakami, T. *et al.* Protease Inhibitor-Resistant Hepatitis C Virus Mutants With Reduced Fitness From Impaired Production of Infectious Virus. *Gastroenterology* **140**, 667–675 (2011).
209. Rong, L. & Perelson, A. S. Treatment of hepatitis C virus infection with interferon and small molecule direct antivirals: viral kinetics and modeling. *Crit. Rev. Immunol.* **30**, 131–48 (2010).
210. Tong, X. *et al.* Identification and analysis of fitness of resistance mutations against the HCV protease inhibitor SCH 503034. *Antiviral Res.* **70**, 28–38 (2006).
211. Yi, M. *et al.* Mutations conferring resistance to SCH6, a novel hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor. Reduced RNA replication fitness and partial rescue by second-site mutations. *J. Biol. Chem.* **281**, 8205–15 (2006).
212. Nijhuis, M., van Maarseveen, N. M. & Boucher, C. A. B. Antiviral Resistance and Impact on Viral Replication Capacity: Evolution of Viruses Under Antiviral Pressure Occurs in Three Phases. in *Antiviral Strategies* 299–320 (Springer Berlin Heidelberg, 2009). doi:10.1007/978-3-540-79086-0_11
213. Pawlotsky, J.-M. Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antiviral Drugs in Interferon-Free Regimens. *Gastroenterology* **151**, 70–86 (2016).
214. Leitner, T. *et al.* Analysis of heterogeneous viral populations by direct DNA sequencing. *Biotechniques* **15**, 120–7 (1993).
215. Gregori, J. *et al.* Ultra-deep pyrosequencing (UDPS) data treatment to study amplicon HCV minor variants. *PLoS One* **8**, e83361 (2013).
216. Ninomiya, M. *et al.* Use of Illumina Deep Sequencing Technology To Differentiate Hepatitis C Virus Variants. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 857–866 (2012).
217. Liu, L. *et al.* Comparison of next-generation sequencing systems. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 251364 (2012).
218. Loman, N. J. *et al.* Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat. Biotechnol.* **30**, 434–439 (2012).
219. Lipkin, W. I. & Firth, C. Viral surveillance and discovery. *Curr. Opin. Virol.* **3**, 199–204 (2013).
220. Mokili, J. L., Rohwer, F. & Dutilh, B. E. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 63–77 (2012).
221. Quiñones-Mateu, M. E., Avila, S., Reyes-Teran, G. & Martinez, M. A. Deep sequencing: Becoming a critical tool in clinical virology. *J. Clin. Virol.* **61**, 9–19 (2014).

222. Saliou, A. *et al.* Concordance between two phenotypic assays and ultradeep pyrosequencing for determining HIV-1 tropism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 2831–6 (2011).
223. Nasu, A. *et al.* Genetic heterogeneity of hepatitis C virus in association with antiviral therapy determined by ultra-deep sequencing. *PLoS One* **6**, e24907 (2011).
224. Quer, J. *et al.* Deep sequencing in the management of hepatitis virus infections. *Virus Res.* **239**, 115–125 (2017).
225. 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**, 219–226 (2015).
226. Soria, M. E. *et al.* Pipeline for specific subtype amplification and drug resistance detection in hepatitis C virus. *BMC Infect. Dis.* **18**, 446 (2018).
227. R Team, C. *Team RDC.R: A Language And Environment For Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria. R: A Language and Environment for Statistical Computing* (2012).
228. Gentleman, R. C. *et al.* Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* **5**, R80 (2004).
229. Pages, H., Aboyoun, P., Gentleman, R. & DebRoy, S. Biostrings: String objects representing biological sequences, and matching algorithms. *R package*
230. AASLD-IDSAs. Recommendations for testing, managing, and treating hepatitis C. (2017).
231. Di Maio, V. C. *et al.* Multiclass HCV resistance to direct-acting antiviral failure in real-life patients advocates for tailored second-line therapies. *Liver Int.* **37**, 514–528 (2017).
232. Dietz, J. *et al.* Patterns of Resistance-Associated Substitutions in Patients With Chronic HCV Infection Following Treatment With Direct-Acting Antivirals. *Gastroenterology* **154**, 976–988.e4 (2018).
233. Rodriguez-Frias, F. *et al.* High HCV subtype heterogeneity in a chronically infected general population revealed by high-resolution hepatitis C virus subtyping. *Clin. Microbiol. Infect.* **23**, 775.e1-775.e6 (2017).
234. Buti, M., Llaneras, J., Riveiro-Barciela, M. & Esteban, R. Therapy for hepatitis C genotype 3: moving forward. *J. Viral Hepat.* **22**, 683–690 (2015).
235. Buti, M. & Esteban, R. Hepatitis C virus genotype 3: a genotype that is not ‘easy-to-treat’. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **9**, 375–385 (2015).
236. Powdrill, M. H. *et al.* Contribution of a mutational bias in hepatitis C virus replication to the genetic barrier in the development of drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 20509–13 (2011).
237. Delang, L., Vliegen, I., Froeyen, M. & Neyts, J. Comparative study of the genetic barriers and pathways towards resistance of selective inhibitors of hepatitis C virus replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 4103–13 (2011).
238. Bertoli, A. *et al.* Prevalence of Single and Multiple Natural NS3, NS5A and NS5B Resistance-Associated Substitutions in Hepatitis C Virus Genotypes 1–4 in Italy. *Sci. Rep.* **8**, 8988 (2018).
239. Svarovskaia, E. S. *et al.* Infrequent development of resistance in genotype 1-6 hepatitis C virus-infected subjects treated with sofosbuvir in phase 2 and 3 clinical trials. *Clin. Infect. Dis.* **59**, 1666–74 (2014).

240. Gane, E. J. *et al.* The emergence of NS5B resistance associated substitution S282T after sofosbuvir-based treatment. *Hepatol. Commun.* **1**, 538–549 (2017).
241. Donaldson, E. F., Harrington, P. R., O’Rear, J. J. & Naeger, L. K. Clinical evidence and bioinformatics characterization of potential hepatitis C virus resistance pathways for sofosbuvir. *Hepatology* **61**, 56–65 (2015).
242. Walker, A. *et al.* Detection of a genetic footprint of the sofosbuvir resistance-associated substitution S282T after HCV treatment failure. *Viol. J.* **14**, 106 (2017).
243. Cheng, G. *et al.* *In Vitro* Antiviral Activity and Resistance Profile Characterization of the Hepatitis C Virus NS5A Inhibitor Ledipasvir. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 1847–1853 (2016).
244. Yoshida, K. *et al.* Long-Term Follow-Up of Resistance-Associated Substitutions in Hepatitis C Virus in Patients in Which Direct Acting Antiviral-Based Therapy Failed. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 962 (2017).
245. Gallego, I. *et al.* Barrier-Independent, Fitness-Associated Differences in Sofosbuvir Efficacy against Hepatitis C Virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 3786–3793 (2016).
246. Sheldon, J. *et al.* Increased replicative fitness can lead to decreased drug sensitivity of hepatitis C virus. *J. Virol.* **88**, 12098–111 (2014).
247. Smith, D. *et al.* Resistance analysis of genotype 3 hepatitis C virus indicates subtypes inherently resistant to nonstructural protein 5A inhibitors. *Hepatology* (2018). doi:10.1002/hep.29837
248. Kai, Y. *et al.* Baseline quasispecies selection and novel mutations contribute to emerging resistance-associated substitutions in hepatitis C virus after direct-acting antiviral treatment. *Sci. Rep.* **7**, 41660 (2017).
249. Briones, C., de Vicente, A., Molina-París, C. & Domingo, E. Minority memory genomes can influence the evolution of HIV-1 quasispecies in vivo. *Gene* **384**, 129–138 (2006).
250. Zeuzem, S. *et al.* NS5A resistance-associated substitutions in patients with genotype 1 hepatitis C virus: Prevalence and effect on treatment outcome. *J. Hepatol.* **66**, 910–918 (2017).
251. Paolucci, S. *et al.* Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naïve patients. *Viol. J.* **10**, 355 (2013).

ANEXO

Anexo 1. Datos clínicos de los pacientes de la cohorte de estudio

Paciente	Tratamiento previo	Grado de fibrosis	Subtipo	Tratamiento del fallo	RBV	Carga viral (UI/ml)	Duración del tratamiento	Tiempo de muestreo ¹ (semanas)
001	NO	Desconocido	1a	SMV + SOF	NO	2,48E+06	Desconocido	Desconocido
002	Desconocido	Desconocido	4d	SMV + DCV	NO	1,10E+06	Desconocido	Desconocido
003	NO	F4	1b	SMV + SOF	SÍ	1,15E+07	24	7,14
004	NO	F4	4d	LDV + SOF	SÍ	7,30E+05	12	Desconocido
005	NO	F4	1b	SMV + SOF	SÍ	1,70E+06	12	31,14
006	Desconocido	F4	3a	SOF	SÍ	3,60E+05	24	19,29
007	Desconocido	F3	1b	SMV + SOF	NO	2,33E+06	Desconocido	Desconocido
008	Desconocido	F3	1b	FDV + Deleobuvir	NO	2,07E+05	Desconocido	Desconocido
009	NO	F3	1b	LDV + SOF	NO	8,48E+05	12	3,86
010	Desconocido	Desconocido	3a	SOF	SÍ	2,50E+05	24	Desconocido
011	Desconocido	F4	1b	LDV + SOF	NO	1,46E+06	12	Desconocido
012	NO	F4	1b	LDV + SOF	NO	2,09E+06	24	Desconocido
013	SÍ (PEG + TPV)	F4	1b	LDV + SOF	NO	1,10E+06	24	Desconocido
014	NO	F3	1a	PTV + OMV + DSV	SÍ	8,80E+06	12	13,29
015	NO	F4	1b	SMV + SOF	SÍ	6,35E+06	12	57,43
016	Desconocido	F3	1b	LDV + SOF	NO	4,37E+06	12	Desconocido
017	NO	F4	1b	PTV + OMV + DSV	SÍ	1,05E+06	12	30,86
018	NO	F3	1b	PTV + OMV + DSV	NO	7,53E+05	12	31,57
019	SÍ (PegIFN + TPV + RBV)	F4	1b	LDV + SOF	SÍ	1,59E+06	12	18,14
020	Desconocido	Desconocido	3a	PTV + OMV + DSV	NO	1,20E+05	Desconocido	Desconocido
021	Desconocido	F4	1b	LDV + SOF	NO	5,46E+06	Desconocido	Desconocido
022	Desconocido	F4	3a	SOF + PegINF	SÍ	1,77E+05	12	Desconocido
023	NO	F2	3a	DCV + SOF	NO	6,60E+06	12	Desconocido
024	NO	F2	1a	LDV + SOF	NO	4,90E+06	12	Desconocido
025	Desconocido	Desconocido	3a	DCV + SOF	NO	Desconocido	24	Desconocido
026	NO	F3	3a	LDV + SOF	NO	2,19E+06	Desconocido	17,71
027 [^]	SÍ (PegRiba + SMV - SOF)	F2	4d	PTV + OMV	SÍ	9,70E+04	12	Desconocido
028	Desconocido	F2	1b	LDV + SOF	SÍ	Desconocido	12	Desconocido
029	SÍ (PegIFN + TPV + RBV)	F4	1a	SMV + SOF	NO	1,41E+05	12	46,57
030	Desconocido	F4	3a	PTV + OMV	SÍ	6,70E+05	24	Desconocido
031	NO	F4	1a	PTV + OMV + DSV	SÍ	2,79E+06	12	42,57
032	NO	F4	1a	PTV + OMV + DSV	SÍ	3,46E+04	24	26,43
033	NO	F4	1b	SMV + SOF	NO	1,14E+06	12	12,57
034	NO	F4	1a	SMV + SOF	SÍ	Desconocido	12	Desconocido
035	NO	F4	1b	LDV + SOF	SÍ	Desconocido	12	Desconocido
036	NO	F4	4d	LDV + SOF	SÍ	Desconocido	12	Desconocido
037	NO	F4	3a	DCV + SOF	SÍ	Desconocido	12	Desconocido

Anexo

038	Sí (PegIFN + TPV + RBV)	F4	1a	DCV + SOF	NO	Desconocido	24	Desconocido
039	NO	F4	1a	LDV + SOF	SÍ	Desconocido	12	Desconocido
040	NO	F4	3a	LDV + SOF	NO	1,12E+05	24	30,57
041	Desconocido	Desconocido	1b	SOF	SÍ		16	Desconocido
042	Desconocido	Desconocido	4d	PTV + OMV	SÍ	9,30E+06	12	Desconocido
043	Desconocido	Desconocido	4d	SMV + SOF	SÍ	7,40E+05	12	Desconocido
044	Desconocido	Desconocido	1b	PTV + OMV + DSV	SÍ	Desconocido	Desconocido	Desconocido
045	NO	F1	1b	FDV + Deleobuvir	SÍ	Desconocido	12	Desconocido
046	Desconocido	Desconocido	1b	SMV + SOF	SÍ	Desconocido	Desconocido	Desconocido
047	Desconocido	Desconocido	1b	SMV + SOF	SÍ	Desconocido	Desconocido	Desconocido
048	Desconocido	F4	1b	LDV + SOF	NO	4,50E+05	12	9,29
049	Desconocido	Desconocido	1b	LDV + SOF	NO	4,70E+06	12	10,14
050	NO	F3	1b	PegIFN lambda + DCV	SÍ	1,34E+06	Desconocido	Desconocido
051	NO	F4	3a	LDV + SOF	NO	8,50E+05	24	24,86
052	Desconocido	F0-F1	1b	FDV + Deleobuvir	SÍ	1,31E+06	48	229,14
053	NO	F3	1a	LDV + SOF	NO	7,90E+05	8	17,71
054	NO	F0-F1	1a	SMV + PEG	SÍ	1,10E+06	24	13,00
055	Desconocido	Desconocido	1b	DCV + SOF	NO	Desconocido	24	Desconocido
056	NO	F4	1b	SMV + SOF	SÍ	1,78E+07	12	12,29
057	Desconocido	Desconocido	3a	DCV + SOF	NO	Desconocido	12	Desconocido
058	Desconocido	Desconocido	3a	PTV + OMV + DSV	NO	Desconocido	12	Desconocido
059	NO	Desconocido	2j	SOF + PEGINF	SÍ	7,42E+06	12	48,86
060	Desconocido	Desconocido	1b	LDV + SOF	SÍ	Desconocido	Desconocido	Desconocido
061	Desconocido	Desconocido	3a	DCV + SOF	SÍ	Desconocido	12	Desconocido
062	Desconocido	Desconocido	3a	DCV + SOF	SÍ	Desconocido	12	Desconocido
063	NO	F4	1b	DCV + SOF	NO	6,88E+05	24	14,00
064	Desconocido	F4	1b	LDV + SOF	NO	1,03E+06	12	19,00
065	NO	F4	3a	LDV + SOF	SÍ	1,53E+05	24	21,71
066	Desconocido	F4	3a	LDV + SOF	SÍ	8,00E+05	12	Desconocido
067	NO	F4	1b	DCV + SOF	NO	Desconocido	24	Desconocido
068	Desconocido	Desconocido	1b	SMV + SOF	SÍ	Desconocido	12	16,00
069	Desconocido	Desconocido	1b	DCV + SOF	SÍ	Desconocido	12	13,00
070	Desconocido	Desconocido	1a	SMV + SOF	SÍ	Desconocido	12	6,43
071	Desconocido	Desconocido	1a	LDV + SOF	SÍ	Desconocido	12	10,43
072	Desconocido	Desconocido	1a	PTV + OMV + DSV	SÍ	Desconocido	24	Desconocido
073	Desconocido	F4	4d	SMV + SOF	SÍ	6,81E+05	12	59,00
074	Desconocido	20KPa	4d	PTV + OMV	SÍ	1,10E+07	Desconocido	Desconocido
075	Desconocido	Desconocido	1b	SMV + DCV	NO	Desconocido	24	13,86
076	Desconocido	Desconocido	1b	SMV + SOF	SÍ	Desconocido	12	4,00
077	Desconocido	Desconocido	4d (69,3%)+ 1b (30,6%)	LDV + SOF	SÍ	Desconocido	12	13,57
078	Desconocido	Desconocido	4d	SMV + SOF	SÍ	Desconocido	12	11,86

079	NO	F4	3a	SOF	SÍ	Desconocido	24	Desconocido
080	Desconocido	Desconocido	3a	LDV + SOF	SÍ	Desconocido	24	Desconocido
081	Desconocido	Desconocido	3a	DCV + SOF	SÍ	Desconocido	24	Desconocido
082	Desconocido	Desconocido	1b	SMV + SOF	SÍ	Desconocido	24	Desconocido
083	Desconocido	Desconocido	1b	SMV + SOF	NO	Desconocido	12	Desconocido
084	Desconocido	Desconocido	1b	LDV + SOF	SÍ	Desconocido	12	Desconocido
085	Desconocido	F4	3a	PTV + OMV	SÍ	7,50E+04	24	13,00
086	NO	13KPa	1b	LDV + SOF	NO	3,70E+06	8	11,86
087	Desconocido	Desconocido	1b	SMV + SOF	SÍ	Desconocido	12	4,00
088	SÍ (PEG-IFN + TPV + RBV)	F3	1b	LDV + SOF	SÍ	Desconocido	12	Desconocido
089	NO	F4	1b	PTV + OMV + DSV	SÍ	Desconocido	12	Desconocido
090	NO	F4	1b	SMV + SOF	NO	Desconocido	12	Desconocido
091	NO	F4	1b	SMV + SOF	NO	Desconocido	12	Desconocido
092	NO	F4	1a	PTV + OMV + DSV	SÍ	Desconocido	24	Desconocido
093	Desconocido	Desconocido	1b	SMV + SOF	SÍ	Desconocido	12	16,14
094	Desconocido	Desconocido	1b	SMV + SOF	SÍ	Desconocido	12	13,86
095	NO	F1	2c	Uprifosbuvir	NO	4,20E+06	8	8,14
096	NO	F2	1a	PTV + OMV + DSV	SÍ	Desconocido	12	Desconocido
097	Desconocido	Desconocido	1b	SMV + SOF	SÍ	Desconocido	12	11,71
098	Desconocido	Desconocido	1b (80%)+1a (19,9%)	SMV + SOF	SÍ	Desconocido	12	Desconocido
099	Desconocido	Desconocido	1b	SMV + SOF	NO	Desconocido	24	Desconocido
100	Desconocido	Desconocido	1b	SMV + SOF	SÍ	Desconocido	12	Desconocido
101	Desconocido	Desconocido	1b	SMV + SOF	SÍ	Desconocido	12	6,43
102	Desconocido	Desconocido	3a	DCV + SOF	SÍ	9,20E+05	24	20,86
103	Desconocido	Desconocido	3a	DCV + SOF	SÍ	Desconocido	24	14,00
104	Desconocido	F4	3a	DCV + SOF	NO	1,44E+05	24	82,86
105	NO	F4	1b	PTV + OMV + DSV	SÍ	8,30E+05	12	62,43
106	NO	F4	1b	LDV + SOF	NO	1,50E+06	12	20,00
107	NO	F2	1a	LDV + SOF	NO	3,43E+06	12	17,00
108	Desconocido	F1	1a	LDV + SOF	NO	3,45E+06	8	18,71
109	NO	Desconocido	3a	DCV + SOF	NO	4,10E+06	24	20,00
110	NO	F4	1b	LDV + SOF	SÍ	1,01E+05	12	23,57
111	Desconocido	F4	1b	LDV + SOF	SÍ	2,82E+06	12	Desconocido
112	SÍ (Debio + PEG + RBV)	7,8KPa	1a	SMV + SOF	SÍ	7,18E+06	12	79,86
113	Desconocido	F4	1b	LDV + SOF	NO	7,49E+05	12	24,71
114	NO	Desconocido	4d	LDV + SOF	NO	3,16E+05	12	14,43
115	Desconocido	F4	1b	SMV + SOF	NO	7,33E+04	12	78,57
116	Desconocido	F4	3a	DCV + SOF	SÍ	1,26E+05	16	17,43
117	NO	F4	4d	LDV + SOF	NO	7,43E+04	12	73,71
118	NO	F4	1a	LDV + SOF	SÍ	1,79E+05	12	12,00
119	NO	Desconocido	1b	DCV + SOF	NO	1,52E+06	12	31,00
120	NO	Desconocido	1b	LDV + SOF	NO	1,40E+06	12	16,00

Anexo

121	NO	48KPa	4d	SMV + SOF	NO	Desconocido	Desconocido	Desconocido
122	Desconocido	F4	1b	PTV + OMV + DSV	NO	3,56E+05	12	19,00
123	NO	F3	1a	LDV + SOF	NO	3,83E+06	12	16,86
124	NO	F2	3a	DCV + SOF	NO	2,07E+07	12	13,00
125	Desconocido	Desconocido	1a	LDV + SOF	NO	1,87E+06	8	29,71
126	Desconocido	F0-F1	3a	DCV + SOF	SÍ	7,23E+06	12	90,43
127	NO	F2	1a	LDV + SOF	NO	4,33E+06	8	21,29
128	Desconocido	Desconocido	1a	LDV + SOF	NO	9,48E+05	12	56,14
129	NO	F4	4d	LDV + SOF	SÍ	3,93E+06	8	8,57
130	NO	F4	4d	LDV + SOF	SÍ	1,04E+06	12	7,57
131	Desconocido	Desconocido	1b	SMV + DCV	NO	3,31E+05	Desconocido	Desconocido
132	NO	F3	1b	SOF	SÍ	Desconocido	15	10,14
133	NO	F3	1b	LDV + SOF	SÍ	3,23E+05	24	10,71
134	NO	F4	1b	SMV + SOF	SÍ	6,07E+06	12	5,29
135	NO	F4	1b	SMV + SOF	NO	1,99E+05	12	24,71
136	SÍ (LDV + SOF + RBV)	F4	1a	SMV + SOF	SÍ	1,31E+06	24	15,86
137	Desconocido	F3	3a	DCV + SOF	NO	5,95E+06	12	20,14
138	NO	Desconocido	1b	SMV + SOF	NO	3,61E+05	12	79,86
139*	Desconocido	F3	3a	DCV + SOF	NO	2,60E+05	16?	Desconocido
140	Desconocido	Desconocido	3a	LDV + SOF	SÍ	4,80E+06	12	Desconocido
141	NO	F4	1a	LDV + SOF	NO	2,21E+06	12	49,14
142	Desconocido	F4	1a	LDV + SOF	NO	6,00E+05	12	36,86
143	NO	F2	1a	LDV + SOF	NO	1,39E+06	8	Desconocido
144	Desconocido	Desconocido	4d	LDV + SOF	SÍ	Desconocido	12	Desconocido
145	NO	F1	1a	PTV + OMV + DSV	NO	5,37E+06	12	41,57
146	NO	F4	4a (98,5%) + 1b (1,5%)	LDV + SOF	NO	1,40E+05	24	23,00
147	Desconocido	F4	1b	DCV + SOF	SÍ	5,28E+06	12	Desconocido
148	Desconocido	Desconocido	1b	LDV + SOF	NO	9,83E+05	12	Desconocido
149	Desconocido	Desconocido	3a	DCV + SOF	NO	Desconocido	Desconocido	Desconocido
150	Desconocido	Desconocido	3a	DCV + SOF	NO	Desconocido	Desconocido	Desconocido
151	Desconocido	F3	3a	LDV + SOF	NO	8,16E+06	12	37,86
152	Desconocido	Desconocido	1a	LDV + SOF	NO	6,10E+05	24	22,71
153	Desconocido	Desconocido	1b	LDV + SOF	SÍ	Desconocido	12	Desconocido
154	NO	F4	3a	DCV + SOF	NO	1,58E+05	24	Desconocido
155	Desconocido	F4	1a	LDV + SOF	SÍ	6,90E+04	Desconocido	Desconocido
156	Desconocido	Desconocido	1b	DCV + IFN	SÍ	Desconocido	Desconocido	Desconocido
157	NO	F3	1b	LDV + SOF	NO	1,93E+05	8	14,00
158	SÍ (PegIFN + RBV + SMV)	Desconocido	4d	PTV + OMV	SÍ	1,38E+05	24	14,43
159	Desconocido	Desconocido	4d	LDV + SOF	SÍ	6,33E+04	12	45,14
160	Desconocido	Desconocido	3a	LDV + SOF	NO	4,29E+05	12	Desconocido
161	NO	F2	1b	PTV + OMV + DSV	NO	7,02E+05	12	20,14
162	SÍ (SMV + SOF)	F4	1a	LDV + SOF	SÍ	2,60E+06	4	11,14

163	NO	8,3KPa	3a	PTV + OMV + DSV	SÍ	1,70E+06	12	31,14
164	NO	10,4KPa	3a	SOF + PEGINF	SÍ	6,06E+05	12	79,29
165	SÍ (IFN + RBV + SOF)	27,4KPa	3a	DCV + SOF	SÍ	1,96E+06	24	16,00
166	Desconocido	Desconocido	2i	SOF	SÍ	Desconocido	Desconocido	Desconocido
167	Desconocido	Desconocido	1b	SMV + SOF	SÍ	Desconocido	Desconocido	Desconocido
168	Desconocido	Desconocido	1b	LDV + SOF	SÍ	Desconocido	Desconocido	Desconocido
169	Desconocido	Desconocido	1b	LDV + SOF	SÍ	Desconocido	Desconocido	Desconocido
170	NO	9,8KPa	1a	PTV + OMV + DSV	NO	4,85E+06	12	48,71
171	NO	F4	1l	LDV + SOF	SÍ	1,09E+06	12	18,00
172	SÍ (SMV + SOF + RBV)	F3-F4	4d	LDV + SOF	SÍ	7,05E+05	24	12,57
173	NO	F4	1a	PTV + OMV + DSV	NO	5,39E+05	12	25,43
174	Desconocido	F4	4d	LDV + SOF	NO	9,66E+05	12	9,86
175	NO	F2	3a	DCV + SOF	NO	1,87E+06	12	14,00
176	NO	F3	3a	DCV + SOF	NO	7,00E+06	12	44,86
177	Desconocido	Desconocido	3a	DCV + SOF	NO	1,33E+04	24	75,14
178	NO	F4	1a	LDV + SOF	NO	4,49E+06	12	37,00
179	Desconocido	Desconocido	1a	LDV + SOF	NO	2,03E+04	12	19,00
180	NO	F2	4d	PTV + OMV	SÍ	1,40E+05	12	13,71
181	NO	F3	1a	LDV + SOF	NO	1,30E+07	12	12,71
182		F4	1b	LDV + SOF	NO	1,23E+06	12	24,00
183	NO	Desconocido	4d (96,7%) + 3a (3,3%)	PTV + OMV	SÍ	1,59E+06	12	3,43
184		F3	1a	SMV + DCV	SÍ	1,41E+06	24	57,43
185	NO	F2	1a	LDV + SOF	NO	2,54E+04	8	22,00
186	NO	F4	1b	LDV + SOF	NO	3,44E+05	12	13,71
187	NO	F4	1b	LDV + SOF	NO	1,57E+06	24	0,43
188	NO	F3	1b	LDV + SOF	NO	6,57E+05	12	12,71
189	Desconocido	Desconocido	4d	LDV + SOF	SÍ	Desconocido	Desconocido	Desconocido
190	Desconocido	Desconocido	1b	ABT493 + ABT530	NO	Desconocido	Desconocido	Desconocido
191	Desconocido	Desconocido	4d	PTV + OMV	SÍ	4,03E+06	12	34,00
192	Desconocido	Desconocido	1a	LDV + SOF	NO	Desconocido	12	Desconocido
193	Desconocido	F2	1a	LDV + SOF	NO	1,72E+06	8	12,29
194	SÍ (PTV + OMV + DSV + RBV)	Desconocido	4d	LDV + SOF	SÍ	6,24E+04	Desconocido	Desconocido
195	NO	Desconocido	1b	SMV + SOF	SÍ	1,64E+06	12	100,14
196	NO	F2	1b	LDV + SOF	NO	4,50E+06	8	14,14
197	Desconocido	Desconocido	4d	GZR + Elbasvir	SÍ	1,45E+06	12	106,71
198	NO	F1	1a	LDV + SOF	NO	3,80E+06	8	14,00
199	NO	F4	1a	LDV + SOF	NO	4,52E+04	12	5,71
200	NO	F4	3a	DCV + SOF	SÍ	3,48E+05	12	2,71
201	Desconocido	Desconocido	3a	DCV + SOF	SÍ	3,22E+07	24	34,71
202	SÍ (LDV + SOF + RBV)	Desconocido	4d	PTV + OMV	SÍ	2,23E+06	12	3,86
203	NO	Desconocido	2j	SOF	SÍ	3,52E+05	16	35,57

Anexo

204	NO	F3	1a	LDV + SOF	NO	1,00E+07	12	27,57
205	SÍ (SMV + SOF)	F4	1a	DCV + SOF	NO	6,32E+05	24	18,86
206	Desconocido	F4	1b	LDV + SOF	NO	1,26E+06	12	6,86
207[^]	SÍ (PTV + OMV)	F3	4d	LDV + SOF	SÍ	3,43E+05	24	0,86
208	NO	F1	1a	PTV + OMV + DSV	NO	Desconocido	12	Desconocido
209	NO	F4	1a	LDV + SOF	SÍ	Desconocido	12	Desconocido
210	NO	F4	1a	LDV + SOF	SÍ	Desconocido	12	Desconocido
211	NO	F1	4d	PTV + OMV	SÍ	Desconocido	12	Desconocido
212	NO	F1	1a	PTV + OMV	NO	Desconocido	12	Desconocido
213	SÍ (IFNpeg/RBV + TPV)	F3	1b	SMV + SOF	NO	Desconocido	12	Desconocido
214	NO	F4	3a	DCV + SOF	NO	Desconocido	24	Desconocido
215	NO	F4	3a	DCV + SOF	NO	Desconocido	24	Desconocido
216	SÍ (SMV + SOF)	F3	1b	LDV + SOF	NO	Desconocido	12	Desconocido
217	Desconocido	Desconocido	1b	LDV + SOF	NO	8,73E+05	12	79,86
218	NO	Desconocido	1b	SOF	SÍ	1,54E+05	4	6,57
219	Desconocido	F0-F1	1a	PTV + OMV	SÍ	1,17E+06	12	1,29
220*	SÍ (DCV + SOF)	Desconocido	3a	GZR + Elbasvir + SOF	NO	7,00E+07	Desconocido	Desconocido

[^] Paciente con fallo terapéutico a dos tratamientos distintos.

* Paciente con fallo terapéutico a dos tratamientos distintos.

¹ Tiempo transcurrido des del fin del tratamiento hasta la extracción de la muestra.