




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>

Tesis doctoral

Estudio de dos situaciones especiales en pacientes con infección crónica por el virus de la hepatitis B: Eficacia y seguridad de los análogos de nucleós(t)idos de segunda generación en una cohorte de práctica clínica real y nuevos biomarcadores para la identificación de portadores inactivos.

María del Mar Riveiro Barciela

Directora y tutora

Dra. María Buti Ferret

Departamento de Medicina,
Programa de doctorado de Medicina,
Facultad de Medicina,
Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2016

UAB
Universitat Autònoma
de Barcelona

A mi madre

Agradecimientos

Si alguien merece una primera mención esa es sin duda mi mentora y directora de tesis, la Dra Buti. Gracias María por todo lo que me has enseñado durante estos años y la paciencia que has tenido conmigo.

Agradecer también al jefe de servicio el Dr Rafael Esteban. Sin la confianza que depositó en mí desde el principio, ni esta tesis ni otros logros hubieran tenido lugar.

Al resto de adjuntos del servicio de Hepatología con los que he tenido el privilegio de trabajar y aprender durante estos años: Joan Córdoba, Víctor Vargas, Joan Genescà, Lluís Castells, Beatriz Mínguez, Antonio González, y en especial Lluís Viladomiu y Nyanyo Esteban.

A todos los compañeros del laboratorio, sin los cuales esta tesis no hubiera sido posible. Gracias Paco por tus consejos y tus teorías; David por tu gran ayuda con todo el trabajo de la cuantificación del HBsAg y con la base de datos del CIBERHEP; María Homs, Chari Casillas, María Blasi, Marta Bes y Silvia Sauleda por todo el trabajo que dio lograr genotipar a los portadores. Me siento una privilegiada por poder formar parte de este gran equipo.

Una mención especial se merecen la gran familia de los *nefastos*, sobre todo a mis dos *R* y hermanas mayores, Eva y Meritxell. Gran parte de los que sé es gracias a vosotras. También mis compañeros de fatigas de urgencias, de los que tanto he aprendido y con los que he compartido tantos “momentos cuñero”, en especial Serafín, Alfredo, Eli, Ada, Sheila, Isi y Francisco Ramón. También a mis digestólogas de referencia (Virginia y Ana), a mi Reumatóloga favorita (Estefanía) y a mis pequeños *padawan* (Jaume y Jordi), por tantos buenos momentos que hemos pasado juntos y por la paciencia que han tenido en los malos tiempos.

Agradecer a las chicas de la casita azul su ayuda, y a mis primeras compañeras de faenas: María Torrents, Mónica y sobre todo Maca, por su apoyo en esa primera etapa de cambalache entre urgencias y consultas.

A mis “niñas”: Fátima, Iria, Andi, Inés, Aurora y Lore, porque a pesar de la distancia siempre habéis estado ahí...y sé que seguiréis estando.

And “last but not least” a mi familia, a mis niños (Pakuco, Helen, Luchi), mis hermanas y sobre todo a la persona que me ha enseñado todo aquello que no sale en los libros: a no rendirme nunca, a saber buscar siempre el lado positivo de las cosas y a aprender a amoldarse a las adversidades. Mamá, no hay tesis suficientes para agradecerte todo lo que de ti he aprendido.

ÍNDICE

I. Introducción

Virus de la hepatitis B

Epidemiología del virus de la hepatitis B

Fases de la infección crónica por el virus de la hepatitis B

Utilidad de la elastografía de transición en la hepatitis B

Tratamiento de la hepatitis crónica B

Cuantificación de los niveles de HBsAg

Utilidad clínica de los niveles de HBsAg en pacientes sin tratamiento antiviral

Utilidad clínica de los niveles de HBsAg en pacientes en tratamiento antiviral

Antígeno relacionado con el core de la hepatitis B

Eficacia del tratamiento antiviral con análogos de nucleós(t)idos

Riesgo de carcinoma hepatocelular en pacientes con hepatitis crónica B

Seguridad del tratamiento antiviral con análogos de nucleós(t)idos

II. Justificación de la unidad temática de la tesis

III. Estudio 1

Eficacia y seguridad de los análogos de nucleós(t)idos de segunda generación en una cohorte de pacientes caucásicos con hepatitis crónica B. Validación de la puntuación Page-B en una cohorte de práctica clínica real.

Hipótesis y objetivos

Método

Resultados

Discusión

IV. Estudio 2

El HBcrAg es más útil que el HBsAg para la identificación de portadores inactivos de la hepatitis B, e independiente del genotipo

Hipótesis y objetivos

Método

Resultados

Discusión

V. Conclusiones

VI. Bibliografía

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNccc: Ácido desoxirribonucleico circular covalentemente cerrado.

ADNrc: Ácido desoxirribonucleico circular relajado.

AEEH: Asociación Española para el Estudio del Hígado.

ANs: Análogos de nucleós(t)idos.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNpg: Ácido ribonucleico pregenómico.

Anti-HBe: Anticuerpo contra el antígeno e de la hepatitis B.

CHC: Carcinoma hepatocelular.

CPT: Child-Pugh-Turcotte.

EASL: European Association for the Study of the Liver.

ET: Elastografía de transición.

ETV: Entecavir.

GT: Genotipo.

HR: Hazard radio.

HCB: Hepatitis crónica B.

HBcrAg: Antígeno relacionado con el core de la hepatitis B.

HBeAg: Antígeno e de la hepatitis B.

HBsAg: Antígeno de superficie de la hepatitis B.

kPa: Kilopascales.

MELD: Model for end-stage liver disease.

mL: Mililitro.

nm: Nanómetros.

PI: portador inactivo.

pegIFN: Interferón pegilado.

TDF: Tenofovir disoproxil fumarato.

UI: Unidades internacionales.

VHB: Virus de la hepatitis B.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

VPP: Valor predictivo positivo.

VPN: Valor predictivo negativo.

I. Introducción

Virus de la hepatitis B

El virus de la hepatitis B (VHB) es un virus ácido desoxirribonucleico (ADN) perteneciente a la familia *Hepadnaviridae*. Los viriones del VHB, también denominados partículas de DANE, son partículas esféricas de 42-45 nanómetros (nm) con una cubierta lipoproteica que contiene 3 glicoproteínas o antígenos de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y un núcleo o proteína del core que contiene el genoma viral y una polimerasa necesaria para la síntesis del ADN viral en los hepatocitos infectados. El genoma de ADN está formado por una doble cadena circular incompleta de aproximadamente 3.200 nucleótidos de longitud ¹⁻³. La replicación del VHB puede sintetizarse en las siguientes etapas: 1) liberación del ADN circular relajado (ADNrc) en los hepatocitos y conversión a ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc) en el interior de su núcleo, 2) transcripción de cuatro diferentes ácidos ribonucleicos (ARN) a partir del ADNccc, 3) exportación de estos ARN al citoplasma del hepatocito, donde uno de ellos, el ARN pregenómico (ARNpg), es empaquetado selectivamente dentro de nuevas partículas del core, 4) síntesis de ADNrc mediante la transcripción reversa del ARNpg, 5) envoltura y liberación como viriones de estas partículas del core o bien transporte de nuevo al núcleo de los hepatocitos para generar más ADNccc ⁴⁻⁶.

EL VHB en su ciclo replicativo tiene una variabilidad elevada con una tasa de sustitución de nucleótidos estimada de $1.4-3.2 \times 10^{-5}$ por sitio y año ⁷. Esta variabilidad es debida a errores de la actividad reparadora de la transcriptasa inversa durante el proceso de replicación viral. La variabilidad genómica ocasiona que existan varios genotipos (GTs) del VHB, subtipos y mutaciones en diferentes regiones así como quasiespecies. En la actualidad se reconoce la existencia de 10 GTs diferentes del VHB, cada uno con una distribución geográfica característica ⁸, siendo el A predominante en el norte de Europa y Estados Unidos, B y C en Asia, D en el sur de Europa, E en África y H y F en Sudamérica ⁹.

Además de la partícula completa de DANE, por microscopia electrónica se visualizan en el suero de los pacientes infectados por VHB, en una proporción unas 10.000 veces

mayor que los viriones, otras estructuras no infecciosas constituidas sólo por HBsAg que se conocen como partículas filamentosas, de 20 nm, y partículas esféricas, de 17-25 nm³.

Epidemiología de la infección por el virus de la hepatitis B

A nivel mundial se estima que unos 350-400 millones de personas son portadoras de antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, y por lo tanto presentan una infección crónica por el VHB, y unas 600.000 mueren cada año como consecuencia de la infección¹⁰⁻¹². En España, se estima que aproximadamente el 0.7% de la población está afectada de infección crónica por VHB¹³, cifra que probablemente haya aumentado en los últimos años debido al incremento de población inmigrante de zonas dónde la infección por VHB es endémica, como África subsahariana o el sudeste asiático⁹.

Las principales vía de transmisión del VHB incluyen, la horizontal, por el empleo de drogas por vía intravenosa, contacto sexual o transfusión de hemoderivados contaminados, y la transmisión vertical, de madres a hijos, que continúa siendo una de las vías primordiales para la persistencia de la infección, sobre todo en zonas dónde la hepatitis B es endémica¹⁴. El riesgo de cronicidad tras la infección aguda varía según la edad del sujeto en el momento de la infección, siendo del 80-90% entre los neonatos infectados nacidos de madres antígeno e del VHB (HBeAg) positivo, 30% en niños menores de los 6 años, 16% entre los 5-9 años y 7% en niños infectados entre los 10 y 19 años^{15,16}.

Fases de la infección crónica por el virus de la hepatitis B

La infección crónica por el VHB es un proceso dinámico de interacción entre el virus, los hepatocitos y el sistema inmune del paciente¹⁷. Esquemáticamente se puede resumir en las siguientes 5 fases^{18,19}: 1) fase de inmunotolerancia, que es típica de pacientes jóvenes HBeAg positivo, ocurre cuando la infección se adquiere por transmisión vertical, y se caracteriza por niveles elevados de ADN VHB y valores normales de alanina aminotransferasa (ALT), siendo la lesión hepática leve o ausente; 2) fase de aclaramiento inmune ó hepatitis crónica B (HCB) HBeAg positivo, que se caracteriza

por la presencia de HBeAg positivo, aunque con menor nivel de replicación que la fase de inmunotolerancia, y niveles fluctuantes de ALT, y un aumento de la actividad histológica con posibilidad de progresión de la fibrosis. Esta fase puede conducir a negativización del HBeAg y seroconversión a anti-HBe, aunque los pacientes que permanecen durante años en esta fase, sobre todo si presentan brotes repetidos de necrosis, pueden desarrollar cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC); 3) fase de portador inactivo (PI) del VHB, que se produce tras la seroconversión a anti-HBe, con niveles normales de ALT, en general ADN VHB <2.000 unidades internacionales (UI)/mililitro (mL), aunque algunos portadores inactivos pueden tener valores de ADN VHB entre 2.000 y 20.000 UI/mL, y lesión hepática leve; 4) HCB HBeAg negativo, que es la forma más frecuente HCB en España, y se caracteriza por fluctuaciones en los niveles de ALT y ADN VHB, y se asocia con mayor riesgo de progresión de la fibrosis; 5) fase de remisión, con pérdida del HBsAg, con o sin desarrollo de anti-HBs.

Las características serológicas, virológicas y bioquímicas de las diferentes fases de la infección crónica por el VHB se resumen en la tabla 1.

	HBsAg	HBeAg	Anti-HBc	Anti-HBc IgM	Anti-HBs	ADN VHB	ALT
Infección aguda	+	+	+	+	-	Elevado	Muy elevada
Inmunotolerancia	+	+	+	-	-	Elevado	Normal
HCB HBeAg +	+	+	+	-	-	>20.000 UI/mL	Elevada
Portador inactivo	+	-	+	-	-	<20.000 UI/mL	Normal
HCB HBeAg -	+	-	+	-	-	>2.000 UI/mL	Elevada/N
Infección curada	-	-	+	-	+/-	Indetectable*	Normal
Vacunación	-	-	-	-	+	Indetectable	Normal

Tabla 1. Fases de la infección por el virus de la hepatitis B.

*En ocasiones puede haber replicación a títulos bajos (ADN VHB < 200 UI/mL) en caso de Infección B oculta.

Los pacientes con infección crónica por VHB sin tratamiento, tienen un riesgo de desarrollar cirrosis que varía del 8 al 20% a los 5 años, siendo superior en los pacientes

con HCB HBeAg negativo que en aquellos que están en la fase de aclaramiento inmune ó HCB HBeAg positivo. Todos los pacientes con infección crónica por el VHB pueden desarrollar como complicación CHC. Sin embargo la incidencia de CHC es mucho más elevada en los pacientes con cirrosis hepática. En esta situación el riesgo de CHC a los 5 años puede alcanzar hasta el 17% en el sudeste asiático y el 10% en el Oeste de Europa y Estados Unidos ¹⁸. En caso de descompensación de la cirrosis, la probabilidad estimada de supervivencia es del 14-35% a los 5 años ²⁰.

Utilidad de la elastografía de transición en la hepatitis B

La elastografía de transición (ET) (Fibroscan©, Echosens, París, Francia) es una técnica sencilla y reproducible que, mediante la combinación de ultrasonidos y ondas de baja frecuencia, estima de forma no invasiva el grado de elasticidad hepática ²¹. Inicialmente fue empleado en pacientes con hepatitis crónica C, en los que los puntos de corte de 7.1 kilopascals (kPa) y 12.5 kPa, presentaban una exactitud diagnóstica en relación con la biopsia hepática del 83% y 95% para fibrosis moderada (METAVIR \geq F2) y cirrosis hepática, respectivamente ²². Con respecto a la infección por VHB, todos los trabajos realizados al respecto han mostrado que la ET tiene mayor capacidad diagnóstica para la identificación de cirrosis que de fibrosis significativa ²³⁻²⁶, variando los puntos de corte descritos entre 11 y 14 kPa. Para la detección de fibrosis hepática al menos significativa, criterio de tratamiento en pacientes con HCB y ADN VHB >2.000 UI/mL, los puntos de corte descritos oscilan entre 5.2 y 8.3 kPa, motivo por el que incluso se ha llegado a proponer un punto de corte dual (FS>9.4 kPa positivo y <6.2 kPa negativo) que presentó una exactitud del 90% en una cohorte de 217 sujetos con HCB y que fue independiente de los niveles de ALT ²⁷. Más recientemente, un trabajo con 357 pacientes con HCB HBeAg negativo corroboró que ningún caso con ET <6.5 kPa presentaba fibrosis moderada ²⁸. Además, se debe tener en cuenta que la presencia de niveles elevados de ALT pueden sobrevalorar los valores de ET ²⁹. Por todo ello, a día de hoy sigue sin haber un punto de corte unificado de ET que permita la correcta identificación de pacientes con fibrosis moderada, dato que sería de gran utilidad sobre todo en aquellos casos en la denominada zona gris (ADN VHB entre 2.000 y 20.000 UI/mL y/o ALT inferior a dos veces el límite alto de la normalidad) ^{19, 30}.

Tratamiento de la hepatitis crónica B

Objetivo del tratamiento de la hepatitis crónica B

El principal objetivo del tratamiento de la HCB es incrementar la supervivencia de los pacientes, evitando el desarrollo de fibrosis hepática por medio de la supresión mantenida de la replicación viral^{19,30}. Además, el control persistente de la infección se ha asociado con mejoría histológica³¹, con disminución del riesgo de progresión a cirrosis y de desarrollo de CHC^{32,33}. La finalidad última del tratamiento es la pérdida del HBsAg y seroconversión a anti-HBs, dado que la infección por VHB no puede ser completamente eliminada ya que el ADNccc del VHB queda integrado en el núcleo de los hepatocitos. Esta situación se conoce como “cura funcional” de la infección y se asocia a una disminución significativa de la mortalidad global y del riesgo de CHC, incluso en aquellos sujetos en fase de cirrosis³⁴. Sin embargo, sólo un pequeño porcentaje de pacientes tratados de forma finita con Interferón pegilado (pegIFN) o durante muchos años con análogos de nucleós(t)idos (ANs) alcanzan dicho objetivo. Por tanto, la principal finalidad del tratamiento en los pacientes con HCB es la supresión mantenida de la replicación viral, así como la pérdida del HBeAg y seroconversión a anti-HBe en aquellos pacientes con infección crónica HBeAg positivo^{19,30}.

Indicaciones de tratamiento.

Tanto en los pacientes HBeAg positivo como negativo, los criterios de tratamiento antiviral son^{19,30}:

- Niveles de ALT por encima del doble de los valores normales junto con ADN VHB >20.000 UI/mL.
- ADN VHB >2.000 UI/mL y presencia de al menos un grado moderado de necroinflamación o fibrosis hepática, independientemente de los niveles de ALT.
- Cirrosis hepática con ADN VHB detectable.

- En los pacientes inmunotolerantes (HBeAg positivo con niveles persistentemente normales de ALT) mayores de 30 años el tratamiento debe individualizarse y puede valorarse en caso de presentar antecedentes familiares de cirrosis o CHC.

Tipos de tratamiento

Actualmente existen dos tipos de terapias aprobadas para el tratamiento de la hepatitis crónica B: los ANs que actúan inhibiendo la transcriptasa reversa, y el Interferón alfa. Las estrategias terapéuticas incluyen tratamiento a largo plazo con un análogo nucleósido, como entecavir (ETV) o de nucleótido como tenofovir disoproxil fumarato (TDF), o bien tratamiento finito con Interferón-alfa pegilado (pegIFN).

Interferón-alfa pegilado

El tratamiento con pegIFN tiene la ventaja de tener una duración limitada (48 semanas), no induce resistencias, y a día de hoy es la terapia que logra con mayor probabilidad la pérdida del HBsAg (hasta 7% tras 1 año de tratamiento en sujetos HBeAg positivo ³⁵). Sin embargo, su administración por vía parenteral, y sobre todo su mala tolerancia debido a un importante número de efectos adversos (síndrome pseudogripal, alteraciones hematológicas...), obligan a reducir la dosis en aproximadamente el 25% de los pacientes y a interrumpirlo precozmente en el 5%. Además, este fármaco está contraindicado en pacientes con cirrosis descompensada, enfermedades neurológicas o trastornos psiquiátricos graves, enfermedades autoinmunes o citopenias. El grupo de pacientes en el que mayor beneficio aporta es en aquellos con hepatitis crónica HBeAg positivo, en los que induce conversión a anti-HBe en casi un tercio de los casos ^{35, 36}. Ciertos factores como edad joven, GT del VHB (A y B), bajos niveles de ADN VHB (<2x10E8 UI/mL) y niveles de ALT elevados se asocian a una mayor probabilidad de respuesta. Además, durante el tratamiento existen otros factores predictores de respuesta como son la disminución de los niveles de ADN VHB <20.000 UI/mL en la semana 12 de tratamiento (que se ha asociado con una probabilidad del 50% de seroconversión a anti-HBe) ³⁷ y disminución en los niveles de HBsAg por debajo de 1.500 UI/mL, que también se han asociado con altas tasas de pérdida del HBeAg ^{38, 39}.

Análogos de nucleós(t)idos

Los fármacos orales se clasifican como análogos de nucleósidos (Lamivudina, Telbivudina y ETV) o de nucleótidos (Adefovir y TDF). Dos de ellos son más potentes y poseen una barrera genética más alta, ETV y TDF, motivo por el que actualmente son los fármacos de elección.

La principal ventaja que presentan frente al pegIFN es su vía de administración, ya que todos los análogos son tratamientos orales, y de excelente tolerancia. Sin embargo, se tratan de tratamientos a largo plazo, a veces de por vida, dado que el seroaclaramiento del HBsAg y conversión a anti-HBs tan sólo se consigue en aproximadamente el 11% de los pacientes HBeAg positivo y <1% de los HBeAg negativo ^{19, 40, 41}. En los pacientes HBeAg positivo se puede realizar un tratamiento “finito” con ANs hasta alcanzar la seconversión a anti-HBe, que se ha descrito hasta en el 39.6% de los pacientes tras 7 años de terapia antiviral ⁴¹, aunque se recomienda mantener el tratamiento un mínimo de 12 meses más tras la seroconversión a anti-HBe.

La presencia de rebote virológico (aumento de los niveles de ADN VHB >1 log o nivel detectable tras 2 determinaciones consecutivas indetectables) durante el tratamiento con ETV o TDF suele ser secundaria a falta de adherencia. En los pacientes con buen cumplimiento terapéutico debe investigarse la posibilidad de desarrollo de resistencias, aunque hasta ahora no se han descrito resistencias a TDF y tan sólo en el 1.2% de los sujetos naïve tratados con ETV durante más de 6 años ^{41, 42}, porcentaje que aumenta significativamente en los pacientes tratados previamente con lamivudina.

Cuantificación de los niveles de HBsAg

Desde su descubrimiento por Blumberg en 1965, el HBsAg se ha convertido en el marcador de infección por el VHB ⁴³. La importancia de la cuantificación del HBsAg radica en que refleja la actividad transcripcional del ADNccc, plantilla para la replicación viral en el núcleo de los hepatocitos ^{44, 45}. Tanto los niveles de ADN VHB como de HBsAg fluctúan durante las fases de la infección crónica por VHB, siendo muy elevadas en la fase de inmunotolerancia, disminuyendo con el paso de los años, a excepción de las fases de reactivación (tabla 2). Los niveles de HBsAg están

controlados, al menos en parte, por la cantidad de ADNccc intrahepático así como la respuesta inmune específica contra las proteínas de la envoltura del VHB. Por tanto, los cambios en los niveles de HBsAg pueden ser útiles como sucedáneos de las variaciones de ADNccc en el hígado, y del número de hepatocitos infectados, especialmente en pacientes HBeAg positivo donde existe una mayor correlación entre ambos ⁴⁶⁻⁵⁰. A este respecto, en una cohorte europea de 226 pacientes con HCB HBeAg positivo, se objetivó una correlación positiva entre los niveles de HBsAg y de ADN VHB en suero ($r = 0.69$) y también con los niveles de ADNccc intrahepático ($r=0.71$) ⁴⁷, poniendo de manifiesto la utilidad del HBsAg como marcador de replicación del VHB.

La incorporación en los últimos años de técnicas comerciales que permiten la cuantificación de los niveles de HBsAg ha propiciado su estudio como posible biomarcador pronóstico. Sin embargo, se debe tener en cuenta que hay ciertos factores que influyen su interpretación, siendo uno de los más relevantes a éste respecto el GT del VHB y/o el HBeAg. Las primeras técnicas de radioinmunoanálisis y enzimoimmunoanálisis para la determinación del HBsAg se desarrollaron en los años 70. Desde entonces han aparecido diferentes ensayos serológicos que son capaces de medir de forma cualitativa los valores de HBsAg con una elevada sensibilidad y especificidad. El HBsAg es el marcador de laboratorio más importante en el diagnóstico de la infección aguda y crónica por VHB, siendo habitualmente detectable a las 6-10 semanas de la exposición al virus. La detección en suero se efectúa mediante enzimoimmunoanálisis que utiliza anticuerpos frente al determinante «a» del HBsAg de elevadas especificidad (99,5%) y sensibilidad ($< 0,15$ ng/mL), lo que ha permitido disminuir sensiblemente el período ventana de la infección. La presencia del HBsAg es un signo de producción de la envuelta vírica, pero no constituye un marcador de replicación viral al ser positivo en todos los portadores crónicos de la infección, independientemente de la actividad de la misma. En los últimos años también se han desarrollado ensayos capaces de cuantificar los valores de HBsAg. En el momento actual se dispone de diferentes ensayos automatizados en los sistemas Architect system (Abbott), Elecsys II (Roche), ADVIA Centaur HBsAg (Bayer) y Hepanostika (Biomérieux). Sin embargo, de todas ellas la más utilizada y con información clínica disponible es la cuantificación del HBsAg mediante el sistema Architect de Abbott ⁵¹⁻⁵⁴.

La determinación de los niveles de HBsAg es técnicamente más sencilla y de menor coste (20 veces menos) que la determinación de los niveles de ADN VHB.

Tabla 2. Niveles de HBsAg en las diferentes fases de la infección por VHB.

Autor, año	Genotipo VHB	Inmunotolerancia	Aclaramiento inmune ó HCB HBeAg positivo	Portador inactivo	HCB HBeAg negativo
Nguyen, 2010 ⁴⁶	B/C (100%)	4.53 logUI/mL (N= 32)	4.03 logUI/mL (N=55)	2.86 logUI/mL (N=50)	3.35 logUI/mL (N=83)
Thompson, 2010 ⁴⁷	B (47%) C (40%) D (11%)	-	9.5 logUI/mL (N=71)	1.64 logUI/mL (N=21/57**)	
Jaroszewicz, 2010 ⁴⁸	A (17%)* B/C (7%) D (40%)	4.96 logUI/mL (N= 30)	4.37 logUI/mL (N=48)	3.09 logUI/mL (N=68)	3.87 logUI/mL (N=68)
Chan, 2011 ⁴⁹	C (58%)	4.97 logUI/mL (N=7)	3.78 logUI/mL (N=25)	2.24 logUI/mL (N=22)	2.98 logUI/mL (N=46)
Kim, 2010 ⁵⁰	ND\$	4.29 logUI/mL (N= 56)	3.64 logUI/mL (N= 150)	2.05 logUI/mL (N= 274)	3.23 logUI/mL (N= 165)

* Hasta en el 34% de los pacientes no se realizó determinación del genotipo. ** Los datos de los pacientes HBeAg negativo (21 portadores inactivos y 57 con hepatitis crónica activa) se mostraron de forma conjunta. \$ Datos sobre el genotipo del VHB no estaban disponibles, pero estudios previos mostraron que el 98-100% de la población de Korea portadores del VHB estaban infectados por el genotipo C.

Utilidad clínica de los niveles de HBsAg en pacientes sin tratamiento antiviral

1. Pacientes con hepatitis B HBeAg positivo

Tal y como se resume en la tabla 2, diferentes estudios han mostrado la evolución de los niveles de HBsAg en las diferentes fases de la infección por VHB, siendo más elevados

en la fase de inmunotolerancia que en la de aclaramiento inmune ó HCB HBeAg positivo en todos los GTs. Algunos de los estudio realizados en países asiáticos, dónde los GTs predominantes son el B y C, han mostrado niveles medios de HBsAg estadísticamente diferentes entre estas dos fases de la enfermedad, siendo los niveles de HBsAg de aproximadamente 5 logUI/ml en los pacientes inmunotolerantes y de 3-4 logUI/mL en los sujetos en fase de aclaramiento inmune ⁴⁹. También en los estudios realizados en Europa, los niveles de HBsAg fueron superiores en los inmunotolerantes ^{46, 48}. Por esta razón, la presencia de niveles de HBsAg superiores a 5 logUI/mL se consideran sugestivos de inmunotolerancia, siendo una herramienta útil para diferenciar esta fase de la aclaramiento inmune, principalmente en pacientes HBeAg positivo con niveles normales de transaminasas y carga viral elevada.

En los pacientes HBeAg positivo también se ha postulado que los niveles de HBsAg podrían servir como marcadores de lesión hepática. Un estudio realizado en Asia que incluyó 56 pacientes mostró que el punto de corte de 4.4 logUI/mL de HBsAg diferenciaba entre ausencia de fibrosis o fibrosis leve (Ishak score 0 o 1) y significativa (Ishak score ≥ 2) con un valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de 92.7% y 60% respectivamente ⁵⁵. Otro trabajo realizado en Francia por Marcellin *et al* demostró una correlación inversa entre los niveles de HBsAg y el grado de lesión hepática ($r = 0.43$), es decir, menores niveles de HBsAg se asociaron con un mayor grado de fibrosis en la biopsia hepática ⁵⁶. En este mismo estudio, se propuso el punto de corte de 3.85 logUI/mL para identificar a los pacientes GT B o C con fibrosis significativa (Ishak score ≥ 2), aunque este dato debe ser interpretado con cautela ya que procede de un subgrupo de tan sólo 36 pacientes ⁵⁶.

2. Pacientes con hepatitis B HBeAg negativo.

En los pacientes HBeAg negativo, una de las dificultades en práctica clínica habitual es su identificación como PIs. Esta etapa de la infección por el VHB está definida por niveles persistentemente normales de ALT, ADN VHB < 2.000 UI/mL (aunque a veces pueden situarse entre 2.000 y 20.000 UI/mL) y ausencia de fibrosis hepática significativa. Los pacientes con hepatitis crónica HBeAg negativo pueden presentar tanto oscilaciones en los niveles de ALT como de ADN VHB, que puede variar y ser inferiores a 2.000 UI/mL, requiriéndose en ocasiones de múltiples determinaciones

analíticas o biopsia hepática para su correcta clasificación. Como recoge la tabla 2, los niveles medios de HBsAg tienden a ser inferiores en los PIs que en los pacientes con HCB HBeAg negativo, tanto en los estudios realizados en Asia como en Europa. A este respecto, un estudio prospectivo realizado en Italia con más de 200 pacientes infectados por el GT D, mostró que la combinación de niveles de HBsAg <1.000 UI/mL y ADN VHB ≤ 2.000 UI/mL en una única determinación analítica era capaz de clasificar a los pacientes como PIs con un VPP del 87.9% y VPN del 96.7%⁵⁷. Otro trabajo realizado en Francia, con 122 pacientes infectados por GTs A o E, la combinación de ADN VHB ≤ 2.000 UI/mL y HBsAg <2.000 UI/mL presentó una especificidad del 100% para la identificación de verdaderos PIs del VHB⁵⁸. Más recientemente, en un trabajo multicéntrico retrospectivo que incluyó 292 pacientes HBeAg negativo seguidos durante una mediana de 8 años (rango 4-9 años), la combinación de HBsAg <100 UI/mL y ADN VHB ≤ 2.000 UI/mL identificó con una especificidad del 98% y VPP a los verdaderos PIs del VHB (definidos como niveles de ALT persistentemente normales y ADN VHB ≤ 2.000 UI/mL durante todo el seguimiento) independientemente del GT del VHB⁵⁹. Asimismo, en los PIs también se ha propuesto que los niveles de HBsAg podrían ser una herramienta útil para predecir la eliminación espontánea del HBsAg. Por ejemplo, un estudio realizado en China con 103 pacientes seguidos a lo largo de 11 años el punto de corte de HBsAg <100 UI/mL presentó una sensibilidad de 75% y especificidad del 91% para la identificación de aquellos pacientes que seroclararían de manera espontánea el HBsAg⁶⁰. En otro realizado en Taiwán, la presencia de HBsAg <100 UI/mL al año de la seroconversión espontánea a anti-HBe, se asoció con una probabilidad 24 veces mayor de perder el HBsAg en comparación con los sujetos con HBsAg >1.000 UI/mL⁶¹. Por lo tanto, los datos de mayor probabilidad de eliminación espontánea del HBsAg se centran principalmente en pacientes infectados por GT B o C. Recientemente en Alemania, en una cohorte prospectiva de 602 sujetos HBeAg negativo sin criterios de tratamiento, se observó una mayor caída anual en los niveles de HBsAg en los pacientes que seroclaraban el HBsAg o presentaban seroconversión a anti-HBs (2.33 y 3.76 logUI/mL, respectivamente) en comparación con los sujetos que no perdían el HBsAg. Sin embargo, debe puntualizarse que la tasa tanto de seroclaramiento como de seroconversión fueron bajas (5.4% y 3.3% respectivamente)⁶².

Utilidad clínica de los niveles de HBsAg en pacientes en tratamiento antiviral

1. Monitorización de pacientes que reciben tratamiento antiviral

Interferón pegilado

En los pacientes HBeAg positivos los niveles de HBsAg se correlacionan con los de ADNccc intrahepático, por lo que la disminución en los títulos de HBsAg podría ayudar a identificar a los pacientes que responderán al tratamiento con pegIFN. Este hecho posteriormente se constató en práctica clínica, observándose que aquellos pacientes que seroconvertían a anti-HBe eran aquellos que presentaban disminuciones más importantes en los niveles de HBsAg⁶³. Pero lo más importante es su valor como factor predictor de ausencia de respuesta. Datos de un amplio ensayo clínico mostraron que los pacientes que no presentaban disminución en los niveles de HBsAg a las 12 semanas de pegIFN presentaban un 97% de posibilidades no responder al tratamiento⁶⁴, por lo que a día de hoy se aconseja suspensión de pegIFN en los pacientes HBeAg positivo que no alcanzan disminución en los niveles de HBsAg tras 12 semanas de tratamiento¹⁹. Por otro lado, caída en los niveles de HBsAg con una cuantificación <1.500 UI/mL a las 12 semanas de tratamiento se ha asociado a altas tasas de seroconversión a anti-HBe⁶⁵.

Con respecto a los pacientes HBeAg negativo, en una serie de 48 pacientes tratados durante 48 semanas con pegIFN se observó que una disminución >0.5 log en los niveles de HBsAg a las 12 semanas de tratamiento, se asociaba con una probabilidad de aproximadamente el 90% de respuesta virológica tras el tratamiento, definido como ADN VHB indetectable a los 6 meses de finalizado el tratamiento⁶⁶. Posteriormente, se ha reportado que un factor relevante a tener en cuenta es el GT del VHB, ya que los niveles basales de HBsAg difieren entre GTs, siendo superiores para el GT A que para los GTs B, C o D⁶⁷. También los niveles de HBsAg al final de tratamiento entre respondedores y no respondedores fueron diferentes según el GT, siendo los puntos de corte <400 UI/mL para GT A, <50 UI/mL para el B, <75 UI/mL para el C y <1000 UI/mL para D, los que ofrecían mayor VPP de respuesta virológica a largo plazo (75%, 47%, 71% and 75% respectivamente). También se ha postulado que la cinética de los niveles de HBsAg durante el tratamiento con pegIFN podrían ser una herramienta útil en los pacientes HBeAg negativo, siendo la probabilidad de respuesta virológica 7 veces

mayor en aquellos sujetos que presentan una disminución superior al 10% en los niveles de HBsAg tras 24 semanas de tratamiento ⁶⁸. Asimismo, niveles de HBsAg <150 UI/mL a las 12 semanas de tratamiento en pacientes con GT B o C se asociaron a un VPP de 86% y VPN de 85% de presentar respuesta virológica ⁶⁹. Sin embargo, la evidencia más sólida se obtuvo con la combinación de los niveles de HBsAg y ADN VHB. Ninguno de los pacientes que no presentaron disminución de los niveles de HBsAg ni caída del ADN VHB <2 logUI/mL presentó respuesta virológica ⁷⁰, razón por lo que en estos pacientes se aconseja interrumpir el tratamiento con pegIFN evitando sus efectos secundarios ¹⁹.

Análogos de nucleós(t)idos

Diversos estudios han mostrado que en los pacientes tratados con ETV y/o TDF las caídas más importantes en los niveles de HBsAg se observan en los sujetos HBeAg positivo ⁷¹, especialmente en aquellos que luego presentan seroconversión a anti-HBe ⁷², o que posteriormente eliminan el HBsAg sérico ⁷³, siendo la cinética de los niveles de HBsAg similares en pacientes naïve que en previamente tratados ⁷⁴. A este respecto, en un grupo de 266 sujetos con HCB HBeAg positivo, 23 seroaclararon el HBsAg tras 5 años de tratamiento con TDF, siendo los principales factores predictores de respuesta: la infección por GTs A o D y la corta duración de la infección (menor de 4 años) ⁷⁵. Además, se observó que la disminución mayor o igual a 1 logaritmo en los niveles de HBsAg a las 12 o 24 semanas de terapia con TDF, también se relacionaba con una mayor tasa de pérdida del HBsAg. Sin embargo, el VPP de este punto de corte fue tan sólo del 35-45%. Por lo tanto, y a diferencia de lo descrito con el tratamiento con pegIFN, no existen puntos de corte bien establecidos en la disminución de niveles de HBsAg que predigan la respuesta virológica en los pacientes tratados con ANs.

2. Cuantificación del HBsAg en los pacientes que interrumpen el tratamiento con análogos de nucleós(t)idos

En pacientes HBeAg negativo, tanto en la guía de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH) como en la guía de la European Association for the Study of the Liver (EASL) no se recomienda la suspensión del tratamiento con ANs ^{19, 30},

especialmente en pacientes cirróticos en los que se recomienda mantener el tratamiento de por vida o hasta alcanzar el seroaclaramiento del HBsAg. En el año 2012 Hadziyannis *et al* describieron que 13 de 33 (39%) pacientes HBeAg negativo seroaclararon el HBsAg después de interrumpir el tratamiento con adefovir tras más de 4 años con carga viral indetectable ⁷⁶. Desde entonces, diversos estudios han mostrado tasas variables de seroaclaramiento del HBsAg (0-39%) y de respuesta virológica mantenida (9-55%), al retirar la terapia con ANs tras años de supresión viral ⁷⁶⁻⁸⁰. Desde entonces, otras series de casos han estudiado los posibles factores asociados a la pérdida del HBsAg o respuesta virológica mantenida (ALT normal y DNA VHB ≤ 2.000 UI/mL) tras la interrupción del tratamiento con ANs. Entre los pacientes HBeAg negativo, la presencia de carga virales elevadas (ADN VHB $> 2 \times 10^5$ UI/mL) ⁷⁹, resistencia previa a lamivudina y los niveles elevados de HBsAg al final de tratamiento con análogos se han asociado a mayores tasas de recidiva virológica tras suspensión de los ANs. En un estudio realizado en China dónde se incluyeron 41 pacientes HBeAg positivo y 43 HBeAg negativo, tan sólo 1 de los pacientes con HBsAg < 100 UI/mL al final de tratamiento presentó recidiva virológica ⁸¹. Las tasas de recidiva, respuesta virológica mantenida y pérdida de HBsAg de las principales series de casos publicadas se resumen en las figuras 1 y 2.

Con respecto a los sujetos HBeAg positivo, la seroconversión mantenida a anti-HBe tras interrupción del tratamiento con ANs también se ha asociado a diferentes variables tales como el GT (los pacientes con GT C recidivan con mayor frecuencia que los B) ⁸², edad más joven ⁸²⁻⁸⁴, mantenimiento más prolongado del tratamiento con análogos tras la seroconversión a anti-HBe ⁸²⁻⁸⁴, ausencia de resistencia a la Lamivudina ⁸¹ y los niveles de HBsAg < 100 UI/mL al final de tratamiento ⁸¹. Recientemente, un meta-análisis estimó que la probabilidad de respuesta virológica mantenida era superior en sujetos HBeAg positivos que negativos (76.2% versus 56.7%, $p=0.130$), siendo la probabilidad acumulada de pérdida del HBsAg del 2% ⁸⁵. A pesar de que en varios estudios la disminución de los niveles de HBsAg durante el tratamiento ⁸⁶ o niveles de HBsAg < 100 UI/mL en el momento de la interrupción de los ANs se asociaron a mayores tasas de respuesta virológica ^{81, 87}, en esa revisión sistemática el único factor predictor fue la supresión de la carga viral durante al menos 24 meses previo a la suspensión de los ANs ⁸⁵.

Figura 1. Tasas de recidiva, respuesta virológica mantenida y pérdida de HBsAg al suspender el tratamiento con ANs en sujetos HBeAg negativo en diferentes estudios publicados.

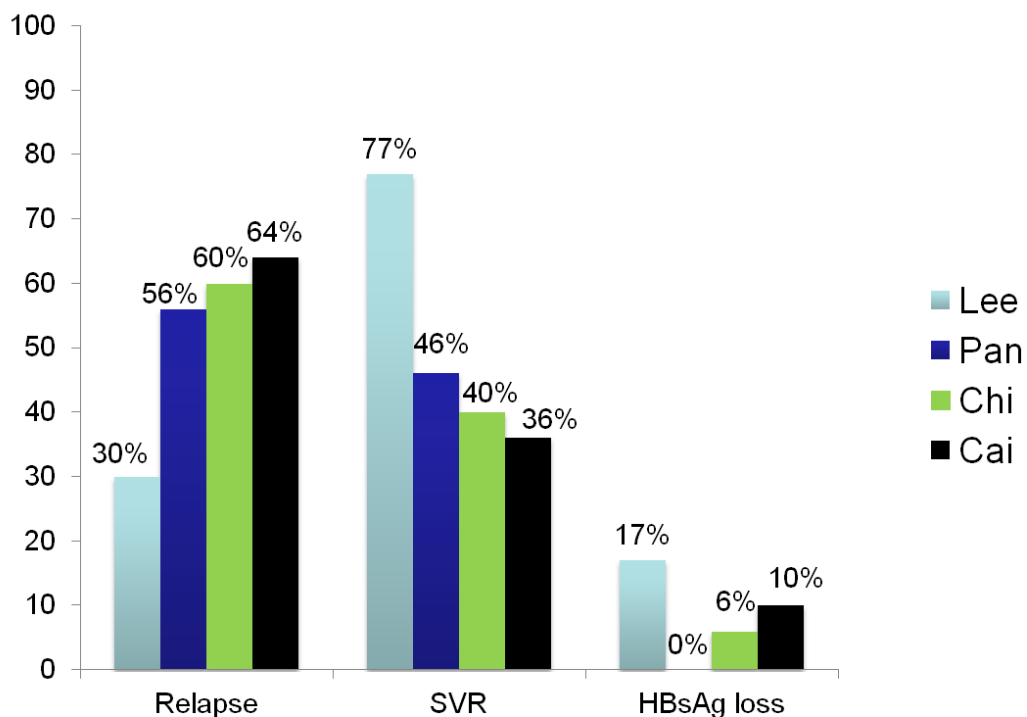
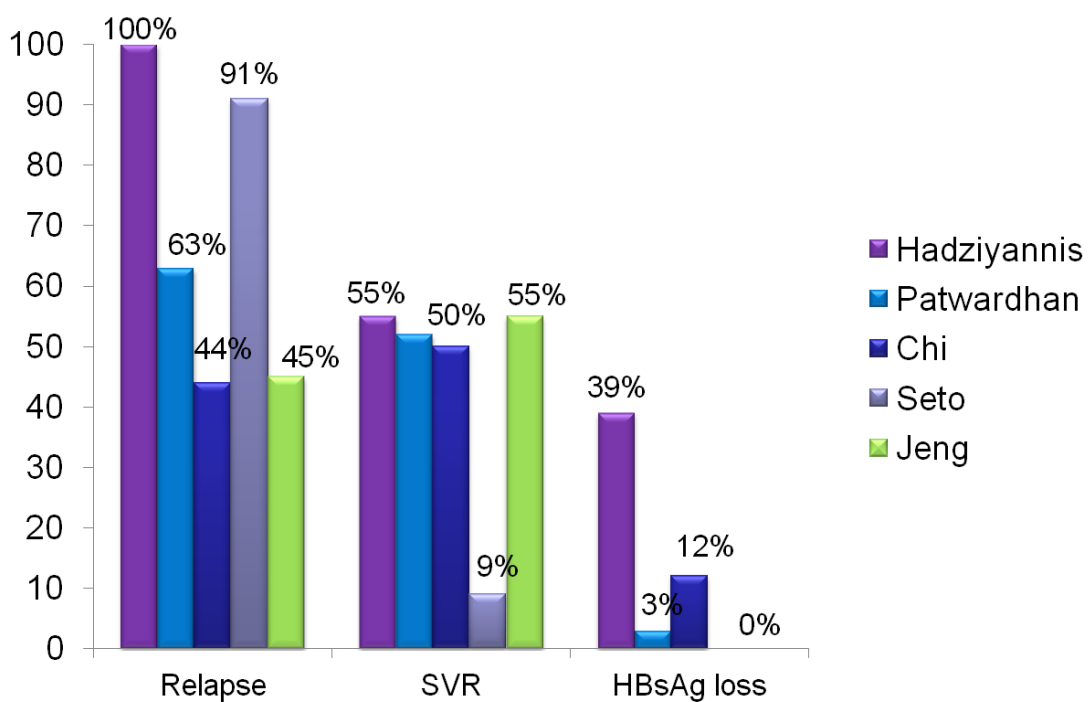


Figura 2. Tasas de recidiva, respuesta virológica mantenida y pérdida de HBsAg al suspender el tratamiento con ANs en sujetos HBeAg negativo.



Antígeno relacionado con el core de la hepatitis B

El antígeno relacionado con el core de la hepatitis B (HBcrAg) es un marcador serológico descrito recientemente que combina la reactividad antigénica derivada de 3 productos derivados del gen del precore/core que comparten una idéntica secuencia de 149 aminoácidos⁸⁸: 1) HBeAg desnaturalizado, 2) el antígeno del core de la hepatitis B y, 3) una proteína relacionada con el core denominada p22cr que se encuentra en las partículas filamentosas y esféricas séricas de HBsAg, sin ADN VHB⁸⁹. La importancia de este marcador radica en que sus niveles se correlacionan no sólo con el ADN VHB plasmático, sino también con los niveles intrahepáticos de ADNccc y el ARNpg, tanto en pacientes naïve como en tratamiento antiviral^{90, 91}. Sus niveles se han relacionado con las siguientes utilidades clínicas:

- **Riesgo de CHC**: en una cohorte japonesa con 1031 pacientes con HCB, niveles de HBcrAg > 2.9 logU/mL se asociaron con una incidencia acumulada de CHC a los 10 y 20 años del 17.1% y 24.3%, en comparación con 3.4% y 5.6% en aquellos sujetos con niveles inferiores, diferencia que alcanzó significación estadística ($p < 0.001$)⁹².
- **Interrupción del tratamiento con ANs**: en un grupo de 34 pacientes japoneses tratados durante un mínimo de 6 meses con lamivudina, el punto de corte de HBcrAg > 4.5 logU/mL al final de tratamiento presentó una sensibilidad y especificidad del 80% para la identificación de aquellos sujetos que presentarían rebote virológico tras la interrupción del mismo.
- **Diferenciación entre fase de portador inactivo y HCB HBeAg negativo**: en una cohorte de pacientes asiáticos, 192 de ellos HBeAg negativo, se observaron niveles superiores de HBcrAg en los pacientes en fase de HCB HBeAg negativo en comparación con los PIs (4.92 logU/mL vs. 2.6 logU/mL, $p < 0.001$)⁹³. Otra cohorte europea de 249 sujetos con infección crónica por VHB, 159 HBeAg negativo (18% GT A, 48% GT D y 34% desconocido), también se describieron niveles superiores de HBcrAg en los pacientes con HCB HBeAg negativo en comparación con los PIs (4.82 logU/mL vs. 2 logU/mL, $p < 0.001$)⁹⁴. En esta cohorte, el 79% de los PIs presentaron niveles de HBcrAg < 3 logU/mL, en comparación con sólo el 12% de los pacientes con HCB HBeAg negativo, siendo el área bajo la curva del HBcrAg del 0.87 ($p < 0.001$) para la diferenciación entre estas dos etapas de la infección por VHB⁹⁴.

Eficacia del tratamiento antiviral con análogos de nucleós(t)idos

Pérdida del HBsAg

El objetivo final del tratamiento antiviral es lograr la “cura funcional” de la infección por VHB, definida como pérdida del HBsAg, que se logra en un porcentaje muy pequeño de pacientes. En los estudios de registro de TDF, se han publicado datos de eficacia tras 7 años de terapia, describiéndose pérdida del HBsAg en 25 de 154 (11.8%) sujetos HBeAg positivo, pero tan sólo 1 de 375 (0.3%) entre los HBeAg negativo ³¹. En los datos de tratamiento con ETV a 6 años, la tasa de seroaclaramiento de HBsAg fue del 1.4% ⁹⁵, pero ha de puntualizarse que el número de pacientes incluidos en el seguimiento a largo plazo fue inferior que con TDF.

Supresión de la replicación viral

Como se ha comentado previamente, la pérdida del HBsAg es excepcional, principalmente en sujetos HBeAg negativo, motivo por el que lograr la supresión mantenida de la replicación viral (ADN VHB indetectable en suero) se considera el objetivo primordial y más realista del tratamiento con ANs.

El tratamiento a largo plazo con los ANs de segunda generación, TDF o ETV presenta una alta tasa de supresión de la replicación viral, tanto en pacientes con HCB HBeAg positivo como HBeAg negativo. Tras 7 años de terapia con TDF el 99.3% de los pacientes alcanzaron ADN VHB inferior al dintel de detección ⁴¹. Además, el 80% de los pacientes presentaron normalización de los niveles de transaminasas ³¹.

Con respecto a ETV, tras 4 años de tratamiento, el 96% de los pacientes alcanzaron carga viral indetectable (100% de los HBeAg negativo y 93% de los HBeAg positivo) ⁹⁶, y el 93% normalización de los niveles de ALT ⁹⁷.

Seroconversión del HBeAg

De los 154 sujetos HBeAg positivos tratados durante 7 años con TDF, 84 (54.5%) presentaron pérdida del HBeAg y 61 (39.6%) seroconversión a anti-HBe ³¹. Con respecto a ETV, el estudio a 4 años mostró una tasa de seroconversión a anti-HBe del 38%, siendo los principales factores determinantes la edad (<40 años), recuento plaquetario (>120.000/mL) y la ADN VHB basal (<7 logUI/mL) ⁹⁶.

Mejoría histológica

En el estudio de registro de TDF, 348 pacientes presentaban biopsia hepática al inicio y a los 5 años de tratamiento, observándose mejoría histológica en el 87% de los casos, con un menor de grado de fibrosis hepática en el 51% e incluso regresión de la cirrosis hepática en el 74% de los 96 pacientes cirróticos ³¹.

En los pacientes tratados con ETV durante 3 años, el estudio de registro con las dosis habituales para sujetos naïve (0.5 mg al día) incluyó 21 pacientes con biopsias pareadas (basal y en tratamiento), observándose en el 57% mejoría en el grado de fibrosis hepática ⁹⁷. En China, una cohorte 204 pacientes naïve con cirrosis por VHB recibieron ETV durante 240 semanas. En un subgrupo de 38 sujetos se realizaron biopsias pareadas (inicial y a las 240 semanas de ETV), observándose mejoría en la necroinflamación o disminución del grado de fibrosis en el 89.5% de los casos ⁹⁸. Por tanto, en todos los estudios se ha mostrado mejoría de la fibrosis y necroinflamación.

Eventos clínicos en pacientes con cirrosis hepática

Diversos estudios han demostrado que la supresión mantenida de la carga viral no sólo puede conllevar mejoría histológica en aquellos casos con cirrosis hepática incipiente, sino que además se asocia a una disminución significativa del número de descompensaciones. Así pues, en una cohorte de 482 pacientes con cirrosis por VHB tratados con ETV, el riesgo de descompensaciones (ascitis, hemorragia digestiva, encefalopatía) y mortalidad de causa hepática fue estadísticamente menor que en un grupo control sin tratamiento ajustado por función hepática (Hazard ratio-HR 0.51 y 0.26, respectivamente) ⁹⁹. Por el contrario, la tasa de complicaciones fue similar al grupo control en aquellos pacientes que desarrollaron resistencias a ETV y volvieron a presentar replicación viral ⁹⁹. En esta línea, en una cohorte europea con 372 sujetos con HCB tratados con ETV, 98 de ellos cirróticos, la supresión de la carga viral se asoció con una menor probabilidad de progresión de la enfermedad (HR 0.29), beneficio que tan sólo fue estadísticamente significativo en pacientes con cirrosis hepática dada la menor tasa de eventos clínicos, significación que permaneció incluso al excluir a los 9 pacientes con cirrosis descompensada (HR 0.22) ¹⁰⁰. Además, la supresión de la replicación viral también se ha asociado a mejoría en la función hepática, y por tanto a una menor necesidad de trasplante hepático. En un grupo de 70 pacientes con cirrosis

hepática descompensada, la tasa de supervivencia libre de trasplante fue del 87.1% tras el primer año de tratamiento con ETV, observándose en el 49% de los pacientes mejoría de más de dos puntos en la clasificación Child-Pugh-Turcotte (CPT) ¹⁰¹. Similares resultados han sido descritos recientemente en una cohorte asiática con 108 sujetos con cirrosis descompensada por VHB, dónde tras 5 años de tratamiento con ETV, el porcentaje de pacientes con CPT B o C disminuyó del 52.9% al 32.4% ⁹⁸. Por todo ello, los pacientes con cirrosis hepática por VHB y carga viral detectable tienen indicación de tratamiento.

Riesgo de carcinoma hepatocelular en pacientes con hepatitis crónica B

En Europa y Estados Unidos se prevén más de 45.000 nuevos casos de tumores hepáticos (incluyendo CHC y colangiocarcinoma) durante el año 2016, siendo el quinto cáncer con mayor mortalidad ¹⁰². Los pacientes con infección crónica por el VHB presentan un alto riesgo de desarrollar cáncer hepático, especialmente aquellos en fase de cirrosis hepática, aunque todos los portadores del VHB presentan riesgo de CHC ³. Por esta razón, durante los últimos años se han descrito diversos modelos con el objetivo de valorar el riesgo de desarrollar CHC en diferentes poblaciones de sujetos con HCB. El primero de ellos fue el REACH-B, obtenido de datos de pacientes asiáticos, naïve, no cirróticos, que incluía como factores predictores los mostrados en la tabla 3 ¹⁰³. En años posteriores, otras cuatro puntuaciones han sido definidas, incluyendo además pacientes cirróticos y bajo tratamiento antiviral, si bien todos ellos de etnia asiática. Sin embargo, todos estos modelos presentaron una baja discriminación cuando fueron extrapolados a pacientes caucásicos con HCB ¹⁰⁴.

Como se ha comentado previamente, la supresión mantenida de la replicación del VHB bajo tratamiento con ETV o TDF se asocia a mejoría histológica e incluso regresión de la cirrosis hepática en casos incipientes, a pesar de lo cual el número de casos de CHC no desaparece, aunque sí disminuye, especialmente en pacientes asiáticos ^{105, 106}. Algunos estudios realizados en pacientes caucásicos han señalado que la supresión de la replicación viral gracias al tratamiento con ANs, disminuye el número de casos de CHC, aunque no de forma significativa ¹⁰⁷.

Tabla 3. Resumen de los modelos predictores de desarrollo de carcinoma hepatocelular en pacientes con hepatitis crónica B.

Raza	Modelo	Sujetos incluidos	Población		Factores predisponentes*
			Tratados	Cirróticos	
Asiáticos	REACH-B	5.089	0%	0%	Edad, ADN VHB, ALT, HBeAg, Sexo (varón)
	CU-HCC	150	15%	38%	Cirrosis, Albúmina, ADN VHB, Bilirrubina, Edad
	GAG-HCC	820	10%	15%	Edad, Cirrosis, mutante promotor core, Sexo (varón), ADN VHB
	mREACH-B	1.130	60%	17%	Elastografía, Edad, Sexo (varón), Consumo alcohol, HBeAg, Albúmina
	LSM- HCC	1.555	38%	32%	Elastografía, Edad, ADN VHB, Albúmina
Caucásicos	Page-B	1.815	100%	20%	Sexo (varón), Edad, Plaquetas

*Factores predisponentes ordenados en base a su peso en el modelo original.

Puntuación Page-B

Dada la baja aplicabilidad de los modelos asiáticos en sujetos europeos con HCB, un nuevo modelo ha sido descrito en pacientes caucásicos, todos ellos en tratamiento con ETV o TDF ¹⁰⁸. La puntuación Page-B estima el riesgo de CHC durante los primeros 5 años de tratamiento antiviral basado en la edad, sexo y recuento de plaquetas al inicio de ETV o TDF. En base a estos 3 factores, a cada paciente se le atribuye una incidencia acumulada de riesgo de CHC. Además, el punto de corte de puntuación Page-B ≥ 10 puntos seleccionó a todos los pacientes que más tarde desarrollarían CHC, con una sensibilidad y VPN del 100%.

Seguridad del tratamiento antiviral con análogos de nucleós(t)idos

Los dos ANs de segunda generación y actualmente de elección para sujetos con HCB, TDF y ETV, presentan un perfil favorable de seguridad, con una baja frecuencia y severidad de efectos adversos. Ambos agentes se eliminan por la orina, sin embargo, en

los estudios post-comercialización, tan sólo TDF se ha asociado con nefrotoxicidad ¹⁰⁹. Éste análogo de nucleótido se elimina sin modificarse por vía glomerular (80%) y secreción tubular proximal (20%). A pesar de ello, en un estudio de pacientes coinfectados por el VHB y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que incluía 43 casos con nefrotoxicidad por TDF con biopsia renal, el daño se halló principalmente a nivel tubular, con cambios de necrosis tubular aguda (70%) y fibrosis intersticial (30%), que conllevaron defecto de secreción tubular y reabsorción de diversas sustancias, produciendo respectivamente aumento de los niveles de creatinina e hipofosfatemia ¹¹⁰. Sin embargo, la mayoría de los casos de nefrotoxicidad, con aparición de insuficiencia renal aguda, síndrome de Fanconi o diabetes insípida, han sido descritos en pacientes infectados por el VIH tratados a largo plazo con TDF ^{111, 112}, siendo escasos los casos reportados en la literatura en pacientes monoinfectados por el VHB ¹¹³⁻¹¹⁵. Con respecto a un posible efecto de TDF sobre la función renal, en los estudios de registro todos los pacientes mantuvieron tasas de filtrado glomerular (FG) >60 mL/min ^{31, 41, 116}, aunque en posteriores series de cohortes de vida real, se han descrito datos contradictorios sobre el posible papel de TDF sobre el FG ¹¹⁷. Así pues, en una cohorte multicéntrica europea que incluyó 374 pacientes con HCB tratados con TDF, el porcentaje de pacientes con hipofosfatemia aumentó del 3 al 6% a los 4 años de terapia antiviral, requiriendo ajuste de dosis o suspensión del tratamiento en 39 (10%) casos, 28 de ellos por eventos renales (24 por insuficiencia renal y 4 por hipofosfatemia) ¹¹⁸. A pesar de los casos de hipofosfatemia, los 3 estudios que han valorado el metabolismo mineral óseo mediante densitometrías óseas en pacientes en terapia con TDF, no mostraron un empeoramiento en comparación con sujetos control no tratados ¹¹⁷. Con respecto a ETV, en pacientes con cirrosis descompensada o hepatitis aguda grave, se han descrito casos de acidosis láctica ¹¹⁹, alguno de ellos letal ^{120, 121}, siendo el principal factor predictor la función de síntesis hepática, documentándose prácticamente todos los casos en pacientes con Model for End-stage Liver Disease (MELD) >20 puntos ¹²¹. Sin embargo, de forma global, la tasa de efectos adversos asociados al tratamiento con ETV es muy baja. A este respecto, tras más de 3 años de terapia no se reportaron efectos adversos (EA) graves en una cohorte de 222 sujetos con HCB ¹²². Incluso en una cohorte con 204 pacientes con cirrosis por VHB tratados con ETV durante 5 años, no se registraron alteraciones en la función renal o casos de acidosis láctica ⁹⁸.

Resistencias al tratamiento con análogos de nucleós(t)idos

Tras 7 años de tratamiento, el 99% alcanzaron supresión de la replicación viral. El 1% restante, con carga viral detectable presentaba bajos niveles de ADN VHB, sin observarse mutaciones asociadas a resistencia a TDF⁴¹. Con respecto a ETV, 5 sujetos naïve presentaron rebote virológico definido como ADN VHB detectable tras haber alcanzado supresión de la replicación viral⁹⁶. Ninguno de ellos presentaba mutaciones basales a ETV, sin embargo en 2 de ellos se detectaron mutaciones en la posición 204 en el momento del rebote virológico. En otra cohorte con más de 200 pacientes naïve con HCB, 1 (1.2%) desarrolló mutaciones al ETV tras 3 años de tratamiento¹²². Los 3 casos mencionados previamente^{96, 122}, eran HBeAg positivo al inicio del tratamiento con ADN VHB >6 logUI/mL. En pacientes previamente tratados con Lamivudina, el porcentaje de pacientes que desarrollan resistencias es mayor. En una cohorte de pacientes con HCB, de los 77 que completaron 2 años de terapia con ETV, en 6 de ellos se objetivaron resistencia al fármaco¹²³.

II. Justificación de la unidad temática de la tesis

La infección por el VHB es la segunda causa más frecuente de hepatitis viral en nuestro medio, afectando a casi el 1% de la población y pudiendo conllevar en muchos casos el desarrollo de fibrosis hepática y finalmente cirrosis y carcinoma hepatocelular, complicaciones que se pueden evitar o reducir mediante el tratamiento con análogos de nucleós(t)idos. Sin embargo, existe un grupo de pacientes denominados portadores inactivos que presenta un riesgo menor de desarrollar lesión hepática, y cuya identificación precoz mediante marcadores serológicos ahorraría el control analítico y clínico que permite su correcta caracterización.

Los dos estudios que configuran esta tesis doctoral, abordan dos problemas en pacientes con infección por VHB.

El primer estudio analiza tanto la seguridad como la eficacia en términos analíticos y clínicos del tratamiento con análogos de nucleós(t)idos de segunda generación (tenofovir y entecavir) en pacientes con infección crónica por VHB en una cohorte de práctica clínica real. Además, incluye la validación en pacientes caucásicos de la puntuación Page-B para el desarrollo de carcinoma hepatocelular. Este trabajo se ha llevado a cabo mediante el análisis retrospectivo de la base de datos multicéntrica CIBERHEP, en la que colaboran 20 hospitales españoles.

En un segundo estudio se plantea el papel de la cuantificación de los niveles de HBsAg y HBcrAg en la identificación precoz de los portadores inactivos de la infección por VHB. Se trata de un estudio prospectivo con seguimiento analítico semestral en pacientes HBeAg negativo que intenta mejorar el conocimiento sobre estos biomarcadores, y en concreto, sobre su posible utilidad en la correcta clasificación de la fase de la infección crónica por VHB. Asimismo se ha realizado genotipado de todos los sujetos incluidos para evaluar su posible influencia en los niveles de HBsAg y HBcrAg.

III. Estudio 1:

Eficacia y seguridad de los análogos de nucleós(t)idos de segunda generación en una cohorte de pacientes caucásicos con hepatitis crónica B. Validación de la puntuación Page-B en una cohorte de práctica clínica real.

Resumen de la hipótesis, objetivos, métodos y resultados globales del estudio.

Discusión

Introducción

En los estudios de registro de los ANs de segunda generación y actualmente primera elección para el tratamiento de los pacientes con hepatitis crónica B, tanto ETV como TDF lograron altas tasas de supresión virológica y normalización bioquímica, siendo escasos los efectos adversos reportados. Sin embargo, el riesgo de CHC no se ha eliminado por completo a pesar de la supresión mantenida de la replicación viral, razón por la que en los últimos años se han desarrollado modelos para intentar predecir el riesgo individual de los sujetos con HCB en tratamiento antiviral. A este respecto, el Page-B es el único modelo descrito hasta ahora en población caucásica, que predice el riesgo de desarrollar CHC durante los 5 primeros años del tratamiento antiviral con ETV o TDF, basándose en 3 variables: edad, sexo y recuento de plaquetas al inicio del tratamiento ¹⁰⁸. La cohorte de validación para este modelo incluyó hospitales de referencia de España, Italia, Holanda y Turquía, realizándose el despistaje de CHC mediante ecografía y/o determinación de alfa-fetoproteína cada 6 y 12 meses para pacientes cirróticos y no cirróticos, respectivamente ¹⁰⁸. Sin embargo, las recomendaciones tanto de la EASL como de la AEEH limitan el despistaje de CHC a aquellos pacientes cirróticos, Asiáticos y Africanos mayores a 40 (hombres) o 50 años (mujeres) o con antecedentes de CHC ^{19, 30, 124}.

Hipótesis

En práctica clínica real la eficacia y tasa de efectos adversos de los AN es similar a los estudios de registro. La supresión de la replicación viral en paciente con HCB tratados con ETV y TDF no elimina el riesgo de desarrollar CHC.

Objetivos

Los objetivos primarios fueron: a) respuesta virológica (definida como ADN VHB <69 UI/mL); b) respuesta bioquímica (normalización de los niveles de ALT definido como ALT <35 UI/mL para mujeres y <50 UI/mL para hombres); c) pérdida de HBeAg y seroconversión a anti-HBe; d) pérdida de HBsAg.

Los objetivos secundarios fueron: a) validar en una cohorte de práctica clínica real el modelo Page-B para predicción del riesgo de CHC en sujetos caucásicos en tratamiento con ETV o TDF; b) analizar la seguridad renal de la terapia a largo plazo con ETV o TDF.

Métodos

CIBERHEP es una base de datos observacional, multicéntrica y prospectiva en la que participan 20 hospitales españoles, y que incluye datos de pacientes con HCB, naïve o previamente tratados, que reciben tratamiento con ANs. Para este estudio y de cara a validar el modelo Page-B, se seleccionaron tan sólo pacientes caucásicos, mayores de 18 años, en tratamiento con ANs de segunda generación (ETV o TDF). Aquellos sujetos coinfectados, trasplantados hepáticos o que desarrollaron CHC durante los primeros 6 meses de tratamiento, fueron excluidos (Figura 5). La incidencia estimada de CHC del modelo Page-B se realizó con los coeficientes de Cox originales de acuerdo al tiempo en riesgo individual de cada sujeto.

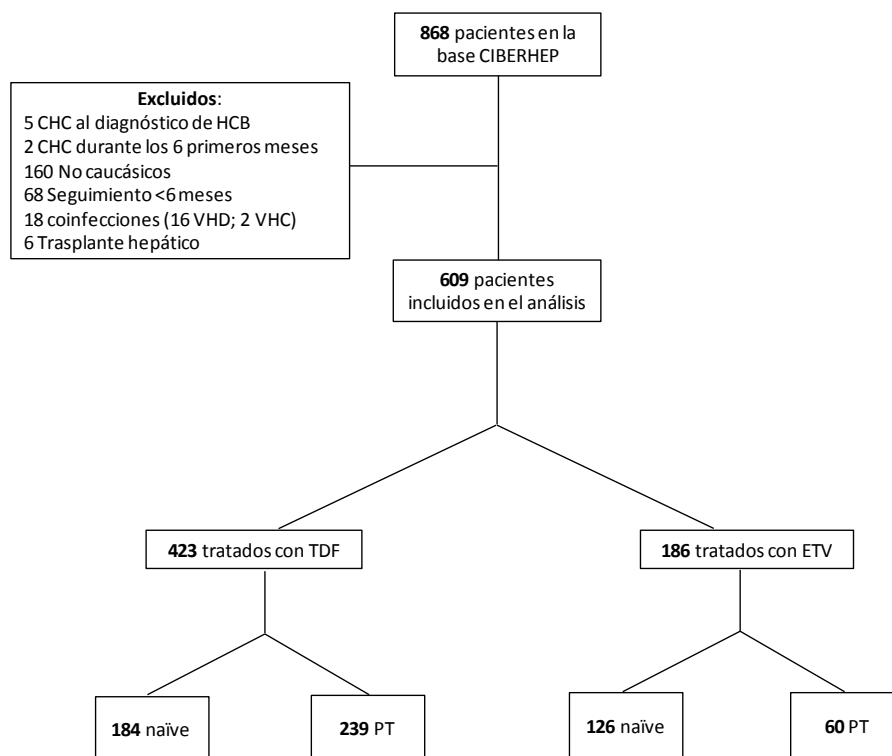


Figura 5. Diagrama de flujo de los pacientes incluidos en el estudio.

El diagnóstico de cirrosis hepática se basó en histología, hallazgos ecográficos, historia de descompensaciones previas o datos analíticos. El despistaje de CHC se realizó a discreción de los investigadores de cada centro y de acuerdo a las recomendaciones de la AEEH y EASL^{30, 124, 125}.

Resultados

Se incluyeron 609 pacientes, la mayoría varones (72.6%), con edad media de 50 años. 196 (32.2%) eran cirróticos y 101 (18.6%) HBeAg positivo. 299 (49.1%) ya habían sido tratados previamente con otro AN. La media de seguimiento fue de 55 y 49 meses respectivamente para los tratados con ETV o TDF. El número de pacientes que completaron el seguimiento a 12, 24, 36, 48 y 60 meses fue de 577, 505, 428, 341 y 224, respectivamente.

El tratamiento con ANs fue altamente eficaz en práctica clínica real, con supresión de la replicación viral en más del 90% de los sujetos a los 12 meses de tratamiento, y del 98% a los 60 meses y normalización de los niveles de ALT del 90% a los 36 meses (tabla 7). Basalmente el porcentaje de sujetos con ADN VHB <69 UI/mL era superior entre aquellos sujetos HBeAg negativo en comparación con los HBeAg positivo (28.8% vs 18.6%, $p=0.039$). Esta diferencia tendió a aumentar tras el inicio de la terapia antiviral (Mes 12: 95.0% vs. 71.2%, $p<0.001$; Mes 36: 96.6% vs. 87%, $p=0.03$), y desapareció al mes 48 (97.3% vs. 95.7%, $p=0.68$). La edad al inicio del tratamiento también impactó sobre la respuesta virológica. A pesar de que tanto el ADN VHB basal (4.2 vs. 4.0, $p=0.43$) como el porcentaje de pacientes indetectables al inicio del tratamiento (28% vs. 32%, $p=0.55$) fue similar entre sujetos mayores y menores de 65 años, aquellos con más de 65 años lograron una menor tasa de respuesta virológica a los 12 meses de tratamiento tanto con TDF (80.6% vs. 93.8%, $p=0.013$) como ETV (64.7% vs. 90.5%, $p=0.005$), diferencia que desapareció durante el seguimiento (95% y 80% al mes 24 de TDF y ETV, respectivamente). A lo largo del tratamiento sólo 4 (0.7%) sujetos perdieron el HBsAg, 3 de los cuales eran HBeAg positivo. De los 101 sujetos HBeAg positivo al inicio de tratamiento con TDF (N=67) o ETV (N=34), 34 (33.7%) y 24 (23.8%) lograron respectivamente negativizar el HBeAg y seroconvertir a anti-HBe (Figura 6).

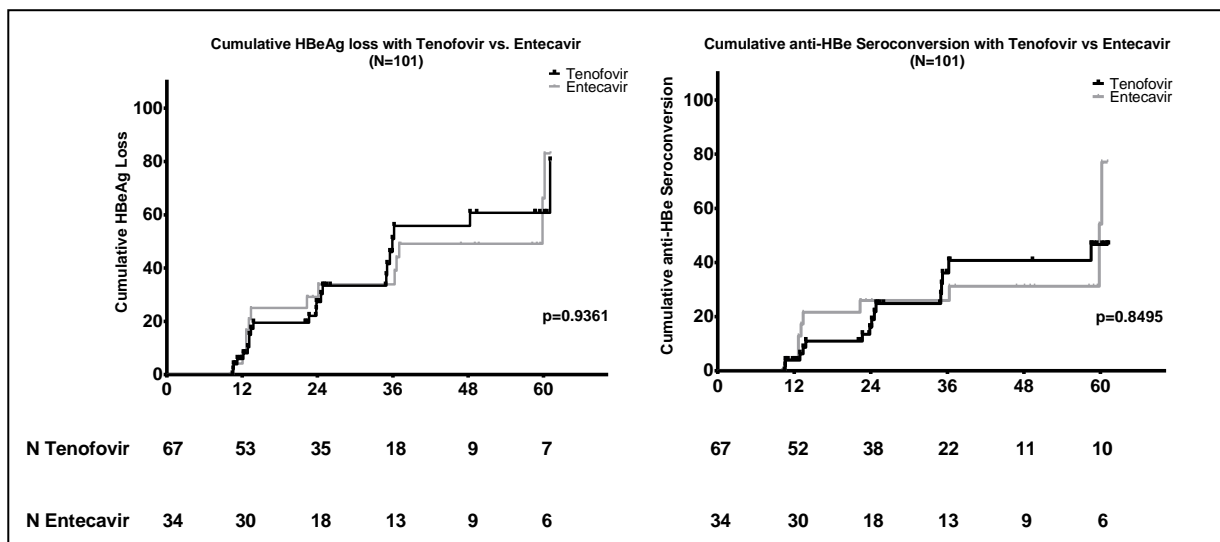


Figura 6. Pérdida acumulada del HBeAg y seroconversión a anti-HBe según el análogo de nucleós(t)ido. La comparación entre ambos fármacos no mostró diferencias.

	Basal	Mes 12	Mes 36	Mes 60
ADN VHB <69 UI/mL, n (%)				
Regímenes con TDF				
Todos (N=423)	135(31.9%)	205(91.9%)	118(95.9%)	55(98.2%)
Naïve (N=184)	11(5.9%)	98(92.5%)	46(97.9%)	18(94.7%)
ETV				
Todos (N=186)	30(16.1%)	87(86.1%)	65(100%)	44(100%)
Naïve (N=126)	9 (7.1%)	65(84.4%)	44(89.8%)	32(100%)
Normalización ALT, n (%)				
Regímenes con TDF				
Todos (N=423)	254(60.5%)	221(86%)	120(84.5%)	53(88.3%)
ALT basal elevada (N=169)	-	78(73.6%)	47(83.9%)	21(84.0%)
ETV				
Todos (N=186)	80(43.5%)	96(85%)	70(84.3%)	46(92%)
ALT basal elevada (N=106)	-	58(80.6%)	38(79.2%)	27(87.1%)
Pérdida acumulada HBsAg, n(%)				
Regímenes con TDF (N=423)	-	0(0%)	2(0.55%)	2(0.55%)
ETV (N=186)	-	0(0%)	2(1.23%)	2(1.23%)

Tabla 7. Respuesta virológica, bioquímica y pérdida de HBsAg durante el seguimiento de acuerdo al regimen de análogo de nucleós(t)ido.

Siete (1.7%) de los sujetos tratados con regímenes basados en TDF y 4 (2.2%) con ETV requirieron de ajuste de dosis, principalmente por alteración de la función renal. 6 (1.4%) de los sujetos tratados con regímenes basados en TDF y 6 (3.2%) con ETV fallecieron durante el tratamiento. 19 (4.5%) de los tratados con TDF y 10 (5.4%) con ETV fueron pérdidas de seguimiento. Con respecto a la seguridad renal, tanto los niveles de creatinina sérica como la tasa de FG a los 36 meses de tratamiento no difirieron de las basales ($p=0.064$ y $p=0.13$, respectivamente) e incluso mejoraron significativamente al mes 60 ($p<0.001$ y $p<0.001$). Estos resultados se mantuvieron en el análisis por separado de cada fármaco, y según la exposición previa a tratamiento con análogos. La única diferencia observada, fue que en los pacientes mayores de 65 años al inicio de la terapia antiviral la función renal a los 36 y 60 meses se mantuvo estable (cambio medio: -0.01 mg/dL, $p=0.92$ y 0 mL/min, $p=0.73$ al mes 36; 0.03 mg/dL, $p=0.45$ y -2.8 mL/min, $p=0.399$ al mes 60) Por el contrario, se observó mejoría en aquellos menores de 65 años (cambio medio: 0 mg/dL, $p=0.05$ y 0 mL/min, $p=0.09$ al mes 36; -0.05 mg/dL, $p=0.002$ y 5.8 mL/min, $p<0.001$ al mes 60).

La supresión de la replicación viral no eliminó el riesgo de desarrollar CHC. 12 (1.97%) sujetos presentaron CHC durante el tratamiento con ETV (N=2) o TDF (N=10) (Figura 7). La incidencia anual de CHC de acuerdo a la presencia de cirrosis y al número de pacientes en riesgo se resume en la tabla 8. En 11 de ellos se disponía de ADN VHB al momento del diagnóstico, siendo en todos los casos indetectable.

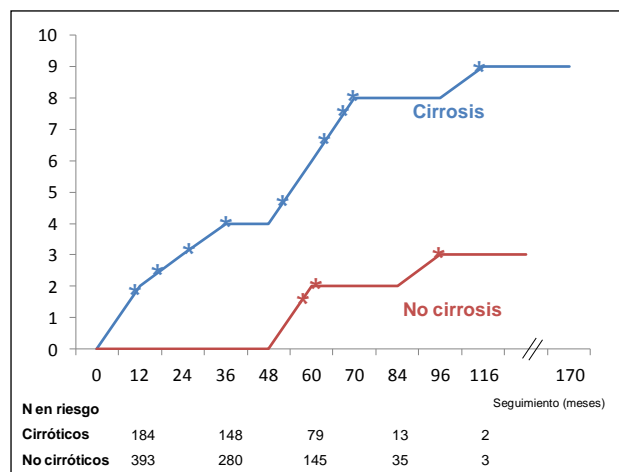


Figura 7. Incidencia de CHC de acuerdo a la presencia de cirrosis hepática en la cohorte CIBERHEP. En total se observaron 12 casos de CHC, 9 en sujetos cirróticos y 3 en no cirróticos. * Los asteriscos indican los casos de CHC.

Siete de los casos fueron diagnosticados durante los primeros 5 años de tratamiento antiviral, en comparación con los 27.8 estimados por el modelo Page-B. Al igual en la cohorte de derivación original del modelo Page-B, todos los pacientes de la base CIBERHEP que desarrollaron CHC presentaron una puntuación basal ≥ 10 puntos (Tabla 9).

Año	Total	Cirrosis	No cirrosis
1	2/609 (0.3%)	2/196 (1.02%)	0/413 (0%)
2	2/505 (0.4%)	2/167 (1.2%)	0/338 (0%)
3	3/428 (0.7%)	3/148 (2.03%)	0/280 (0%)
4	4/341 (1.17%)	4/116 (3.45%)	0/225 (0%)
5	7/224 (3.1%)	6/79 (7.6%)	1/145 (0.7%)

Tabla 8. Incidencia anual de CHC de acuerdo a la presencia de cirrosis y al número de pacientes en riesgo.

Puntuación Page-B ≥ 10		
	Cohorte Page-B	Cohorte CIBERHEP
	N=484	N=609
Sensibilidad	100%	100%
Especificidad	41.2%	25.1%
Valor predictivo positivo	9.8%	2.6%
Valor predictivo negativo	100%	100%

Tabla 9. Exactitud del punto de corte ≥ 10 del modelo Page-B para predecir el desarrollo de CHC en las cohortes Page-B y CIBERHEP

Discusión

Este estudio confirma las altas tasas de respuesta virológica y bioquímica observadas en los estudios de registro con ETV y TDF, en una cohorte de práctica clínica real amplia de sujetos con HCB, con un seguimiento medio de más de 50 meses. En nuestro estudio se incluyeron tanto pacientes HBeAg positivo como negativo, siendo la respuesta virológica más rápida en aquellos HBeAg negativo. Este dato ya había sido descrito en la cohorte de práctica clínica real Francesa ¹²⁶, aunque el seguimiento más prolongado en nuestro estudio permitió observar que esta diferencia desaparecía tras 5 años de tratamiento antiviral. También la edad pareció impactar en la respuesta al tratamiento. A pesar de que el número de sujetos mayores de 65 años era relativamente bajo (N=81), se observó que inicialmente el porcentaje que alcanzó ADN VHB <69 UI/mL fue menor, aunque tendió a igualarse con el paso de los meses.

En comparación con series europeas previas dónde 11 de 400 y 14 de 440 sujetos con HCB seroclararon el HBsAg durante el tratamiento ^{126, 127}, el número fue menor en nuestra cohorte, datos que podría ser explicados parcialmente por el mayor porcentaje de pacientes HBeAg positivo en las series Francesa y Alemana. A este respecto y en línea con nuestros resultados, en el estudio de 7 años de terapia con TDF, tan sólo 1 de 375 (0.3%) pacientes HBeAg negativo eliminó el HBsAg ⁴¹.

Con respecto a la seguridad, la evolución de la función renal en la base CIBERHEP ha sido evaluada mediante los niveles séricos de creatinina y la tasa de FG. Los valores de ambas variables permanecieron estables durante el seguimiento, e incluso tendió a mejorar tras 5 años de terapia antiviral. Ni el tipo de análogo (ETV o TDF), ni la exposición previa a tratamiento impactó en la función renal. Sin embargo, en aquellos sujetos mayores de más de 65 años no se observó dicha mejoría a largo plazo. Debe tenerse en cuenta que en nuestro estudio presenta una importante limitación a este respecto ya que en la base de datos original del CIBERHEP no se recogieron datos de comorbilidad. Por lo tanto, posibles sesgos de confusión como la presencia de diabetes mellitus o hipertensión arterial, que además son más frecuentes en sujetos de dicha edad, no pueden ser descartados. En esta línea, un estudio retrospectivo reciente que incluyó 3.175 sujetos con HCB tratados con ANs durante más de 1 año mostró que la edad, la hipertensión, la diabetes junto con el trasplante, la enfermedad renal crónica

y el uso de diuréticos eran los factores de riesgo principales para presentar empeoramiento de la función renal durante la terapia antiviral ¹²⁸.

A pesar de que tanto el TDF como ETV se eliminan por vía renal, tan sólo TDF ha sido asociado con casos de nefrotoxicidad en los estudios post comercialización, la gran mayoría de los casos en pacientes coinfectados por el VIH ^{111, 112}. De hecho, en los estudios de registro no se registraron eventos renales relevantes ^{31, 41, 98, 116, 122}. Trabajos posteriores, incluso en pacientes con cirrosis descompensada ¹²⁹ o estratificados por factores de riesgo como edad, diabetes y trasplante previo, tampoco han demostrado que TDF produzca mayor disfunción renal que ETV ¹³⁰.

Por último, mediante la inclusión de únicamente pacientes caucásicos se ha intentado validar en una cohorte de práctica clínica real el modelo Page-B para predicción del riesgo de desarrollar CHC en sujetos bajo tratamiento con ETV o TDF. En la cohorte CIBERHEP se recogieron 12 (1.97%) casos de CHC, la mayoría (75%) en pacientes cirróticos. La incidencia acumulada durante los primeros 5 años fue del 3.1% (7.6% en cirróticos y 0.7% en no cirróticos). Este valor es inferior al 3.8% reportado en la cohorte Page-B. A destacar, que de acuerdo con este modelo, la predicción de casos de CHC en nuestra cohorte en el supuesto de que todos los sujetos completen el seguimiento, sería de 27.8. Esta discrepancia no puede ser explicada mediante las diferencias en las características basales, dado que el seguimiento, edad media y el porcentaje de sujetos cirróticos y HBeAg positivo eran superponibles en las dos series. Sin embargo, en contraste con la cohorte Page-B ¹⁰⁸, en la que a todos los sujetos se les realizaba seguimiento ecográfico periódico (cada 6 meses para cirróticos y 12 meses para no cirróticos), el despistaje de CHC en nuestra serie se llevó a cabo a discreción de cada investigador en su centro. Por tanto, estas diferencias entre ambas cohortes destacan la importancia del cribado de CHC incluso en pacientes con supresión de la replicación viral bajo tratamiento. De hecho, en nuestra cohorte todos los pacientes con ADN VHB disponible al momento del diagnóstico del CHC presentaban carga viral indetectable. A este respecto, el punto de corte del modelo Page-B ≥ 10 podría ser útil para seleccionar aquellos sujetos que se beneficiarían de la realización de despistaje de CHC. Al igual que en la cohorte original, todos los pacientes de la base CIBERHEP que desarrollaron CHC presentaron basalmente una puntuación Page-B superior o igual a 10, siendo el VPN de este punto de corte del 100%.

Nuestro estudio tiene varias limitaciones. A destacar que no todos los sujetos incluidos han completado el seguimiento de 5 años, y por tanto los resultados de CHC no son totalmente superponibles a los de la cohorte Page-B. Además, variables que podrían suponer sesgos en el análisis de la seguridad renal como en concreto, la presencia de comorbilidades, no se contemplaron en el diseño de la base de datos.

En conclusión, en esta cohorte de práctica clínica real de sujetos caucásicos con infección crónica por B tratados con ETV o TDF durante una media de 52 meses se observaron altas tasas de respuesta virológica y bioquímica, con baja tasa de interrupción del tratamiento y mortalidad. La aplicación del modelo Page-B en nuestra cohorte confirmó que el punto de corte ≥ 10 es útil para identificar aquellos sujetos en riesgo de desarrollar CHC.

IV. Estudio 2:

El HBcrAg es más útil que el HBsAg para la identificación de portadores inactivos de la hepatitis B, e independiente del genotipo

Resumen de la hipótesis, objetivos, métodos y resultados globales del estudio.

Discusión

Introducción

La HCB HBeAg negativo es la forma más frecuente de infección por VHB en muchos países, incluyendo España. Uno de los aspectos más complejo en estos pacientes es distinguir entre las distintas fases de la infección, especialmente entre la etapa de PI y HCB HBeAg negativo. Esta caracterización es importante dado que los PI no requieren tratamiento y la monitorización se puede espaciar dado su buen pronóstico a largo plazo. Por el contrario, aquellos sujetos con HCB HBeAg negativo precisan un control más estrecho y en muchos casos terapia antiviral para evitar la progresión de la fibrosis hepática. Al menos 3 determinaciones de ALT y ADN VHB a lo largo de un año son necesarias para clasificar correctamente a los pacientes HBeAg negativo. Entre los marcadores serológicos que podrían ser útiles a este respecto está el HBsAg que es el marcador principal de infección crónica por VHB. Los niveles de HBsAg se han correlacionado con los de ADNccc intrahepáticos, siendo superiores en sujetos inmunotolerantes y disminuyendo tras la seroconversión a anti-HBe. A este respecto, un estudio realizado en pacientes GT D, el punto de corte de <3 logUI/mL identificó con una exactitud diagnóstica al 93% de los PIs. Más recientemente, el HBcrAg también ha sido señalado como un marcador serológico con buena correlación con el ADNccc, tanto en sujetos naïve como en sujetos en tratamiento con ANs, por lo que también podría ser de utilidad en la caracterización de sujetos HBeAg negativo.

Hipótesis

Los niveles de HBsAg o HBcrAg podrían ser marcadores válidos para la correcta clasificación de los pacientes HBeAg negativo infectados por diferentes genotipos del VHB.

Objetivos

El objetivo primario es investigar la utilidad de los niveles de HBsAg y HBcrAg como marcadores para identificar a los PIs del VHB.

Los objetivos secundarios fueron: a) valorar el impacto del GT del VHB sobre los niveles séricos de HBsAg y HBcrAg; b) valorar la evolución temporal de los niveles de HBsAg en pacientes HBeAg negativo.

Métodos

Estudio prospectivo de 202 pacientes HBeAg negativo con seguimiento analítico semestral. Los pacientes fueron clasificados de acuerdo con las recomendaciones de la EASL ¹²⁵: a) portadores inactivos (aquellos con niveles persistentemente normales de ALT y ADN VHB ≤ 2.000 UI/mL en 3 determinaciones a lo largo de un año), b) Portadores activos (ADN VHB > 20.000 UI/mL, o al menos una fluctuación de ADN VHB > 2000 UI/mL más niveles elevados de ALT. Aquellos pacientes con fluctuaciones de ADN VHB entre 2.000 y 20.000 UI/mL con niveles de ALT persistentemente normales o bien, ALT elevada junto con ADN VHB < 2.000 UI/mL se clasificaron como “intermedios” (Figura 3). Tanto los portadores activos como los “intermedios” se analizaron conjuntamente como sujetos con “actividad por el VHB” dato que todos estos pacientes presentaron de forma al menos puntual ADN VHB > 2.000 UI/mL y por tanto 3 veces mayor probabilidad de progresión de la enfermedad hepática ^{125, 131}. En todos los sujetos incluidos se determinó el GT del VHB. Los resultados de los sujetos GTs F o H se analizaron conjuntamente dada su proximidad filogenética y distribución geográfica ^{132, 133}.

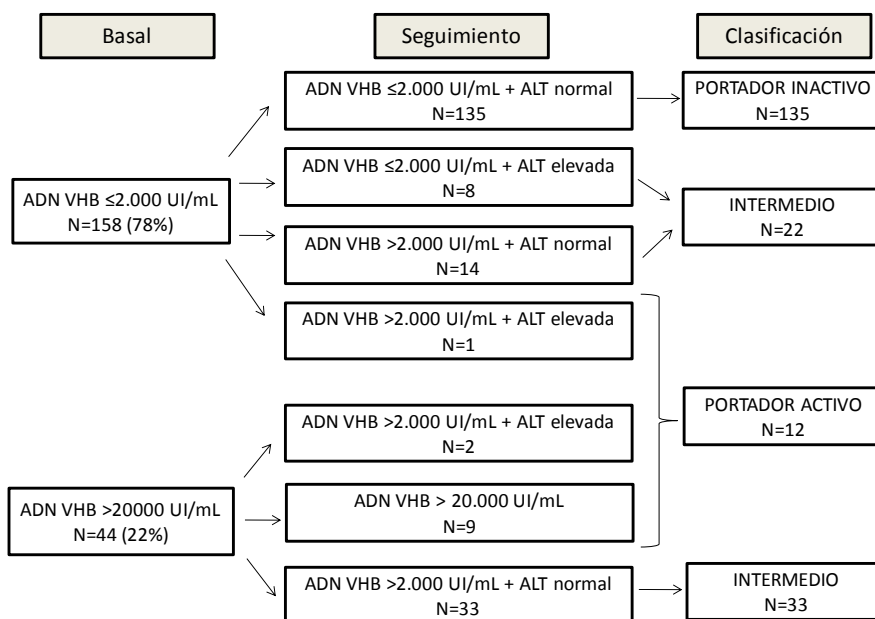


Figura 3. Clasificación de los pacientes incluidos en el estudio.

Resultados

135 sujetos cumplieron criterios de PIs y 67 sujetos presentaron actividad por el VHB. Los GTs predominantes fueron: A (37%), D (27%), E (19%), y F o H (13%). Las características basales de los pacientes de acuerdo con su clasificación se resumen en la tabla 4. En comparación con los PIs, los pacientes con actividad por el VHB fueron más jóvenes, con niveles más elevados de ALT, ADN VHB, HBsAg y HBcrAg.

	Total N= 202	Portadores inactivos N=135	Actividad por VHB N= 67	p
Edad, años, media±DS	48±13	50±12	44±14	0.004
Varones, n (%)	112 (55%)	81 (60%)	31(47%)	0.07
Genotipo, n (%)				
- A	75(37%)	52 (38%)	23(34%)	0.98
- B o C	5(2%)	1 (1%)	4(6%)	
- D	58(29%)	38(28%)	20(30%)	
- E	36(18%)	26(19%)	10(15%)	
- F o H	24(12%)	16(12%)	8(12%)	
- Mixto A/E	4 (2%)	2(2%)	2(3%)	
ALT (UI/mL), media±DS	21±12	19±11	26±14	<0.001
Plaquetas (10E9/L), media±DS	223±46	219±46	228±47	0.25
Albúmina (mg/dL), media±DS	4.4±0.4	4.4±0.5	4.3±0.3	0.81
HBsAg (logUI/mL), media±DS	3.3±1	3.1±1.1	3.6±0.7	0.003
HBcrAg (logU/mL), media±DS^e	2.3±0.7	2.1±0.3	2.7±1.0	<0.001
ADN VHB (logUI/mL), media±DS	2.7±0.9	2.4±0.7	3.4±0.8	<0.001

^eDisponible en 134 sujetos.

Tabla 4. Características basales de los pacientes incluidos en el estudio.

Los niveles de HBsAg fueron diferentes según el GT ($p<0.001$), con títulos más elevados en aquellos GT F o H (4.2 ± 0.6 logUI/mL), seguidos por E (3.4 ± 1.1 logUI/mL), A (3.4 ± 0.8 logUI /mL) y D (2.7 ± 1.1 logUI /mL). Esta diferencia se observó tanto en PIs como pacientes con actividad por el VHB (Tabla 5).

		Total	GT A	GT D	GT E	GT F o H	<i>p</i>
Total	N	202	75	58	36	24	-
	HBsAg (logUI/mL)*	3.3±1	3.4±0.8	2.7±1.1	3.4±1.1	4.2±0.6	<i>p</i> <0.001
	HBcrAg (logU/mL)*	2.3±0.7	2.4±0.6	2.2±0.4	2.6±1.3	2±0	0.052
Portadores inactivos	N (%)	135(67%)	52(39%)	38(28%)	26(19%)	16(12%)	-
	HBsAg (logUI/mL)*	3.1±1.1	3.2±0.8	2.3±1.1	3.3±1.1	4.1±0.7	<0.001
	HBcrAg (logU/mL)*	2.1±0.3	2.2±0.3	2.1±0.3	2.2±0.3	2.0±0	0.63
Sujetos con actividad por el VHB	N (%)	67(33%)	23(34%)	20(30%)	10(15%)	8(12%)	-
	HBsAg (logUI/mL)*	3.6±0.7	3.8±0.6	3.3±0.6	3.7±0.7	4.2±0.3	0.003
	HBcrAg (logU/mL)*	2.7±1	2.9±0.8	2.3±0.5	3.6±2.1	2±0	0.02

*Expresado como media±desviación estándar.

Tabla 5. Comparación de los niveles de HBsAg y HBcrAg de acuerdo al genotipo del VHB y a la presencia de actividad por el VHB.

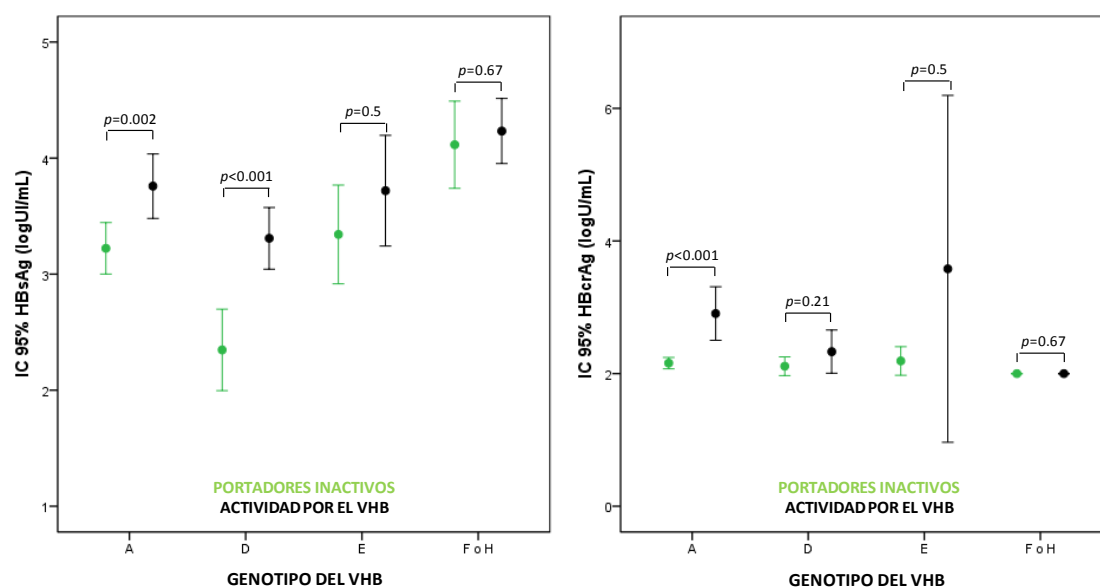


Figura 4. Comparación de los niveles de HBsAg entre PIs y sujetos con actividad por el VHB de acuerdo al genotipo del VHB.

En general los niveles de HBsAg fueron inferiores en los PIs que en sujetos con actividad por el VHB. Cuando cada GT se analizó por separado, la diferencia entre PIs y sujetos con actividad por el VHB sólo alcanzó significación estadística en aquellos sujetos GT A o D (Figura 4), GTs en los que se observó correlación entre los niveles de HBsAg y ADN VHB ($r= 0.46$, $p<0.001$; $r= 0.56$, $p<0.001$, respectivamente). El área bajo la curva de los niveles de HBsAg para identificar a los PIs fue del 0.63 (IC 95%: 0.55-0.71, $p=0.001$). El punto de corte con el mayor índice de Youden fue 3.21 logUI/mL (sensibilidad, 49.6%; especificidad, 77.6%). Los niveles más bajos de HBsAg en pacientes infectados por GT D permitieron una buena discriminación del punto de corte de HBsAg <3 logUI/mL. 76% de los PIs GT D presentaron HBsAg <3 logUI/mL en comparación con $\leq 30\%$ de los GTs A, E H o F (Tabla 6). Sin embargo, en los sujetos GT A, el punto de corte de HBsAg que presentó mayor discriminación diagnóstica fue HBsAg ≤ 3.7 logUI/mL, con un VPP del 82.2% y exactitud diagnóstica del 69.3%.

El área bajo la curva de los niveles de HBcrAg para identificar a los PIs fue del 0.67 (95% CI: 0.56-0.77, $p=0.003$). El punto de corte con el mayor índice de Youden fue 3 logU/mL (sensibilidad, 94.4%; especificidad: 34.1%). El análisis independiente por GTs mostró que sólo para sujetos infectados por GT A el HBcrAg mostraba una buena caracterización de los PIs (0.80, IC 95% 0.65-0.95, $p<0.001$). La combinación del punto de corte de niveles de HBcrAg ≤ 3 logU/mL y ADN VHB <2.000 UI/mL mostró VPP y exactitud diagnóstica $>85\%$ para la correcta clasificación de los PIs en todos los GTs, a excepción de los GTs H o F, cuyo VPP y exactitud diagnóstica fueron 62.5% y 72.7%. La combinación de los niveles de HBsAg, con los valores de ADN VHB no mejoraron la exactitud diagnóstica de los mismos, a excepción del GT D (Tabla 6).

Ciento tres (51%) y 81 (40%) sujetos presentaron determinaciones consecutivas de HBsAg a los 6 y 12 meses, respectivamente. En general, no se observaron diferencias a lo largo de este período de tiempo (mes 6: diferencia media 0.036, IC 95% -0.035-0.11, $p=0.32$; mes 12: diferencia media 0.069, IC 95% -0.024-0.16, $p=0.15$). El análisis por separado de los PIs sí mostró una disminución significativa en los niveles de HBsAg. En los 48 PIs que presentaban determinaciones separadas por un intervalo de 12 meses, se observó una disminución media de 0.16 logUI/mL (IC 95% 0.078-0.23, $p<0.001$), diferencia no significativa para los sujetos con actividad por el VHB ($p=0.67$).

	HBsAg ≤ 3.21 logUI/mL					HBsAg ≤ 3.21 logU/mL + ADN VHB ≤ 2000 UI/mL				
Población	Todos	GT A	GT D	GT E	GT F o H	Todos	GT A	GT D	GT E	GT F o H
	N=202	N=75	N=58	N=36	N=24	N=202	N=75	N=58	N=36	N=24
VPP (%)	81.7%	92.3%	81.6%	83.3%	100%	89.3%	92.3%	93.9%	90.9%	100%
VPN (%)	43.3%	42.9%	65.0%	33.3%	34.8%	46.5%	42.9%	66.7%	36%	34.8%
Sensibilidad (%)	49.6%	46.2%	81.6%	38.5%	6.3%	49.6%	46.2%	81.6%	38.5%	6.3%
Especificidad (%)	77.6%	91.3%	65.0%	80%	100%	88.1%	91.3%	90%	90%	100%
Exactitud diagnóstica (%)	58.9%	60%	75.9%	50%	37.5%	62.4%	60.0%	84.4%	52.8%	37.5%
	HBcrAg ≤ 3 logU/mL					HBcrAg ≤ 3 logU/mL + ADN VHB ≤ 2000 UI/mL				
Población	Todos	GT A	GT D	GT E	GT F o H	Todos	GT A	GT D	GT E	GT F o H
	N=134	N=65	N=38	N=16	N=11	N=134	N=65	N=38	N=16	N=11
VPP (%)	73.3%	82.5%	68.6%	78.6%	45.5%	86.1%	92.2%	85.7%	90.9%	62.5%
VPN (%)	85.7%	87.5%	66.7%	100%	0%	90.9%	92.9%	90%	80%	100%
Sensibilidad (%)	97.8%	97.9%	95%	100%	100%	96.7%	97.9%	96%	90.9%	100%
Especificidad (%)	27.3%	41.2%	15.4%	40%	0%	68.2%	76.5%	69.2%	80%	50%
Exactitud diagnóstica (%)	74.6%	83.1%	68.4%	81.3%	45.5%	87.3%	92.3%	86.8%	87.5%	72.7%

Tabla 6. Valores predictivos e índices diagnósticos de los puntos de corte con mayor capacidad predictiva en nuestro grupo de estudio.

Discusión

En esta cohorte de pacientes con infección crónica por VHB HBeAg negativo bien caracterizados mediante seguimiento prospectivo, que incluyó PIs y sujetos con actividad por el VHB, se ha observado que los niveles de HBsAg varían en función del GT, siendo superiores en sujetos infectados por GT H o F. La buena correlación entre los niveles de HBsAg y ADN VHB en pacientes GT A y D se tradujo en un buen rendimiento del HBsAg para la identificación de PIs infectados por uno de estos dos GTs. Sin embargo, el hecho de que los niveles de HBsAg variaran en función del GT dificultó la identificación de un único punto de corte que fuera útil para ambos. A este respecto, el punto de corte de HBsAg < 3 logUI/mL descrito previamente por el grupo

de Brunetto *et al*⁵⁷, mostró un VPP del 83% y exactitud diagnóstica del 74% en GT D, resultados que están en relación a los bajos niveles de HBsAg documentados en estos pacientes. Por el contrario, en el resto de GTs del VHB estudiados en nuestra cohorte, el porcentaje de PIs que presentaban HBsAg <3 logUI/mL fue $\leq 30\%$, dato que enfatiza la necesidad de genotipado del VHB para el uso en práctica clínica de este punto de corte. Así pues, con respecto al GT A, los niveles que presentaron una mejor discriminación para la identificación de los PIs fue HBsAg ≤ 3.7 logUI/mL. Estas diferencias en los niveles de HBsAg entre GTs ya habían sido documentadas previamente en modelos celulares y animales. En un estudio realizado en 2006, Sugiyama *et al* demostraron que la expresión de ADN viral y HBsAg difería entre los distintos GTs, siendo superiores en GT A que B o C, seguidos por D¹³⁴. En una cohorte europea de sujetos naïve con HCB, los niveles basales de HBsAg fueron superiores en infectados por GT A que D ($p=0.007$)⁴⁸. También en acuerdo con nuestros hallazgos, datos de pacientes con HCB tratados con pegIFN mostraron niveles basales de HBsAg superiores en sujetos GT A (4.7 logUI/mL) en comparación con GT D (3.8 logUI/mL)⁶⁷.

El HBcrAg es un marcador sérico recientemente descrito y entre cuyas potenciales utilidades se encuentra la identificación de pacientes en riesgo de desarrollar CHC o de presentar recidiva de la infección por VHB tras interrumpir el tratamiento antiviral. En nuestro estudio, los niveles de HBcrAg no difirieron entre PIs infectados por diferentes GTs del VHB, y de hecho, la combinación del niveles de HBcrAg junto con ADN VHB mostró una excelente discriminación para la identificación de PIs, con VPP y exactitud diagnóstica $>85\%$ en todos los GTs, excepto los GTs H o F, para los cuales estos valores fueron 62.5% y 72.7%, respectivamente. Por lo tanto, una determinación puntual de HBcrAg ≤ 3 logU/mL y ADN VHB ≤ 2.000 UI/mL permite clasificar a los sujetos HBeAg negativo como PIs con una alta exactitud diagnóstica, sin necesidad de realizar genotipado del VHB.

Una de las ventajas de nuestro estudio es la inclusión prospectiva de pacientes infectados por diferentes GTs del VHB, incluyendo E, H y F, sobre los cuales la información es escasa, a pesar de ser los GTs más frecuentes en algunas de las zonas dónde la infección por VHB es más prevalente. Entre las limitaciones se encuentra que la distribución de sujetos según GT no fue homogénea, hecho que resulta de la inclusión prospectiva, no seleccionada de pacientes. A este respecto, pocos pacientes infectados

por GT B o C pudieron ser incluidos y por lo tanto no fueron analizados. Además, los niveles de HBcrAg no pudieron ser realizados en todos los sujetos, derivando en un número relativo pequeño de sujetos cuando la muestra se dividía en PIs y sujetos con actividad por el VHB.

En conclusión, en esta cohorte amplia de sujetos HBeAg negativo se ha observado una fuerte influencia del GT del VHB sobre los niveles de HBsAg, que fueron más elevados en sujetos infectados por GT H o F, hecho que dificulta la identificación de un único punto de corte útil para todos los GTs. Por lo tanto, el uso de los niveles de HBsAg para la clasificación de los pacientes como PIs requiere de genotipado del VHB o bien identificación del GT predominante en la población estudiada. Por el contrario, los niveles de HBcrAg fueron homogéneos entre PIs infectados por diferentes GTs y su combinación con los niveles de ADN VHB permitió la correcta identificación del PIs sin necesidad de genotipar el VHB.

V. Conclusiones

Estudio 1

- El tratamiento antiviral a largo plazo con entecavir o tenofovir en sujetos caucásicos se asocia en práctica clínica real con una alta tasa de respuesta virológica y bioquímica. La seguridad de estos fármacos fue buena, sin observarse empeoramiento de la función renal.
- La supresión de la replicación viral mediante tratamiento con análogos de nucleós(t)idos disminuye, aunque no elimina, el riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular.
- Una puntuación igual o superior a 10 puntos en el modelo Page-B permite seleccionar a todos los sujetos caucásicos con riesgo de presentar carcinoma hepatocelular durante el tratamiento con entecavir o tenofovir.

Estudio 2

- Los niveles de HBsAg en sujetos con infección crónica por VHB HBeAg negativo, difieren de acuerdo con el genotipo del VHB.
- Los niveles de HBcrAg presentan una mayor exactitud diagnóstica para la identificación de portadores inactivos del VHB que los de HBsAg.
- La combinación de los niveles de HBcrAg ≤ 3 logUI/mL junto con ADN VHB ≤ 2.000 UI/mL es útil para la identificación de portadores inactivos del VHB, independientemente del genotipo.

VI. Bibliografía

1. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:51-68.
2. Simon K, Lingappa VR, Ganem D. Secreted hepatitis B surface antigen polypeptides are derived from a transmembrane precursor. *J Cell Biol* 1988;107:2163-8.
3. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004;350:1118-29.
4. Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 2007;13:48-64.
5. Liaw YF. Hepatitis B virus replication and liver disease progression: the impact of antiviral therapy. *Antivir Ther* 2006;11:669-79.
6. Tong S, Revill P. Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability. *J Hepatol* 2016;64:S4-S16.
7. Lau JY, Wright TL. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet* 1993;342:1335-40.
8. Kao JH. Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:643-50.
9. McMahon BJ. Chronic hepatitis B virus infection. *Med Clin North Am* 2014;98:39-54.
10. Fattovich G. Natural history and prognosis of hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2003;23:47-58.
11. McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Semin Liver Dis* 2004;24 Suppl 1:17-21.
12. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007;45:507-39.
13. Salleras L, Dominguez A, Bruguera M, et al. Declining prevalence of hepatitis B virus infection in Catalonia (Spain) 12 years after the introduction of universal vaccination. *Vaccine* 2007;25:8726-31.
14. Zhu YY, Mao YZ, Wu WL, et al. Does hepatitis B virus prenatal transmission result in postnatal immunoprophylaxis failure? *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:1836-41.
15. Hyams KC. Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review. *Clin Infect Dis* 1995;20:992-1000.
16. McMahon BJ, Alward WL, Hall DB, et al. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *J Infect Dis* 1985;151:599-603.
17. Liaw YF. Impact of therapy on the long-term outcome of chronic hepatitis B. *Clin Liver Dis* 2013;17:413-23.
18. Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol* 2008;48:335-52.
19. Lok AS, Trinh H, Carosi G, et al. Efficacy of entecavir with or without tenofovir disoproxil fumarate for nucleos(t)ide-naïve patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2012;143:619-28.e1.
20. Fattovich G, Olivari N, Pasino M, et al. Long-term outcome of chronic hepatitis B in Caucasian patients: mortality after 25 years. *Gut* 2008;57:84-90.
21. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, et al. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 2003;29:1705-13.
22. Castera L, Vergniol J, Foucher J, et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005;128:343-50.
23. Degos F, Perez P, Roche B, et al. Diagnostic accuracy of FibroScan and comparison to liver fibrosis biomarkers in chronic viral hepatitis: a multicenter prospective study (the FIBROSTIC study). *J Hepatol* 2010;53:1013-21.

24. Oliveri F, Coco B, Ciccorossi P, et al. Liver stiffness in the hepatitis B virus carrier: a non-invasive marker of liver disease influenced by the pattern of transaminases. *World J Gastroenterol* 2008;14:6154-62.
25. Marcellin P, Ziol M, Bedossa P, et al. Non-invasive assessment of liver fibrosis by stiffness measurement in patients with chronic hepatitis B. *Liver Int* 2009;29:242-7.
26. Chan HL, Wong GL, Choi PC, et al. Alanine aminotransferase-based algorithms of liver stiffness measurement by transient elastography (Fibroscan) for liver fibrosis in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2009;16:36-44.
27. Vigano M, Paggi S, Lampertico P, et al. Dual cut-off transient elastography to assess liver fibrosis in chronic hepatitis B: a cohort study with internal validation. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;34:353-62.
28. Papatheodoridis GV, Manolakopoulos S, Margariti A, et al. The usefulness of transient elastography in the assessment of patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 2014;21:517-24.
29. Fung J, Lai CL, Cheng C, et al. Mild-to-moderate elevation of alanine aminotransferase increases liver stiffness measurement by transient elastography in patients with chronic hepatitis B. *Am J Gastroenterol* 2011;106:492-6.
30. Buti M, Garcia-Samaniego J, Prieto M, et al. [Consensus document of the Spanish Association for the Study of the Liver on the treatment of hepatitis B infection (2012)]. *Gastroenterol Hepatol* 2012;35:512-28.
31. Marcellin P, Gane E, Buti M, et al. Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. *Lancet* 2013;381:468-75.
32. Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 2004;351:1521-31.
33. Papatheodoridis GV, Chan HL, Hansen BE, et al. Risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B: assessment and modification with current antiviral therapy. *J Hepatol* 2015;62:956-67.
34. Kim GA, Lim YS, An J, et al. HBsAg seroclearance after nucleoside analogue therapy in patients with chronic hepatitis B: clinical outcomes and durability. *Gut* 2014;63:1325-32.
35. Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, et al. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet* 2005;365:123-9.
36. Lau GK, Piratvisuth T, Luo KX, et al. Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005;352:2682-95.
37. Fried MW, Piratvisuth T, Lau GK, et al. HBeAg and hepatitis B virus DNA as outcome predictors during therapy with peginterferon alfa-2a for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Hepatology* 2008;47:428-34.
38. Piratvisuth T, Marcellin P, Popescu M, et al. Hepatitis B surface antigen: association with sustained response to peginterferon alfa-2a in hepatitis B e antigen-positive patients. *Hepatol Int* 2013;7:429-36.
39. Sonneveld MJ, Hansen BE, Piratvisuth T, et al. Response-guided peginterferon therapy in hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B using serum hepatitis B surface antigen levels. *Hepatology* 2013;58:872-80.
40. Chang TT, Liaw YF, Wu SS, et al. Long-term entecavir therapy results in the reversal of fibrosis/cirrhosis and continued histological improvement in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2010;52:886-93.

41. Buti M, Tsai N, Petersen J, et al. Seven-year efficacy and safety of treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B virus infection. *Dig Dis Sci* 2015;60:1457-64.
42. Tenney DJ, Pokornowski KA, Rose RE, et al. Entecavir maintains a high genetic barrier to HBV resistance through 6 years in naive patients. *J Hepatol* 2009;50:S10.
43. Blumberg BS, Sutnick AI, London WT. Hepatitis and leukemia: their relation to Australia antigen. *Bull N Y Acad Med* 1968;44:1566-86.
44. Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* 2004;126:1750-8.
45. Chan HL, Wong VW, Tse AM, et al. Serum hepatitis B surface antigen quantitation can reflect hepatitis B virus in the liver and predict treatment response. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:1462-8.
46. Nguyen T, Thompson AJ, Bowden S, et al. Hepatitis B surface antigen levels during the natural history of chronic hepatitis B: a perspective on Asia. *J Hepatol* 2010;52:508-13.
47. Thompson AJ, Nguyen T, Iser D, et al. Serum hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen titers: disease phase influences correlation with viral load and intrahepatic hepatitis B virus markers. *Hepatology* 2010;51:1933-44.
48. Jaroszewicz J, Calle Serrano B, Wursthorn K, et al. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: a European perspective. *J Hepatol* 2010;52:514-22.
49. Chan HL, Wong VW, Wong GL, et al. A longitudinal study on the natural history of serum hepatitis B surface antigen changes in chronic hepatitis B. *Hepatology* 2010;52:1232-41.
50. Kim YJ, Cho HC, Choi MS, et al. The change of the quantitative HBsAg level during the natural course of chronic hepatitis B. *Liver Int* 2011;31:817-23.
51. Le Guillou DB, Duclos-Vallee JC, Eberle F, et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection and quantification of hepatitis B virus PreS1 envelope antigen in serum samples: comparison with two commercial assays for monitoring hepatitis B virus DNA. *J Viral Hepat* 2000;7:387-92.
52. Wursthorn K, Jaroszewicz J, Zacher BJ, et al. Correlation between the Elecsys HBsAg II assay and the Architect assay for the quantification of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in the serum. *J Clin Virol* 2011;50:292-6.
53. Wiegand J, Wedemeyer H, Finger A, et al. A decline in hepatitis B virus surface antigen (hbsag) predicts clearance, but does not correlate with quantitative hbeag or HBV DNA levels. *Antivir Ther* 2008;13:547-54.
54. Manesis EK, Hadziyannis ES, Angelopoulou OP, et al. Prediction of treatment-related HBsAg loss in HBeAg-negative chronic hepatitis B: a clue from serum HBsAg levels. *Antivir Ther* 2007;12:73-82.
55. Seto WK, Wong DK, Fung J, et al. High hepatitis B surface antigen levels predict insignificant fibrosis in hepatitis B e antigen positive chronic hepatitis B. *PLoS One* 2012;7:e43087.
56. Martinot-Peignoux M, Carvalho-Filho R, Lapalus M, et al. Hepatitis B surface antigen serum level is associated with fibrosis severity in treatment-naive, e antigen-positive patients. *J Hepatol* 2013;58:1089-95.
57. Brunetto MR, Oliveri F, Colombatto P, et al. Hepatitis B surface antigen serum levels help to distinguish active from inactive hepatitis B virus genotype D carriers. *Gastroenterology* 2010;139:483-90.
58. Martinot-Peignoux M, Lada O, Cardoso A, et al. Quantitative HBsAg: a new specific marker for the diagnosis of HBsAg inactive carriage. *J Hepatol* 2010;52:S992.

59. Brouwer WP, Lik-Yuen Chan H, Brunetto MR, et al. Repeated Measurements of Hepatitis B Surface Antigen Identify Carriers of Inactive HBV During Long-Term Follow-Up. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016.
60. Chan HL, Wong GL, Tse CH, et al. Viral determinants of hepatitis B surface antigen seroclearance in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients. *J Infect Dis* 2011;204:408-14.
61. Tseng TC, Liu CJ, Su TH, et al. Serum hepatitis B surface antigen levels predict surface antigen loss in hepatitis B e antigen seroconverters. *Gastroenterology* 2011;141:517-25, 525.e1-2.
62. Knop V, Herrmann E, Vermehren J, et al. Prediction of HBsAg seroclearance and HBsAg seroconversion in a cohort of inactive European hepatitis B (HBV) carriers: a prospective longitudinal study (ALBATROS study). *J Hepatol* 2015;62:S533-S534.
63. Janssen HL, Kerhof-Los CJ, Heijtkink RA, et al. Measurement of HBsAg to monitor hepatitis B viral replication in patients on alpha-interferon therapy. *Antiviral Res* 1994;23:251-7.
64. Sonneveld MJ, Rijckborst V, Boucher CA, et al. Prediction of sustained response to peginterferon alfa-2b for hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B using on-treatment hepatitis B surface antigen decline. *Hepatology* 2010;52:1251-7.
65. Piratvisuth T, Marcellin P, Popescu M, et al. Hepatitis B surface antigen: association with sustained response to peginterferon alfa-2a in hepatitis B e antigen-positive patients. *Hepatol Int* 2011.
66. Moucari R, Mackiewicz V, Lada O, et al. Early serum HBsAg drop: a strong predictor of sustained virological response to pegylated interferon alfa-2a in HBeAg-negative patients. *Hepatology* 2009;49:1151-7.
67. Brunetto MR, Marcellin P, Cherubini B, et al. Response to peginterferon alfa-2a (40KD) in HBeAg-negative CHB: on-treatment kinetics of HBsAg serum levels vary by HBV genotype. *J Hepatol* 2013;59:1153-9.
68. Goulis I, Karatapanis S, Akriviadis E, et al. On-treatment prediction of sustained response to peginterferon alfa-2a for HBeAg-negative chronic hepatitis B patients. *Liver Int* 2015;35:1540-8.
69. Peng CY, Lai HC, Li YF, et al. Early serum HBsAg level as a strong predictor of sustained response to peginterferon alfa-2a in HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;35:458-68.
70. Rijckborst V, Hansen BE, Cakaloglu Y, et al. Early on-treatment prediction of response to peginterferon alfa-2a for HBeAg-negative chronic hepatitis B using HBsAg and HBV DNA levels. *Hepatology* 2010;52:454-61.
71. Singh AK, Sharma MK, Hissar SS, et al. Relevance of hepatitis B surface antigen levels in patients with chronic hepatitis B during 5 year of tenofovir treatment. *J Viral Hepat* 2014;21:439-46.
72. Zoulim F, Carosi G, Greenbloom S, et al. Quantification of HBsAg in nucleos(t)ide-naive patients treated for chronic hepatitis B with entecavir with or without tenofovir in the BE-LOW study. *J Hepatol* 2015;62:56-63.
73. Gish RG, Chang TT, Lai CL, et al. Quantitative hepatitis B surface antigen analysis in hepatitis B e antigen-positive nucleoside-naive patients treated with entecavir. *Antivir Ther* 2013;18:691-8.
74. Papatheodoridis G, Triantos C, Hadziyannis E, et al. Serum HBsAg kinetics and usefulness of interferon-inducible protein 10 serum in HBeAg-negative chronic hepatitis B patients treated with tenofovir disoproxil fumarate. *J Viral Hepat* 2015;22:1079-87.

75. Marcellin P, Buti M, Krastev Z, et al. Kinetics of hepatitis B surface antigen loss in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B treated with tenofovir disoproxil fumarate. *J Hepatol* 2014;61:1228-37.
76. Hadziyannis SJ, Sevastianos V, Rapti I, et al. Sustained responses and loss of HBsAg in HBeAg-negative patients with chronic hepatitis B who stop long-term treatment with adefovir. *Gastroenterology* 2012;143:629-36.
77. Chi H, Hansen BE, Yim C, et al. Reduced risk of relapse after long-term nucleos(t)ide analogue consolidation therapy for chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther* 2015;41:867-76.
78. Seto WK, Hui AJ, Wong VW, et al. Treatment cessation of entecavir in Asian patients with hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B: a multicentre prospective study. *Gut* 2015;64:667-72.
79. Jeng WJ, Sheen IS, Chen YC, et al. Off-therapy durability of response to entecavir therapy in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients. *Hepatology* 2013;58:1888-96.
80. Patwardhan VR, Sengupta N, Bonder A, et al. Treatment cessation in noncirrhotic, e-antigen negative chronic hepatitis B is safe and effective following prolonged anti-viral suppression with nucleosides/nucleotides. *Aliment Pharmacol Ther* 2014;40:804-10.
81. Liang Y, Jiang J, Su M, et al. Predictors of relapse in chronic hepatitis B after discontinuation of anti-viral therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;34:344-52.
82. Chien RN, Yeh CT, Tsai SL, et al. Determinants for sustained HBeAg response to lamivudine therapy. *Hepatology* 2003;38:1267-73.
83. Lee HW, Lee HJ, Hwang JS, et al. Lamivudine maintenance beyond one year after HBeAg seroconversion is a major factor for sustained virologic response in HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Hepatology* 2010;51:415-21.
84. Pan X, Zhang K, Yang X, et al. Relapse rate and associated-factor of recurrence after stopping NUCs therapy with different prolonged consolidation therapy in HBeAg positive CHB patients. *PLoS One* 2013;8.
85. Papatheodoridis G, Vlachogiannakos I, Cholongitas E, et al. Discontinuation of oral antivirals in chronic hepatitis B: A systematic review. *Hepatology* 2016;63:1481-92.
86. Buti M, Casillas R, Riveiro-Barciela M, et al. Tenofovir discontinuation after long-term viral suppression in HBeAg negative chronic hepatitis B. Can HBsAg levels be useful? *J Clin Virol* 2015;68:61-8.
87. Cai W, Xie Q, An B, et al. On-treatment serum HBsAg level is predictive of sustained off-treatment virologic response to telbivudine in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients. *J Clin Virol* 2010;48:22-6.
88. Glebe D, Bremer CM. The molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis* 2013;33:103-12.
89. Kimura T, Ohno N, Terada N, et al. Hepatitis B virus DNA-negative Dane particles lack core protein but contain a 22-kDa precore protein without C-terminal arginine-rich domain. *J Biol Chem* 2005;280:21713-9.
90. Wong DK, Tanaka Y, Lai CL, et al. Hepatitis B virus core-related antigens as markers for monitoring chronic hepatitis B infection. *J Clin Microbiol* 2007;45:3942-7.
91. Suzuki F, Miyakoshi H, Kobayashi M, et al. Correlation between serum hepatitis B virus core-related antigen and intrahepatic covalently closed circular DNA in chronic hepatitis B patients. *J Med Virol* 2009;81:27-33.
92. Tada T, Kumada T, Toyoda H, et al. HBcrAg predicts hepatocellular carcinoma development: An analysis using time-dependent receiver operating characteristics. *J Hepatol* 2016;65:48-56.

93. Seto WK, Wong DK, Fung J, et al. Linearized hepatitis B surface antigen and hepatitis B core-related antigen in the natural history of chronic hepatitis B. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:1173-80.
94. Maasoumy B, Wiegand SB, Jaroszewicz J, et al. Hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) levels in the natural history of hepatitis B virus infection in a large European cohort predominantly infected with genotypes A and D. *Clin Microbiol Infect* 2015;21:606.e1-10.
95. Chang TT, Lai CL, Kew Yoon S, et al. Entecavir treatment for up to 5 years in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Hepatology* 2010;51:422-30.
96. Ono A, Suzuki F, Kawamura Y, et al. Long-term continuous entecavir therapy in nucleos(t)ide-naïve chronic hepatitis B patients. *J Hepatol* 2012;57:508-14.
97. Yokosuka O, Takaguchi K, Fujioka S, et al. Long-term use of entecavir in nucleoside-naïve Japanese patients with chronic hepatitis B infection. *J Hepatol* 2010;52:791-9.
98. Xu Y, Zhang YG, Wang X, et al. Long-term antiviral efficacy of entecavir and liver histology improvement in Chinese patients with hepatitis B virus-related cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2015;21:7869-76.
99. Wong GL, Chan HL, Mak CW, et al. Entecavir treatment reduces hepatic events and deaths in chronic hepatitis B patients with liver cirrhosis. *Hepatology* 2013;58:1537-47.
100. Zoutendijk R, Reijnders JG, Zoulim F, et al. Virological response to entecavir is associated with a better clinical outcome in chronic hepatitis B patients with cirrhosis. *Gut* 2013;62:760-5.
101. Shim JH, Lee HC, Kim KM, et al. Efficacy of entecavir in treatment-naïve patients with hepatitis B virus-related decompensated cirrhosis. *J Hepatol* 2010;52:176-82.
102. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016;66:7-30.
103. Yang HI, Yuen MF, Chan HL, et al. Risk estimation for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B (REACH-B): development and validation of a predictive score. *Lancet Oncol* 2011;12:568-74.
104. Arends P, Sonneveld MJ, Zoutendijk R, et al. Entecavir treatment does not eliminate the risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B: limited role for risk scores in Caucasians. *Gut* 2015;64:1289-95.
105. Hiramatsu N, Yamada R, Takehara T. The suppressive effect of nucleos(t)ide analogue treatment on the incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2015.
106. Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, et al. Long-term entecavir treatment reduces hepatocellular carcinoma incidence in patients with hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2013;58:98-107.
107. Papatheodoridis GV, Manolakopoulos S, Touloumi G, et al. Virological suppression does not prevent the development of hepatocellular carcinoma in HBeAg-negative chronic hepatitis B patients with cirrhosis receiving oral antiviral(s) starting with lamivudine monotherapy: results of the nationwide HEPNET. Greece cohort study. *Gut* 2011;60:1109-16.
108. Papatheodoridis G, Dalekos G, Sypsa V, et al. PAGE-B: A risk score for hepatocellular carcinoma in Caucasians with chronic hepatitis B under a 5-year entecavir or tenofovir therapy. *J Hepatol* 2015.
109. Viread I-tdf-EMA.
110. Sise ME, Hirsch JS, Canetta PA, et al. Nonalbumin proteinuria predominates in biopsy-proven tenofovir nephrotoxicity. *Aids* 2015;29:941-6.
111. Fontana RJ. Side effects of long-term oral antiviral therapy for hepatitis B. *Hepatology* 2009;49:S185-95.

112. Gupta SK. Tenofovir-associated Fanconi syndrome: review of the FDA adverse event reporting system. *AIDS Patient Care STDS* 2008;22:99-103.
113. Conti F, Vitale G, Cursaro C, et al. Tenofovir-induced Fanconi syndrome in a patient with chronic hepatitis B mono-infection. *Ann Hepatol* 2016;15:273-6.
114. Hwang HS, Park CW, Song MJ. Tenofovir-associated Fanconi syndrome and nephrotic syndrome in a patient with chronic hepatitis B mono-infection. *Hepatology* 2015;62:1318-20.
115. Viganò M, Brocchieri A, Spinetti A, et al. Tenofovir-induced Fanconi syndrome in chronic hepatitis B mono-infected patients that reverted after tenofovir withdrawal. *J Clin Virol* 2014;61:600-3.
116. Marcellin P, Heathcote EJ, Buti M, et al. Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2008;359:2442-55.
117. Lampertico P, Chan HL, Janssen HL, et al. Review article: long-term safety of nucleoside and nucleotide analogues in HBV-mono-infected patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2016;44:16-34.
118. Lampertico P, Soffredini R, Yurdaydin C, et al. Four years of tenofovir monotherapy for NUC naïve field practice European patients suppresses HBV replication in most patients with a favorable renal safety profile but does not prevent HCC in patients with or without cirrhosis. *Hepatology* 2013;58:S653.
119. Marzano A, Marengo A, Marietti M, et al. Lactic acidosis during Entecavir treatment in decompensated hepatitis B virus-related cirrhosis. *Dig Liver Dis* 2011;43:1027-8.
120. Cohen SM, Levy RM, Jovanovich JF, et al. Fatal lactic acidosis associated with the use of combination oral medications to treat reactivation of hepatitis B. *J Clin Gastroenterol* 2009;43:1008-10.
121. Lange CM, Bojunga J, Hofmann WP, et al. Severe lactic acidosis during treatment of chronic hepatitis B with entecavir in patients with impaired liver function. *Hepatology* 2009;50:2001-6.
122. Yuen MF, Seto WK, Fung J, et al. Three years of continuous entecavir therapy in treatment-naïve chronic hepatitis B patients: VIRAL suppression, viral resistance, and clinical safety. *Am J Gastroenterol* 2011;106:1264-71.
123. Sherman M, Yurdaydin C, Simsek H, et al. Entecavir therapy for lamivudine-refractory chronic hepatitis B: improved virologic, biochemical, and serology outcomes through 96 weeks. *Hepatology* 2008;48:99-108.
124. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer* 2012;48:599-641.
125. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2012;57:167-85.
126. Marcellin P, Zoulim F, Hezode C, et al. Effectiveness and Safety of Tenofovir Disoproxil Fumarate in Chronic Hepatitis B: A 3-Year, Prospective, Real-World Study in France. *Dig Dis Sci* 2016.
127. Petersen J, Heyne R, Mauss S, et al. Effectiveness and Safety of Tenofovir Disoproxil Fumarate in Chronic Hepatitis B: A 3-Year Prospective Field Practice Study in Germany. *Dig Dis Sci* 2015.
128. Shin JH, Kwon HJ, Jang HR, et al. Risk Factors for Renal Functional Decline in Chronic Hepatitis B Patients Receiving Oral Antiviral Agents. *Medicine (Baltimore)* 2016;95:e2400.
129. Liaw YF, Sheen IS, Lee CM, et al. Tenofovir disoproxil fumarate (TDF), emtricitabine/TDF, and entecavir in patients with decompensated chronic hepatitis B liver disease. *Hepatology* 2011;53:62-72.

130. Gish RG, Clark MD, Kane SD, et al. Similar risk of renal events among patients treated with tenofovir or entecavir for chronic hepatitis B. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012;10:941-6; quiz e68.
131. Iloeje UH, Yang HI, Su J, et al. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology* 2006;130:678-86.
132. Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994;198:489-503.
133. Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, et al. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002;83:2059-73.
134. Sugiyama M, Tanaka Y, Kato T, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the intra- and extracellular expression of viral DNA and antigens. *Hepatology* 2006;44:915-24.