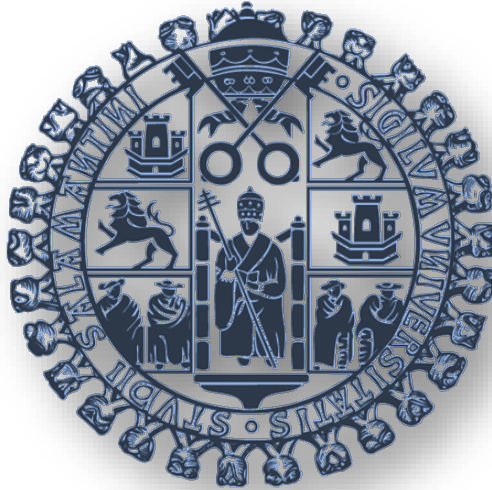


UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

**Departamento de Ciencias Biomédicas y
del Diagnóstico**



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VIRUS DE LA
HEPATITIS B RESISTENTES**

TESIS DOCTORAL

Ana María Blázquez de Castro

2015

A mis padres

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis la Dra. María Nieves Gutiérrez Zufiaurre y el Dr. Santiago Muñoz Criado su apoyo para llevar adelante este proyecto.

A la Dra. Ana María Haro del Servicio de Medicina Preventiva y Salud Pública del Hospital de Salamanca por su ayuda en cuestiones estadísticas.

A todo el Servicio de Microbiología del Hospital de Salamanca, en especial a los laboratorios de Biología Molecular y Serología, por su profesionalidad y buen hacer que hicieron posible la realización de este trabajo a lo largo de estos años. Gracias, Anarbella Bajo, Loli Blanco, Maite Blázquez, María José de Cabo, Mar Clemente, Elva González, Mary Cruz Navazo y María José Salvador. Desde aquí quiero recordar con cariño y gratitud a Paula Gómez que ya no está entre nosotros.

Deseo mencionar de manera especial a Pepa García Ávila que sufrió conmigo todos los escollos que surgieron mientras se realizaba este trabajo y nunca se desalentó. Al final, logramos salvarlos.

A todos mis compañeros que día a día me enriquecen personal y profesionalmente, sobre todo a los que me ayudaron en este proyecto, la Dra. Ángela Sánchez de San Lorenzo y el Prof. Dr. Juan Luis Muñoz Bellido.

A todos los microbiólogos que contribuyeron a mi formación, en especial el Dr. Jesús Iglesias.

A los residentes que desinteresadamente me ayudaron estos años: Isabel Porras, Silvia Vega, Mada González, Lourdes Viñuela, Marisa Fernández, Lucy Asensio, Noelia Calvo, María Siller y Sara Hernández. El futuro de la Microbiología está en buenas manos.

A Maribel Mateos por su eficacia para gestionar todo lo relativo a las historia clínicas y a Berna María por su ayuda técnica.

Por último quiero agradecer a mi familia su apoyo constante: a mis tías María Amelia y María Cruz y a mi prima Belén por preocuparse por mí, a mis hermanos Francisco Javier y Mateo y a mis cuñadas Lupe y Mabel que siempre están ahí para lo que necesite. Gracias a mis sobrinos Ana Isabel y Mateo por levantarme el ánimo en los momentos bajos, y por último gracias a mis padres que ni un solo instante de mi vida me han defraudado.

1. ESTRUCTURA DEL VHB	7
2. ESTRUCTURA DEL GENOMA VIRAL.....	10
2.1. Gen <i>C</i>	10
2.2. Gen <i>S</i>	11
2.3. Gen <i>P</i>	12
2.4. Gen <i>X</i>	12
2.5. Promotores y <i>enhancer</i>	12
2.6. ADN y ARN	13
3. PROTEINAS VÍRICAS	15
3.1. Polimerasa vírica.....	15
3.2. Antígeno core.....	15
3.3. Antígeno e.....	16
3.4. Antígeno de superficie	16
3.5. Proteína <i>X</i>	17
4. VARIABILIDAD GENÓMICA DEL VHB.....	19
4.1. Mutaciones en el gen <i>C</i>	20
4.2. Mutaciones en el gen <i>S</i>	21
4.3. Mutaciones en el gen <i>P</i>	22
4.4. Mutaciones en el gen <i>X</i>	23
5. GENOTIPOS	24
6. CICLO BIOLÓGICO.....	27
7. PATOGENIA.....	29
8. MARCADORES SEROLÓGICOS	32
8.1. Antígeno de superficie (HBsAg)	32
8.2. Anticuerpo de superficie (HBsAc).....	32
8.3. Antígeno del core (HBcAg).....	32
8.4. Anticuerpo del core (HBcAc)	32
8.5. Antígeno e (HBeAg).....	33
8.6. Anticuerpo e (HBeAc)	33
9. PATRONES SEROLÓGICOS ATÍPICOS	35
10. EPIDEMIOLOGÍA	38
11. HISTORIA NATURAL.....	41
11.1. Hepatitis aguda.....	41
11.2. Hepatitis crónica	42

12. CLÍNICA	44
12.1. Hepatitis aguda.....	44
12.2. Hepatitis fulminante.....	45
12.3. Hepatitis crónica	46
13. INFECCIÓN CRÓNICA POR VHB Y CIRROSIS	48
14. HEPATITIS B Y HEPATOCARCINOMA.....	49
15. HEPATITIS OCULTA	52
16. HEPATITIS B Y EMBARAZO	54
17. HEPATITIS B CRÓNICA EN NIÑOS	54
18. COINFECCIONES CON OTROS VIRUS	55
18.1. Coinfección VHB-VIH	55
18.2. Coinfección VHB-VHC.....	55
18.3. Coinfección VHB-VHD	55
19. DIAGNÓSTICO	57
19.1. Marcadores bioquímicos.....	57
19.2. Marcadores serológicos	59
19.3. Marcadores virológicos.....	59
19.4. Marcadores histológicos	61
19.4.1. Ecografía abdominal	61
20. TRATAMIENTO.....	62
20.1. Respuesta al tratamiento	67
20.2. Fármacos antivirales	68
20.3. Factores predictivos de respuesta.....	73
20.4. Recaída virológica	75
20.5. Monitorización del tratamiento.....	76
20.6. Tratamiento en cirrosis	77
20.7. Tratamiento en coinfecciones	78
20.8. Tratamiento en niños.....	79
20.9 Tratamiento en el embarazo.....	79
20.9. Tratamiento para prevenir reactivaciones en inmunodeprimidos.....	79
20.10. Tratamiento de las manifestaciones extrahepáticas	80
21. MUTANTES DE RESISTENCIA	81
21.1. Mutaciones relacionadas con resistencia a lamivudina	83
21.2. Mutaciones relacionadas con resistencia a telbivudina	84
21.3. Mutaciones relacionadas con resistencia a adefovir	84
21.4. Mutaciones relacionadas con resistencia a entecavir.....	85

21.5. Mutaciones relacionadas con resistencia a tenofovir.....	85
21.6. Mutaciones ADASM (antiviral-drug-associated S gene mutations)	86
21.7. Mutaciones PBC y <i>precore</i> y relación con resistencias.....	86
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	¡Error! Marcador no definido.
IV. RESULTADOS	112
V. DISCUSIÓN	¡Error! Marcador no definido.
VI. CONCLUSIONES.....	¡Error! Marcador no definido.
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	144

1. ESTRUCTURA DEL VHB

El virus de la hepatitis B (VHB) fue descubierto en 1967. Baruk Blumberg, estudiando el suero de enfermos que habían recibido múltiples transfusiones y presentaban transaminasas repetidamente elevadas en suero, descubrió la presencia de una proteína antigénica con una velocidad electroforética similar a las globulinas α -2. Se trataba del antígeno de superficie del VHB (HBsAg). Se le denominó antígeno Australia debido a que se aisló en un aborigen australiano por primera vez (Blumberg y col., 1965).

El VHB es un virus ADN perteneciente al género Orthohepadnavirus, dentro de la familia *Hepadnaviridae*. Es un virus pequeño, de morfología esférica, de 42-47 nm de diámetro (Landers TA y cols., 1977), con dos zonas:

- una zona externa, constituida por una bicapa lipídica de 7 nm de espesor de origen eucariota, a la que se encuentra asociado el HBsAg, y que condiciona el tropismo del VHB por los hepatocitos (Dane y col., 1970; Mason y col., 1980).
- una zona interna o nucleocápside, de simetría icosaédrica y 22-25 nm de diámetro, que incluye el antígeno *core* (HBcAg), una ADN polimerasa (Robinson y col., 1974), una proteína con actividad kinasa que fosforila el HBcAg (Feitelson y col., 1982), el ADN vírico y proteínas del hospedador (Hu y col., 1997). El ADN vírico es una molécula de ADN parcialmente bicatenaria, de modo que la cadena negativa, que está completa, tiene un extensión aproximada de 3200 pb, mientras que la cadena positiva, incompleta, tiene un tamaño que oscila entre los 1800 y los 2700 pb (Hruska JF y col., 1977; Sattler y col. 1979; Okamoto y col., 1988). Está unido covalentemente a la proteína terminal de la polimerasa viral (Ganem y col., 2001). La complementariedad entre las regiones 5' de las dos cadenas actúa de región terminal cohesiva permitiendo la configuración circular del genoma. Esta región contiene dos repeticiones de 11 nucleótidos llamados DR1 y DR2 (repeticiones directas cortas) que juegan un papel esencial en la replicación vírica (Miller y col., 1989) y en la integración del ADN del VHB en la célula hospedadora y están fuertemente conservadas entre los diferentes VHB y otros Hepadnavirus (Dejean A y col., 1984). El extremo 5' de la cadena negativa se halla dentro del DR1 y el 3' de la positiva en DR2 (Seeger y col., 1986).

Existe además otro antígeno vírico, el HBeAg, que no forma parte de la estructura del virus, sino que se sintetiza a partir del mismo gen que codifica el HBcAg. Es un antígeno soluble, se detecta en suero y se cree que tiene una función reguladora (Yang y col., 2006) (Figura 1).

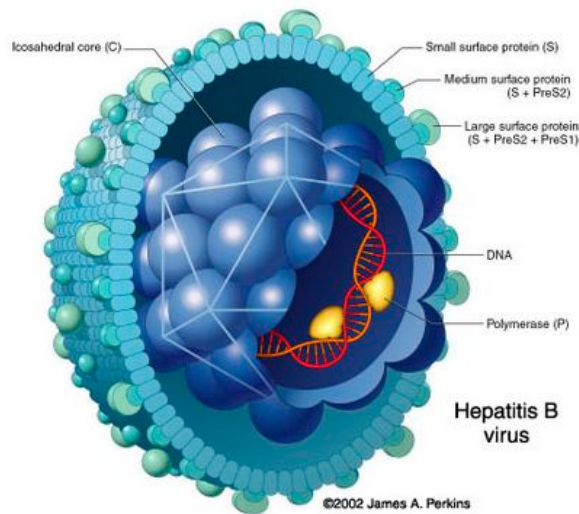


Figura 1. Estructura del VHB. J A Perkins. Tomado de es.slideshare.net

Las partículas virales completas (partículas de Dane) tienen un diámetro de 42 nm. La concentración de partículas víricas en suero puede ser superior a 10^9 copias/mL. En el suero también se encuentran las partículas S. Se trata de partículas esféricas, de 16-25 nm de diámetro, o filamentosas, de 22 nm de espesor y longitud variable, constituidas por acúmulos de HBsAg, sin componentes de la nucleocápside. Su concentración en suero puede ser superior a la de las partículas víricas (10^{13} copias/mL) (Dane y col., 1970; Summers y col., 1978; Marion y col., 1980) (Figura 2).

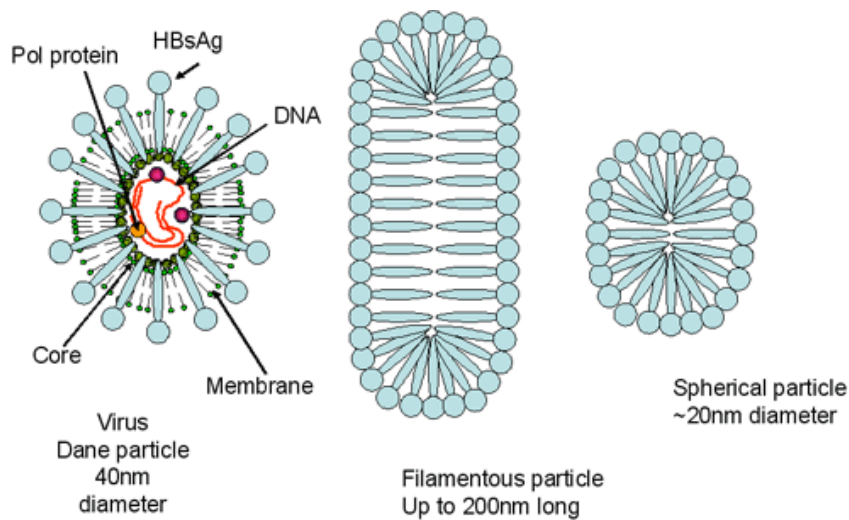


Figura 2. Estructura de partícula Dane y partículas S. Tomado de Microbiologybook.org.

2. ESTRUCTURA DEL GENOMA VIRAL

La organización del genoma del VHB es muy compleja, debido a que debe generar múltiples proteínas a partir de una molécula de ADN de extensión muy reducida. Mientras el tamaño del genoma del VHB es de unos 3200 pb si se tiene en cuenta la cadena completa, otros virus ADN, como los del grupo herpes, tienen un genoma cuyo tamaño oscila entre los 125.000 y los 250.000 pb.

Para paliar este déficit, el genoma del VHB se estructura en 4 marcos de lectura abierta (ORF) C, P, S y X fuertemente solapados. Este solapamiento hace que toda la secuencia del genoma sea codificante y que incluya los elementos reguladores. Su capacidad codificante es 1,5 veces superior a la que tendría si no existiera solapamiento de genes que se transcriben dando lugar a 5 ARN mensajeros (ARN_{precore}, ARN_{core}, ARN_{preS1}, ARN_{preS2/S} y ARN_X) (Miller y col., 1989) (Figura 3).



Figura 3. Esquema del genoma del VHB
Adaptado de proanalysis.com

Los ARNm difieren en su extremo 5' (en función de los promotores correspondientes), pero el extremo 3' es una señal poliadenilada (TATAAA) común, localizada en la región 1916-1921. Los ARN *precore* y *core* tienen una longitud mayor que el genoma, con una redundancia en el extremo 3' que va desde el lugar de inicio de la transcripción (5') hasta la señal de poliadenilación, de manera que la señal de poliadenilación sólo es reconocida como señal para la finalización de la transcripción en una segunda lectura de la transcripción. En este fragmento, la secuencia correspondiente a la región *precore* posee una estructura secundaria que es la señal de encapsulación o señal ϵ , fundamental en la replicación del virus (Junker-Niepmann y col., 1990; Pollack JR y col., 1993; Kidd AH y col., 1996).

2.1. Gen C

El gen C o *precore-core* (posiciones 1814-2458) codifica dos proteínas y tiene dos codones de iniciación (ATG). Cuando la traducción se inicia en el primer codon (posición 1814) da lugar a un péptido de 25 kD y por proteólisis, da lugar al HBeAg, de 21 kD soluble que se cree que tiene un papel importante en la inmunotolerancia y la persistencia viral. Cuando lo hace en el segundo codón de iniciación (posición

1901), da lugar al HBcAg de 21 k δ , componente de la cápside vírico. La región situada entre los dos codones de iniciación se denomina preC o *precore*.

2.2. Gen S

El gen S (posiciones 2854-833) codifica la proteína que constituye la envuelta del virus completo y las partículas no infectivas. Presenta 3 codones de iniciación (posiciones 2854, 3211 y 155) en el interior del ORF, que definen 3 regiones denominadas PreS1, PreS2 y S. En función del codón de iniciación utilizado se pueden generar 3 polipéptidos de diferente tamaño, denominados péptido L o proteína PreS1, correspondiente a las 3 regiones S, PreS1 y PreS2, con un peso molecular de 39 k δ péptido M o proteína preS2, correspondiente a las regiones PreS2 y S, con un peso molecular de 33 k δ y péptido S o proteína S, correspondiente solamente a la región S, con un peso molecular de 24 k δ . Estas proteínas muestran una glucosilación variable y dan lugar a la envuelta del virus. La proteína S es la más abundante y en ella se encuentra el asa (*loop*) antigénica “a”, que incluye los aminoácidos 124-147, frente a la que se produce la respuesta primaria de anticuerpos neutralizantes anti-HBs.

Aunque la estructura del HBsAg se mantiene en todos los casos, existen componentes alternativos que determinan la existencia de diferentes subtipos. Todos poseen el determinante antigénico “a” y dos pares de determinantes mutuamente excluyentes según los aminoácidos:

- *d/y* (aminoácido lisina o arginina en la posición 122 del HBsAg)
- *w/r* (aminoácido lisina o arginina en la posición 160 del HBsAg) con subespecies según el aminoácido en la posición 127: *w1/w2* (prolina) *w3* (treonina) o *w4* (leucina) y fenilalanina en posición 134 y/o alanina en 159 para *w2*.

Además la especificidad *q-* que corresponde a los aminoácidos alanina y glicina en las posiciones 177 y 178 y *q+* que corresponde a valina y glicina en 177 y 178 (Norder H y col., 1992; Wong W y col., 2012). Según esto, existen 10 serotipos o subtipos *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw3*, *adw4q-*, *adrq+* y *adrq-* (Robinson W y col., 1982). La proteína PreS1 parece ser la encargada de reconocer los receptores de la superficie del hepatocito e interactuar con las células T y B por lo que juega un importante papel en la respuesta inmune contra la infección por VHB (Kuroki K y cols., 1990; Maeng CY y cols., 2000; Park JH y cols., 2000; Chen BF y cols., 2006). Su receptor funcional específico es un polipéptido transportador de taurocolato sódico (Yan H y cols. 2012).

Las partículas subvéricas están formadas sobre todo por polipéptidos S, con menores cantidades de PreS2 y cantidades muy pequeñas de PreS1.

2.3. Gen P

El gen P del VHB (posiciones 2307-1623) abarca las tres cuartas partes del genoma y se solapa con la porción carboxi-terminal del gen C, el gen S completo y la porción amino-terminal del gen X. Tiene cuatro dominios funcionales: una región que codifica el cebador proteínico para la síntesis de la cadena negativa llamado proteína terminal (PT) que permanece unido covalentemente a la cadena de ADN por su dominio amino-terminal (Bartenschlager y col. 1988; Bosch y col., 1988), una región espaciadora de 300 bases no esencial, una región catalítica que codifica un polipéptido básico de 90 kDa con actividad ADN polimerasa/transcriptasa inversa (dominio RT) y el dominio RH en el extremo carboxi-terminal con actividad H ribonucleasa (Miller y col., 1986; Radziwill y col., 1990).

2.4. Gen X

El gen X del VHB es el gen más pequeño, está situado entre las posiciones 1374-1838. Codifica el HBx, un polipéptido de 145-154 aminoácidos que parece esencial para incrementar la replicación del VHB (Murakami y col., 1999; Bouchard y col., 2001; Tang y cols., 2006) y que se asocia, por mecanismos aun poco conocidos, a una mayor probabilidad de aparición de hepatocarcinoma (Moriarty y col., 1985; Haruna y col., 1991; Kim y col., 1991; Song y col. 2003; Tang y cols., 2006).

2.5. Promotores y *enhancer*

Las regiones promotoras y los potenciadores (*enhancer*) de la transcripción son otros elementos genómicos en el VHB (Kosovkiy col., 1998). La síntesis de cada uno de los ARNm está determinada por su correspondiente promotor (Ganem y col., 1987), y la actividad de estos promotores está regulada a su vez por los elementos potenciadores o *enhancer* I y II (Su y col., 1992; Guo y col., 1991; Wang y col. 1990). Aunque el promotor es la región necesaria para lograr el inicio de la transcripción, puede no ser suficiente para determinar la regulación completa del gen (Werner, 1999). Los dos *enhancer* presentan especificidad hepática, debido a que requieren factores de transcripción hepáticos para su actividad (Kosovki y col., 1998) y se encuentran en ORF C. El proceso completo de replicación requiere varios cambios de posición de los cebadores.

Se han identificado 4 regiones promotoras: PreS1, PreS2, *precore*-core y X, situadas en ORF P:

- El promotor PreS1 contiene los sitios a los que se unirán los factores de transcripción del hepatocito FNH-1 (factor nuclear del hepatocito-1) y FNH-3 (factor nuclear del hepatocito-3) (Raney y col., 1989). Son activados por el factor nuclear 4α del hepatocito y se inicia la transcripción del ARNm que codifica la proteína PreS1/L de la envoltura vírica.
- El promotor PreS2 o S da lugar a la transcripción de los ARNm que origina el polipéptido preS2/M y al S, también presenta especificidad hepática y es controlado por *enhancer* II (Zhou y

col.1990). En la región S existe un promotor de transcripción que permite a la célula excretar HBsAg sin que exista replicación del genoma.

- El promotor *precore-core* incluye 232 nucleótidos entre las posiciones 1591 a la 1822. En él se distinguen dos regiones: el promotor básico del core (PBC) y la *upper regulatory region* (región reguladora en 5' respecto al promotor básico del gen *precore-core*). El PBC es suficiente para iniciar la transcripción del ARN *precore* y el ARN pregenómico (Kramvis y col., 1999). Contiene un sitio de unión para un factor de transcripción que se encuentra predominantemente en el hígado. Por eso, la replicación vírica, que necesita un paso inicial de transcripción de ARNm pregenómico, tiene lugar en el hepatocito (López Cabrera M y col., 1990). La unión del factor de transcripción al promotor permite la transcripción de dos ARNm. Uno codifica la proteína *precore* que contiene el HBeAg y otro, ARNm pregenómico, codifica la polimerasa y el HBcAg, y sirve como plantilla para la replicación de la cadena negativa del ADN vírico por transcripción reversa. El promotor *precore-core* es regulado por *enhancer* I y II, que pueden ser activadas por factores de transcripción del huésped (Guo W y col., 1993).
- El promotor X controla la transcripción de la proteína X que se encuentra muy conservada entre todos los hepadnavirus de los mamíferos pero está ausente en los de las aves (Wei Y y col., 2010).

En ambas cadenas de ADN se solapa la región de los extremos 5', y así se mantiene la conformación circular aunque no esté cerrado covalentemente (ADN rc). Dentro del hepatocito, el ADN se cierra de forma covalente (ADNccc) gracias a la polimerasa vírica y a actividades enzimáticas del huésped (Summers y col. 1982; Moraleda y col., 1997; Beck y col., 2007; Zhu y col., 2001).

En un hepatocito infectado pueden existir hasta 50 moléculas de ADNccc unidas a diferentes tipos de proteínas, principalmente histonas, existiendo como minicromosomas o episomas que permanecerán de por vida, constituyendo un reservorio vírico y haciendo imposible la curación *sensu stricto* de la hepatitis B (Newbold y col., 1995).

Se han obtenido evidencias de la regulación epigenética de la transcripción, demostrándose que los niveles altos de replicación se correlacionan con un aumento de la acetilación de histonas H3/H4 ligadas a los minicromosomas, mientras que niveles bajos de viremia se correlacionan con hipacetilación (Pollicino y col., 2006).

2.6. ADN y ARN

La cadena negativa del ADNccc será el molde para la ARN polimerasa II del huésped, que sintetizará cuatro ARN mensajeros subgenómicos que son traducidos en HBeAg (de ARNm *precore* de 3.5 Kb), partícula subviral S o partículas de la envuelta (ARNm de 2.4 kb y 2.1 kb), proteína X (de ARNm de

0.8 kb) y un ARN pregenómico que la polimerasa convierte en nuevas cadenas de ADN, que serán empaquetadas en nuevas partículas víricas o repondrán el reservorio de ADNccc.

Por lo tanto, la polimerasa tiene una doble actividad: transcriptasa (de ADN a ARN) y retrotranscriptasa (de ARN pregenómico a ADN) (Summers y col., 1982). Esta última carece de capacidad correctora de errores (*proof reading*), por lo que hay una tasa de mutación de $1,4-7,9 \times 10^{-5}$ sustituciones/nucleótido/año (Okamoto y col., 1988; Orito y col., 1989; Fares y col., 2002; Osiowy C y col., 2006), muy superior a las que se registran con otras ADN polimerasas. Debido a esto, no puede hablarse de infección por un único virus, sino por un conjunto de variantes genéticas víricas (*quasispecies*) que evolucionará a lo largo de la infección según la respuesta inmunológica y los tratamientos, siendo responsable de la aparición de resistencias. Según esta variabilidad se han identificado hasta 10 genotipos diferentes (A-J) y en algunos de ellos, subtipos, dependiendo de inserciones o deleciones de aminoácidos que provocan una diferencia mayor del 8% en las secuencias del genoma vírico completo (Yun y col., 2012) (Figura 4).

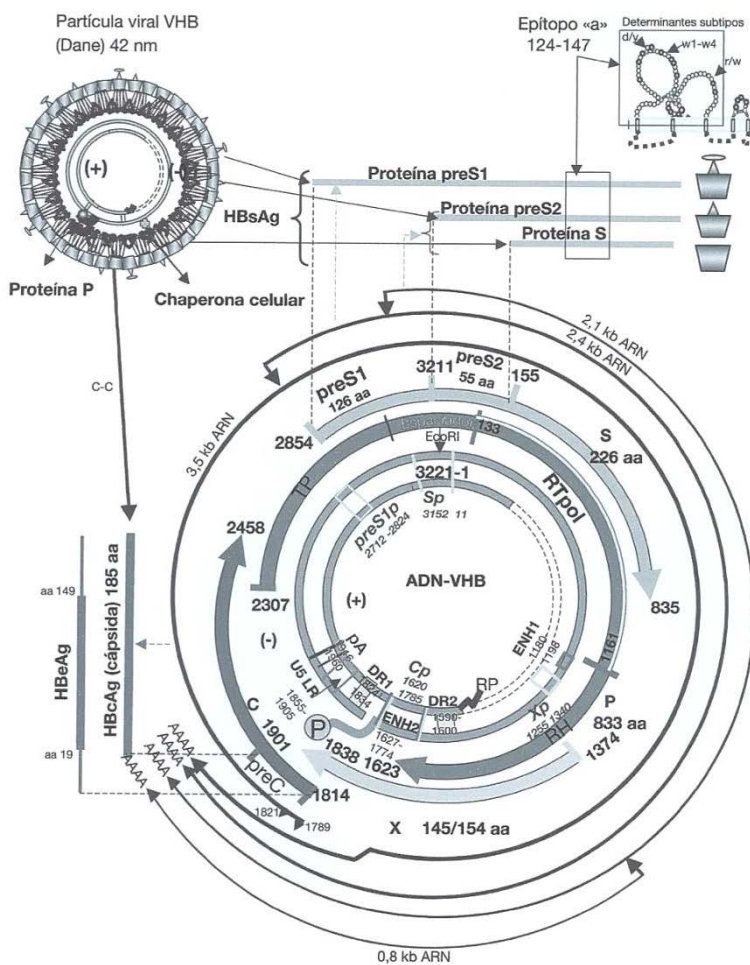


Figura 4. Esquema de VHB.
Tomado de
Rodríguez Frías y col., *Enferm
Infecc Microbiol Clin* 2008

3. PROTEINAS VÍRICAS

3.1. Polimerasa vírica

La polimerasa vírica está formada por 832 aminoácidos, y tiene varias funciones enzimáticas que en otros virus realizan enzimas independientes. Tiene actividad transcriptasa inversa, que crea la cadena corta de ADN a partir de un molde ARN; actividad ribonucleasa, que degrada el molde de ARN (Nassal M, 1999); y actividad ADN polimerasa, que genera la cadena larga de ADN partir del molde de ADN (Ganem D y col., 2001) (Figura 5). Existen 4 dominios funcionales:

- La proteína terminal (PT), unida covalentemente por un residuo de tirosina a la posición 63 del extremo 5' de la cadena negativa de ADN y que hace de cebador (Bartenschlager R y col., 1988; Bosch V y col., 1988)
- La región espaciadora, con una función más estructural que enzimática y hace que contacten la PT y la región de la transcriptasa inversa.
- La transcriptasa inversa (RT), que puede tener variantes. Posee 8 dominios catalíticos (A-G). La secuencia YMDD del dominio C (tirosina- metionina-aspartato-aspartato) es característica de las regiones RT retrovíricas. Variaciones en esta región pueden tener consecuencias trascendentes en la actividad enzimática.
- Región carboxiterminal tiene actividad ARNasaH (Nassal M, 1999). Degrada el molde de ARN pregenómico una vez que la transcripción ha tenido lugar (Seeger y col., 2000).

3.2. Antígeno core

El antígeno c o HBcAg es una proteína pequeña, de 185 aminoácidos en los subtipos *adw* y *adw2*, y de 183 aminoácidos en los demás subtipos. Consiste en 4 hélices α con dos hélices interiores formando una horquilla antiparalela. Dos monómeros de proteína *core* forman un dímero (Zhou y col., 1992; Günther y col., 1999), y 90-120 dímeros se ensamblan y forman una partícula *core* icosaédrica de aproximadamente 28 nm de diámetro, que presenta en la superficie vírica la región de unión de la horquilla antiparalela que por microscopía electrónica se observa en forma de espículas (Crowther y col., 1994, Gunther y col., 1999). Se cree que el epítipo dominante para las células B se encuentra en estas espículas (Salfeld y col., 1989).

El HBcAg es también una diana para la inmunólisis celular mediada por células T, ya que en los pacientes con hepatitis B crónica se ha demostrado la presencia intrahepática de linfocitos T específicos para el VHB (Moreno y col., 2000). El extremo C-terminal, rico en argininas, se localiza en el interior de las partículas y es el que se une al ARN pregenómico para la replicación del virus (Seifer y col., 1994; Zlotnick y col., 1997). La fosforilación de la cápside por kinasas del hospedador regula la unión del genoma vírico a la proteína de la cápside y la estabilidad de la nucleocápside. Se cree que también juega un importante papel en los primeros estadios de la replicación vírica (Nassal, 1992; Yeh y col., 1990).

3.3. Antígeno e

El antígeno e o HBeAg se descubrió en 1972. La proteína “precore/core” está constituida por el HBcAg y 29 aminoácidos adicionales codificados por la región *precore*. Esta extensión, que se sitúa en el extremo amino-terminal, contiene una señal peptídica altamente hidrofóbica y permite la inserción de la proteína en el retículo endoplasmático de la célula huésped (Ou, 1997). Por acción de una peptidasa se elimina la señal y se genera una proteína llamada p22e que es transportada al aparato de Golgi, donde se eliminarán aminoácidos en un número variable, y es exportada al torrente sanguíneo como un antígeno soluble, el HBeAg (Jean Jean y col., 1989; Wang y col., 1991; Ou, 1997) (Figura 5). Su función se desconoce, aunque se ha descrito en experimentos *in vitro* que la no expresión de esta proteína aumenta la replicación del virus (Lamberts y col., 1993; Buckwold y col., 1996; Guidotti y col., 1996). Se cree que atraviesa la placenta y actúa como inmunotolerógeno al activar una respuesta antiinflamatoria, lo que facilita el establecimiento de una infección persistente y podría tener que ver con el gran índice de cronicidad observado en hijos de madres HBeAg+ (Yang y col., 2006).

3.4. Antígeno de superficie

El antígeno de superficie o HBsAg es un complejo formado por tres proteínas:

- Proteína S, compuesta por 226 aminoácidos, y es la principal envoltura del virus.
- Proteína M de 281 aminoácidos.
- Proteína L de 345 aminoácidos.

Posee una configuración en doble lazo con estabilidad por puentes disulfuro y al menos 5 epítomos conformacionales (HBs1- HBs5), algunos de los cuales contribuyen al ensamblaje del determinante antigénico “a” (aminoácidos 121-149). La mayor parte de los HBsAc y las inmunoglobulinas específicas policlonales lo reconocen (Gibb R y col., 2007)

Las proteínas de HBsAg se insertan en una bicapa lipídica de origen eucariota. Pueden autoensamblarse en envolturas víricas vacías en ausencia de otras proteínas víricas o ácidos nucleicos es decir, las proteínas de superficie pueden ser secretadas independientemente desde las células como partículas subvíricas sin otros componentes virales (Dubois y col., 1980). La proteína S contiene una región hidrofílica que reconoce y se une a un receptor de la membrana del hepatocito, permitiendo la infección de la célula.

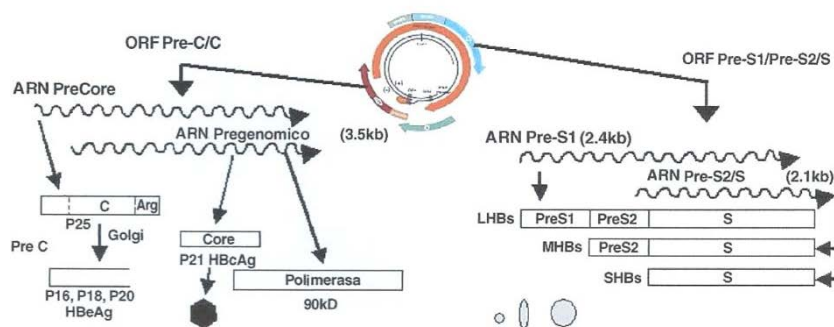


Figura 5. Síntesis de precore/core, polimerasa y proteínas de envoltura desde ARNm. Tomado de Cassino L, "Coinfección HIV-HBV en regiones genómicas reguladoras" 2011.

3.5. Proteína X

La proteína X o HBx está codificada por el gen X, contiene 154 aminoácidos y está conservada en todos los hepadnavirus de mamíferos pero está ausente en los de las aves. Es apenas detectable tanto en infecciones agudas como crónicas (Su Q y col., 1998). Está mal caracterizada y se desconoce su localización en la partícula vírica y en la célula hospedadora. Se trata de una proteína viral reguladora única ya que no se une a cualquier ADN viral o del hospedador y es un transactivador débil, aunque capaz de activar la transcripción de genes virales y celulares por interacción directa o indirecta con varias dianas (Twu JS y cols., 1987). Además, puede modular varias funciones celulares, incluyendo las respuestas inmunes celulares y humorales, lo que parece relacionado con la hepatocarcinogénesis (Su Q y cols., 1998). Es necesaria para la infectividad del virus *in vivo*: se observó que genomas de hepadnavirus X-deficientes inoculados en hígados de marmotas fueron incapaces de iniciar una infección (Chen Hs y col., 1993; Zoulim F y col., 1994). Además se ha demostrado, usando sistemas celulares y un modelo de ratón, que la expresión de HBx era capaz de restaurar la replicación de un VHB X-deficiente, dando lugar a cifras de viremia similares a las del virus silvestre (Tang H y col., 2005; Keasler VV y col., 2007).

Este amplio espectro de actividades se basa en dos mecanismos: la interacción directa con reguladores transcripcionales nucleares y la activación de la señal de transducción. HBx transactiva y se une a promotores celulares y *enhancers*, como el NF- κ B (factor nuclear-kappa-B), AP-1 (activador de proteína 1), AP-2, CCAAT-enhancer binding protein (c-EBP), factor activador de transcripción (ATF)/CREB, ARN polimerasa, factor nuclear de células T activadas (NF-AT), promotores celulares asociados con la proliferación celular como IL-8, TNF, TGF β y receptor de factor de crecimiento epidérmico. La activación de la transcripción CREB/ATF-dependiente la realiza por dos mecanismos: aumenta la afinidad de CREB/ATF y ADN y aumenta el reclutamiento de CBP/p300 para el CREB/ATF unido a promotores celulares (Barnabas S y col., 1997; Cougot D y col., 2007). La familia CREB/ATF juega un

papel esencial en la proliferación hepática, el metabolismo y la oncogénesis. La modulación de su actividad puede ser una función importante del HBx (Abramovitch R y col. 2004). Además esta actividad estaría involucrada en la activación de la transcripción del VHB mediada por HBx desde una secuencia *CREB-like* (CRE) presente en enhancer 1 y en PreS2.

Se necesitan más estudios del papel de CREB y otros coactivadores como CBP/p300 en la activación de la replicación del VHB por HBx.

HBx también se ha relacionado con otras actividades como la regulación del ciclo celular, activación de mecanismos de señalización, modulación de apoptosis e inhibición de la reparación del ADN (Andrisani OM y col., 1999; Bouchard MJ y col., 2004; Tang H y col., 2006). La apoptosis es un mecanismo primario de defensa antivírica en las células infectadas, y muchos virus codifican proteínas que interactúan con los mecanismos reguladores de muerte celular. Si el virus logra interferir en la apoptosis lograría establecer una infección persistente y a la inversa, algunos virus (lentivirus, retrovirus y papiloma) han desarrollado funciones pro-apoptosis para facilitar su diseminación y eludir la respuesta inflamatoria (Yamada T y col., 1994; Westendorp MO y col., 1995; Desaintes C y col., 1997). En las etapas preneoplásicas de la carcinogénesis, la continua muerte y regeneración hepática podrían favorecer la selección de células que han desarrollado estrategias de supervivencia y contrarrestarían la actividad proapoptosis de HBx. DDB1 es una subunidad del complejo UV-DDB involucrado en la reparación del ADN (Chu G y col., 1988). HBx puede interactuar con DDB1 (aunque su papel aún es desconocido) y por lo tanto, interferir en la reparación del ADN.

Además HBx contribuye a la carcinogénesis modulando la angiogénesis, ya que la expresión de HBx induce la transcripción del factor de crecimiento endotelial y estabiliza el factor inductor de hipoxia (HIF-1) (Yoo YG y col., 2008; Han HK y col., 2007). La mayoría de las actividades de HBx se pueden interpretar como un intento de manipular los mecanismos celulares para estimular la replicación vírica, lo que podría tener efectos colaterales como alteraciones y disfunciones en la célula hospedadora y conducir a una malignización. Se han descrito mutantes HBx en hígado y en suero de pacientes en diferentes situaciones clínicas. Las deleciones de COOH-terminal alteran la capacidad de controlar la proliferación celular y la actividad transcripcional, y pueden estar implicadas en carcinogénesis (Tu H y col., 2001). Se han descrito mutaciones en los aminoácidos 130 y 131 que parecen asociadas con hepatitis crónicas graves y aumentan el riesgo de desarrollar hepatocarcinoma. En un estudio en suero se vio que estas mutaciones aparecen antes del desarrollo del hepatocarcinoma, sin embargo, las consecuencias funcionales de estas mutaciones no están todavía claras (Iavarone M y col., 2003; Leon B y col., 2005; Kuang SY y col., 2004).

4. VARIABILIDAD GENÓMICA DEL VHB.

Aunque el VHB es un virus ADN, intracelularmente no es estable. Presenta una alta tasa de mutación, en torno a $1,4-7,9 \times 10^{-5}$ sustituciones/nucleótido/año (Okamoto H y col., 1988; Orito E y col., 1989; Fares MA y col., 2002; Osiowy C y col., 2006) debido a la fase de transcripción reversa presente en su ciclo replicativo, a la carencia de actividad *proof reading* de la retrotranscriptasa, y al solapamiento de genes del virus.

Como consecuencia, a medida que la infección progresa en el tiempo, el virus circula cada vez más no como un elemento genéticamente homogéneo, sino como una mezcla de variantes genéticas que constituyen *quasiespecies* (QS); esta mezcla de QS tiende a hacerse más heterogénea a lo largo del tiempo, aunque la intensidad de esta diversificación se ve influenciada por otros factores, como la situación inmunológica del huésped y el uso de fármacos antivíricos que ejercen una presión selectiva. La cepa silvestre y las QS son almacenadas en el reservorio de los hepatocitos. De este modo, en un paciente infectado, a partir de un determinado momento en la evolución de la infección, coexiste una secuencia predominante con una gran variedad de secuencias minoritarias, que difieren de la mayoritaria en unas pocas mutaciones o deleciones. Los factores anteriormente citados, como la presión inmunológica o los tratamientos antivíricos, pueden desplazar la secuencia mayoritaria, seleccionando una secuencia minoritaria hasta ese momento y convirtiéndola en predominante.

Existen estudios que demuestran como las mutaciones asociadas al uso de antivirales se encuentran en pacientes con hepatitis B crónica incluso antes del uso de terapia antiviral (Kim y cols., 2008) por lo que es posible que mutaciones que confieren resistencia a antivirales puedan preexistir antes del tratamiento como una población de QS minoritaria que puede no ser detectada debido a la falta de sensibilidad de las técnicas empleadas si están en una proporción menor del 20% (Lok y cols., 2007; Kao y cols., 2008).

Se ha documentado que en la fase de inmunotolerancia existen menos variantes que en la fase inmunológica activa (Tedder y cols., 2013). También se ha observado que años antes de que se produzca la pérdida de HBeAg y aparición de HBeAc existen cambios dinámicos en el pool de QS, es decir, parece que la seroconversión HBeAg es más un proceso lento que un acontecimiento serológico repentino (Lim y cols., 2007).

Por tanto, las variantes del VHB son relevantes en el diagnóstico de la enfermedad, la progresión de la misma, el desarrollo de hepatocarcinoma y los fallos de vacuna y de la terapia antiviral.

El ARN pregenómico del VHB es la matriz de la replicación vírica, y puede sufrir “splicing” (Günther S y col., 1997). Estos ARNs se diferencian por el sitio de ensamblaje o “splicing” y pueden representar el 30% del ARN pregenómico (Bréchet C y col., 2010). Su papel en la replicación vírica no está establecido. Sobre los ARNs con “splicing” puede haber fenómenos de encapsidación, retrotranscripción y pueden secretarse con las partículas defectivas (Günther S y col., 1997; Terré S y col., 1991). Se ha demostrado “in vivo” que la secreción de al menos una de estas partículas está relacionada con la severidad de la enfermedad hepática en portadores crónicos (Soussan P y col., 2008).

Uno de los ARN con “splicing” codifica una proteína llamada “hepatitis B spliced protein” HBSP hallada en muestras de biopsia de hígado de pacientes con hepatitis crónica activa (Soussan P y col., 2000). Se encuentran anticuerpos dirigidos contra esta proteína en el 50% de pacientes con hepatitis crónica (Soussan P y col., 2000; Soussan P y col., 2003), parece existir correlación entre la detección de anticuerpos anti-HBSP y fibrosis (Soussan P y col., 2003). También existe una respuesta de células T contra HBSP en pacientes con hepatitis crónica (Mancini-Bourgine M y col., 2007). HBSP induce la apoptosis sin bloquear el ciclo celular (Soussan P y col., 2000; Lu YW y col., 2008).

4.1. Mutaciones en el gen C

El gen *precore-core* codifica dos proteínas al tener dos codones distintos de iniciación: la preC, que dará lugar por proteólisis al HBeAg, y la proteína *core*. En la fase de la hepatitis crónica HBeAg- con replicación viral existen variantes en el *precore* y el PBC que impiden o disminuyen la expresión del HBeAg (Akahane Y y cols., 1990; Brunetto MR y cols., 1991).

La mutación más frecuente es la G1896A, que produce una señal de parada en el codón 28 (TGG pasa a TAG) lo que impide el paso de la proteína *precore* al retículo endotelial celular y la secreción de HBeAg. Esta mutación está asociada a genotipos que tienen un nucleótido timina en la posición 1858 en vez de un nucleótido citosina (genotipos B, D, E y parte de los C y F). Esta variante afecta a la estabilidad de la estructura epsilon y a la señal de encapsidación (Akahane Y y cols., 1990). La mutación preC se observa más en el genotipo D (65%) que en el A (9%) (Gao S y cols., 2015).

Las mutaciones que ocurren en la región PBC pueden regular la transcripción del ARNm preC e inhibir la síntesis de HBeAg. La doble mutación A1762T/G1764A en la región PBC, conduce a una reducción de ARNm preC resultando una seroconversión HBeAg y una reducción de los niveles de HBeAg en un 50 % (Buckwold VE y cols., 1996; Scaglioni PP y cols; 1997). Además, la carga en pacientes HBeAg- es menor que en HBeAg+, pero la capacidad de replicación puede ser restaurada por la mutación PBC, especialmente si se añaden mutaciones adicionales como T1753C, C1766T y T1768A (Baumert TF y cols., 1996).

Al igual que las mutaciones preC, las mutaciones PBC son más frecuentes en determinados genotipos como el D y el C (Chan HL y cols., 1999).

La mutante *precore* se detecta como media en un 60%: 92% en el área mediterránea, 50% en Asia y 24% en Estados Unidos. Sobre la PBC existen pocos datos, en Asia está en torno al 77% entre los pacientes HBeAg-. (Funk MI y col., 2002).

Las mutaciones preC y PBC están también relacionadas con las respuesta a la terapia con IFN: la mutación G1896A está asociada a una respuesta pobre al interferón independientemente de HBeAg (Fattovich G y cols., 1995), mientras que menos mutaciones en la región PBC están asociadas a una respuesta mejor (Lok AS y cols., 2000).

Otras variantes que se sitúan en las posiciones 1814-1816 alterando el codón de iniciación (Carman WF y col., 1989; Jardi R y col., 2004) se asocian a hepatitis fulminante y son muy frecuentes en el área mediterránea (Rodríguez-Frías F y col., 1995).

Se cree que, en primer lugar, aparecen las variantes del PBC y después las *precore* (Kay A y col., 2007), siendo muy frecuente la detección simultánea de las dos en hepatitis crónicas. Si a esta combinación se añaden mutantes preS1 y preS2, el curso de la enfermedad será más severo, incluyendo hepatitis fulminante y hepatocarcinoma.

4.2. Mutaciones en el gen S

La envoltura proteica del VHB está codificada por el gen *preS1/preS2/S* generando las proteínas L, M y S. Los anticuerpos se unen predominantemente a la región hidrofílica del HBsAg llamada determinante “a”. Las mutaciones en el determinante “a” afectan a la antigenicidad del HBsAg, originando variantes de escape a la vacuna ya que los virus no podrán ser neutralizados por los anticuerpos, fallos en tratamientos con inmunoglobulina específica y falsos negativos en técnicas diagnósticas (Carman WF y cols., 1990).

La transmisión de estas mutantes de escape puede llegar a ser un problema de salud pública (Thakur V y cols., 2005). El primer caso se describió en Italia estudiando niños de madres portadoras que habían sido vacunados y desarrollaron infección. En uno de ellos, al realizar el análisis molecular, se observó una mutación de guanina por alanina en el nucleótido 587 que se tradujo en cambio de aminoácido glicina por arginina (G145R) en el determinante altamente antigénico del HBsAg (Carman W y col., 1990). Se trataba de la más común de las variantes de escape de la vacuna: la sG145R. Es una mutación estable y se puede transmitir horizontalmente en presencia de altos títulos de HBsAc (Chakravarty R y cols., 2002). La mutante G145R junto a una inserción entre las posiciones 122 y 123 del determinante “a” se observó en una reactivación fulminante de la hepatitis (Carman WF y cols., 1995).

La estructura del HBsAg puede afectarse por otras variantes como K141E, T131I, N144R, y la inserción de tres aminoácidos entre las posiciones 123 y 124 (Seddigh-Tonekaboni S y cols., 2000; Weber B, 2005).

Otras sustituciones en el determinante “a” que se han detectado son T116N, P120/S/E, I/T126A/N/I/S, Q129H/R, M133L, K141E, P142S y D144/A/E. Aunque estas mutantes son más frecuentes en zonas donde se llevan a cabo programas de inmunización universal, hasta ahora no han originado ningún efecto negativo (Basuni AA y cols., 2004).

El gen *preS* es el que presenta más alta heterogenicidad en el genoma del VHB (Sterneck M y cols., 1999). La presión inmune debida a la vacunación o la inmunoterapia puede inducir mutaciones en la región *preS* que afecten no solo a la respuesta inmune sino a la expresión del virus, la síntesis y la secreción (Chen BF y cols., 2006; Kim HS y cols., 1996; Bruss V 1997; Chaudhuri V y cols., 2004).

Mutantes HBsAg pueden producir hepatitis B oculta (OBI), ya que no se detecta el HBsAg por los ensayos convencionales y hay un nivel moderado-alto de carga viral.

También se han observado mutantes por delección en la hepatitis crónica por VHB especialmente en pacientes con genotipo C (Sugauchi F y cols., 2003). La mutante por delección está relacionada con la progresión de la enfermedad debido, posiblemente, a un defecto en la secreción que hace que se acumule el HBsAg en el retículo endoplásmico celular conduciendo al stress celular y, según parece, a la oncogénesis (Chen CH y cols., 2007)

La mutante por delección pre-s junto a otra mutación puntual S se correlaciona con la coexistencia de HBsAg y HBsAc, indicando selección por presión inmune (Huang X y col., 2010).

También hay que tener en cuenta que debido al fuerte solapamiento, mutaciones en el gen *P* pueden causar concomitantemente mutaciones en el gen *S* y viceversa.

4.3. Mutaciones en el gen *P*

Las variantes del gen de la polimerasa son las responsables de la resistencia a los tratamientos con inhibidores de la enzima (análogos de nucleótidos y de nucleósidos). Son debidas a sustituciones de aminoácidos en los diferentes dominios catalíticos de la transcriptasa inversa vírica (A-G). Si el análogo del nucleótido/nucleósido no es reconocido por la polimerasa debido a un cambio de aminoácido, no se inhibe su actividad catalítica y el virus se replica, aumentando además la proporción de mutantes, hasta que éstas se convierten en mayoritarias y aumenta la carga vírica, ocurriendo el fenómeno de “emergencia de las resistencias”. En un primer momento se detectan mutantes en el genoma (resistencia genotípica) y posteriormente se detectará un aumento de la carga viral (resistencia fenotípica).

El motivo YMDD (tirosina, metionina, aspartato, aspartato) localizado en el dominio C está altamente conservado en todos los genotipos y juega un papel catalítico esencial en la replicación del VHB. Las mutaciones en YMDD, como YVDD (rtM204V, valina por metionina) y YIDD (rtM204I; isoleucina por metionina) pueden conducir a resistencias y defectos de replicación (Figura 5). Hasta ahora cuatro vías de resistencia mayor han sido identificadas (Locarnini S y col., 2008):

- Vía de los L-nucleósidos que se caracteriza por la mutación rtM204V/I y confiere resistencia a lamivudina y telbivudina.
- Vía los fosfonatos acíclicos que se identifica por la mutación rtN236T y confiere resistencia a adefovir y sensibilidad reducida a tenofovir.
- Vía compartida por L-nucleósidos y adefovir con la mutación rtA181T/V.
- Vía D-ciclopentanos que se caracteriza por la presencia de las mutaciones rtL180M y rtM204V/I más al menos una sustitución en uno de los aminoácidos de rtT184, rt202 y rtM250 y confiere resistencia a entecavir.

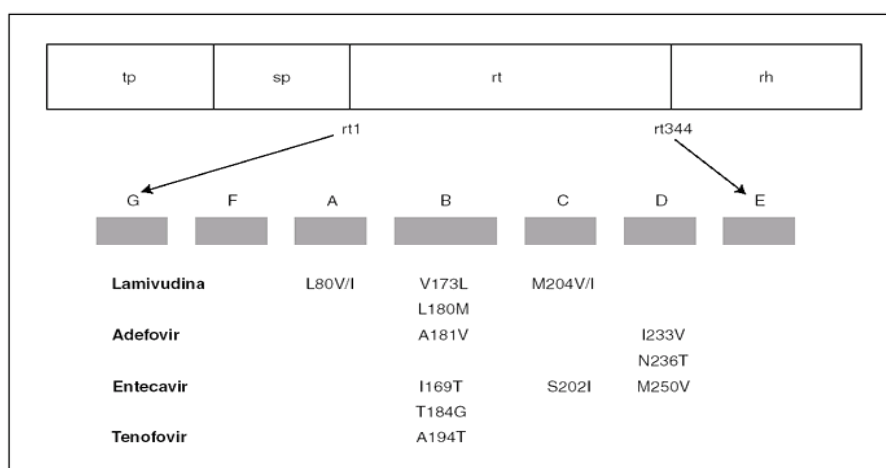


Figura 5. Mutaciones en el gen de la polimerasa seleccionadas por terapia antiviral. Tomado de Sáez-López A y col., Enferm Infecc Microbiology Clin 2006. Adaptado de Bartholomeusz A y col., Semin Liver Dis 2006

4.4. Mutaciones en el gen X

Se han observado varias mutaciones y deleciones en el gen X en pacientes con hepatocarcinoma. Por ejemplo, la doble mutación HBx130+HBx131 y la triple mutación HBx5+HBx130+HBx131 tienen riesgo de desarrollo de hepatocarcinoma (Lee JH y col., 2011). Se han encontrado secuencias de gen HB X en tejido hepático de la mayoría de pacientes con hepatitis B crónica y aproximadamente en 86% de hepatocarcinomas relacionados con el VHB (Sung WK y col., 2012).

5. GENOTIPOS

Desde el punto de vista genómico existen 9 genotipos (A-I) que se determinan por una divergencia en el genoma mayor del 7,5 % (Kramvis y cols., 2008). Es posible que exista un genotipo “J” aislado en un paciente japonés (Tatematsu y cols., 2009). Se han identificado al menos 35 subgenotipos (en los genotipos A, B, C, D, F y H, pero no en los genotipos E y G). Los genotipos están distribuidos geográficamente y étnicamente. Por ejemplo, los genotipos B y C son prevalentes en Asia y los A y D en Europa, área mediterránea y Oriente Próximo (Kramvis y cols., 2005) (Figura 5 y Tabla 1).

Según los determinantes antigénicos, existen 10 serotipos mutuamente excluyentes: *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw3*, *adw4q-*, *adrq+* y *adrq-*. Existe correlación entre los genotipos y los subtipos, pero con la excepción de los genotipos F, H y E, que se asocian casi exclusivamente con serotipos *adw4* y *ayw4* respectivamente. Los demás pueden encontrarse asociados a dos o más serotipos diferentes (Echevarría JM y col., 2005). Estas asociaciones a menudo presentan una distribución geográfica característica: *adw* es frecuente en EEUU y *adr* en el Sudeste asiático y China.

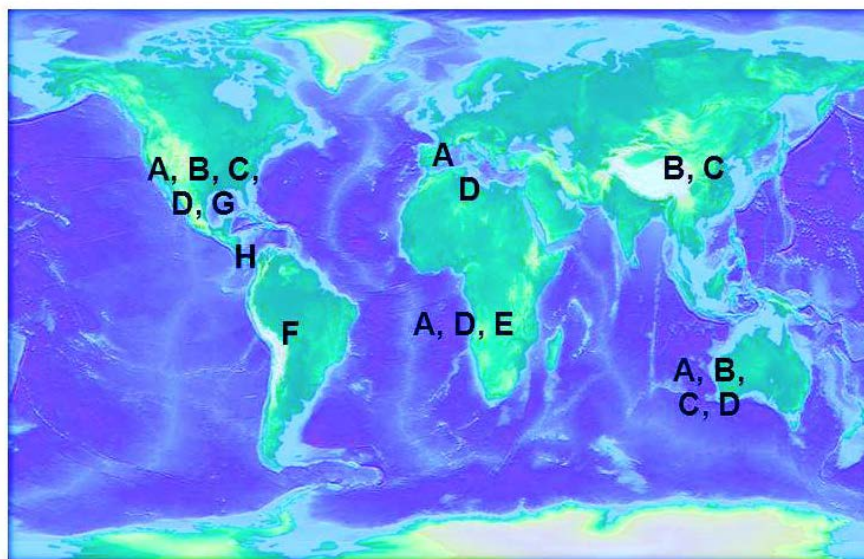


Figura 5. Distribución geográfica de genotipos de VHB. Tomado de Liaw YF y col., *Liver Int* 2005. Chu CJ y col., *Gastroenterology* 2003

GENOTIPO	SUBGENOTIPO	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA PREDOMINANTE
A	A1	África subsahariana
	A2	Norte de Europa
	A3	África Occidental
B	B1	Japón
	B2-5	Este de Asia, Taiwán, China, Indonesia, Vietnam, Filipinas
	B6	Alaska, Norte de Canadá, Groenlandia
C	C1-3	Taiwán, China, Corea, Sudeste Asiático
	C4	Australia
	C5	Filipinas, Vietnam
D	D1-5	Sur de Europa, Oriente Medio, India
E		África Occidental
F	F1-4	América Central y Sudamérica
G		Francia, Alemania, E.E.U.U.
H		América Central
I		Vietnam, Laos
J		Ryukyu, Japón

Tabla 1. Genotipos VHB y distribución geográfica (Liaw y col., 2012)

En España predominan los genotipos D (48,1%) y A (39,5%), seguidos del genotipo F (4,1%) y el B, el C y el E (<1%) (Rodríguez-Frías F y col., 2006).

El genotipo parece estar relacionado con el curso de la infección, la duración de la seroconversión HBeAg y la respuesta a la terapia (Kramvis y cols., 2005; Liaw YF y cols., 2010; McMahon BJ. 2009). En España, el genotipo A tiene mejor pronóstico que el D, con mayores tasas de aclaramiento del HBsAg y de remisión sostenida tras la seroconversión a HBeAg- (Sánchez-Tapias JM y col., 2002). Respecto al tratamiento con interferón, la seroconversión a HBeAg- es del 44% para el genotipo A, del 44% para el B, del 28% para el C y del 25 % para el D (Janssen HLA y col., 2005). Con respecto a los antivíricos, parece que la resistencia a lamivudina aparece antes en el genotipo A que en el D (Zollner B y col., 2004; Chien RN y col., 2003), y que el genotipo A responde peor a adefovir (Buti M y col., 2007), aunque esto tiene menor relevancia clínica con antivirales más nuevos como tenofovir o entecavir.

Algunas mutaciones son más frecuentes en determinados genotipos. Por ejemplo, la mutación precore es más frecuente en los genotipos B, C y D que en el genotipo A (Lindh y cols. 1997; Chu CJ y cols., 2003). El genotipo C tiene más tendencia a presentar mutaciones que el genotipo B (Liu S y cols., 2009) y en éste ocurren más seroconversiones espontáneas HBeAg que en el C (Chu CJ y cols., 2002).

En resumen, los genotipos influyen desde el punto de vista clínico en (Gao y cols., 2015):

- El porcentaje y durabilidad de la pérdida/seroconversión de HBeAg: A y D > B y C.
- Riesgo de desarrollo de hepatitis B crónica HBeAg- agresiva: C y D > A
- Pérdida de HBeAg espontánea: B > C
- Cirrosis: C
- Hepatocarcinoma: C en asiáticos y F en nativos de Alaska
- Respuesta a antivirales: A y B > C y D.

6. CICLO BIOLÓGICO

El VHB es hepatotrofo, aunque se ha descrito la presencia de ADN vírico en otras células, especialmente linfocitos, que constituyen un segundo reservorio (Pontisso P y col., 2008).

El VHB interactúa con un receptor de la membrana del hepatocito recientemente identificado como polipéptido cotransportador de taurocolato sódico (Yan H y col., 2012). La proteína del virus que se une al receptor es la PreS1 (Bruss y col., 1996). Se fusiona la bicapa lipídica del virus con la membrana del hepatocito, se introducen las partículas de *core* en el citoplasma y se dirigen al núcleo. La nucleocápside interactúa con los poros nucleares y libera ADNrc en el interior del núcleo del hepatocito, donde madura y pasa a ADNccc. La presencia de ADNccc indica el éxito en el establecimiento de la infección por VHB (Locarnini S y col., 2010). Este proceso requiere la intervención de la polimerasa vírica y de topoisomerasas del hepatocito. El ADNccc no se incorpora al genoma del hepatocito y no afecta a su viabilidad; persistirá a lo largo de toda la vida del hepatocito proporcionando nuevos viriones infectivos y será el responsable de las recurrencias en pacientes que habían sido tratados o en inmunocomprometidos. La cadena negativa del ADNccc sirve de molde para la transcripción de los distintos ARN por la polimerasa II del hepatocito. Estos ARN son trasladados a los ribosomas del citoplasma para ser traducidos a diferentes proteínas del VHB (Figura 6).

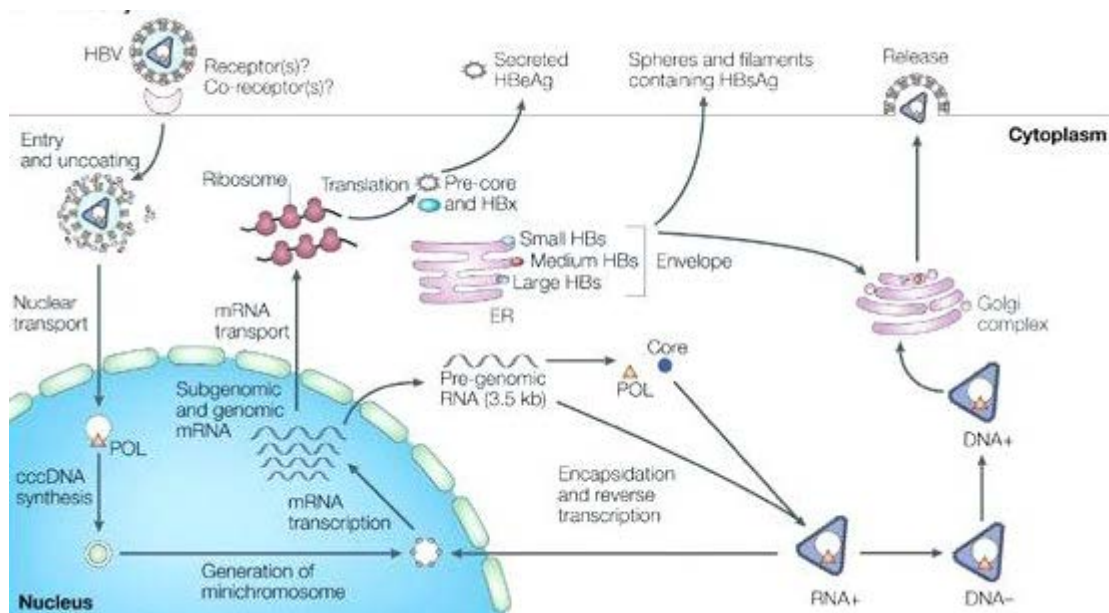


Figura 6. Ciclo replicativo del VHB. Adaptado de Reherman B y col., Nature Reviews Immunology 2005

Por su parte, el ARNm pregenómico tiene 3.5 Kb y una estructura epsilon en forma de horquilla en el extremo 5'. Servirá de molde para la actividad transcriptasa inversa de la proteína P. El primer paso es la unión de un nucleótido dGTP al residuo Tyr63 de la polimerasa, tras lo cual la polimerasa vírica interacciona con la señal ϵ de encapsidación del ARNm pregenómico, que es usado como molde para la adición de los primeros nucleótidos. Mientras se va formando la cadena de ADN, el ARNm pregenómico es degradado por la actividad ARNasaH de la polimerasa. La cadena positiva es sintetizada a partir de la cadena negativa por la ADN polimerasa (Seeger C y col., 2006; Will H y col., 1987).

La encapsidación hace que se defosforilen las proteínas *core*, aumentando su afinidad por la doble cadena de ADN recién formada (Bartenschlager R y col., 1992).

Las nucleocápsides con el ADN pueden ser conducidas de nuevo al núcleo, en un proceso de realimentación o se recubren en el retículo endoplásmico con una envuelta formada por lípidos y proteínas que incluyen el HBsAg, migran al aparato de Golgi y desde allí son liberadas al torrente sanguíneo. Si estas partículas no contienen viriones, se autoensamblan y son igualmente liberadas dando lugar a las partículas S no infecciosas (Figura 6). El proceso de ensamblaje de las tres proteínas de la cubierta es crítico, ya que un exceso de proteína PreS1 con respecto a la S puede conducir al acúmulo de partículas víricas en el retículo endoplásmico, impidiendo el paso al aparato de Golgi y la liberación de los viriones, lo que produce un efecto citopático en el hígado (Chen CH y col., 2007).

Aunque el VHB es un virus predominantemente hepatotropo cada vez hay más evidencias de que el sistema inmune también es un sitio de persistencia viral (Pontisso P y col., 2008). En el modelo animal del virus de la marmota, la infección puede quedar totalmente restringida al sistema linfóide y ésta estar relacionada con la carga viral (Coffin CS y col., 1999; Michalak TI y col., 2004). En estudios en humanos, el genoma del VHB se ha detectado en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con infección crónica sometidos a terapia con antivirales (Coffin Cs y col., 2011), en pacientes tras la resolución de una hepatitis aguda con aclaramiento de HBsAg (Michalak TI y col., 1994; Cabrerizo M y col., 2000) y en células mononucleares de sangre periférica transplacentarias de madres VHB positivas, posiblemente vehiculando la infección al feto (Shao Q y col., 2013). Antígenos del VHB, ARNm, ADNccc y formas integradas se han detectado en células mononucleares de sangre periférica y tejidos extrahepáticos como médula ósea, bazo, y células linfoblásticas (Mason A y col., 1993; Stoll-Becker y col., 1997). La regulación de la replicación de VHB en células mononucleares de sangre periférica *ex vivo* es por estimulación por mitógeno (Bouffard P y col., 1992).

En diversos estudios, genoma y proteínas víricas han sido detectados en muchas subpoblaciones de células inmunes y en algunos el virus aparece específicamente en células B y monocitos (Yoffe B y col., 1986; Trippler M y col., 1999; Chemin I y col., 1994; Bouffard F y col., 1990).

7. PATOGENIA

Según estudios, el VHB no produce un efecto citopático directo sobre el hepatocito (Koziel MJ, 1998). Por ejemplo, se ha visto en chimpancés que antes de la llegada al hígado de las células T específicas del virus, la totalidad de los hepatocitos pueden estar infectados y no haber evidencia bioquímica o histológica de daño hepático (Guidotti LG y col., 1999; Thimme R y col., 2003). La respuesta inmune parece ser la responsable del daño hepático. Además, cuando la respuesta inmune es deficiente o suprimida por fármacos, el VHB puede replicarse a altos niveles y no existir anormalidades citológicas o inflamación (Chisari FV y col., 1995; Ferrari C y col., 2003; Ganem D y col., 2004).

La respuesta inmune está provocada por antígenos, especialmente el HBcAg y en menor medida el HBsAg, que ponen en marcha mecanismos de inmunidad humoral y celular, siendo esta última la que eliminará a los hepatocitos infectados. En adultos inmunocompetentes la respuesta inmune es intensa, policlonal y multiespecífica, dando lugar a una hepatitis aguda autolimitada, a la aparición de inmunidad celular y humoral mantenidas y a la supresión del virus. En cambio, la respuesta es relativamente débil y apenas detectable en pacientes que desarrollan una hepatitis crónica (Chisari FV y col., 2010).

En muchos virus como el de la hepatitis C, la replicación viral a menudo induce una respuesta inmune innata produciendo rápidamente interferón α/β en las células infectadas (Samuel CE, 1991). El interferón a su vez induce la transcripción de genes que activan mecanismos intracelulares antivirales que pueden limitar la producción viral y su diseminación (Samuel CE, 1991; Wieland SF y col., 2005). Esto no ocurre en el VHB que a diferencia del VHC, no induce ninguna expresión de genes celulares y así se disemina a través del hígado (Wieland S y col., 2004; Samuel CE, 1991).

La respuesta inmune humoral de los linfocitos B va dirigida contra epítomos del virus. El más inmunógeno es el HBcAg, en el primer mes aparece la IgM dirigida contra este antígeno y posteriormente la IgG. La respuesta de anticuerpos dirigidos contra antígenos de la envoltura es T dependiente (Tsui LV y col., 1995). Estos anticuerpos se detectan en pacientes que aclaran el virus y son generalmente indetectables en la infección crónica, por lo que se cree que juegan un papel esencial en el aclaramiento del virus formando inmunocomplejos con las partículas virales libres y aclarándolas o previniendo la infección de nuevos hepatocitos al dificultar su interacción con los receptores específicos. En estudios realizados con chimpancés se ha observado que si resuelven una infección previa, son inmunes a la reexposición (Moss B y col., 1984).

La aparición de anticuerpos neutralizantes ocurre relativamente tarde tras la exposición al virus, por lo que no contribuyen al aclaramiento vírico durante la fase aguda. Probablemente previenen la diseminación vírica a partir de las escasas células que permanecen infectadas tras la resolución de la infección.

Para que los linfocitos T CD4⁺ reconozcan los antígenos virales se necesita la expresión de una molécula MCH tipo II la superficie del hepatocito. En un estudio se demostró que personas procedentes de Gambia portadores de HLA DRB1*1302 estaban protegidos de la infección crónica por VHB (Thursz MR. Y col., 1995). La respuesta de linfocitos T CD4⁺ es intensa y multiespecífica en pacientes con hepatitis aguda que aclaran el virus y débil en pacientes con hepatitis crónica (Ferrari C y col., 1990). La asociación entre respuesta intensa de T CD4⁺, hepatitis aguda y aclaramiento viral parece clara (Tsui LV y col., 1995; Moss B y col. 1984; Jung MC y col., 1991). Sin embargo, en chimpancés infectados, se ha observado que la depleción de células T CD4⁺ en el pico de la infección por VHB no tiene efecto directo en el aclaramiento vírico y el daño tisular (Thimme R y col., 2003). Los linfocitos T CD4⁺ probablemente actúan indirectamente induciendo una respuesta mantenida y específica de los linfocitos T CD8⁺ y de células B.

La respuesta celular específica T CD8⁺ juega un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad hepática y en el aclaramiento del virus. Es una respuesta intensa y policlonal en pacientes que aclaran el VHB y débil en hepatitis crónica, ya que en el hígado de estos pacientes hay células T CD8⁺ específicas que no son capaces de aclarar la infección (Penna A y col., 1991; Rehmann B y col., 1995; Bertoletti A y col., 1991; Tsui LV y col., 1995).

En un estudio que examina la relación entre el número de células T CD8⁺, la extensión de enfermedad hepática y los niveles de VHB en infección crónica por VHB, se observó que la inhibición de la replicación sería independiente del daño hepático y que es más importante para el control de la replicación la funcionalidad de las células T CD8⁺ que el número (Maini NK y col., 2000). En chimpancés se ha observado que el aclaramiento viral y el comienzo de la enfermedad hepática coinciden con un acúmulo de T CD8⁺ específicos, inducción de interferón- γ que puede inhibir la replicación viral y genes inducibles por interferón- γ en el hígado (Guidotti LG y col., 1999, Thimme R y col., 2003).

En la respuesta inmune celular, los hepatocitos infectados son atacados por linfocitos T CD8⁺ que liberan citocinas inflamatorias y destruyen el hepatocito para facilitar su eliminación por los macrófagos. Esta es la causa de la elevación de las transaminasas en suero. Por eso, en pacientes tratados con citostáticos o inmunodeprimidos, apenas hay lesión hepática, pese a la intensa replicación vírica. Cuando estos pacientes reconstituyen su inmunidad, el alto nivel de replicación vírica y la expresión de grandes cantidades de antígenos víricos en la superficie celular de los hepatocitos, precipita una reacción inmune muy potente, con la posibilidad de una amplia necrosis hepática. La depleción de células T CD8⁺ en el pico de la viremia retrasa el aclaramiento vírico y el comienzo de la hepatitis vírica hasta que vuelven a aparecer, probando que el daño tisular y el aclaramiento vírico están mediados por estas células (Thimme R y col., 2003). La eliminación de las células infectadas puede ser ineficaz si los T CD8⁺ son ampliamente superados en número por los hepatocitos infectados ya que se requiere contacto entre los

linfocitos T CD8+ y las células infectadas (Guidotti LG y col., 1999; Thimme R y col., 2003; Asabe S y col., 2009).

Las causas de la respuesta inmune inadecuada de la infección crónica en adultos no están claras, parecen ser múltiples factores, entre ellos el tamaño del inóculo. En la transmisión vertical, la persistencia viral en neonatos puede ser debida al HBeAg que atraviesa la placenta e induce intolerancia según se ha demostrado en ratones (Milich DR y col., 1990). La capacidad de la respuesta inmune para controlar la infección inicial determinará la evolución. Si la eliminación de las células infectadas es más lenta que la infección de nuevos hepatocitos, habrá un daño hepático crónico, apareciendo hepatitis crónica y eventualmente cirrosis.

8. MARCADORES SEROLÓGICOS

8.1. Antígeno de superficie (HBsAg)

El HBsAg, inicialmente denominado antígeno Australia, aparece 6-8 semanas tras la exposición al virus, y puede detectarse en el periodo de incubación. Es el marcador serológico más importante para diagnosticar tanto la infección aguda como crónica, y, de hecho, la duración de su periodo de detección determina el criterio de cronicidad (Figuras 7 y 8). Su presencia indica producción de la envuelta vírica; si la evolución es favorable, desaparecerá paulatinamente y si persiste a los 6 meses, se considera que se trata de una infección crónica.

Hay que tener en cuenta que existen casos con producción prácticamente indetectable de HBsAg, pero en los cuales se detecta ADN vírico circulante, si bien en concentraciones bajas, detectables en muchas ocasiones sólo por las técnicas más sensibles, como la RT-PCR. En estos casos sí se suele detectar, en cambio, la presencia de anticuerpos anti-HBc. Constituirían las que se han venido denominando “hepatitis B ocultas”, ya que no son detectadas por el método convencional de diagnóstico, que es la positividad del HBsAg.

8.2. Anticuerpo de superficie (HBsAc)

El HBsAc empieza a ser detectable al desaparecer el HBsAg. La detección aislada de este marcador indica vacunación y, junto al HBcAc, infección resuelta. Un título de anticuerpos superior o igual 10mUI/mL indica inmunidad frente al VHB (Figuras 7 y 8).

8.3. Antígeno del core (HBcAg)

El HBcAg es un antígeno intracelular que no se detecta en suero.

8.4. Anticuerpo del core (HBcAc)

El HBcAc es el primer anticuerpo que se positiviza y va dirigido contra los epítomos del antígeno *core*. No posee capacidad neutralizante. Aparece con los primeros síntomas clínicos y permanecerá positivo independientemente de la evolución de la infección (Figuras 7 y 8). Se trata del marcador más sensible de contacto con el VHB, pero también del menos específico. Puede detectarse de manera aislada en el periodo de recuperación de una hepatitis B, en el periodo de seroconversión de HBsAg+ a HBsAc+, aunque no se trata de un hallazgo frecuente porque la duración de esta fase suele ser muy corta. También puede detectarse aislado en pacientes donde la infección se ha resuelto pero no existe seroconversión. Su detección significa contacto previo o actual con VHB. El **HBcAc IgM** indica infección aguda, persiste 12-18 meses y puede positivizarse en algunas hepatitis B crónicas con replicación vírica.

8.5. Antígeno e (HBeAg)

El HBeAg se produce en los hepatocitos durante la replicación vírica. Es detectado en la fase aguda y en algunas hepatitis B crónicas activas. Es un marcador de replicación vírica, y su desaparición junto con la aparición de HBeAc indica buen pronóstico. Puede no aparecer en algunas hepatitis crónicas replicativas debidas a mutantes *precore* que tienen peor pronóstico (Figuras 7 y 8).

8.6. Anticuerpo e (HBeAc)

El HBeAc aparece en el curso de una infección aguda indica, generalmente, buen pronóstico y disminución de la infectividad. Generalmente es detectado antes de la desaparición del HBsAg y puede permanecer positivo años después de la infección. Su presencia indica escasa replicación del virus, excepto en variantes *precore*, donde su aparición no supone ni mejoría clínica ni histológica (Figuras 7 y 8).

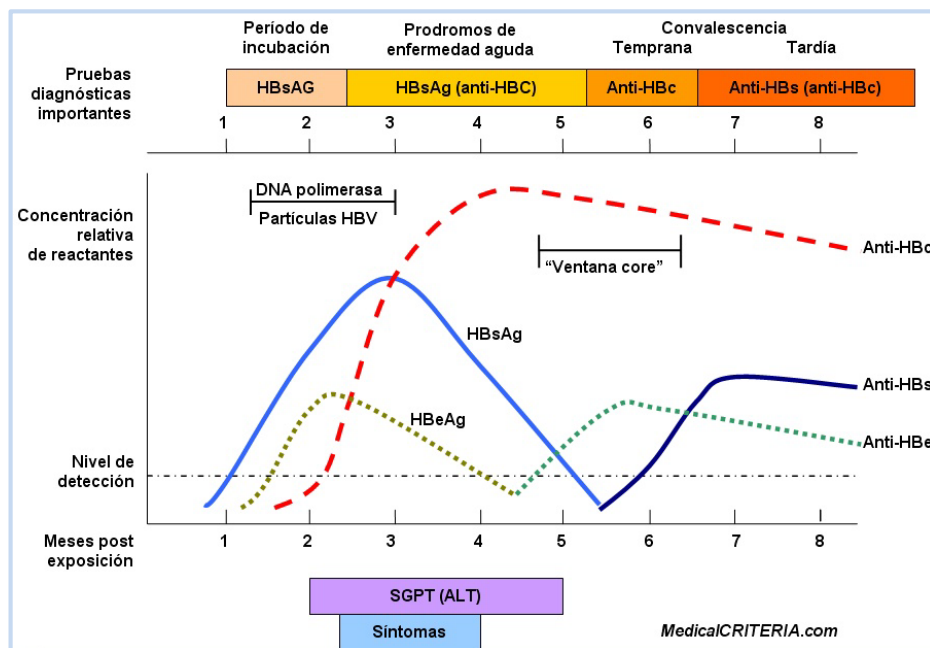


Figura 7. Evolución de los marcadores serológicos en hepatitis B aguda. Tomado de MedicalCRITERIA.com

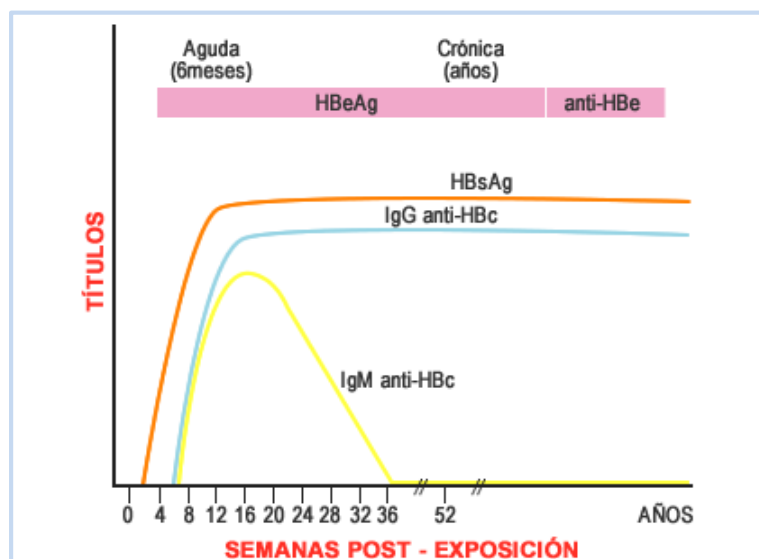


Figura 8. Evolución de marcadores serológicos en hepatitis B crónica. Tomado de www.lookfordiagnosis.com

9. PATRONES SEROLÓGICOS ATÍPICOS

La mayoría de las infecciones por el VHB presentan una evolución serológica que da lugar a la aparición de diferentes perfiles de marcadores según la fase de la enfermedad. De este modo, en términos generales, un determinado perfil se corresponde con una fase evolutiva concreta de la enfermedad. No obstante, desde inicios de los años 80 se vienen describiendo patrones serológicos de difícil interpretación. Pueden ser debidos a problemas técnicos, a factores dependientes del paciente o factores dependientes del virus como las mutaciones. Éstas pueden originar un comportamiento anormal de los marcadores (no aparición del marcador, permanencia del marcador a pesar de la aparición del anticuerpo correspondiente, etc.) o una alteración de la respuesta inmune que da lugar a formas evolutivas no habituales en la clínica. Estas mutantes se comportan con frecuencia como formas de escape frente a la respuesta inmune, siendo seleccionadas por ésta y convirtiéndose así en prevalentes. Hoy en día no se conoce la respuesta para todos los patrones atípicos que se pueden encontrar. Antes de etiquetar como tal a uno de estos patrones se debe comprobar su persistencia en el tiempo, solo así se pueden considerar como tales (Muñoz Criado y col., 1997).

La detección de ADN del VHB, en ausencia de HBsAg puede ocurrir, dentro de la evolución normal de la enfermedad, durante el periodo ventana de la infección aguda. Salvo esta circunstancia, la detección de ADN del VHB en ausencia de HBsAg (que puede ocurrir de manera aislada, o acompañada de otros marcadores serológicos) casi siempre se asocia la infección por una mutante del gen S (mutante de escape) que afecta al determinante antigénico “a”, como la G145R, la más frecuente de todas. Estas mutaciones hacen que el HBsAg no sea reconocido por los anticuerpos anti-HBs “normales”, lo que tiene dos consecuencias:

- por una parte, puede no ser detectado por algunos sistemas de diagnóstico serológico convencionales, lo que hace que ese paciente sea considerado erróneamente como HBsAg negativo.
- por otra parte, al no interaccionar con normalidad con los anticuerpos anti-HBs, puede no ser neutralizado por los mismos, sean éstos procedentes de la vacunación o de un contacto previo con el virus, lo que implica que podrían reinfectar tanto a pacientes que ya han pasado la enfermedad como a pacientes vacunados.

En consecuencia, la presencia de estas mutantes pueden traducirse en infecciones con ADN circulante, pero ausencia de HBsAg. Pueden aparecer en un paciente sin contacto previo aparente con el virus o con serología correspondiente a una infección pasada o con HBcAc aislado o en presencia simultánea de HBeAc y HBsAc o con HBeAg en ausencia de HBsAg o en vacunados (Gerlich WH, 2004). El diagnóstico suele ser complejo por cuanto, a la atipicidad del perfil, se suma el hecho de que las

concentraciones de ADN vírico suelen ser tan bajas (80-1.000 UI/mL) que pueden no detectarse en estudios de cribado de donantes lo que supone un problema para los bancos de sangre (Allain P, 2004).

La coexistencia de HBsAg y HBsAc puede ocurrir de manera fugaz en el curso normal de una hepatitis B o en el tratamiento con interferón de hepatitis crónicas. Este patrón se encuentra en hepatitis crónica activa, hepatocarcinoma, reactivaciones de VHB en inmunodeprimidos y en UDVP (Gerlich WH, 2007).

La reactividad de HBsAg con HBcAc negativo puede deberse a un falso positivo, contaminación, vacunación reciente, infección en un estadio muy inicial, inmunotolerancia extrema que determina la ausencia de respuesta inmune humoral, infección crónica por mutante del gen X con valores de HBsAg bajos y resto de marcadores negativos (perfil infrecuente y solo descrito en pacientes sometidos a hemodiálisis) o infección por el VHB tipo 2. Este virus se describió en Senegal en 1987 en un estudio de vacunación frente al virus B. Se detectaron simultáneamente HBsAg y HBsAc en algunos pacientes (Courgaset P y col., 1987). También se han descrito casos en España (Echevarría JM y col., 1988) y otros países. Compartiría con el VHB algunos determinantes antigénicos relacionados con el HBsAg mientras que los relacionados con el HBcAc tendrían especificidades antigénicas diferentes.

La presencia aislada del HBcAc es frecuente en población de riesgo (10-25%). Puede corresponderse con diversas situaciones como infecciones antiguas en que el HBsAc se ha hecho indetectable, circulación del HBsAg en forma de inmunocomplejos que impide su detección por métodos convencionales, infecciones autolimitadas que no desarrollan HBsAc, infección por mutante en el gen S, infecciones activas con títulos indetectables de HBsAg, respuestas inmunes anómalas o coinfección por VHC. El VHC suprime la replicación del VHB y por tanto la expresión del HBsAg (Chu CM y col., 1998).

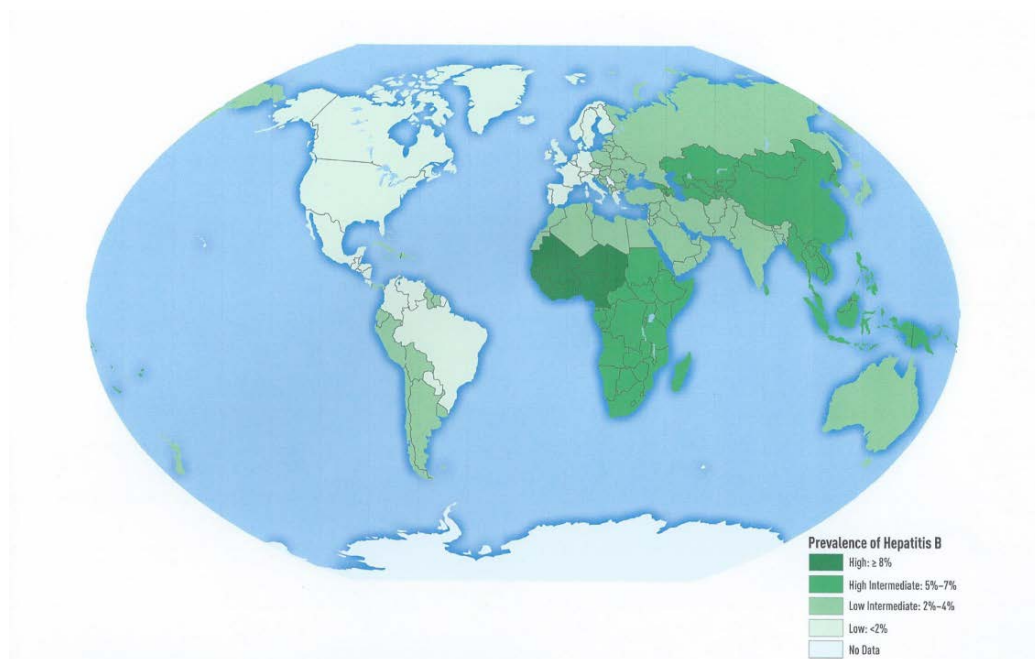
La reactividad aislada del HBsAc en individuos no vacunados suele ser baja y deberse a una reactividad inespecífica de una IgM que se une al HBsAg, pérdida del HBcAc (0,1-0,5%) o respuesta inmune incompleta frente a la infección por una mutante S (García Bermejo I, 2007).

Se han descrito casos de pacientes con hepatitis B crónicas, sobre todo HBeAg+, que no presentan en ningún momento de la infección HBcAc (Santana OE y col., 1995). Este patrón suele aparecer en pacientes inmunodeprimidos, y parece relacionarse con altas cantidades de HBcAg (Lee JH y col., 1992; Lazizi Y y col., 1993). Diversos autores han achacado estos casos a alteraciones del sistema inmune como la inmunodepresión en VIH (Ikeda Y y col., 1986) a la presencia de un interferón defectuoso que reduciría la expresión de antígenos HLA en la superficie del hepatocito (Lee JH y col., 1992) o a una deficiencia selectiva en la respuesta inmune frente al HBcAg. En España este patrón serológico afecta a un 0.3% de los casos, la mayoría VIH + (Santana OE y col., 1995).

La aparición de HBsAg (seroinversión) en pacientes inmunodeprimidos con patrón de infección resuelta ocurre durante o tras la quimioterapia sobre todo en hematológicos y tumores sólidos (Yeo W ycol., 2004). Últimamente se han incrementado las reactivaciones debido al uso de anticuerpos monoclonales antilinfocitos B o T como rituximab o alemtuzumab. El ADN es el marcador más precoz, ya que precede en 2-3 semanas al aumento de la ALT.

10. EPIDEMIOLOGÍA

Según la OMS, dos mil millones de personas, lo que supone un tercio de la población mundial, han sido infectadas por el VHB y, de ellos, 350-400 millones presentan una infección crónica y 780.000 personas fallecen al año (WHO, 2014). La prevalencia varía significativamente según las regiones del mundo, siendo alta en África subsahariana, Asia-Pacífico y cuenca del Amazonas (Bolivia, Brasil, Colombia, Venezuela, Perú y Ecuador) donde más del 8 % de la población son portadores crónicos del VHB y entre 70-98% muestra evidencia serológica de haber estado expuesto al virus. En la zona de Asia-Pacífico se encuentran aproximadamente el 75 % de todos los portadores de VHB. Aproximadamente, el 45 % de la población mundial vive en regiones endémicas para el VHB (WHO, 2003; WHO, 1996). Japón, India, zonas del sureste y centro de Europa y Oriente Medio tienen prevalencias intermedias: 1-8 % de la población son portadores crónicos y 10-60 % muestra evidencia serológica de exposición al VHB. El resto de las regiones tienen prevalencias bajas: menos de un 1% son portadores y entre 0.5-2% muestran evidencia de exposición al virus (Kew MC, 2010). En España la prevalencia es de un 0,7% y es la tercera causa de enfermedad hepática tras la hepatitis por VHC y el alcohol (Suárez-González A y col., 2004).



La transmisión de la hepatitis B se produce de persona a persona a través de sangre y fluidos corporales como el semen o las secreciones vaginales. Los mecanismos de transmisión son los mismos que para el VIH, pero el VHB es 50-100 veces más infeccioso ya que alcanza concentraciones muy elevadas en sangre (Stevens JJ y col., 2012).
Figura 9. Prevalencia del VHB. Tomado de Stevens JJ y col., Vaccine 2012

Los mecanismos de transmisión más frecuentes en los países en desarrollo son:

- Perinatal: transmisión durante el parto de la madre HBsAg+ al recién nacido. El virus B es incapaz de atravesar la placenta, a menos que esté dañada, por lo que la infección intrauterina es poco frecuente.
- Infecciones asintomáticas en la primera infancia por contacto directo con infectados
- Inyecciones no seguras
- Transfusiones de sangre
- Contacto sexual

Y en los países desarrollados se produce, sobre todo, entre adultos jóvenes por:

- Contacto sexual
- Consumo de drogas parenterales
- Profesionales sanitarios por pinchazos accidentales

El VHB no se transmite por alimentos, aguas contaminadas o contactos ocasionales en el lugar de trabajo.

Durante tres décadas se ha usado una vacuna recombinante segura y efectiva que ha reducido la infección en los países que han llevado a cabo programas de inmunización (FitzSimons D y col., 2011).

En nuestro país, la vacuna se introdujo en 1982 en grupos de riesgo y en 1992 el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud empezó a incluirla de forma gradual desde el nacimiento y la adolescencia, de manera que ya en 2002 figuraba en el calendario vacunal de todas las autonomías.

Antes de la vacunación, España se consideraba un país de prevalencia intermedia ya que los portadores de HBsAg oscilaban entre un 1 y un 5 % (CNE, 2014, AEEH, 1994). Tras la vacunación, la prevalencia disminuyó. Por ejemplo, en Cataluña la prevalencia de HBsAg descendió desde un 1,5% en 1989 al 0,7 % en 2002 (Salleras L y col., 2007) y la prevalencia de HBcAc en el mismo periodo disminuyó de 15,6% a 8.7%. En la Comunidad Autónoma de Madrid, se produjo una disminución de la seroprevalencia de HBcAc desde un 20,8 % en 1988 a un 10,9% en 1994 y el número de portadores crónicos disminuyó de un 2% a un 1,2% (Rodríguez Agulló JL y col., 1996). También disminuyó la incidencia: en 2002 había 2 casos por 100.000 habitantes; en 2005, 1,27 por 100.000 habitantes; en el periodo de 2005-2008 aumentó por la inmigración a 2,27 por 100.000 habitantes (Hernando MV y col., 2010). La tasa de

incidencia más alta se da entre los 35-54 años, con 1,99 casos por 100.000 habitantes (Boletín Epidemiológico, 2014).

El espectro de enfermedad crónica por VHB y su historia natural varían desde el estado de portador inactivo a hepatitis crónica progresiva que puede evolucionar a cirrosis y hepatocarcinoma. El paciente con hepatitis B crónica tiene un 15-40% de probabilidad de evolucionar a cirrosis, insuficiencia hepática y carcinoma hepatocelular (William R, 1997; Lee WM 2003). La incidencia de cirrosis es más frecuente en HBeAg- asociado a mutaciones de la región *precore* (Hadziyannis SJ y col, 2001), que mantienen la replicación vírica activa (8-10%) (Manesis EK y col., 2006) que en HBeAg+ (2-5%). El riesgo de desarrollar hepatocarcinoma es de un 1% en pacientes con hepatitis B crónica y de un 3-10% en los que tienen cirrosis hepática (Chu CM, 2000). Cargas superiores a 2.000 UI/ml (11.200 copias/ml) incrementan el riesgo de desarrollo de hepatocarcinoma (Chen CJ y col., 2006).

La morbilidad y mortalidad son altas, ya que la infección por VHB es uno de los factores fundamentales de riesgo para desarrollar cáncer de hígado. Se cree que entre 520.000 y 1.200.000 muertes anuales son debidas al VHB (WHO, 2004; EASL, 2003), 1/10 debido a infección aguda y el resto por el desarrollo de cirrosis o cáncer en el curso de infecciones crónicas. Además, un 5-10 % de casos de trasplante de hígado son debidos al VHB (WHO 2004; Ganem C y col., AM. 2004).

La edad de adquisición de la infección por VHB es el factor predictivo más importante de la evolución de la infección. En el adulto inmunocompetente, la mayoría de las infecciones que se producen, se resuelven de forma espontánea. En regiones endémicas de alta prevalencia como el Sudeste de Asia o África subsahariana, es frecuente adquirir la infección en el momento del parto o en los primeros años de vida (Mc Mahon BJ y col., 1985; Botha JF y col., 1984). El riesgo es mayor en niños nacidos de madres HBeAg +. De ellos, un 70-90% se infectarán y un 90% desarrollará una hepatitis B crónica. Si la madre es HBeAg -, un 10-40 % se infectará y un 40-70 % de ellos desarrollará una hepatitis B crónica (Mc Mahon BJ y col., 1985; Hyams KC, 1995). La transmisión horizontal en la infancia es la forma predominante de transmisión entre la población subsahariana (Bothe JF y col., 1984), aunque la progresión a infección crónica es menor, en torno al 50% (Mc Mahon BJ y col., 1985). Las fuentes de infección son jóvenes recientemente infectados: hermanos, compañeros y otros miembros de la familia, sobre todo la madre. Contribuyen a la alta incidencia rituales como los tatuajes, escarificaciones o incisiones en la piel, circuncisiones o amputaciones realizadas con material sin esterilizar y en ceremonias que involucran a un gran número de jóvenes. La prevalencia es mayor en el medio rural que en el urbano.

En las regiones con prevalencia media o baja, la transmisión se produce preferentemente por vía parenteral o sexual, por lo que la infección tiene lugar a edades más avanzadas y predomina en poblaciones de riesgo como usuarios de drogas por vía parenteral o individuos promiscuos o personal

sanitario (Alter MJ, 2003; Shepard CW y col., 2006). En España la edad media en el momento del diagnóstico ronda los cuarenta años, como en otros países de nuestro entorno. La frecuencia de la infección crónica por VHB es mayor en hombres que en mujeres tanto en nuestro país como en áreas próximas (Cadranel JF y col., 2007; Zarski JP y col. 2006, Poves Martínez y col., 2012).

La inmigración no controlada, los viajes aéreos y la globalización contribuyen a la diseminación del VHB. Cuando los inmigrantes llegan a zonas de baja prevalencia procedentes de zonas de alta prevalencia, ésta disminuye en las generaciones siguientes debido a las nuevas condiciones de vida. Sin embargo, este descenso es menor en el caso de los asiáticos debido a que es mayor la transmisión vertical (Kew MC, 1983).

Factores de riesgo de progresión a hepatocarcinoma y cirrosis son los valores altos de ADN, la elevación de transaminasas séricas y algunos genotipos. También influyen, tanto en la evolución de la infección como en la eficacia de las estrategias antivíricas, la coinfección con otros virus, sobre todo, virus de la hepatitis D, virus de hepatitis C, VIH, el alcoholismo y el sobrepeso.

En los países de baja prevalencia, el VHB ocasiona aproximadamente el 10% de las cirrosis hepáticas.

El hepatocarcinoma es el sexto cáncer más frecuente a nivel mundial, el quinto en el hombre y el octavo en la mujer. Cada año se diagnostican 630.000 nuevos casos que suponen el 5.7 % de nuevos casos de cáncer, 7.5 % en hombres y 305 % en mujeres (Parkin DM y col., 2005). La incidencia anual del hepatocarcinoma asociado a VHB es del 2-5% cuando existe cirrosis previa (Fattovich G y col., 2004).

11. HISTORIA NATURAL

11.1. Hepatitis aguda

Cuando se produce la infección por el VHB, en un 30% de los casos los síntomas clínicos serán de una hepatitis aguda con astenia, anorexia, ictericia y elevación de transaminasas y el 70% de los casos serán asintomáticos. La mortalidad de la hepatitis aguda es muy baja, y se asocia en casi todos los casos a una hepatitis fulminante (Chan PC y col., 2005). Si se logra hacer un trasplante hepático la supervivencia al año es del 60-70 % (Montalti R y col., 2005)

El 95% de las veces se logra una respuesta inmune satisfactoria que controla la replicación vírica y lleva a la “curación” de la infección, aunque una inmunodepresión grave puede reactivarla a partir del ADNccc, que permanece en el hepatocito toda la vida y originar una lesión hepática de evolución más grave, incluso mortal (Pungpapong S y col., 2007).

11.2. Hepatitis crónica

En un 5% de los pacientes persistirá el HBsAg circulante y el ADN vírico, por lo que se establece una infección crónica en cuya patogenia influyen 3 factores: el sistema inmune, el tejido hepático y el virus.

La hepatitis crónica tendrá varias fases, si bien los pacientes no tienen por qué pasar por todas las fases de la infección (Figura 10):

11.2.1 Fase de inmunotolerancia

Se caracteriza por una alta tasa de replicación vírica, con cifras elevadas de ADN y HBeAg+, habitualmente acompañadas de escasa repercusión clínica, niveles normales o poco elevados de ALT debido a la débil respuesta inmune frente al VHB (Lok AS y col., 2007). Son muy contagiosos debido a la elevada carga viral. Esta fase es frecuente en niños que se infectan en el periodo neonatal o a lo largo de la infancia, y es rara en los adultos (Lok AS y col., 1988). Se cree que es debido a que el HBeAg atraviesa la placenta y actúa como inmunotolerógeno, al activar una respuesta antiinflamatoria que hace ineficaces a los linfocitos T citotóxicos (Yang y col., 2006). Esta fase de inmunotolerancia puede durar de 10 a 40 años, la seroconversión espontánea o por tratamiento es del 5% aproximadamente, el riesgo de aparición de cirrosis es de un 5% (Carneiro de Moura M y col., 2008) y puede evolucionar a hepatocarcinoma, sobre todo con cirrosis previa. Se han descrito casos de enfermedad activa en niños considerados inmunotolerantes (Chang MH y col., 1988; Bertolotti A y col., 2014) y gran diversidad de *quasispecies*, que pueden ser debidas a la presión inmune selectiva (Wang HY y col., 2010)

11.2.2. Fase de respuesta inmune o aclaramiento

Marca el final de la etapa anterior y es un intento del sistema inmune de eliminar el virus atacando a los hepatocitos. En el caso de los niños, coincide con la maduración del sistema inmune al llegar a la pubertad. Los pacientes suelen estar asintomáticos, aunque pueden presentar un cuadro parecido a una hepatitis aguda. Aparece un pico de transaminasas, valores fluctuantes de ADN y lesiones necroinflamatorias en el hígado.

Puede producirse la seroconversión del HBeAg, lo que hace que la infección sea menos replicativa e incluso seroconversión del HBsAg.

Finalmente, la actividad antiinflamatoria va cediendo, hasta que se alcanza un equilibrio con transaminasas no tan elevadas y HBeAg y ADN detectables. Un 10-30% de estos pacientes presentarán episodios de aumento de la replicación vírica a lo largo de su enfermedad, con elevaciones importantes de las transaminasas y del ADN del VHB. A veces el periodo de reactivación da lugar a la detención de

la replicación del VHB con una disminución sérica del ADN-VHB hasta que se vuelve indetectable, junto a la aparición de HBeAc.

La seroconversión de HBeAg es de 5-20 % al año y puede ir precedida de aumento de transaminasas (Sánchez-Quijano A y col., 2006). El aumento de transaminasas que ocurre durante las reactivaciones parece relacionado con la destrucción de los hepatocitos infectados por el sistema inmune (Chu CM y col., 1987). La seroconversión espontánea parece más frecuente en pacientes con edades en torno a los 35 años (Yuen MF., 2003), concentración elevada de ALT en el momento del diagnóstico, en episodios de exacerbación aguda y en determinados genotipos (más frecuente en B que en C). La duración de esta fase, así como la frecuencia e intensidad de las reactivaciones, se correlaciona con el riesgo de evolución a cirrosis y hepatocarcinoma.

11.2.3. Fase de portador asintomático

Comienza tras la seroconversión del HBeAg. Se normalizan las transaminasas, el ADN es bajo o indetectable y hay pocas lesiones necroinflamatorias en el hígado. La mayoría permanecen en esta fase indefinidamente y su pronóstico es bueno.

Algunos pacientes, un 0,5-2% en países occidentales y un 0,1-0,8 en el sudeste asiático, pueden hacer una seroconversión HBsAg (Chu CM y col., 2007; Lok AS y col., 1987), con un pronóstico a largo plazo favorable salvo que ya presenten cirrosis (Yuen MF y col., 2004) por lo que deben ser controlados ya que pueden evolucionar a un hepatocarcinoma (Huo TI y col., 1998).

Existen casos en los que puede ocurrir una reactivación de la replicación vírica, espontánea o por inmunodepresión (Lok AS y col., 1991), que puede evolucionar a cirrosis o hepatocarcinoma. La desaparición de HBeAc y reaparición de HBeAg se denomina seroinversión.

11.2.4. Fase de reactivación

Ocurre cuando el equilibrio alcanzado entre el sistema inmune y el VHB de la fase anterior se rompe y el virus comienza de nuevo a replicar. Suele afectar a pacientes de edad más avanzada y es la forma más frecuente en España. Se detectan niveles más o menos altos de ADN en sangre, aumento de las transaminasas y lesiones necroinflamatorias en el hígado (Hadziyannis SJ y col., 2001). El HBeAg es negativo y el HBeAc positivo ya que la infección está producida por variantes del gen *C* o *precore* y su evolución es peor que la de los pacientes HBeAg+. Dos tercios de los pacientes evolucionarán de manera fluctuante por lo que para distinguir el portador inactivo de HBsAg de un paciente con hepatitis crónica HBeAg- es necesario realizar una serie de determinaciones de transaminasas y ADN vírico a lo largo de un año cada 3-4 meses. El 20-40% de los pacientes en esta fase presenta cirrosis en el momento del diagnóstico.

En los países occidentales la hepatitis B crónica con HBeAg- representa el 70% de los casos de hepatitis crónica (Zarski JP y col., 2006).

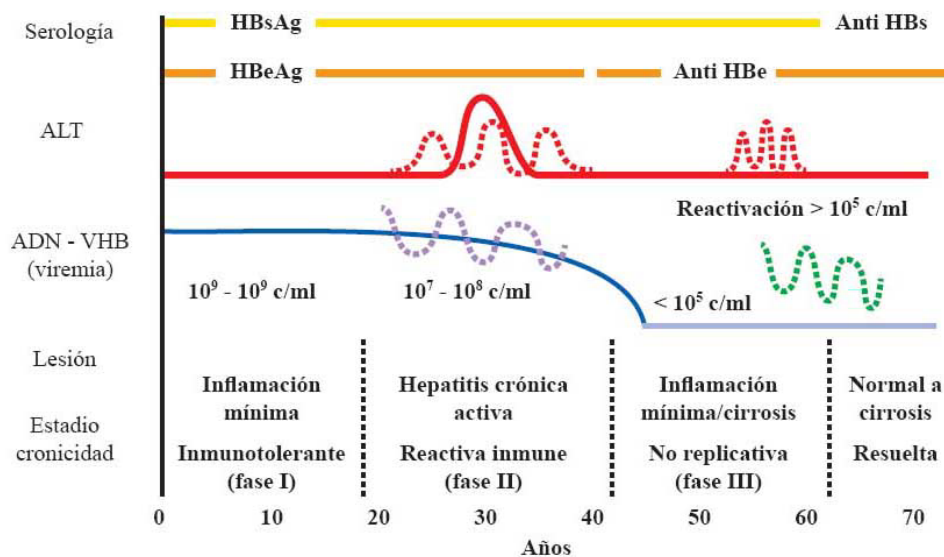


Figura 10. Historia natural de la infección crónica por el VHB. Tomado de Cabezas Sánchez C, Acta Med Per 2008.

12. CLÍNICA

El VHB no tiene un efecto citopático directo sobre el hepatocito, sino que la hepatopatía es debida a la respuesta inmune celular. En la mayoría, esta respuesta es intensa, policlonal y multiespecífica por parte de los linfocitos T citotóxicos, dando lugar a una hepatitis aguda autolimitada, a una reducción de la carga vírica y a una inmunidad humoral y celular que se mantienen a largo plazo. La infección crónica se asocia a una respuesta débil, que da lugar a una reducción en la expresión de los antígenos víricos en las células infectadas en grado suficiente como para eludir el reconocimiento inmunológico, pero no lo bastante como para que el virus sea eliminado, lo que da lugar a la persistencia del virus y a la enfermedad hepática crónica. Las manifestaciones clínicas son distintas en la hepatitis aguda y en la crónica.

12.1. Hepatitis aguda

La hepatitis aguda por VHB no se diferencia de otras hepatitis víricas agudas.

Tras la exposición al VHB, el periodo de incubación puede variar de 1 a 6 meses.

Puede existir una fase de pródromos de 2-4 semanas con fiebre, artralgias, artritis, mialgias y exantema cutáneo.

Después aparece el cuadro de hepatitis aguda con aumento de las transaminasas y un cuadro gripal inespecífico: cansancio, que puede durar varios meses, malestar general, anorexia, náuseas. En menos de un tercio de los pacientes aparece ictericia asociada a orina de color oscuro siempre junto a altos niveles de bilirrubina conjugada durante días o meses (media 2-3 semanas). Puede haber discreta hepatomegalia dolorosa, raramente se detectan adenopatías o esplenomegalia. La enfermedad aguda es más intensa si se produce coinfección con otros virus como el delta o con enfermedad subyacente como hepatopatía alcohólica.

El hallazgo analítico más destacado es el aumento de 10-50 veces de ALT y AST. La hipoalbuminemia es excepcional, y se suele asociar a evolución hacia la cronicidad. Los niveles de AST, ALT y HBsAg disminuyen simultáneamente.

En un 5% de los casos el HBsAg se puede eliminar precozmente y no detectarse cuando se inician los síntomas. En el 80% de los casos desaparece 12 semanas tras iniciarse los síntomas. Debido a esto, el diagnóstico se establece por la detección de HBcAc IgM y ADN-VHB, aunque en la mayoría de pacientes se detectan valores de HBsAg circulantes. Su persistencia más de 6 meses indica evolución a la cronicidad.

12.2. Hepatitis fulminante

La hepatitis fulminante es infrecuente, ya que aparece en menos de un 1% de los casos de hepatitis sintomática ictericia. Ocurre en las 4-6 semanas posteriores al inicio de los síntomas y, de no realizarse un trasplante hepático, se asocia a una mortalidad muy elevada.

Aparecen repentinamente fiebre, dolor abdominal, vómitos e ictericia, también se observan signos de insuficiencia hepática, como coagulopatía y síntomas neurológicos característicos de encefalopatía hepática que pueden ser desde el estadio I con desorientación y temblor, estadio II con confusión hasta el III con coma. Son factores de mal pronóstico la presión arterial baja en el momento del ingreso y recuento plaquetario bajo (Schiodt FV y col., 1999).

No se conocen los mecanismos de la hepatitis fulminante pero parece relacionada con una respuesta inmune masiva por linfocitos T citotóxicos, en ocasiones asociada a una activación y desregulación de citocinas proinflamatorias frente al virus. En estos pacientes las concentraciones de HBeAg o de ADN-VHB son indetectables por lo que la tasa de recidiva de la infección tras el trasplante hepático es muy

baja (Samuel D y col., 1993). La hepatitis fulminante es más frecuente en coinfección con el virus delta y cuando se retira el tratamiento inmunosupresor, por ejemplo tras un trasplante.

12.3. Hepatitis crónica

La hepatitis crónica se define como la persistencia del VHB durante, al menos, 6 meses. No suele haber antecedentes de una hepatitis aguda previa y el diagnóstico en muchos pacientes se debe a la observación casual de una elevación de transaminasas.

El paciente con hepatitis B crónica puede permanecer asintomático durante muchos años (Lee WM y col., 1997; Pungpapong S y col., 2007). En los casos sintomáticos, la clínica es muy inespecífica, la astenia es el dato más frecuente y menos frecuentes son malestar, anorexia, mialgias o artralgias. La exploración puede ser normal, aunque a veces puede detectarse hepatomegalia dolorosa. En pacientes con cirrosis se pueden identificar los signos de una hepatopatía crónica.

Las pruebas de laboratorio pueden ser normales en pacientes con infección crónica en fase inactiva. En pacientes asintomáticos, pero con actividad inflamatoria, puede existir un ligero aumento de las transaminasas. En fases de exacerbación o inmediatamente antes de la seroconversión con aparición de HBeAg, las transaminasas pueden alcanzar valores superiores a 1.000 U/l, sobre todo la ALT. Tras algunos brotes, puede disminuir el ADN-VHB sin desaparecer el HBeAg, y después desarrollarse un cuadro de insuficiencia hepática grave. Cuando progresa a cirrosis, disminuye el recuento de plaquetas, hay hipoalbuminemia, hiperbilirrubinemia y prolongación del tiempo de protrombina y en formas avanzadas aumentan las inmunoglobulinas en general.

La alteración histológica más típica de la hepatitis crónica por VHB son los hepatocitos en vidrio esmerilado, debido al acúmulo de HBsAg en el interior del retículo endoplásmico.

Las exacerbaciones agudas de la hepatitis B crónica se han observado sobre todo en pacientes HBeAg- y HBeAg+. No se conoce el desencadenante, se cree que son espontáneas. El 45-60% de pacientes infectados por variantes *precore* presenta episodios en los que aumenta la concentración sérica de las transaminasas, manteniéndose normal el nivel entre un episodio de exacerbación y otro (Bonino F y col., 2003). Las mutaciones en la región basal del promotor del *core* se asocian con aumento de la replicación vírica. También aparecen exacerbaciones tras suspender tratamiento con análogos de nucleósidos o desarrollar resistencias. En pacientes con tratamiento inmunosupresor (trasplantes, quimioterapia o corticoides) que son HBsAg+ y/o HBeAg+ antes del tratamiento que se suspende, puede aparecer una exacerbación. En estos casos, la administración de tratamiento antivírico no es capaz de interrumpir la destrucción celular, por lo que se debe administrar antes de empezar el tratamiento inmunosupresor y mantenerlo hasta 6 meses después de su conclusión.

Las manifestaciones extrahepáticas de la hepatitis B ocurren en el 10-20 % de los pacientes, y pueden atribuirse a otra enfermedad si no hay evidencia de la enfermedad hepática. Se dan tanto en las formas agudas como crónicas de la hepatitis B. No se conoce bien su patogenia: la respuesta inmune del huésped en su intento por eliminar al virus puede provocar una lesión vascular o tisular por depósito de inmunocomplejos circulantes o por efecto del virus o sus antígenos con formación de inmunocomplejos locales y activación posterior de la inmunidad celular (Mason A y col., 2005).

Se han descrito distintos tipos de glomerulonefritis, las más frecuentes la membranosa y la membrano-proliferativa. La complicación de síndrome nefrótico por glomerulonefritis membranosa o membrano-proliferativa afecta sobre todo a niños con replicación vírica activa y es infrecuente. El 30-60 % presentará una remisión espontánea a la vez que se produce la seroconversión HBeAg (Gilbert RD y col., 1994). Puede evolucionar a insuficiencia renal, sobre todo en adultos. El tratamiento de elección son los análogos de nucleósidos, ya que el interferón, al ser un inmunomodulador, puede ser perjudicial en estos pacientes.

Entre las manifestaciones cutáneas están el exantema máculo-papular, urticaria, exantema purpúrico o acrodermatitis papular de la infancia (Gianotti-Crosti), que cursa con una erupción eritematosa plana y papular, con lesiones de 2-3 mm localizadas en cara y extremidades y linfadenopatía generalizada y afecta a niños de 2-6 años de edad con hepatitis aguda (Boeck K y col., 1998; De Gaspari G y col., 1970; Fergin P, 1983).

Los síntomas articulares pueden aparecer de forma aislada o formar parte de un síndrome por inmunocomplejos en los pródromos, durante y tras la curación aparente. Puede haber poliartalgias, poliartritis, tenosinovitis o poliartritis nodosa (PAN). La PAN es una vasculitis sistémica que afecta arterias de pequeño y mediano calibre con elevada morbimortalidad. Puede confundirse con artritis reumatoide ya que afecta a las mismas articulaciones y presenta rigidez matutina pero no hay deformación de la articulación. Es infrecuente. Se ha detectado HBsAg + en el 30-70 % de casos de PAN (Guillevin L y col., 2005). No existe correlación entre la gravedad de la hepatopatía y la vasculitis, se trata con antivíricos solos, o combinados con plasmaféresis (Onay S y col., 2007) ya que los esteroides pueden mejorar la PAN pero empeoran la hepatitis.

Otras manifestaciones extrahepáticas poco frecuentes son el síndrome de Guillain-Barré, encefalitis, mononeuropatía periférica, mononeuropatía múltiple, polineuropatía, polimiositis, dermatomiositis, miocarditis, líquen plano, eritema nodoso, pioderma gangrenoso, artritis reumatoide, polimialgia reumática, crioglobulinemia mixta (tipo II y III), anemia aplásica, pancitopenia, trombocitopenia y, más raramente, pericarditis o pancreatitis aguda.

13. INFECCIÓN CRÓNICA POR VHB Y CIRROSIS

La progresión de la infección por VHB a cirrosis se asocia a varios factores como HBeAg+, sexo masculino, edad avanzada, alcoholismo, obesidad, diabetes mellitus, coinfección con VHC, VHD o VIH y, sobre todo, el genotipo y la replicación del VHB.

Según un estudio realizado en Taiwan, el factor que más estrechamente se relaciona con la progresión a cirrosis es el nivel de replicación. Pacientes con valores de viremia <300 copias/mL tenían una tasa de progresión del 4,5 %, mientras que en pacientes con valores de viremia >1.000.000 copias/mL la tasa era de 36,2 % (Iloeje UH y col., 2006).

Respecto a los genotipos, la cirrosis fue más prevalente en el genotipo C que en el B (Sumi H y col., 2003). En las coinfecciones, la probabilidad acumulativa de tener cirrosis a los 10 años es del 9% en paciente sin coinfección, del 48% en coinfección con VHD y del 21 % en coinfección con VHC (Thio CL y col., 2002).

Marcadores que se usan en fibrosis son el propéptido del colágeno tipo III (P-III-P), el ácido hialurónico (Schupan D y col., 2004; Serejo F y col., 2001) o los marcadores de apoptosis como la citoqueratina 18 (Papatheodoridis G y col., 2007).

La elastografía hepática es un método no cruento para valorar la fibrosis con un valor predictivo elevado para identificar fibrosis significativa (F3 y F4). En los casos HBeAg- no es tan claro su valor por las reactivaciones.

14. HEPATITIS B Y HEPATOCARCINOMA

Desde 1975 se conoce la asociación entre infección por VHB y hepatocarcinoma (CHC) (Blumberg BS y col., 1975). De los pacientes con hepatitis B crónica sólo una minoría – menos de un 10% - desarrollará CHC. También se ha observado que más del 50 % de los pacientes con CHC tenía una infección previa por VHB (Zoulim F, 2006).

En pacientes HBsAg - la incidencia de este tumor es de 0,1 %, en pacientes con hepatitis crónica es del 1 % y en los que tienen cirrosis hepática es del 3-10% (Chu CM, 2000).

Recientemente se ha demostrado la relación entre la carga vírica y el riesgo de CHC: la incidencia acumulada de CHC aumenta de 1.3% a 14.9% cuando la carga vírica varía de <300 copias/mL a >1.000.000 copias/mL. Esta asociación no está relacionada con la gravedad de la enfermedad, y puede observarse en pacientes con transaminasas normales y sin cirrosis manifiesta (Zoulim F, 2006).

También se asocian a la aparición de CHC la duración de la infección, la edad avanzada, la raza (asiáticos y africanos), infección por mutante *precore*, el alcoholismo, la coinfección por VHC, VHD o VIH, cargas elevadas de ADN-VHB, antecedentes familiares, tabaquismo, obesidad, diabetes mellitus, sexo masculino, positividad para HBeAg, el genotipo C comparado con el B, y en África y el Sudeste asiático, la exposición a aflotoxinas producidas por *Aspergillus flavus* que contaminan los alimentos (Ohnishi K y col., 1982; Chen CJ y col., 2006).

La doble mutación en el PBC A1762T/G1764A y mutaciones en preC son propensas a la generación de carcinoma hepatocelular en comparación con el tipo silvestre. (Liu S y col., 2009; Yin J y col., 2011). Un reciente metaanálisis concluye que especialmente en los pacientes asiáticos, los infectados por VHB con mutaciones G1896A son más propensos a desarrollar enfermedad severa y carcinoma hepatocelular. Otras mutaciones en PreC como G1899A, C1653T, T1753V también conllevan un aumento de riesgo de desarrollo de hepatocarcinoma (Liao Y y col., 2012).

La proteína X modula las respuestas inmunes celular y humoral que pueden estar involucradas en la oncogénesis (Su Q y col., 1998). Además la activación de NF-κB (factor nuclear-kappa-B) por HBx puede promover la supervivencia de células mutadas e infectadas que favorecen la oncogénesis (Beg AA y col., 1995; Murakami S y col., 1994). Anteriormente, ya se ha citado que HBx también contribuye a la carcinogénesis modulando la angiogénesis, induciendo la transcripción del factor de crecimiento endotelial y estabilizando el factor inductor de hipoxia (HIF-1) (Yoo YG y col., 2008; Han HK y col., 2007).

Los niveles de ADN-VHB en suero generalmente bajan cuando se desarrolla un CHC. Sin embargo, en Asia se detecta una importante replicación vírica cuando aparece el CHC (Brechot C y col., 2010). Las células tumorales no expresan el HBcAg, aunque puede detectarse el HBsAg en un 20 % de los casos (Wang WL y col., 1991).

En la cirrosis, la síntesis de ADN en las células hepáticas está aumentada respecto a las células de un hígado normal. En aproximadamente la mitad de los nódulos cirróticos existen características de expansión clonal de las células por lo que la hepatitis crónica activa subyacente es un factor carcinogénico que explica el mayor riesgo de CHC en pacientes con cirrosis activa (Brechot C y col., 1980). Sin embargo, en estudios realizados en marmotas y roedores americanos infectados por Hepadnavirus (WHV- Woodchucks Hepatitis Virus- y GSHV -Ground Squirrel Hepatitis Virus-) se vio que desarrollaron CHC con una hepatitis crónica activa de base pero sin cirrosis, luego ésta no es un requerimiento estricto para el desarrollo de CHC (Tennant BC y col., 2004).

Los mecanismos moleculares por los que el VHB inicia la oncogénesis hepática no están claros. En el 70- 80 % de los CHC existe ADN vírico que se integra a nivel del genoma de la célula hospedadora, pero la mayoría de los genes aparecen fragmentados o inactivados a nivel de transcripción (Ganem D y col., 2001). La integración del ADN puede ocurrir en genes que codifican proteínas con un papel fundamental en el control de las señales celulares, la proliferación y la viabilidad. En el caso de la marmota americana infectada por el WHV, el desarrollo de CHC se debe a la integración del ADN vírico en una zona próxima al oncogen *N-myc2*, que es activado como consecuencia de la misma (Buendia MA, 1998). Sin embargo, la integración del ADN vírico no es obligatoria en el ciclo vital del virus, sino que puede actuar como un mutágeno de inserción, activar oncogenes celulares por la proteína X o por proteínas truncadas de la envuelta vírica y provocar inestabilidad genómica por amplificaciones, translocaciones y deleciones que pueden dar lugar a neoplasia (Koike K y col., 1998).

En ratones transgénicos que contienen diferentes inserciones de ADN de VHB se demuestra la importancia de la regeneración celular hepática secundaria a la necrosis de los hepatocitos en ausencia de agentes mutágenos. Si se produce un acúmulo de PreS1/S2/S, esta proteína de la envuelta vírica induce un efecto tóxico directo en el hepatocito, independientemente de la respuesta inmune. Por otro lado, la respuesta inmune desencadena regeneración celular y aumento de riesgo de hepatocarcinoma. En este modelo también se ha demostrado el daño oxidativo del ADN, posiblemente por la síntesis de citoquinas (Brechot C y col, 2010).

Se ha observado una incidencia de deleción *pre/S* en un 52-62 % de pacientes que desarrollaron carcinoma hepatocelular (Chen BF y col., 2006; Chen CH y col., 2007; Hsieh YH y col., 2007; Ito K y col. 2007; Kajiyama Y y col., 2002) y genes *preS2/S* con el extremo terminal 3´truncado de ADN de VHB integrado en tejido de carcinoma hepatocelular. Las proteínas truncadas pueden tener potencial

transcripcional/transactivación y conducir al desarrollo del carcinoma, (Caseman WH y col., 1990; Kekulé AS y col., 1990)

Debido a la respuesta inflamatoria, se destruyen y regeneran hepatocitos continuamente a lo largo de años lo que puede originar mutaciones en los hepatocitos infectados. En la mayoría de los tumores avanzados, los genes del VHB han desaparecido, por lo que el virus estaría implicado sólo en el inicio y promoción de la carcinogénesis.

Se ha documentado que el tratamiento con interferón en pacientes que responden, reduce el riesgo de desarrollar un CHC (Van Zonneveld M y col., 2004).

15. HEPATITIS OCULTA

La existencia de la hepatitis “oculta” (OBI: “occult” HBV infection) ha sido causa de debate. La persistencia de genoma de VHB en pacientes HBsAg- se describió a finales de los años 70 (Wands JR y col., 1975; Hoofnagle y col., 1978), pero cuando se desarrolla la biología molecular en los últimos 10 años, es cuando se ve realmente la prevalencia y su repercusión clínica.

Según la reunión de expertos de Taormina en el año 2008 (Raimondo G y col., 2008), la hepatitis oculta se define como la presencia de ADN-VHB en tejido hepático (y en algunos casos en el suero) en individuos en los que el HBsAg no puede ser detectado por los ensayos comerciales. La base molecular sería la persistencia de ADNccc en el hepatocito (Raimondo G y col., 2007; Levrero M y col., 2009). En la mayoría de OBI se produciría una supresión de la replicación y expresión de los genes por mecanismos no aclarados. Debido a esto la cantidad de ADN circulante es muy baja (<200 IU/mL), frecuentemente inferior a los límites de detección de las técnicas diagnósticas convencionales. En ausencia de HBsAg, si se encontraran niveles de ADN comparables a los de la infección con HBsAg +, se trataría muy probablemente de una infección por una mutante de escape (gen S mutado) (Raimondo G y col., 2008).

Hay varios mecanismos responsables de la desaparición de HBsAg en el suero: disminución progresiva de la replicación vírica, mutaciones genéticas y factores ambientales. Existen dos tipos de OBI según el perfil serológico: las OBI seropositivas con HBcAc + aislado o junto a HBsAc+, y las OBI seronegativas (20%), con todos los marcadores serológicos negativos (Toberson y col., 2002). No se sabe si existe diferencia clínica entre OBI seropositivas o seronegativas. La OBI muestra que la respuesta celular T específica duradera contra epítomos del VHB *in vitro* es débil, pero más eficiente en OBI seropositivas que seronegativas (Zerbini A y col., 2008).

Para diagnosticar una hepatitis B oculta se debería detectar ADN-VHB en el hepatocito. Como esto no es posible en la mayoría de pacientes porque obligaría a una biopsia hepática, se debe realizar una PCR a tiempo real con buena sensibilidad (Raimondo G y col., 2008). Si esto no es posible, se usaría HBcAc como sustituto para identificar OBI seropositivas en donantes de sangre, órganos o tejidos o cuando se administra terapia inmunosupresora.

La OBI está ampliamente diseminada. Su prevalencia varía según el área geográfica, pero es alta en los infectados por VHC: el ADN-VHB es detectable en un tercio de portadores de VHC con HBsAg negativo en el área mediterránea. La prevalencia es incluso mayor en Extremo Oriente (Raimondo G y col., 2007; Toberson M y col., 2002). En Norteamérica, donde parece estar menos diseminada, es muy prevalente en pacientes con enfermedad hepática avanzada por VHC (Shetty K y col., 2008). También

está presente en individuos con enfermedad criptogénica del hígado o cirrosis, especialmente en países en vías de desarrollo. En un estudio en Italia se analizó tejido hepático de pacientes sin enfermedad hepática y se detectó una prevalencia del 17% (Raimondo G y col., 2008).

El impacto clínico puede ser importante en varios contextos como la posible transmisión de la infección, el riesgo de reactivación o su contribución a la progresión de enfermedad hepática. Diversos estudios muestran asociación significativa entre OBI y enfermedad hepática grave, sobre todo en pacientes con infección por VHC, que sugieren que la infección oculta puede acelerar la evolución a cirrosis y CHC (Cacciola I y col., 1999).

Se ha especulado que durante la OBI, el VHB infecta preferentemente células mononucleares de sangre periférica. Las cargas virales muy bajas sugieren un mecanismo selectivo específico del sistema inmune del hospedador involucrado (Coffin CS y cols., 2011; Coffin CS y cols., 2011; Coffin CS y cols., 2014).

16. HEPATITIS B Y EMBARAZO

La transmisión vertical del VHB de madre portadora al recién nacido ocurre en un 85-90% de los casos en madres HBeAg+ y en un 30% en madres HBeAg- (Stevens CE y col., 1975). El riesgo es prácticamente nulo en hijos de madres portadoras de HBsAg con ADN-VHB negativo. El niño se puede infectar intraútero (5 % de los casos) por rotura de la barrera placentaria o, más frecuentemente, durante el parto cuando entra en contacto con la sangre de la madre que contiene partículas víricas, o en el periodo neonatal (Lin HH y col., 1987). Hasta la aparición de la vacuna, este tipo de transmisión era un factor importante en el mantenimiento de un reservorio de portadores crónicos ya que en los casos de transmisión vertical, más del 85 % se convertirán en portadores crónicos del VHB (Petersen J, 2011) en la infección horizontal en lactantes un 50 %, en niños de uno a tres años un 30 % y en niños mayores, un 5% (Jara P y col., 2008). Durante el embarazo, la mujer puede sufrir cualquier forma clínica de hepatitis B: aguda, exacerbación de infección latente por VHB o hepatitis crónica. El embarazo no aumenta las complicaciones ni para el feto ni para la madre. Lo que hay que evitar es la transmisión vertical.

En la mujer embarazada debe realizarse de forma obligatoria en el tercer trimestre la determinación de HBsAg y, si no ha sido controlada durante el embarazo, realizarlo tan pronto como sea posible con el fin de proceder a la profilaxis en el recién nacido. Si el HBsAg es positivo, se determinará ADN-VHB y signos de enfermedad hepática y se valorará si instaurar el tratamiento valorando la gravedad de la enfermedad en la madre y el riesgo de transmisión perinatal (Nguyen G y col., 2009). Si la embarazada está recibiendo tratamiento con análogos, se recomienda interrumpirlo, al menos durante el primer trimestre, y seguir un control estricto, ya que no hay suficiente información sobre el riesgo para la madre si se interrumpe o para el feto si se continúa (Buti M y col., 2012).

17. HEPATITIS B CRÓNICA EN NIÑOS

En niños asiáticos contagiados por transmisión vertical se ha observado que el paso del HBeAg a través de la placenta hace que el niño tenga una fase de inmunotolerancia con HBeAg +, carga viral elevada, transaminasas normales durante años por lo que no requieren tratamiento (Iorio R y col., 2007). Cuando madura el sistema inmune, se produce daño hepático. No obstante, también se ha observado que niños con infección perinatal pueden presentar alteración hepática desde el principio.

En España se han dado los dos patrones en niños infectados antes de 1985 (Bortolotti F y col., 1998). En niños se ha utilizado interferón, lamivudina y adefovir con resultados similares a los de los adultos y no hay datos con el resto de análogos (Jonas MM y col., 2002; Jonas MM y col., 2008).

18. COINFECCIONES CON OTROS VIRUS

18.1. Coinfección VHB-VIH

En los países occidentales la infección crónica por VHB es diez veces más frecuente en pacientes VIH positivos que en la población general (Kellerman S y col., 2033).

La coinfección por ambos virus es un hallazgo frecuente debido a que comparten vías de transmisión: sexual, parenteral y vertical.

La coinfección con VIH eleva la morbilidad y mortalidad por enfermedad hepática (Kellerman SE y col., 2003; Thio Cl y col., 2002; Pérez Olmeda M y col., 2003). Para tratar ambos virus a la vez se recomienda usar tenofovir combinado con emtricitabina añadiendo un tercer agente antirretroviral. En pacientes con $CD4+ > 500/\mu l$, se puede usar interferón, adefovir y telbivudina.

En pacientes VIH sin infección concomitante con VHB se recomienda la vacunación siempre que los $CD4+$ estén por encima de los 300-350/ μl .

18.2. Coinfección VHB-VHC

Un 7-15 % de pacientes con hepatitis B crónica está coinfectados por el VHC (Peters MG. 2009).

El VHC suele inhibir la replicación del VHB y éste último no parece influir en la eficacia de los tratamientos frente a VHC.

Se han descrito casos en los que tras erradicar el VHC con PEG-IFN y ribavirina aumentó la carga viral de VHB y más recientemente con los nuevos tratamientos como sofosbuvir y simeprevir (Collins JM y col., 2015).

18.3. Coinfección VHB-VHD

El virus delta (VHD) es un virus defectivo que necesita al VHB para replicarse.

El VHD puede adquirirse a la vez que el VHB o producirse una sobreinfección en un paciente previamente infectado por el VHB. La coinfección con VHD agrava la enfermedad hepática y su evolución a cirrosis.

La hepatitis fulminante es más frecuente en la coinfección que en la infección por VHB (Yurdaiyin C y col., 2010). La cronificación tras una hepatitis aguda por VHB-VHD es menos frecuente y la hepatitis crónica delta se produce en 70-90 % de pacientes sobreinfectados (Yurdaiyin C y col., 2010; Hughes SA y col., 2011).

La prevalencia del VHD es de 15- 20 millones en el mundo, lo que supone que el 5% de los infectados por VHB también lo están por el VHD (Wedemeyer H y col., 2010). Por esta razón, debería realizarse el estudio de VHD en todos los pacientes HBsAg+, especialmente en el área Mediterránea y Este de Europa donde su prevalencia es de un 5-10 % en los pacientes infectados con el VHB (Wedemeyer H y col., 2007) e instaurarse tratamiento.

El diagnóstico se realiza por detección de IgM, técnicas inmunohistoquímicas para el antígeno de VHD o por PCR, pero no están al alcance de todo el mundo (Figura 11).

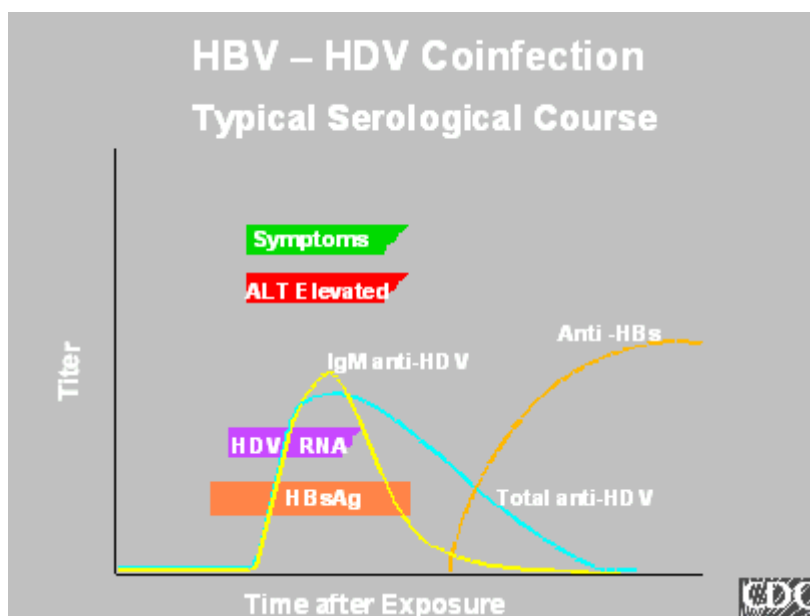


Figura 11. Perfil serológico en infección por VHD. Tomado de http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset/hep_d/slide_4.htm

19. DIAGNÓSTICO

Todo paciente diagnosticado de infección por VHB debe ser sometido a una evaluación inicial que permita establecer la fase de la infección, coexistencia con otras infecciones víricas como VHC, VHD, VIH y con otras enfermedades hepáticas de naturaleza metabólica, tóxica (principalmente por consumo de etanol) o autoinmunes que puedan contribuir al desarrollo de la enfermedad hepática.

Para evaluar la enfermedad por VHB tenemos 4 tipos de marcadores clínicos: bioquímicos, serológicos, virológicos e histológicos.

19.1. Marcadores bioquímicos

Los marcadores bioquímicos se relacionan de forma directa con la intensidad de la respuesta inmune y la actividad necroinflamatoria. Entre las pruebas de laboratorio que se deben solicitar están la realización de un hemograma y bioquímica completos incluyendo estudio de alanino aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), lactato deshidrogenasa (LDH), gammaglutamiltranspeptidasa o gammaglutamiltransferasa (GGT), fosfatasa alcalina (FA), proteínograma, alfa-fetoproteína, recuento sanguíneo, coagulación y actividad de protrombina. La VSG puede ser normal los primeros días y después incrementarse ligeramente.

19.1.1. Alanino aminotransferasa

El predominio de ALT es debido a hepatitis crónicas por VHC o VHB, fármacos y toxinas, esteatosis, esteatosis no alcohólica, hemocromatosis, hepatitis autoinmune, enfermedad de Wilson y hepatitis agudas virales por VHA, VHB, VHC, VHD, VHE, Epstein-Barr o citomegalovirus.

Las concentraciones de ALT se usan como marcador de enfermedad hepática. Es útil para caracterizar la infección, para las indicaciones de tratamiento y evaluar la respuesta. No predice el grado de actividad necroinflamatoria, ni de fibrosis ni establece pronóstico.

Se ha observado que en presencia de lesiones hepáticas moderadas o graves un porcentaje importante de pacientes, sobre todo varones mayores de 40 años, tenía cifras de ALT inferiores a 2 veces el límite superior de la normalidad o incluso normales (Lok AS y col., 2004).

En estudios realizados en Asia se ha visto que el riesgo de presentar complicaciones y fallecer por enfermedad hepática es mayor entre los que tienen valores de ALT entre 0.5-1 y 1-2 veces el límite superior de la normalidad que entre los que tienen menos de 0.5 veces el límite superior de la normalidad (Yuen HJ y col., 2005). En otro estudio entre donantes se vio que con unos límites más bajos para la ALT sérica de 30 UI/mL para varones y 19 UI/mL para mujeres ofrecían mayor sensibilidad que los

valores tradicionales de 40 y 30 UI/mL respectivamente para detectar el daño hepático (Prati D y col., 2002).

Hay que tener en cuenta que la elevación de ALT puede ser por otra causa distinta, sobre todo en países occidentales donde aumenta la incidencia de hígado graso. Es conveniente realizar varias determinaciones trimestrales e interpretar los resultados junto a otros parámetros como el sexo, la edad y los marcadores serológicos de replicación viral.

19.1.2. Aspartato aminotransferasa

La AST es una enzima citoplasmática y mitocondrial presente en los hepatocitos pero también en células de otros tejidos como corazón, músculo esquelético y riñón. El cociente AST/ALT >1 sugiere enfermedad hepática de origen alcohólico, pero también podemos encontrar ese cociente en cirrosis independientemente de su etiología.

19.1.3. Lactato deshidrogenasa

La LDH está presente en múltiples tejidos orgánicos y se libera como consecuencia de la destrucción celular (fisiológica o patológica) por lo que es un marcador de destrucción celular poco específico. Existen 5 isoenzimas de LDH que permiten hasta cierto punto establecer su procedencia. La LDH-5 procede mayoritariamente del hígado y la piel. Sin embargo, la determinación de isoenzimas no se usa en la práctica por no ser totalmente específicas y existir otros marcadores más eficaces. En las hepatitis agudas virales la elevación se inicia en los prodromos y es máxima al inicio de la ictericia. En hepatitis crónicas, cirrosis y hepatocarcinoma el incremento es moderado.

19.1.4. Gammaglutamiltranspeptidasa o gammaglutamiltransferasa

La GGT está sobre todo en hígado, aunque también se encuentra en páncreas, bazo y pulmón. En las hepatopatías tiene paralelismo con los cambios de la fosfatasa alcalina. Es muy sensible pero poco específica. Aumenta en hepatitis virales agudas siendo el aumento menor que el de las transaminasas y puede ser la última en regresar a valores normales. También aumenta en hepatitis crónicas virales. Otras causas de aumento son hepatocarcinoma, cirrosis, metástasis, hepatitis alcohólica, colestasis, pancreatitis, obesidad, hepatitis medicamentosa, etc.

19.1.5. Fosfatasa alcalina

La FA se encuentra en diversos órganos. La fosfatasa alcalina sérica suele provenir de hígado, huesos o intestino. Los aumentos de origen hepático suelen deberse a un proceso de colestasis. Las hepatitis virales agudas o crónicas y la cirrosis producen hepatopatía parenquimatosa sin colestasis obstructiva por lo que el aumento es moderado (menos de 5 veces el valor normal).

19.1.6. Proteínograma

En el proteínograma, la hiperproteinemia con disminución del cociente albúmina/globulina por aumento de la fracción globulínica puede ser entre otras causas, por cirrosis. La hipoalbuminemia puede ser debida a un defecto de síntesis que se presenta en la insuficiencia hepática de diversas causas, siendo más importante en las crónicas.

19.1.7. Alfa-fetoproteína

La alfa-fetoproteína se ha asociado al carcinoma hepatocelular primario. Cerca del 70 % de pacientes con carcinoma hepatocelular primario tienen concentraciones elevadas de alfa-fetoproteína en suero.

19.1.8. Factores de coagulación

La actividad de los factores de coagulación se realiza por el tiempo de protrombina y el tiempo de tromboplastina parcial activada. Las deficiencias de los factores de coagulación pueden ser adquiridas por fallo hepático.

19.2. Marcadores serológicos

Se solicitarán los marcadores serológicos de VHB (HBsAg, HBsAc, HBcAc totales e IgM, HBeAg y HBeAc) (Figura X), VIH, VHC, VHD, VHA.

Si no existen anticuerpos frente a VHA el paciente debe ser vacunado ya que es mayor el número de complicaciones y de hepatitis fulminante por VHA en pacientes con enfermedad hepática subyacente.

Los marcadores serológicos han sido citados anteriormente y su interpretación se refleja en la tabla 2.

19.3. Marcadores virológicos

El marcador virológico es la cuantificación del ADN-VHB por PCR. Es el más relacionado con la progresión de la enfermedad y el más útil para monitorizar el tratamiento. El resultado se expresará en copias/mL o preferiblemente en UI/mL (1UI/ml equivale a 5,6 copias/mL).

Si esta prueba es positiva, se puede extraer el ADN y realizar un estudio de mutaciones relacionadas con resistencia al tratamiento, mutantes *precore*, mutantes del gen S y determinar el genotipo ya que la evolución de la enfermedad y la respuesta a los tratamientos varían según ellos. Por ejemplo el genotipo A y en menor medida el B responden mejor al tratamiento con interferón que el genotipo C o D (Janssen HL y col., 2005), aunque se necesitan más estudios que confirmen estos datos.

	HBsAc	HBsAg	HBcAc IgM	HBcAc Ig G	HBe Ag	HBeAc	ADN- VHB
Infección aguda	-	+	+	+/-	+	-	+
Infección pasada	+	-	-	+	-	+/-	-
Infección crónica con replicación	-	+	+/-	+	+	-	+
Infección crónica con replicación (mutante <i>precore</i>)	-	+	+/-	+	-	+	+
Portador asintomático	-	+	-	+	-	+/-	-
Vacunación o periodo precoz.	+	-	-	-	-	-	-
No existe infección por VHB o periodo muy precoz de la infección	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 2. Marcadores serológicos y su interpretación.

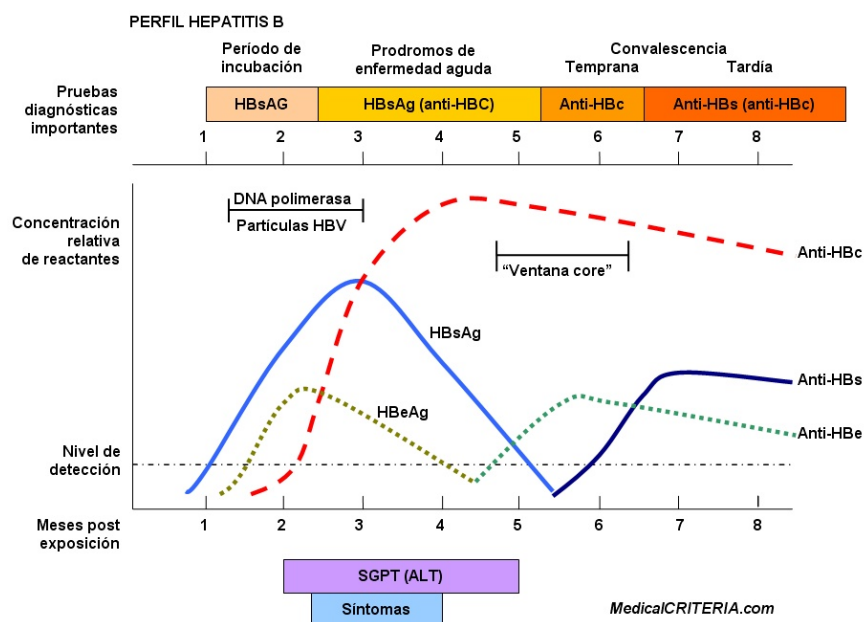


Figura 12. Marcadores serológicos según la fase de la infección. Tomado de Medical CRITERIA.com

19.4. Marcadores histológicos

19.4.1. Ecografía abdominal

Se recomienda la realización de una ecografía abdominal. Es útil para identificar signos de cirrosis, hipertensión portal y hepatocarcinoma. Sin embargo, puede ocurrir que exista enfermedad avanzada sin alteraciones ecográficas.

19.4.2. Elastografía por pulso unidimensional

La elastografía por pulso unidimensional mide la rigidez o elasticidad de un tejido expresándose el resultado en KPa (kilopascales). La elastografía de transición (ET) o Fibroscan es una prueba cualitativa que mide la rigidez hepática ya que ésta es proporcional al grado de fibrosis. La escala de METAVIR y la clasificación de Scheuer (Bedossa P y col., 1996; Scheuer PJ y col., 1995) gradúan la fibrosis en 5 estadios:

- F0 (ausencia de fibrosis)
- F1 (fibrosis portal)
- F2 (periportal)
- F3 (puentes de fibrosis entre espacios portales)
- F4 (cirrosis)

La ET es fiable para diagnosticar la cirrosis (F4) y la fibrosis significativa (F2 o >2). Evita la biopsia hepática en el 90% de pacientes con cirrosis y en el 70% de fibrosis significativa (Carrión JA,2009). Sin

embargo la precisión diagnóstica y los valores de corte para establecer los estadios no están tan bien establecidos como para la hepatitis C.

19.4.3. Biopsia hepática

La realización de biopsia hepática depende de numerosos factores. Es el método más fiable para ver el grado de actividad necroinflamatoria y de fibrosis hepática pero es una técnica invasiva y con complicaciones por lo que no se recomienda salvo en situaciones especiales ya que es preferible realizar una elastometría para evaluar la fibrosis hepática. Estaría indicada en pacientes con elevación de ALT y ADN con valores que no alcanzan criterios de tratamiento para excluir otras enfermedades. La Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEHH) no la considera en pacientes con indicación de tratamiento mientras que para la Asociación Americana para el Estudio de las enfermedades hepáticas (AASLD) sería opcional.

20. TRATAMIENTO

En la actualidad, no existe un criterio uniforme para seleccionar a los pacientes que deben recibir tratamiento. El objetivo es reducir el riesgo de desarrollo de cirrosis o la aparición de hepatocarcinoma, evitar el trasplante hepático y aumentar la supervivencia. Como erradicar la infección no es posible por la integración del ADN-VHB en el genoma del hepatocito como ADNccc, se trata de inhibir la replicación de manera prolongada.

En la hepatitis aguda por VHB no está indicado tratamiento ya que su evolución natural es hacia la curación, excepto en casos de hepatitis graves o cuando se realiza trasplante hepático para reducir el riesgo de recidiva (Known H y col., 2011; EASL, 2009).

En el caso de la hepatitis crónica por VHB hay que tener en cuenta la historia natural de la enfermedad, y el riesgo de que aparezcan mutantes resistentes a los fármacos empleados.

Según la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH) la indicación de tratamiento es la misma para pacientes HBeAg+ y HBeAg-. Hay que basarse en los niveles de ALT, la carga viral y la lesión hepática valorada por biopsia o elastometría (Buti M y col., 2012). El tratamiento estaría indicado con ADN-VHB >2.000 UI/mL, actividad necroinflamatoria y/o fibrosis moderada. Si la carga viral es superior a 2.000 UI/mL y las transaminasas normales, será el grado de lesión hepática lo que determinará la instauración de tratamiento.

Con grado de afectación hepática leve, hay que hacer seguimiento y valorar tratamiento.

En pacientes jóvenes en fase inmunotolerante, no es necesario si no existen datos de enfermedad hepática o antecedentes de hepatocarcinoma, se hará seguimiento y se realizará biopsia hepática cuando se eleve la ALT o alcancen 30 años de edad.

En pacientes con cirrosis, el enfoque es distinto según esté compensada o no. En la compensada se puede

	HEPATITIS CRÓNICA HBeAg+	HEPATITIS CRÓNICA HBeAg-
EASL (2009)	ADN-VHB >2000 UI/mL y/o ALT>LSN. Considerar BH y tratar si inflamación moderada/grave o fibrosis significativa	ADN-VHB >2000 UI/mL y/o ALT>LSN. Considerar BH y tratar si inflamación moderada/grave o fibrosis significativa
AASLD (2009)	ADN-VHB > 20.000 UI/mL + si ALT > x 2 LSN (3-6 meses de observación si ausencia de pérdida de HBeAg). Considerar BH previa al tratamiento o tratar si descompensación o ictericia. Si ALT ≤ 2 LSN: observación. Considerar BH si edad>40 años, historia familiar de HCC o alteración persistente de ALT y tratar si inflamación moderada/grave o fibrosis significativa	ADN-VHB > 20.000 UI/mL ALT > x 2 LSN Si ADN-VHB: 2.000-20.000 UI/mL y ALT > LSN, considerar BH y tratar inflamación moderada/grave o fibrosis significativa
APASL (2008)	ADN-VHB > 20.000 UI/mL+ si ALT> x5 LSN, Si ALT > x2-5 LSN (persistente tras 3-6 meses o descompensación hepática), si ALT< x2 LSN: monitorizar ADN y BH si edad > 40 años (Tratar si inflamación/fibrosis moderada/grave).	ADN-VHB > 20.000 UI/mL+, si ALT > x 2 LSN (persistente tras 3-6 meses o descompensación hepática, Si ALT< x2 LSN: BH (tratar si inflamación/fibrosis moderada /grave)
<p>ALT: alanino-aminotransferasa; LSN límite superior de la normalidad; BH: biopsia hepática;</p> <p>HCC: hepatocarcinoma:</p>		

considerar tratamiento con carga viral detectable pero menor de 2.000 UI/mL. Si la cirrosis está descompensada, se instaurará tratamiento independientemente de los valores del ADN-VHB y ALT ya que puede producirse mejoría clínica si se controla la replicación del virus (Shim JH y col., 2010; Liaw YF, Sheen IS y col., 2011; Liaw YF, Raptopoplou-Gigi M y col., 2011).

Las guías de tratamiento de infección crónica por VHB de la American Association for the Study of the Liver Diseases (AASLD), European Association for the Study of the Liver (EASL) y Asian-Pacific Association for the Study of Liver (APASL) basan la elección de tratamiento en la existencia de actividad de enfermedad hepática medida por la elevación de las transaminasas al menos dos veces por encima del límite superior de la normalidad, elevadas concentraciones de ADN-VHB y positividad de HBeAg (Tabla 3).

Tabla 3: Indicaciones de tratamiento de hepatitis crónica por VHB (Cortés L y col., 2012)

Después de 40 años, las alternativas terapéuticas frente a la hepatitis B están mejorando continuamente debido al mejor conocimiento del virus, aunque todavía existen áreas en las que hay que seguir investigando.

Es imposible actualmente hacer recomendaciones que valgan para todos los pacientes debido a la gran variabilidad del virus y de la evolución de la enfermedad. En Europa, al igual que en el resto del mundo, ha aumentado la prevalencia de la hepatitis B HBeAg- (Funk ML y col., 2002).

Se elaboran diferentes guías terapéuticas, aún así existe gran disparidad de criterios entre los especialistas para enfocar el tratamiento, de manera que éste debe establecerse de manera individualizada teniendo en cuenta todos los factores: edad, probabilidad de respuesta, pronóstico de la enfermedad, efectos adversos, desarrollo de resistencias, etc. y también hay que tener en cuenta el momento más indicado para establecerlo.

En Septiembre de 2011 se revisó la Guía Práctica Clínica (GPC), elaborada por la *European Association for the Study of the Liver* (EASL) en 2009, basándose en publicaciones existentes y en la experiencia de un equipo de expertos. Las recomendaciones tienen asignados grados según el *Grading of Recommendations Assessment and Evaluation* (GRADE) (Tabla 4).

Los expertos consideraron una serie de cuestiones:

- Cómo evaluar la hepatopatía antes del tratamiento
- Objetivos y parámetros de valoración del tratamiento
- Definiciones de respuesta
- Enfoque óptimo del tratamiento de primera línea
- Factores predictivos de respuesta

- Definiciones y abordaje de resistencia
- Monitorización del tratamiento
- Momento de dejar el tratamiento
- Tratamiento de grupos especiales
- Cuestiones actuales no resueltas

Grados de evidencia		Símbolo
Calidad alta	Improbable que una investigación mayor modifique la confianza atribuida a la estimación del efecto	A
Calidad moderada	Probable que una investigación mayor influya de manera importante en la confianza atribuida a la estimación del efecto y pueda modificarla	B
Calidad baja o muy baja	Es muy probable que una mayor investigación tenga una influencia importante en la confianza atribuida a la estimación del efecto y es probable que pueda modificarla. Toda estimación del efecto es incierta	C
Grado de la recomendación		
Fuerte	Los factores que influían en la fuerza de la recomendación fueron la calidad de evidencia, los resultados de presunta importancia para el paciente y el coste	1
Débil	Variabilidad en preferencias y valores o mayor incertidumbre: más probable que esté justificada una recomendación débil. La recomendación se hace con menor certidumbre, coste o consumo de recursos superior	2

Tabla 4: Grados de evidencia y recomendaciones (adaptado del sistema GRADE por la EASL)

La evaluación de la hepatopatía antes del tratamiento debe ser a largo plazo ya que los niveles de transaminasas en pacientes en fase de inmunotolerancia y en portadores inactivos pueden ser normales y en pacientes con HBeAg- fluctúan.

No solo debemos evaluar al paciente, también a familiares en primer grado y parejas sexuales a los que se les debe hacer estudio de marcadores serológicos y si son negativos, vacunar.

Para ver la gravedad de la hepatopatía habrá que estudiar ALT, AST, LDH, GGT, fosfatasa alcalina, bilirrubina, proteínas, hemograma, estudio de coagulación, α -fetoproteína, ecografía hepática, niveles de ADN-VHB por PCR a tiempo real, coinfección por VIH, VHC y/o VHD y estudio frente a VHA recomendándose vacunación si son seronegativos (A1). Los niveles de ALT suelen ser superiores a los de AST, aunque cuando progresa a cirrosis puede invertirse, disminuir niveles de albúmina, aumentar los de globulinas, prolongarse el tiempo de protrombina y disminuir las plaquetas. Los niveles de ADN-VHB en suero se expresarán en UI/mL según normativa de la Organización Mundial de la Salud (Saldanha J y col., 2001) (1UI/mL equivale a 5,6 copias/mL). También será necesario estudiar la hepatopatía alcohólica, esteatosis (A1).

Si es necesario realizar biopsia hepática para instaurar tratamiento habrá que tener en cuenta el riesgo de complicaciones graves (1/4.000-1/10.000). La biopsia ha de tener buen tamaño y así establecer el grado de fibrosis (Bedossa P y col., 2003) (A1).

El objetivo del tratamiento sería la erradicación completa del virus. Esto no es posible actualmente con los fármacos disponibles por la persistencia de ADNccc en el hepatocito que es el responsable de las reactivaciones (Raimondo G y col., 2008; Brechot C y col., 1981; Brechot C y col., 2001). Los objetivos reales del tratamiento son evitar la evolución a cirrosis, cirrosis descompensada, insuficiencia hepática terminal, hepatocarcinoma y muerte, mejorando la calidad de vida del paciente y disminuyendo la tasa de infectividad del mismo.

Está claro que la replicación viral es la clave del daño hepático y la progresión de la enfermedad por lo que la supresión viral es muy importante (Liaw YF y col., 2004). Clínicamente el objetivo a corto plazo es alcanzar una respuesta inicial con seroconversión HBeAg, y/o niveles de ADN-VHB indetectables, normalización de ALT, prevenir la descompensación hepática y tratar de que la respuesta sea mantenida. El objetivo a largo plazo es prevenir la descompensación hepática y evitar la progresión a cirrosis y/o hepatocarcinoma, el trasplante y aumentar la supervivencia.

Para lograrlo se tratará de impedir la replicación viral de forma sostenida en el tiempo (B1) y como consecuencia mejorarán los niveles de transaminasas, la progresión de la fibrosis y existirá menos riesgo de eventos clínicos por VHB.

En cualquier paciente (HBeAg- o HBeAg+) la pérdida de HBsAg con o sin seroconversión a HBsAc sin tratamiento, supone la remisión de la actividad de la hepatitis B crónica (A1).

La respuesta bioquímica y virológica sostenida en pacientes sin tratamiento HBeAg- (o seropositivos al comienzo y con seroconversión HBeAc persistente), también se asocia a buen pronóstico (B1).

Pacientes HBeAg- y HBeAg+ que no hacen seroconversión a HBeAc, en los que se consigue la remisión virológica sostenida (ADN-VHB indetectable por PCR) tras tratamiento antiviral, son otro criterio deseable (A1).

En el caso del tratamiento con antivirales orales, un objetivo es impedir la selección de mutantes resistentes y para ello el nivel de ADN-VHB debe ser indetectable a partir de la semana 24 de tratamiento. Los análogos inhiben la replicación viral en la hepatitis B crónica, pero su efecto sobre la pérdida de HBsAg es desconocido, aunque hay estudios con tenofovir y entecavir que sugieren que se tardarían décadas en lograr la pérdida de HBsAg. Es decir, el aclaramiento de HBsAg, que es un objetivo en el tratamiento de la hepatitis B crónica, seguirá siendo un acontecimiento extraordinario durante la terapia con análogos de nucleós(t)idos (Zoutendijk R y col., 2011).

Como ya se ha citado anteriormente, la hepatitis aguda no requiere tratamiento ya que suele evolucionar hacia la curación. Sin embargo, en casos de hepatitis graves puede intentarse el tratamiento aunque no exista evidencia, sobre todo si precisa trasplante, para evitar la infección del injerto (Known H y col., 2011; EASL, 2009).

20.1. Respuesta al tratamiento

Existen varios tipos de respuestas: bioquímica, histológica, serológica y virológica.

20.1.1. Respuesta bioquímica

La bioquímica es la normalización de los niveles de ALT haciendo seguimiento cada tres meses a lo largo de un año tras el tratamiento. A veces, a lo largo de ese año puede haber alguna elevación transitoria, en ese caso, se hará el seguimiento durante dos años.

20.1.2. Respuesta histológica

La respuesta histológica es la disminución de la actividad necroinflamatoria sin progresión de la fibrosis comparándola con la previa al tratamiento.

20.1.3. Respuesta serológica

La respuesta serológica es la seroconversión de HBeAg a HBe Ac en los pacientes HBeAg+ y la seroconversión de HBsAg a HBsAc en todos los pacientes.

20.1.4. Respuesta virológica

La respuesta virológica depende del tratamiento empleado. La respuesta completa es la respuesta virológica sostenida sin tratamiento con pérdida del HBsAg.

20.2. Fármacos antivirales

En la actualidad se dispone de 6 fármacos aprobados para el tratamiento de hepatitis B en Europa: interferón, análogos de nucleósidos (L-nucleósidos): lamivudina, emtricitabina, y telbivudina; D-ciclopentanos: entecavir y análogos de nucleótidos (alquilfosfanatos): adefovir y tenofovir. Se eliminan por riñón por lo que se debe controlar el aclaramiento de creatinina en todos los pacientes que inicien tratamiento con ellos. Los análogos de nucleótidos son más nefrotóxicos, especialmente adefovir.

20.2.1. Interferón

El IFN α fue el primer fármaco en usarse para tratar la hepatitis crónica por VHB. Actualmente se prescribe su forma pegilada (PEG-IFN α). La pegilación (monometoxi-polietilenglicol) reduce su aclaramiento renal aumentando la semivida, disminuyendo el número de administraciones y aumenta la tasa final de respuesta.

El interferón- α_{2a} induce la producción de proteínas inhibitorias de la replicación del virus. El interferón- α_{2b} también induce la producción de proteínas inhibitoras y aumenta la citotoxicidad de los macrófagos pero ha sido probado en pocos países (Zhao H y col., 2007).

El objetivo es normalizar la ALT y la seroconversión de HBeAg con la aparición de HBeAc al menos en dos determinaciones. En el caso de PEG-IFN esta respuesta puede aparecer hasta seis meses después de finalizado el tratamiento (Buti M y col., 2012). Un 4-6% de los pacientes logran la seroconversión de HBsAg a HBsAc (Lau GK y col., 2005). Tras su suspensión es frecuente la recidiva en HBeAg- (Wong DK y col., 1993; Lampertico P y col., 2003; Papatheodoridis GV y col., 2001).

Es eficaz sobre todo en pacientes con transaminasas elevadas, cargas bajas de DNA y HBeAg+ donde logra la seroconversión del HBeAg y la normalización de las transaminasas en un tercio de los casos tras 48 semanas de tratamiento (Lau G y col., 2005; Janssen H y col., 2005).

En pacientes HBeAg-, a las 12 semanas de tratamiento, si el nivel de HBsAg no desciende y la bajada de ADN-VHB es inferior a $2 \log_{10}$ UI/mL, se puede suspender el tratamiento porque la probabilidad de respuesta es muy baja (Rijckborst V y col., 2010).

Las ventajas de interferón son que no selecciona mutantes resistentes, se puede lograr una respuesta virológica sostenida tras el tratamiento con seroconversión a HBeAc y HBsAc y tiene una duración determinada.

Tiene múltiples efectos secundarios como aumentar la concentración de anticoagulantes, teofilina y zidovudina, interactuar con psicofármacos, puede provocar síntomas pseudogripales e infiltrados pulmonares, neutropenia, trombopenia y depresión. Está contraindicado en insuficiencia renal, hepática, cardíaca, alteraciones de médula ósea, hipertiroidismo no controlado, embarazo, enfermedad cerebral, epilepsia, hepatitis autoinmunes y en hepatitis con cirrosis avanzada y descompensada. Otro inconveniente es su forma de administración, vía subcutánea.

La respuesta primaria a interferón es una carga viral menor de 2.000 UI/mL determinada a los 6 meses, al finalizar el tratamiento y 6 y 12 meses tras tratamiento. Si se mantiene al menos 12 meses, se considera respuesta sostenida.

20.2.2. Thymosin α -1

Thymosin α -1 es un inmunomodulador, pero solo ha sido probado en algunos países asiáticos donde ha mostrado que a los seis meses de tratamiento en pacientes HBeAg+, se normaliza la ALT, se produce la pérdida de HBeAg y el ADN-VHB permanece indetectable a los 12 meses.

La respuesta es mayor (52%) en genotipo B que en el C (24 %) (Chien RN y col., 1998; Chien RN y col., 2006).

Aunque Thymosin α -1 tiene como ventajas la duración determinada del tratamiento y mínimos efectos secundarios, son necesarios estudios en gran escala para confirmar su eficacia.

20.2.3. Lamivudina

Lamivudina (3TC) se aprobó como tratamiento oral para la hepatitis B crónica en 1998. Se trata de un inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósidos, concretamente de la citosina. Mejora la inflamación, la fibrosis, disminuye la carga viral rápidamente y normaliza la ALT (Lai C y col., 1998).

Selecciona con facilidad mutantes resistentes: 15-20% al año de tratamiento, 80% a los 5 años (Lok AS y col., 2003). Estas mutantes provocan resistencia cruzada con otros antivirales orales. Por ejemplo la M204V/I reduce la eficacia del fármaco más de 1.000 veces por lo que no se puede compensar

umentando la dosis y suele acompañarse de otras mutaciones compensatorias que mejoran la replicación viral.

Está contraindicada la monoterapia con lamivudina y actualmente se considera un fármaco de segunda línea debido a la aparición de resistencias.

20.2.4. Emtricitabina

La emtricitabina (FTC) es un análogo de la citosina similar a 3TC, pero más potente. También selecciona mutantes resistentes con facilidad (Lim S y col., 2006), existe resistencia cruzada con lamivudina. No se usa en monoterapia. Se presenta coformulada con tenofovir para el tratamiento de VIH.

20.2.5. Adefovir dipivoxil

Adefovir dipivoxil (ADV) es un análogo de nucleótidos (adenina). Induce rápida caída de la viremia con una frecuencia de selección de mutantes del 30 % a los 5 años (Marcellin P y col., 2003; Hadziyannis S y col., 2005; Buti M y col., 2007), aunque un porcentaje de pacientes, en torno al 5-10%, no existe respuesta debido a uso de dosis bajas, polimorfismos virales o resistencia cruzada en pacientes que han recibido previamente lamivudina (Martín Carbonero L, 2012).

Posee una potencia menor que telbivudina, entecavir y tenofovir y una tasa de resistencias mayor que estos dos últimos.

Puede producir toxicidad renal (Chan HL y col., 2007; Leung N y col., 2009; Marcellin p 2008; Ha NB y col., 2009). Desde la aprobación de tenofovir, su uso ha disminuido.

20.2.6. Tenofovir

Tenofovir (TDF) es un análogo de nucleótidos (adenina) como adefovir, pero más potente y menos nefrotóxico. Hasta el momento no se han descrito mutaciones relacionadas con resistencia a TNF (Marcellin P y col., 2011) aunque se ha observado que la eficacia de tenofovir en monoterapia es subóptima en pacientes cargas virales elevadas por recaídas por resistencia a adefovir (Van Bommel F y col., 2010). Posee una alta barrera genética, definida como el número de mutaciones requeridas para producir una disminución significativa en la sensibilidad.

20.2.7. Entecavir

Entecavir (ETV) es un análogo de nucleósido (guanosina). Más potente que lamivudina o adefovir. El riesgo de desarrollo de resistencias es bajo, un 1,2 % a los 6 años en pacientes no tratados (Tenney DJ y col., 2009; Chang TT y col., 2010) ya que las mutaciones de resistencia a lamuvudina favorecen la

aparición de resistencias a entecavir, aunque deben acumularse varias para que la resistencia sea clínicamente significativa (Tenney D y col., 2004).

A largo plazo es capaz de revertir la fibrosis (Chang TT y col., 2010).

20.2.8. Telbivudina

Telbivudina (LdT) es un análogo de nucleósidos (timidina). Más potente que adefovir o lamivudina (Lai C y col., 2005). Aunque desarrolla menos resistencias que éstos, en pacientes con carga basal elevada sí las desarrolla. Tiene una baja barrera genética y no se recomienda su uso como fármaco de primera línea.

20.2.9. Clevudina

Clevudina es un análogo de nucleósido (pirimidina) con potente actividad antiviral frente a VHB, aunque su uso sólo se ha aprobado en Corea y Filipinas por producir miopatía (Flischer RD y col., 2009). A la semana 24 aparecen mutantes resistentes en 2.7% de los pacientes (Liaw YF y col., 2012).

20.2.10. LB80830

LB80830 es un análogo de nucleótido similar a adefovir y tenofovir, pero su desarrollo se encuentra en fase II (Liaw YF y col., 2012).

Cuando el tratamiento se realiza con análogos hay que tener en cuenta la potencia antiviral, la rapidez de acción, la seguridad, el desarrollo de resistencias y el coste. La potencia es un factor a tener en cuenta cuando se quiere conseguir una inhibición rápida de la replicación como en hepatitis aguda grave, enfermedad descompensada o cuando se va a iniciar un tratamiento inmunosupresor.

Las tasas de resistencias que generan los análogos son muy diferentes. Son altas para lamivudina, intermedias para telbivudina y bajas para el resto, especialmente para los de alta barrera genética como tenofovir o entecavir.

En cuanto al coste, lamivudina es el más barato, seguido de adefovir, entecavir y telbivudina. Los más caros son interferón pegilado y, sobre todo, tenofovir.

Para saber si ha habido respuesta o no, se mide la carga viral cada 3-6 meses. La falta de respuesta primaria con el tratamiento de los antivirales se produce cuando el nivel de ADN-VHB desciende menos de $1\log_{10}$ UI/mL a los 3 meses de tratamiento y la respuesta virológica se produce cuando los niveles de ADN-VHB son indetectables. La respuesta es parcial con análogos de baja barrera genética como lamivudina y telbivudina con ADN detectable a las 24 semanas de tratamiento y con los de alta barrera genética como adefovir, entecavir y tenofovir, con ADN detectable a partir del año. Se considera rebrote

virológico si tras determinaciones indetectables, se vuelve a detectar ADN o aumenta el nivel de ADN más de 1 log₁₀ UI/mL respecto al valor más bajo en los análogos de alta barrera genética. En estos casos hay que comprobar cumplimiento y resistencias (Buti M y col., 2012). El rebrote siempre precede a la recaída bioquímica (aumento de ALT). La suspensión del tratamiento con antivirales no es frecuente, pero si se suspenden, la respuesta sostenida sin tratamiento es cuando se detectan valores de ADN-VHB inferiores a 2000 UI/mL durante doce meses tras la interrupción del tratamiento.

El tratamiento óptimo de primera línea se consigue combinando tres criterios: niveles de ADN-VHB, ALT y grado de hepatopatía. El tratamiento es conveniente en aquellos pacientes con niveles de ADN-VHB superiores a 2.000 UI/mL, niveles elevados de ALT y necroinflamación activa moderada o grave y/o fibrosis moderada (A1), incluso si cumplen los criterios de niveles de ADN-VHB e histológicos puede iniciarse tratamiento aunque la ALT esté normal (A1).

Los antivirales tienen un efecto antiviral potente, buena tolerancia y administración oral. Sin embargo la duración del tratamiento no está definida, no se conoce su seguridad a largo plazo y seleccionan mutantes resistentes. En paciente HBeAg+ tras producirse la seroconversión HBeAc debe mantenerse un año más (Lee HW y col., 2010) y vigilar estrechamente las recaídas. La seroconversión se mantiene en 40-80% de los casos (Reijnders JG y col., 2010; van Nunen AB y col., 2003) (B1). El tratamiento a largo plazo se considera para pacientes HBeAg-, pacientes que no logran seroconversión HBeAc y pacientes con cirrosis (C1).

Por su alta barrera genética y su capacidad de reducir la viremia, pueden usarse en monoterapia como primera línea entecavir y tenofovir (A1). La duración del tratamiento con estos antivirales durante más de tres años logra la remisión virológica mantenida en la mayoría de pacientes (A1) (Chang TT y col., 2010; Marcellin P y col., 2011; Heathcote EJ y col., 2011). No hay datos sobre el beneficio de la terapia combinada con otros antivirales en pacientes no tratados previamente (C1) (Lok AS y col., 2011). En países con pocos recursos económicos, se tienen en cuenta terapias secuenciales, empezando con fármacos de primera línea como tenofovir o entecavir, pasando a lamivudina cuando se alcance la carga indetectable.

20.2.11. Tratamientos combinados

Se han probado combinaciones de interferón con lamivudina o telbivudina pero la respuesta sostenida no fue superior por lo que no se recomiendan (Lau GK y col., 2005; Janssen y col., 2005; Marcellin P y col., 2004; Marcellin P y col., 2010) (A1). Con otros antivirales la experiencia es limitada.

Los tratamientos combinados tienen las ventajas teóricas de una mayor actividad antiviral y una menor tasa de resistencias y las desventajas de un mayor coste, mayor toxicidad, interacciones farmacológicas y riesgo de desarrollar resistencias múltiples.

Se ha ensayado la combinación de PEG-IFN con análogos de nucleós(t)idos como lamivudina, adefovir, tenofovir y entecavir (Lau GK y col., 2005; Lutgehetman M y col., 2008; Fleischer RD y col., 2009) y de diferentes análogos como lamivudina con adefovir (Sung JJ y col., 2008), entecavir con tenofovir (Lok AS y col., 2011), entecavir con adefovir (Lim YS y col., 2012), tenofovir con emtricitabina (Santos SA y col., 2006; Fung S y col., 2014).

En estudios de interferón pegilado y lamivudina se observó que la respuesta era más intensa en el tratamiento combinado que en monoterapia, pero la respuesta sostenida al interrumpirlo era similar, aunque la tasa de resistencias a lamivudina fue inferior en el combinado (Janssen HL y col., 2005; Lau G y col., 2005; Chan HLY y col., 2005; Marcellin P y col., 2004). Resultados similares se observaron en estudios realizados combinando adefovir y lamivudina (Sung JJY y col., 2003).

En estudios combinando emtricitabina y adefovir la inhibición de la replicación fue mayor, pero posiblemente debido a la mayor potencia de emtricitabina, no a la combinación (Lau G y col., 2004). Combinando, lamivudina con telbivudina también la respuesta fue más intensa, pero debido a la mayor potencia de telbivudina. En este último estudio además la seroconversión de HBeAg fue inferior en la terapia combinada (Lai CL 2005). La eficacia de entecavir en monoterapia es similar a la de entecavir combinado con tenofovir en pacientes naïve HBeAg+. La terapia combinada sólo resulta beneficiosa en cargas elevadas (Lok AS y col., 2012).

La falta de efecto sinérgico entre los análogos probablemente es debida a que los dos fármacos usan la misma diana terapéutica, la polimerasa viral.

De estos estudios se deduce que la combinación de dos análogos no es más eficaz que el más potente de ellos en monoterapia, pero existe una menor aparición de mutantes resistentes.

Actualmente no se recomienda el uso de tratamientos combinados en pacientes no tratados previamente, a no ser que se trate de pacientes naïve en los que el tratamiento combinado está indicado como pacientes con enfermedad descompensada en los que es peligroso que desarrollen resistencias. En el resto hay que realizar estudios a largo plazo comparando fármacos potentes con alta barrera genética en monoterapia con tratamientos combinados. En el caso de haber aparecido alguna resistencia a análogos, el tratamiento combinado parece claramente indicado para evitar resistencias múltiples (Lok A y col., 2007).

20.3. Factores predictivos de respuesta

En la respuesta al tratamiento influirán factores del virus y del paciente. En los HBeAg+, se obtendrá mejor respuesta con cargas virales bajas, niveles altos de ALT en suero, genotipos A y B y actividad alta en biopsia hepática (B2) (Lau GK y col., 2005; Janssen HL y col., 2005, Perrillo RP y col., 1990; Wong DKH y col., 1993). En los HBeAg- no existen factores predictivos previos al tratamiento.

20.3.1. Factores predictivos de respuesta a interferón

Durante el tratamiento con interferón, los HBeAg+ en los que a las doce semanas haya disminuido el ADN-VHB a menos de 20.000 UI/mL, tienen una probabilidad del 50% de seroconversión (Fried MW y col., 2008). También se ha visto en los HBeAg+ que la reducción por debajo de 1500 UI/mL es un factor predictivo de seroconversión a HBeAc (C2) (Piravitsuth T y col., 2011). Los aumentos de ALT tras disminuciones de ADN-VHB se asocian a seroconversión (B2) (Flink HJ y col., 2005). También los niveles de HBeAg en la semana 24 pueden predecir la seroconversión (B2) (Fried MW y col., 2008). Los HBeAg- con cargas inferiores a 20.000 UI/mL en la semana 12 tienen un 50 % de posibilidad de respuesta mantenida sin tratamiento (Bonino T y col., 2007). En los HBeAg- europeos con genotipo D, la no disminución de HBsAg y la disminución inferior a 2 log₁₀ indican mala respuesta (B2) (Rijckborst y col., 2010; Rijckborst y col., 2012). El HBsAg como factor predictivo de respuesta necesita nuevos estudios.

20.3.2. Factores predictivos de respuesta a análogos

Los factores predictivos de respuesta al tratamiento con antivirales en HBeAg+ son carga viral baja, niveles altos de ALT en suero y alta actividad en biopsia hepática (A1) (Marcellin P y col., 2003; Marcellin P y col 2008; Liaw YF y col., 2009; Perrillo RP y col., 2002).

Los genotipos no influyen en el tratamiento antiviral con análogos (Wiegand J y col., 2008). Pacientes con niveles de ADN-VHB indetectables a las 24 semanas con lamivudina o telbivudina o a las 48 semanas con adefovir tanto en HBeAg+ como HBeAg- tienen más probabilidad de respuesta virológica sostenida y seroconversión a HBeAc (B1) (Liaw YF y col., 2009; Hadziyannis SJ y col., 2006; Yuen MF y col., 2001; Zeuzem S y col., 2009).

La disminución de HBsAg en HBeAg+ puede predecir posterior pérdida de HBeAg o HBsAg (C1) (Wurstthorn K y col., 2010; Lee JM y col., 2011; Marcellin P y col., 2011).

El fracaso terapéutico puede ser por falta de respuesta primaria, respuesta parcial virológica o recaída virológica.

En todos los casos hay que descartar mal cumplimiento del tratamiento por parte del paciente. En la falta de respuesta primaria es importante determinar el genotipo y posibles mutaciones de resistencia y cambiar el fármaco (B1).

La falta de respuesta primaria es más frecuente con adefovir que con otros análogos, en estos casos se recomienda cambiar a tenofovir o entecavir (B1).

En pacientes tratados con fármacos con barrera genética baja como lamivudina o telbivudina en los que a las 24 semanas sólo se ha obtenido una respuesta parcial, o tratados con adefovir con respuesta parcial a las 48 semanas se recomienda cambiar a fármacos de alta barrera genética como entecavir o tenofovir que no posean resistencias cruzadas (A1). El manejo de estos pacientes no está claro. Si a la semana 48 van bajando los niveles de ADN-VHB se puede mantener el tratamiento ya que el riesgo de desarrollo de resistencias es bajo (B1) (Zoutendijk R y col. 2011). Algunos expertos recomiendan asociar un fármaco, sobre todo si no disminuye el nivel de ADN-VHB (C2).

20.4. Recaída virológica

La recaída virológica está relacionada con el desarrollo de resistencias. La aparición de resistencias comienza con la selección de mutantes en el gen de la polimerasa. Esto hace que aumente la carga viral y que semanas después asciendan los niveles de ALT con la progresión de la enfermedad.

La aparición de resistencias depende de las características del fármaco y de la duración del tratamiento. El riesgo es mayor si los niveles iniciales de ADN-VHB son elevados, si la disminución de la carga viral es lenta y si ha habido tratamientos previos con antivirales. Las mutantes deben detectarse cuanto antes, a ser posible cuando aumenta la carga viral (B1), antes de elevarse la ALT e iniciar así el tratamiento de rescate con un fármaco que no tenga resistencias cruzadas para evitar cepas multirresistentes (A1) (Tabla 5), en este sentido deben evitarse los de barrera genética baja (C1).

En el caso de resistencia a lamivudina o telbivudina se aconseja el cambio a tenofovir o tenofovir combinado con emtricitabina ya que es igual de efectivo tenofovir solo que combinado con lamivudina (Van Bommel F y col., 2010) o añadir adefovir si no se dispone de tenofovir (B1).

Si aparece resistencia a adefovir se aconseja entecavir en monoterapia o tenofovir (B1). Si la viremia es elevada es preferible entecavir (C2). Si previamente ha sido tratado con lamivudina y presenta determinadas mutaciones de resistencia, se añadirá un análogo de nucleósido o se cambia a tenofovir en monoterapia (C1), peor no se debe usar entecavir.

Si existe resistencia a entecavir se cambia a tenofovir o se añade (C1). No se han descrito resistencias a tenofovir.

En el caso de tenofovir en monoterapia, se han observado casos de menor eficacia en pacientes con altos niveles de carga viral y resistencia a adefovir. Si se describe alguna resistencia, lo lógico es añadir un análogo de nucleósido (C2) o entecavir. Si no ha sido tratado previamente con lamivudina, cambiar a entecavir (C2).

	Nivel de susceptibilidad				
	3TC	LdT	ETV	ADV	TDF
Wild-Type	S	S	S	S	S
M204V	R	S	I	I	S
M204I	R	R	I	I	S
L180M+M204V	R	R	I	I	S
A181T/V	I	S	S	R	S
N236T	S	S	S	R	I
L180M+M204V/I+/-I169T+/-V173L+/-M250V	R	R	R	S	S
L180M+M204V/I+/-T184G+/-S202I/G	R	R	R	S	S

Tabla 5: Resistencia cruzada para las variantes de VHB más frecuentes

20.5. Monitorización del tratamiento

20.5.1. Monitorización del tratamiento con interferón

En la monitorización durante el tratamiento con interferón en pacientes HBeAg+, se hará control serológico y determinación de carga viral a los 6 y 12 meses y, tras finalizar el tratamiento, a los 6 y 12 meses. El objetivo será que la carga sea inferior a 2000 IU/mL, seroconversión HBeAc sostenida y normalización de ALT. Posteriormente se vigilará a largo plazo una posible seroinversión o progresión a hepatitis crónica HBeAg- en los tratados con PEG-IFN (A1) (Buster EH y col., 2008; Wong VW y col., 2010). Si el ADN-VHB es indetectable tras la seroconversión HBeAc, hay que controlar el HBsAg anualmente, ya que se puede producir la seroconversión con pérdida de HBsAg y aparición de HBsAc.

Cuanto más rápidamente caiga la viremia y el HBsAg, más posibilidad de respuesta (Moucari R y col., 2009). Si a los tres meses no se ha conseguido disminuir estas cifras, la probabilidad de seroconversión HBeAg es baja y se puede valorar dejar el tratamiento (C2) (Piratvisuth T y col., 2011; Gane E y col., 2011; Sonneveld MJ y col., 2010).

En HBeAg- tratados con interferón, el control se hace a los 6 y 12 meses de iniciado el tratamiento y 6 y 12 meses tras finalizarlo. Con un ADN-VHB < 2000 UI/mL sostenido sin tratamiento existe probabilidad de pérdida de HBsAg a largo plazo. El objetivo sin embargo, sería alcanzar niveles de ADN-VHB indetectables de manera sostenida tras dejar el tratamiento y así la probabilidad de pérdida de HBsAg aumentaría comprobando éste último cada 12 meses (B1). En estos pacientes se debe controlar la aparición de HBsAc y posibles reactivaciones que serán menos probables según pase el tiempo (A1) (Manesis EK y col., 2001). Si a los tres meses, no han disminuido los niveles $\geq 2 \log_{10}$ ni disminuye el HBsAg, la posibilidad de respuesta será baja y se puede plantear la posibilidad de interrumpir tratamiento (B2) (Rijckborst V y col., 2010; Rijckborst V y col., 2010).

20.5.2. Monitorización del tratamiento con antivirales

En pacientes tratados con antivirales y HBeAg+ el objetivo es seroconversión mantenida a HBeAc sin tratamiento, ADN-VHB < 2000 UI/mL, niveles de ALT normales y eliminación de HBsAg con controles cada seis meses (A1). Si se consiguen niveles indetectables de ADN-VHB, se producirá la seroconversión HBeAc pudiendo interrumpirse el tratamiento a los 12 meses de obtenida la seroconversión (B1). El tratamiento con análogos puede continuar hasta alcanzar la negativización del HBsAg sobre todo en enfermedad avanzada (C1) aunque no ocurre frecuentemente. Con cargas indetectables de ADN-VHB (menos de 10-15 UI/mL) se evitan resistencias.

20.6. Tratamiento en cirrosis

En cirrosis compensada puede usarse interferón pegilado en la misma pauta que para hepatitis crónica o monoterapia con tenofovir o entecavir (A1), vigilando las exacerbaciones, la aparición de resistencias y la posible evolución a hepatocarcinoma. Así se puede estabilizar al paciente e incluso lograr la regresión de la fibrosis. El tratamiento podría suspenderse a los doce meses de lograr la seroconversión HBeAg o tras la pérdida de HBsAg y seroconversión HBsAg.

En cirrosis descompensada se pueden emplear análogos como entecavir o tenofovir (A1), no interferón, y si se logra una mejoría clínica, mantener el tratamiento y así evitar el trasplante, vigilando la posibilidad de aparición de hepatocarcinoma que en estos pacientes es elevada.

El trasplante hepático es la opción terapéutica en caso de insuficiencia hepática aguda, cirrosis descompensada o hepatocarcinoma. Al principio, la tasa de recidiva era muy elevada. Al principio de

los 90 empezó a administrarse de forma profiláctica γ globulina hiperinmune anti-VHB a dosis elevadas por vía intravenosa y la recidiva bajó a un 30 % (Samuel D y col., 1993). Posteriormente empezó a tratarse en los momentos previos al trasplante con una combinación de lamivudina y γ globulina hiperinmune anti-VHB y la tasa de recidiva bajó al 10 % con lo que aumentó la supervivencia (Steinmüller T y col., 2002).

El riesgo de recidiva tras el trasplante está en relación con los niveles de ADN-VHB en el momento de su realización. En un estudio realizado en 177 pacientes que recibieron γ globulina hiperinmune y/o lamivudina se vio que no existían recidivas si en el momento del trasplante la carga era indetectable, si las cargas eran de 200-10⁵ copias/mL las recidivas eran del 7,5% y del 50% en los que la viremia era superior a 10⁵ copias/mL (Marzano A y col., 2005) por lo que es necesario conseguir una carga de ADN-VHB lo más baja posible en el momento del trasplante y utilizar un análogo potente de alta barrera genética para reducir el riesgo de recurrencia en el órgano trasplantado y evitar la aparición de resistencias (A1).

20.7. Tratamiento en coinfecciones

Los pacientes VIH coinfectados con VHB tenían más riesgo de cirrosis y hepatocarcinoma hasta la aparición del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA). Las indicaciones de tratamiento son las mismas que en los pacientes VIH negativos. Se deben tratar simultáneamente el VIH y el VHB *de novo* con tenofovir combinado con emtricitabina o lamivudina más un tercer antirretroviral (A1) (Rockstroh JK y col., 2008; de Vries-Sluijs TE y col., 2010), es decir debido a que se generan más frecuentemente resistencias, la estrategia habitual debe ser un régimen triple frente al VIH que contenga dos fármacos activos frente al VHB.

En pacientes con un recuento CD4 >500/mL puede tratarse primero la hepatitis B pero sin usar lamivudina, entecavir o tenofovir en monoterapia ya que pueden desarrollar resistencia frente al VIH (A1). Al monitorizar la respuesta, hay que tener en cuenta que en estos pacientes la respuesta puede ser más lenta y seguir detectándose ADN-VHB en el sexto mes, pero si los niveles van disminuyendo, hay que asumir que el tratamiento es eficaz.

Los análogos no sirven para la hepatitis por coinfección VHB-VHD, sólo se podría tratar con interferón pegilado (Farci P, 2006) (A1). La duración del tratamiento no está bien definida, se mide el ARN-VHD a los tres y seis meses, aunque no están estandarizados (C2) y puede prolongarse hasta más de un año (C2). Un 25-40% de los pacientes logra una respuesta virológica sostenida (Yurdayin C y col., 2010; Hughes SA y col., 2011; Wedemeyer h y col., 2011).

En la coinfección con VHC aumenta la progresión de la enfermedad y el riesgo de desarrollar un hepatocarcinoma. Los niveles de VHB suelen ser bajos y la enfermedad suele ser debida al VHC que es

el que hay que tratar (B1) y vigilar las posibles reactivaciones del VHB que deberán ser tratadas con análogos (B1). Como citamos anteriormente, se han descrito casos en los que tras erradicar el VHC, aumentó la carga viral de VHB y más recientemente con los nuevos tratamientos como sofosbuvir y simeprevir (Collins JM y col., 2015).

20.8. Tratamiento en niños

En la mayoría de los niños la hepatitis crónica se encuentra en fase de inmunotolerancia por lo que el tratamiento suele ser conservador (Iorio R y col., 2007) (A1).

Se han evaluado interferón convencional, lamivudina y adefovir con resultado similares a los de los adultos (Jonas MM y col., 2002; Jonas MM y col., 2008). La terapia con interferón no proporciona mayor beneficio que no tratar y la terapia con antivirales no se recomienda por la pérdida de beneficios a largo plazo y riesgos concomitantes, a menos que exista una indicación absoluta como descompensación hepática, fibrosis o cirrosis avanzada.

20.9 Tratamiento en el embarazo

En el embarazo el interferón pegilado está contraindicado. Tenofovir y emtricitabina están clasificados como categoría B y entecavir, lamivudina y adefovir, categoría C (Giles M y col., 2011). Se prefiere tenofovir por su alta barrera genética y la seguridad en embarazo (B1) (Bzowej NH, 2010).

La transmisión vertical se produce en el momento del parto, y para evitarla se combina la vacunación con la inmunización pasiva en el recién nacido. Sin embargo en mujeres con carga viral elevada, superior a 10^{6-7} , que suelen ser HBeAg+, el riesgo de transmisión aumenta >10% y se les debe informar del uso de un análogo en el tercer trimestre para reducir la carga en el momento del parto (B1) (del CR y col., 1997; Xu WM y col., 2009; Han Gr y col., 2011). Puede usarse lamivudina, telbivudina o tenofovir. Si el tratamiento se ha instaurado para evitar la transmisión vertical, puede suspenderse en los tres meses siguientes al parto. Existe riesgo de exacerbaciones tras un parto (B1) por lo que la paciente no tratada o que haya interrumpido el tratamiento debe ser controlada (Rawal BK y col., 1991; Borg MJ y col., 2008).

No se conoce la seguridad del tratamiento durante la lactancia. El HBsAg se detecta en leche materna, así como el tenofovir aunque por su biodisponibilidad los lactantes sólo están expuestos a dosis bajas.

20.9. Tratamiento para prevenir reactivaciones en inmunodeprimidos

En pacientes que vayan a recibir tratamiento inmunosupresor o quimioterapia, es importante realizar un estudio serológico previo (A1). Si son seronegativos se recomienda la vacunación (A1).

En HBsAg+ tratados con inmunosupresores, especialmente con rituximab en monoterapia o combinado con corticoides, el riesgo de reactivación es alto. Durante las terapias y en los doce meses posteriores se debe administrar tratamiento profiláctico, independientemente del nivel de ADN-VHB (A1). En general se recomienda lamivudina para tratamientos inmunosupresores cortos y niveles bajos de ADN-VHB (B1) (Loomba R y col., 2008) y entecavir o tenofovir para tratamientos inmunosupresores largos y/o alta carga viral (C1).

En pacientes HBsAg- y HBcAc+, se debe determinar la carga viral y poner tratamiento cuando se positiviza el ADN-VHB antes de elevarse la ALT (C1), aunque también se recomienda la profilaxis si el tratamiento se va a hacer con rituximab o en tratamientos de enfermedades hematológicas malignas, trasplante de médula ósea o células madre (Lalazar G y col., 2007; Marzano A y col., 2007).

En trasplantes hepáticos se administrará de forma profiláctica e indefinidamente lamivudina en receptores HBsAg- con donante HBcAc+ (B1) (Cholongitas E y col., 2010).

En pacientes con enfermedad renal terminal es frecuente el VHB. Se debe realizar estudio serológico y si son seronegativos, vacunar. Como tratamiento se puede usar interferón pegilado o un análogo, pero controlando la función renal y ajustando las dosis (A1). El interferón debe evitarse en trasplantados para evitar el rechazo.

20.10. Tratamiento de las manifestaciones extrahepáticas

Cada vez son menos frecuentes las manifestaciones extrahepáticas de la hepatitis B. Hay que tener en cuenta que el uso de interferón puede agravar aquellas cuyo mecanismo es inmunitario. La plasmaféresis y los corticoides pueden ser útiles al principio en determinados casos (C2).

Tanto la EASL como la APASL en sus guías señalan una serie de cuestiones que requieren ser estudiadas como mejorar el conocimiento en pacientes HBeAg+ inmunotolerantes y HBeAg- con ADN-VHB < 20.000 UI/mL; estudiar la influencia de los niveles de HBsAg en la evolución y las respuestas al tratamiento; conocer mejor los marcadores séricos y biofísicos para evaluar la gravedad y el seguimiento, marcadores genéticos del hospedador y el virus y marcadores que permitan interrumpir con éxito el tratamiento; establecer diagnósticos precoces y tratamientos adecuados evaluando la seguridad a largo plazo de los tratamientos, la aparición de resistencias y tratamientos combinados de interferón y análogos; desarrollar nuevos fármacos, en especial para el VHD y profilaxis que eviten la inmunoglobulina en el trasplante hepático y evitar repercusiones a largo plazo en el tratamiento de cirrosis, complicaciones y hepatocarcinoma.

21. MUTANTES DE RESISTENCIA

Durante el tratamiento, la presencia de DNA-VHB indica mala adherencia o aparición de mutaciones en el gen de la polimerasa que pueden conferir resistencia a un fármaco, a una familia de fármacos e incluso resistencia cruzada entre los diferentes antivirales.

Las mutaciones aparecen principalmente en el *motif* tirosina-metionina-aspartato-aspartato (YMDD) del dominio C de la ADNpolimerasa dependiente del ARN.

La incidencia de aparición varía según la carga viral previa al tratamiento, la rapidez de la supresión de la replicación viral por el fármaco, el tiempo de la exposición al mismo y exposición previa a otros antivirales (Fung S y col., 2006). Si el antiviral logra suprimir la replicación viral, el riesgo de seleccionar mutantes es mínimo, mientras que un fármaco que no logre suprimir la replicación viral, puede ejercer la presión selectiva suficiente para seleccionar mutantes.

Una vez que se seleccionan mutantes en el gen de la polimerasa, la carga viral es baja ya que las mutantes tienen menos capacidad de replicación que la cepa silvestre. Posteriormente aparecerán mutaciones compensatorias que hacen que se recupere la capacidad de replicación de estas cepas y aumente la carga viral (Lok A y col 2007). Semanas después se exacerbará la bioquímica hepática elevándose la ALT (*flares*) y se producirá una progresión de la enfermedad. Por lo tanto el estudio de esas mutaciones será clave para el manejo del tratamiento de los pacientes.

Debido al alto grado de replicación del VHB, 10^{12} viriones al día y a una tasa de error de 10^{-5} sustituciones/base/ciclo, se producen 10^{10-11} mutaciones puntuales diarias en individuos con replicación activa ya que la transcriptasa reversa del VHB no tiene capacidad de corregir errores y reparar los nucleótidos incorporados erróneamente (Nowak M 1996).

El genoma tiene 3.200 pares de bases que pueden cambiar, de manera que el VHB es una mezcla de virus (cuasiespecies) que evolucionan en el tiempo y que pueden presentar mutaciones. Sin embargo, el contagio de VHB resistente procedente de un paciente tratado frente a VHB es poco frecuente, por lo que el estudio genotípico de mutaciones que confieren resistencia al tratamiento frente a VHB en pacientes *naïve* no se recomienda, aunque son necesarios estudios de vigilancia para evaluar los cambios de las resistencias primarias en distintas áreas geográficas (Álvarez M y col., 2013).

En la hepatitis crónica, el ADNccc actúa como un reservorio ya que la terapia con antivirales no puede impedir su formación de forma que la persistencia de viremia durante la terapia hace que se infecten

nuevas células y que las mutaciones seleccionadas queden en el ADNccc de manera que pueden ser seleccionadas rápidamente en el caso de emplear antivirales con resistencia cruzada (Zoulim F, 2005). Por otra parte, los hepatocitos infectados tienen una vida media de 30-100 días, lo que contribuye a la persistencia del VHB en el hígado.

La presión del tratamiento con antivirales hará que se seleccionen mutantes específicas o se seleccionen mutantes preexistentes con mayor capacidad de replicación que acabarán convirtiéndose en las variantes mayoritarias.

La resistencia puede ser fenotípica o genotípica. El estudio de la resistencia fenotípica es complejo y se realiza en cultivos virales *in vitro*, en los que se observa una pérdida de la inhibición de la replicación viral. *In vivo* se produciría un aumento de la carga viral de al menos 1 logaritmo comparado con el valor *nadir*. Para el estudio de resistencias desde el punto de vista genotípico se utiliza la secuenciación de amplificadores de la RT y técnicas de hibridación inversa sobre tiras de nitrocelulosa (InnoLIPA).

La polimerasa tiene cuatro dominios funcionales: la región “priming” o cebadora, la región espaciadora, una región catalítica con función ARN/ ADN polimerasa ARN-dependiente y una región carboxiterminal con actividad H ribonucleasa. Su forma es similar a la mano derecha con palma pulgar y dedos. Tiene siete dominios: A-G. El motivo YMDD está en el dominio C que está situado en el centro de la molécula, en la “palma” (Figura 12). Al menos 8 codones de la polimerasa están asociados con resistencia primaria.

Ya habíamos visto como las mutaciones YVDD (rtM204V) y YIDD (rtM204I) conducían a resistencia y defectos en la replicación viral y como cuatro vías de resistencia mayor habían sido identificadas (Locarnini S y col., 2008):

- Vía de los L-nucleósidos que se caracteriza por la mutación rtM204V/I y confiere resistencia a lamivudina y telbivudina.
- Vía de los fosfonatos acíclicos que se identifica por la mutación rtN236T y confiere resistencia a adefovir y sensibilidad reducida a tenofovir.
- Vía compartida por L-nucleósidos y adefovir con la mutación rtA181T/V.
- Vía D-ciclopentanos que se caracteriza por la presencia de las mutaciones rtL180M y rtM204V/I más al menos una sustitución en uno de los aminoácidos de rt I169, rtT184, rt S202 I/G y rtM250 y confiere resistencia a entecavir.



Figura 13. Estructura de la polimerasa del VHB. Tomado de Sheldon J y col., *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008

21.1. Mutaciones relacionadas con resistencia a lamivudina

La lamivudina se aprobó como tratamiento oral para la hepatitis B crónica en 1998. Reduce rápidamente la carga viral y presenta buena tolerancia, pero es la que tiene peor perfil de resistencia ya que tiene un rango de resistencia anual de 15-25 % y más del 80% a los 5 años de tratamiento (Lai CL y col., 2003).

Las mutaciones reducen la eficacia del fármaco más de 1.000 veces, por lo que no se puede compensar aumentando la dosis. Aparecen en la región de YMDD de la RT en las posiciones 204 (rtM204V/I) y en la 180 (rtL180M).

La rtM204I confiere resistencia por sí sola y la rtM204V suele acompañarse de la rtL180M, mutación que tiene lugar en el subdominio B de la RT y aumenta la actividad enzimática hacia el sustrato natural y así compensa la pérdida de viabilidad del virus haciendo que se recupere el *fitness* (Allen M y col., 1998; Sheldon J y col., 2006).

Otras mutaciones compensatorias que aparecen en pacientes tratados con lamivudina son rtL80V/I (dominio A), que mejora la capacidad de replicación, rtI169T, rtV173L, rtT184S/G, rtS202I y rtQ215S (Bartholomeusz A y col., 2006). Las mutaciones compensatorias son capaces de restaurar la replicación viral a niveles próximos al de la cepa silvestre.

Las variantes YMDD también se encuentran en pacientes *naïve* (Brechot C y col., 2001). Además, las mutaciones espontáneas en YMDD son más frecuentes en pacientes con genotipo C y carcinoma hepatocelular, lo que parece relacionado con la mayor progresión a carcinoma del genotipo C comparado

con el B (Yang J y col., 2014). Recientemente se ha realizado un estudio en China que demuestra que las mutaciones ocurren frecuentemente en pacientes *naïve*, con un 5,73%, siendo más prevalente la rtM204V/I con un 4.89%. También se observó que eran ligeramente más frecuentes en el genotipo C, en hombres y HBeAg- (Zhang Q y col., 2015).

21.2. Mutaciones relacionadas con resistencia a telbivudina

En el tratamiento con telbivudina, la mutación M204V/I también se selecciona aunque con menor prevalencia ya que la tasa puede llegar al 3.6 % el primer año y 14.8 % para el segundo (Álvarez Estévez M y col., 2013). La mutación A181T/V también asocia resistencia a telbivudina.

21.3. Mutaciones relacionadas con resistencia a adefovir

En el caso de adefovir, la tasa de selección de resistencias es baja con una tasa del 3% a los 2 años y del 29% a los cinco años (Hadziyannis S y col., 2005). Pueden ser más elevadas en pacientes con mutaciones preexistentes asociadas a análogos (Marcellin P y col., 2008).

Las mutaciones que confieren resistencia a adefovir son rtN236T en el dominio D y rtA181V en el dominio B, pertenecientes a la vía de los fosfonatos acíclicos. La rtN236T confiere un grado de resistencia mayor que la rtA181V.

Por otra parte, el grado de resistencia a adefovir es más bajo que a lamivudina por tener menor potencia intrínseca, por lo que con grados más bajos de susceptibilidad se anula su actividad.

Existen otras mutaciones secundarias relacionadas con fracaso terapéutico de adefovir como rtV84M, rtS85A en el dominio A, rt181T/V en el dominio B, rtQ215S en el interdominio C-D y rtl233V, rtP237H y rt238T/D que pueden aparecer sin la rtN236T en pacientes que no responden a adefovir (Bartholomeusz A y col., 2006; Schildgen O y col., 2006).

En el caso de los pacientes *naïve* en Europa, un 25% no responde al tratamiento con adefovir, esto puede ser debido a la necesidad de tratar con dosis inferiores por la nefrotoxicidad, polimorfismo en el codón l233V de la RT, mutación rtA181T/S seleccionada por lamivudina que crea resistencia cruzada con adefovir o rtL217R presente de forma natural en el genotipo A2, variante del genotipo A que es el más frecuente en Europa (Schildgen O y col., 2006; Thio C y col., 2007; Schildgen O y col., 2004; Chang T y col., 2006; Chueca N y col., 2007).

21.4. Mutaciones relacionadas con resistencia a entecavir

Con entecavir las tasas de resistencia son de 1,2 % tras cinco años de tratamiento (Chang TT y col., 2010), siempre que no existan mutaciones previas que confieran resistencia a lamivudina ya que si las hay, la tasa sube hasta el 19 % tras tres años de tratamiento (Tenney D y col., 2007) y el 57% a los seis años (Tenney DJ y col., 2009).

Entecavir posee una alta barrera genética y su resistencia se asocia a distintas mutaciones en el gen de la polimerasa: rtI169T, rtL180M y/o rtS184G en el dominio B, rtS202I y rtM204V/I en el dominio C y rtM250V en el dominio E.

La rtM250V incrementa la concentración inhibitoria (CI_{50}) en 10 veces mientras que rtI169T, rtT184G y rtS202I tienen poco efecto en la CI_{50} .

La resistencia a entecavir es infrecuente, aparece tras una exposición prolongada y siempre junto a mutaciones de resistencia a lamivudina: rtL180M+rtM204V/I y rtT184G/S o rtS202I/G o rtM250V (Tenney D y col., 2004; Zoulim F y col., 2009).

En estudios *in vitro* se observó que en las cepas que presentaban mutaciones que producían resistencia a lamivudina, para que entecavir fuera efectivo, se necesitaba una concentración mayor, por lo que parece haber cierta resistencia cruzada. Sin embargo, si estaban presentes rtI169T y rtM250V o rtT184G y rtS202I, las cepas se volvían completamente resistentes a entecavir *in vitro* (Zoulim F, 2006).

21.5. Mutaciones relacionadas con resistencia a tenofovir

El tenofovir es el fármaco con barrera genética más elevada y hay trabajos que muestran que el fracaso virológico y la aparición de resistencias son excepcionales (Kitrinos Km y col., 2014).

En un estudio multicéntrico europeo con 45 pacientes coinfectados por VIH y VHB tratados con tenofovir en combinación con otros antirretrovirales, dos pacientes presentaron la mutación rtA194T junto a otras mutaciones asociadas a resistencia a lamivudina (L180M+M204V) en las semanas 63 y 78 (Sheldon J y col., 2005).

La rtA194T está asociada a resistencia parcial a tenofovir y disminución de la replicación *in vitro* (Amini-Bavil-Olyae S y col., 2009).

Las mutaciones primarias rtN236T y rtA181T/V eran inducidas por adefovir y tenofovir y conferían resistencia a adefovir. La primera no afecta a lamivudina, telbivudina o entecavir, pero disminuye la eficacia *in vitro* a tenofovir y la segunda reduce la sensibilidad a tenofovir y confiere resistencia parcial a lamivudina y telbivudina (Villet S y col., 2008). Debido a esto, en pacientes con estas mutaciones en los que fracasó adefovir, cuando se emplea tenofovir como terapia de rescate, la eficacia antiviral se ve

reducida. Otras mutaciones que han mostrado conferir disminución de la sensibilidad *in vitro* e *in vivo* a tenofovir son rtP177G y rtF249A (Qin B y col., 2013).

21.6. Mutaciones ADASM (antiviral-drug-associated S gene mutations)

La mutación rt181T/V además codifica un codón de parada en el aminoácido 172 en una zona de solapamiento con la región S (sW172*) con un cambio de marco de lectura que conducirá a una secreción defectiva de la proteína S. También está asociada a cirrosis y hepatocarcinoma. (Lai MW y col., 2008; Lee SA y col., 2012). Es decir, debido al solapamiento en ORF de los genes *P/S*, las mutantes seleccionadas por análogos pueden producir cambios en el HBsAg y alterar la antigenicidad y al revés, mutaciones en el gen S seleccionadas tras la vacunación o el tratamiento con inmunoglobulinas pueden afectar al gen de la polimerasa originando mutaciones de resistencia primarias o compensatorias en el gen *P* (Torresi J y col., 2002). Estas mutaciones se denominan ADASM (antiviral-drug-associated S gene mutations) (Kamili S y col., 2009).

La asociación de mutaciones V173L+L180M+M204V en el gen de la polimerasa, asocia las mutaciones E164D+I195M en el gen S que hacen disminuir la capacidad de unión HBsAg-HBsAc de igual forma que las mutantes de escape sG145R seleccionadas tras la vacunación frente a VHB (Matthewus Gv y col., 2006; Torresi J, 2002; Villet S y col., 2006).

Las mutaciones relacionadas con resistencia a lamivudina M204I o V207I pueden generar las mutaciones de stop W196S/L que reducen la producción de HBsAg (Sheldon J y col. 2006). Debido a esto, algunos pacientes tratados con lamivudina o adefovir aclaran aparentemente el HBsAg pero siguen con niveles detectables de ADN-VHB.

21.7. Mutaciones PBC y *precore* y relación con resistencias

Por otra parte, las mutaciones en PBC y en *precore* aumentan la eficacia de la replicación viral en mutantes resistentes a lamivudina. Se demostró que la introducción de mutaciones *precore* en la cepa silvestre no afectaba a la replicación o a la sensibilidad a lamivudina, pero la combinación de mutaciones *precore* con mutaciones de resistencia a lamivudina restaura la replicación a nivel de cepas silvestres. Las mutantes PBC también aumentan la replicación viral y la liberación de virones en cepas resistentes a lamivudina (Tacke F y col., 2004).

A modo de resumen, en la tabla 6 aparecen las mutaciones que pueden aparecer y su significado clínico.

LOCALIZACIÓN	AMINOACIDO O SUSTITUCIÓN DE NUCLEOTIDO (mutación de gen solapado asociada)	IMPACTO CLÍNICO
P (RT-A)	rtI169T (sF161L)	Resistencia a entecavir
P (RT-B)	rtL180M (sE164D)	Resistencia a entecavir
P (RT-B)	rtA181T/V	Resistencia a lamivudina, telbivudina adefovir, tenofovir
P (RT-B)	rtT184S/A/I/L/G/C/M	Resistencia a entecavir
P (RT-C)	rtS202C/G/I	Resistencia a entecavir
P (RT-C)	rtM204V/I	Resistencia a lamivudina
P (RT-C)	vrtM204I (sW196S)	Resistencia a telbivudina
P (RT-C)	rtM204V (sI195M)	Resistencia a entecavir
P (RT-D)	rtN236T	Resistencia a adefovir/tenofovir
P (RT-E)	rtM205I/V	Resistencia a entecavir
P (RT-A)	rtL80V/I	Baja respuesta a adefovir con variantes previas resistentes a lamivudina
P (RT-B)	rtF166L (sF158Y)	Compensatoria asociada a lamivudina
P (RT-B)	rtV173L(sE164D)	Compensatoria asociada a lamivudina (aumento de replicación)
P (RT-B)	rtA194T	Resistencia a tenofovir

LOCALIZACIÓN	AMINOACIDO O SUSTITUCIÓN DE NUCLEOTIDO (mutación de gen solapado asociada)	IMPACTO CLÍNICO
S-determinante "a"	sG145R(rtW153Q)	Mutante de escape asociada a anticuerpos, reducción nivel de HBsAg y restablecimiento de replicación de VHB resistente a lamivudina
S-determinante "a"	sD144E/G145R (rtG153E)	Mutante de escape asociada a anticuerpos
S-determinante "a"	sP120T (rtT128N)	Reducción nivel de HbsAg
EnhII	C1653T	Hepatocarcinoma (genotipo C)
PBC	T1753V	Hepatocarcinoma (genotipoB)
PBC	A1762T/G1764A	Reducción producción de HBeAg; seroconversión HBeAg; inmunidad escape HBeAc
Pre-C	G1896A	Seroconversión HBeAg; inmunidad escape HBeAc, curso enfermedad más severo; hepatocarcinoma
S	W172* (rtA181T)	Cirrosis; hepatocarcinoma
Pre-S1/Pre-S2	Delección Pre-S1/Pre-S2 (codón de iniciación Pre-S2y/o deleciones en el extremo 5'-terminal de la región pre-S2 y extremo 3'-terminal de pre-S1)	Enfermedad progresiva del hígado; hepatocarcinoma, (genotipo C)
Pre-S	Mutación en promotor Pre-S1 y promotor Pre-S2	Hepatocarcinoma
X	K130M+V311L (doble)	Hepatocarcinoma

LOCALIZACIÓN	AMINOACIDO O SUSTITUCIÓN DE NUCLEOTIDO (mutación de gen solapado asociada)	IMPACTO CLÍNICO
X	V5M/L+K130M+V131I (triple)	Hepatocarcinoma

Tabla 6: Variantes del virus de la hepatitis B relevantes clínicamente (Gao S y col., 2015)

Conocer la prevalencia de mutaciones en el gen de la polimerasa relacionadas con resistencias a los distintos fármacos antivirales en pacientes con HBC tratados con interferón α -2a pegilado, análogos de nucleótidos y nucleósidos en nuestro medio.

Estudiar la evolución de las mutantes relacionadas con el gen de la polimerasa y su relación con los distintos tratamientos

Conocer la prevalencia de genotipos de VHB en pacientes infectados por virus resistentes a antivíricos.

Conocer la prevalencia de mutantes precore/core de VHB en pacientes infectados por virus resistentes a antivíricos.

Estudiar evolución de las mutaciones en precore/core.

Estudiar la prevalencia de seroconversiones HBeAg y su relación con los tratamientos.

Estudiar la prevalencia de seroconverisones HBsAg y su relación con los tratamientos.

-Sujetos de estudio: 51 pacientes con HBC conocida procedentes del área de Salamanca que acudieron a los servicios de Digestivo y Enfermedades Infecciosas del Hospital Clínico de Salamanca a los que se realizó estudio de mutaciones de resistencia entre los años 2006-2010 por falta de respuesta virológica.

-Se recogieron muestras en tubos de extracción de sangre por el sistema de vacío en Z Serum Sep Clot Detractor 9ml Vacuette® o K3EDTA Vacuette® 9ml de Greiner Bio-One.

-Las muestras se refrigeraron hasta su procesamiento en las primeras 24-72 horas. En caso de que esto no fuera posible, se almacenaron a -20°C.

-Determinación cualitativa de HBsAg en suero o plasma por ARCHITECT HBsAg Qualitative (inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas –CMIA-) en ARCHITECT *i System*. Con resultado inicial S/CO <1.00 se consideró no reactivo y con resultado S/CO \geq 1.00, reactivo, según criterio del ensayo ARCHITECT HBsAg Qualitative.

Determinación cuantitativa de HBsAc en suero o plasma por ARCHITECT Anti-HBs (inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas –CMIA-) en ARCHITECT *i System*. Las muestras inferiores a 10.00 mUI/ml se consideraron no reactivas y las iguales o superiores a 10 mUI/ml reactivas, según el criterio de ensayo de ARCHITECT Anti-HBs.

-Determinación cualitativa de HBeAg en suero o plasma por ARCHITECT HBeAg (inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas –CMIA-) en ARCHITECT *i System*. Según el criterio del ensayo ARCHITECT HBeAg, muestras con valores S/CO <1.000, se consideraron no reactivas y con valores de S/CO \geq 1.000, reactivas.

-Determinación cualitativa de HBeAc en suero o plasma por ARCHITECT®Anti-HBeAc (inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas –CMIA- de tipo competitivo) en ARCHITECT *i System*. El ensayo considera no reactivas las muestras con valores S/CO > 1.00 y reactivas las muestras con valores S/CO \leq 1.00. Las no reactivas presentan un porcentaje de inhibición < 50% y las reactivas \geq 50%.

-Determinación cualitativa de HBcAc en suero o plasma por ARCHITECT Anti-HBc II (inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas –CMIA-) en ARCHITECT *i System*. Con resultado inicial S/CO <1.00 se consideró no reactivo y con resultado S/CO \geq 1.00 reactivo, según criterio del ensayo ARCHITECT Anti-HBc II.

-Determinación cualitativa de anticuerpos frente a VHC en suero o plasma por ARCHITECT Anti-VHC (inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas –CMIA-) en ARCHITECT *i System* en aquellos pacientes en los que fue solicitado por el clínico. Con resultado inicial S/CO <1.00 se consideró no reactivo y con resultado S/CO \geq 1.00 reactivo, según criterio del ensayo ARCHITECT Anti-VHC. Para confirmar el resultado positivo de las muestras reactivas se realizó INNO-LIA HCV Score (INNOGENETICS®-FUJIREBIO®), inmunoensayo de tercera generación que incorpora dos antígenos del core C1 y C2, E2 de la región hipervariable, NS3 de la región de la helicasa, NS4A, NS4B y NS5.

-Detección cualitativa simultánea de antígeno p24 y anticuerpos frente al VIH-1 (VIH-1 grupo M y grupo O) y/o VIH-2 en suero o plasma por ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo (inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas –CMIA-) en ARCHITECT *i System* en aquellos pacientes en que fue solicitado por el clínico. Con resultado inicial S/CO <1.00 se consideró no reactivo y con resultado S/CO \geq 1.00 reactivo, según criterio del ensayo ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo. A las muestra reactivas se les realizó INNO-LIA HIV I/II Score (INNOGENETICS®-FUJIREBIO®) para confirmar el resultado. Esta técnica usa proteínas sintéticas y péptidos recombinantes del VIH-1 y VIH-2 y un péptido sintético de VIH-1 grupo O: sgp120 y gp41 detectan anticuerpos específicos frente a VIH-1, p31, p24 y p17 frente a VIH-1 y VIH-2. Los péptidos del VIH-1 grupo O están presentes en la banda sgp120. Los antígenos gp36 y sgp105 se usan para detectar los anticuerpos frente a VIH-2.

-Determinación de anticuerpos frente al virus Delta por ETI-AB-DELTAK-2, DiaSorin (ELISA competitivo simultáneo) en aquellos pacientes en que fue solicitado por el clínico. Según el criterio del ensayo, las muestras con una absorbancia menor o igual al cut-off, se consideran reactivas, y con una absorbancia superior al cut-off, no reactivas.

-La cuantificación de ADN de VHB se llevó a cabo por hibridación de ácidos nucleicos tipo sandwich en suero o plasma (VERSANT® HBV DNA 3.0 (bDNA) de SIEMENS® desde 2007 hasta 2012, con un límite inferior de cuantificación de 2000 copias/ml y un límite superior de cuantificación de 100.000.000 copias/ml (factor de conversión aportado por el fabricante 1IU/ml=5,6 copias/ml).

Desde 2012 hasta 2015, la cuantificación se realizó por COBAS® Ampliprep/ COBAS® Taqman® HBV v2.0 que se basa en dos procesos principales: 1) aislamiento del ADN del VHB y 2) amplificación del ADN diana mediante PCR y detección simultánea de sonda oligonucleótida doblemente marcada, escindida y específica para la diana. El intervalo de detección es de 20 1.700.000.000 UI/ml (factor de conversión aportado por el fabricante 1UI/ml=5.82 copias/ml).

-La extracción de ADN se realizó a partir de suero o plasma por NucliSENS®easyMAG® partiendo de un volumen de muestra de 200 µl y obteniendo un volumen de ADN de VHB de 25µl.

-La identificación de los distintos genotipos (A-H) se realizó por PCR nested con cebadores biotinilados e INNO-LIPA HBV Genotyping (INNOGENETICS®-FUJIREBIO®) detectando secuencias específicas de los dominios B y C de la polimerasa del VHB. En la primera fase de la PCR se obtuvo una secuencia de 409 pb amplificada, pero al no ser suficiente cantidad de producto se realizó una PCR anidada produciéndose una secuencia de 342 pb.

Posteriormente se llevó a cabo una visualización de control en gel de agarosa al 5%. En la electroforesis se dejó correr el gel entre 70-150 mv y se observó el producto amplificado.

El ADN biotinilado se hibridó con sondas de oligonucleótidos específicos fijados en forma de bandas en una tira de membrana en *Auto-LIPA* que posee una línea de marca, una línea de control de amplificado, otra de control de conjugado y las bandas de los genotipos. Con *Auto-LIPA* se realizó de forma automatizada los pasos de hibridación, lavado astringente de ADN no hibridado y revelado de color (añadiendo estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina que se une a híbridos biotinilados e incubando con el cromógeno BCIP/NBT) produciéndose un precipitado púrpura marrón. Para la interpretación de resultados se empleó la tabla de tipaje que identifica los patrones de bandas con los correspondientes genotipos (A-H) (Tabla 7). En el momento de la lectura se tuvo en cuenta la existencia de genotipos mixtos.

Caracterización molecular de virus de hepatitis B resistentes

Línea	A							B			C			D				E			F			G		H			
1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3	X	X		X	X																								
4	X	X	X			X																							
5	X		X	X			X																						
6								X	X																				
7								X		X																			
8											X	X																	
9											X		X																
10														X		X	X												
11														X	X		X												X
12																	X	X		X									
13																		X	X										
14																					X	X							
15																					X		X						X
16																										X	X		

Tabla 7. Tabla para tipaje de genotipos

-La identificación de polimorfismos en los nucleótidos nt1762 y nt1764 del promotor basal del core (BCP) y en codón 28 de la región precore de VHB se realizó por PCR nested con cebadores biotinilados e INNO-LIPA HBV Pre-core (INNOGENETICS®-FUJIREBIO®). En la primera PCR se obtuvo una secuencia de 326 pb. Como la cantidad de amplificado era insuficiente se realizó una PCR anidada que proporcionó un amplificado de 239 pb. A continuación se realizó la visualización del amplificado en gel de agarosa al 5% corriendo el gel entre 70-150 mv. El ADN biotinilado se hibridó con sondas de oligonucleótidos específicos fijados en forma de bandas en una tira de membrana en *Auto-LIPA* que tiene líneas de marca, de control de conjugado, de control de amplificado, 5 líneas de BCP: una wild type (A/1762/G1764) y 4 mutantes (BCP A1762/A1764, BCP A1762/T1764 y 2 BCP T1762/A1764) y dos líneas para pc codón 28: wild type y mutante. Con *Auto-LIPA* se realizó de forma automatizada los pasos de hibridación, lavado astringente de ADN no hibridado y revelado de color (añadiendo estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina que se une a híbridos biotinilados e incubando con el cromógeno BCIP/NBT) produciéndose un precipitado púrpura marrón. Para la interpretación de resultados se empleó la tabla de tipaje (Tabla 8).

Líneas	Interpretación
3-BCP (A1762/G1764)	Silvestre
4- BCP (A1762/A1764)	Mutante
5- BCP (A1762/T1764)	Mutante
6- BCP (T1762/A1764)	Mutante
7- BCP (T1762/A1764)	Mutante
8-PC codón 28	Silvestre
9-PC codón 28	Mutante

Tabla 8. Tabla de tipaje para mutantes precore/core

-La detección de mutaciones o polimorfismos de VHB situados en los codones 80, 173, 180, 181, 194, 202, 204, 236 y 250 del gen de la polimerasa se realizó por una única PCR usando primers biotinilados que amplifican desde el dominio A al F del gen de la polimerasa e INNO-LIPA HBV Multi-DR (INNOGENETICS®-FUJIREBIO®). La secuencia obtenida es de 867 pb.

A continuación se realizó la visualización del amplificado en gel de agarosa al 5% corriendo el gel entre 70-150 mv.

El ADN biotinilado se hibridó con sondas de oligonucleótidos específicos fijados en forma de bandas en dos tiras de membrana (DR v2 y DR v3) en *Auto-LIPA*. *Auto-LIPA* realiza de forma automatizada los pasos de hibridación, lavado astringente de ADN no hibridado y revelado de color (añadiendo estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina que se une a híbridos biotinilados e incubando con el cromógeno BCIP/NBT) Produciéndose un precipitado púrpura marrón. Para la interpretación de resultados se emplearon las tablas de tipaje (Tablas 9 y 10).

V2		
Líneas	Interpretación	Fármaco
3 y 4-L80	Silvestre	-
5-V80	Mutante	Lamivudina (compensatoria)
6 y 7-I80	Mutante	Lamivudina (compensatoria)
8-V173	Silvestre	-
9-G173	Silvestre	-
10-L173	Mutante	Lamivudina (compensatoria)
11-L180/A181	Silvestre	-
12 y 13-L180/T181	Silvestre/Mutante	Adefovir
14-L180/V181	Silvestre/Mutante	Adefovir
15-M180/V181	Mutante/Silvestre	Lamivudina
16-M180/T181	Mutante	Lamivudina/Adefovir
17-M180/V181	Mutante	Lamivudina/Adefovir
18 y 19-M204	Silvestre	-
20 y 21- V204	Mutante	Lamivudina/Telbivudina

V2		
Líneas	Interpretación	Fármaco
22, 23 y 24-I204	Mutante	Lamivudina/Telbivudina
25-S204	Mutante	Lamivudina/Telbivudina
26, 27, 28, 29 y 30-N236	Silvestre	-
31, 32, 33 y 34-T236	Mutante	Adefovir

Tabla 9. Tabla de tipaje para mutaciones en gen de la polimerasa

V3		
Líneas	Interpretación	Fármaco
3-T184	Silvestre	-
4, 5, 6 y 7-S/C/G/A184	Mutante	Entecavir
8, 9 Y 10 I/L/F/M 184	Mutante	Entecavir
11-A194	Silvestre	-
12-T194	Mutante	Tenofovir
13-S202	Silvestre	Entecavir
14-G202	Mutante	Entecavir
15-C202	Mutante	Entecavir
16-I202	Mutante	Entecavir
17 Y 18-M250	Silvestre	-
19 Y 20-V250	Mutante	Entecavir
21 Y 22-I250	Mutante	Entecavir
23 y 24-L250	Mutante	Entecavir

Tabla 10. Tabla de tipaje para mutaciones en gen de la polimerasa.

-Los datos recogidos de las historias clínicas de los pacientes y los resultados obtenidos a partir de las distintas técnicas realizadas se incorporaron a una base de datos. A continuación se utilizó el programa SPSS para Windows versión 13 para el procesamiento de los mismos.

Para las variables cuantitativas se calcularon medias y se compararon con la T de Student.

Para las variables cualitativas se calcularon porcentajes y se compararon por la prueba χ^2 .

Debido al tamaño de la muestra, se utilizó el nivel de significación estándar. Se consideraron significativos cuando el nivel de significación obtenido fue inferior al 5.

De los cincuenta y un pacientes estudiados veintitrés eran mujeres (45,1%) y veintiocho hombres (54,9%) con edades comprendidas entre los 6 y 75 años con una media de 37,71 años y desviación típica de 17,3. La edad media por sexos fue de 35,22 años \pm 16,21 para las mujeres y de 39,75 años \pm 18,19 para los hombres.

El mecanismo de transmisión fue vertical en diez casos (19,6%), familiar en tres (5,9%), sexual en dos (3,9%), parenteral en uno (2,0%), post-transfusional en dos (3,9%), por reactivación en cinco (9,8%) y desconocida en veintiocho (54,9%).

La edad media en el momento del diagnóstico según la transmisión se refleja en la tabla 11.

Vía de transmisión	Edad media	Desviación típica
Desconocida	40,39	15,24
ADVP	30,00	0
Familiar	51,00	18,02
Post-transfusional	35,50	20,50
Reactivación	51,20	19,34
Sexual	41,50	14,84
Vertical	19,90	10,55

Tabla 11. Media de edad según el mecanismo de transmisión

Respecto a la coinfección con VIH, sólo un paciente estaba coinfectado por el VIH-1 (2,0%), 42 fueron negativos (82,4%) y no se solicitó en ocho pacientes (15,7%).

Los coinfectados por el VHC fueron tres (5,9%), cuarenta y seis resultaron negativos (90,2%) y no se solicitó estudio de VHC en dos pacientes (3,9%).

No hubo ningún paciente en los que se solicitara estudio de VHC y VIH que estuviera coinfectado con ambos virus a la vez.

No hubo ningún coinfectado con virus delta de los diecinueve en los que se solicitó la prueba (37,3%). No se solicitó en treinta y dos pacientes (62,7%).

Los cincuenta y dos pacientes fueron positivos para el HBsAg.

Cincuenta y un pacientes fueron positivos para HBcAc y uno negativo.

De los cincuenta y un pacientes, dos mostraron positividad a la vez para HBsAg y HBsAc (3,9%).

Respecto al genotipo, veintisiete pacientes pertenecían al genotipo D (52,9%), quince al A (29,4%), dos al B (3,9%), tres al C (5,9%), dos al F (3,9%) y dos al H (3,9%). No se detectó ningún genotipo E, G o mixto. Cuatro pacientes de Europa del Este eran genotipo D, un paciente sudamericano genotipo A y los genotipos B y C eran de origen asiático.

El estudio de mutaciones en *precore/core* se realizó en veintiocho pacientes HBeAg-/HBeAc+ (54,9% de la muestra). En un paciente no fue posible realizar la PCR por inhibición de la técnica (3,6% de los HBeAg-/HBeAc+), en cuatro pacientes no apareció ninguna mutación (14,3%) y en los veintitrés restantes apareció alguna (82,1%). La frecuencia de las distintas mutaciones en los pacientes HBeAg-/HBeAc+ está reflejada en la tabla 12.

Mutación	Frecuencia
BCP A1762/A1764	3 (10,7%)
BCP A1762/T1764	0 (0%)
BCP T1762/A1764	18 (64,3%)
Pc codón 28	21 (75%)

Tabla 12. Frecuencia de mutaciones en *precore/core*

De los tres que presentaban la mutación **BCP A1762/A1764**, dos tenían asociada mutación en **PC codón 28** y de los dieciocho que presentaron la mutación **BCP T1762/A1764**, quince asociaron la mutación **PC codón 28**, es decir en 60,7% aparecieron asociadas la **mutación PC codón 28** con alguna PBC, especialmente la **BCP T1762/A1764**.

El nivel de significación de relacionar HBeAg-/HBeAc+ con las distintas mutaciones fue inferior al 5% en todos los casos ($p < 0.05$).

En el momento del diagnóstico, veintinueve pacientes eran HBeAg-/HBeAc+ (56,8%) y veintidós pacientes eran HBeAg+/HBeAc- (43,1%).

De los veintinueve HBeAg-/HBeAc+, uno hizo seroinversión a HBeAg+ y posteriormente pasó a ser HBeAg-/HBeAc- (2% del total). De ellos, dieciséis tenían genotipo D (55,2%), ocho, entre ellos el de la seroinversión, el A (27,6%), uno el B (3,4%), dos el F (6,9%) y dos el H (6,9%).

Los genotipos de los veintidós HBeAg+/HBeAc- fueron once del genotipo D (50%), siete del genotipo A (31,8%), uno del B (4,5 %) y tres del C (13,6%).

De los veintidós HBeAg+/HBeAc-, ocho seroconvirtieron a HBeAg-/HBeAc+ (15,7%) y uno seroconvirtió y posteriormente seroinvirtió (2,0%). De los que seroconvirtieron cuatro pertenecían al genotipo A y cuatro al D y el que seroinvirtió pertenecía al genotipo D. En el momento de la seroconversión tres no estaban siendo tratados, dos recibían adefovir, uno tenofovir, uno entecavir y uno interferón. A tres pacientes de los que seroconvirtieron se les realizó estudio de mutantes *precore/core* en los años siguientes apareciendo en dos de ellos mutación en **PC codón 28** a los 2 y 4 años de haberse producido la seroconversión y en uno la **BCP T1762/A1764** a los 3 años.

De los cincuenta y un pacientes, cinco hicieron seroconversión HBsAg-/ HBsAc+ (9,8%); tres pertenecían al genotipo A y dos al genotipo D.

Tres de los pacientes que hicieron la seroconversión HBsAg-/HBsAc+ eran HBeAg+/HbeAc-, por lo que no se realizó el estudio de mutantes en *precore/core*. De los dos HBeAg-/HBeAc+, uno no presentaba ninguna mutación y el otro tenía ambas mutaciones (**BCP T1762/A1764** y **PC codón 28**). De los seroconvertidores HBsAg uno estaba a tratamiento con interferón, dos estaban a tratamiento con tenofovir, uno con adefovir y otro con la combinación de lamivudina con adefovir. En los cinco las cargas tras la seroconversión fueron indetectables y mantenidas en el tiempo.

Cuarenta y tres pacientes (84,3%) fueron sometidos a algún tipo de tratamiento y ocho no (15,7%) aunque se realizó estudio de mutaciones de resistencia ante la posibilidad de instaurarlo.

De los veintiocho pacientes en los que se hizo el estudio de mutaciones en *precore/core*, en cuatro (7,8% del total) no se instauró tratamiento. De ellos en uno no se detectó ningún tipo de mutación, uno solamente en **PC codón 28** y dos tenían mutaciones tanto en BCP como en PC: **BCP A1762/A1764+PC codón 28** y **BCP T1762/A1764+PC codón 28**. La media de sus cargas virales fue de 5.000 copias/mL.

En los 24 pacientes (47,1% del total) en los que se instauró algún tipo de tratamiento y presentaban mutación en *precore/core*, solamente en dos no bajó la carga a niveles clínicamente

poco significativos, uno tenía la mutación **BCP T1762/A1764** y había recibido terapia con interferón y posteriormente con lamivudina no bajando la carga de 160.000 copias/mL y otro presentaba la mutación en **PC codón 28** y había recibido tratamiento con lamivudina no bajando la carga de 60.000 copias/mL.

La frecuencia de las mutaciones *precore/core* que aparecieron en los distintos genotipos se indican en la tabla 13.

Genotipo	BCP A1762/A1764	BCP A1762/T1764	BCP T1762/A1764	PC codón 28	Negativo	No Realizado
A	1(6,6%)	0(0%)	4(26,6%)	2(13,3%)	0(0%)	8(53,3%)
B	0(0%)	0(0%)	1(50%)	1(50%)	0(0%)	1(50%)
C	-	-	-	-	-	3 (100%)
D	2(7,4%)	0(0%)	11(40,7%)	16(59,2%)	0(0%)	11(40,7%)
F	0(0%)	0(0%)	1(50%)	1(50%)	0(0%)	1(50%)
H	0(0%)	0(0%)	2 (100%)	1(50%)	0(0%)	0(0%)

Tabla 13. Frecuencia de mutaciones en *precore/core*

Dos pacientes desarrollaron hepatocarcinoma. Ambos tenían HBeAg-/HBeAc+ y mutaciones **BCP T1762/A1764+PC codón 28**. Uno pertenecía al genotipo F y otro al A.

En los cuarenta y tres pacientes que recibieron terapia se utilizaron tratamientos en monoterapia o combinados. Los análogos en monoterapia se utilizaron en 68 ocasiones y la terapia combinada de análogos en 19. No se utilizó nunca la combinación de interferón y análogo. Se consideró fracaso terapéutico la falta de respuesta virológica. Los tratamientos empleados se reflejan en la tabla 14.

Tratamiento	Frecuencia
Interferón	16 (37,2%)
Lamivudina	22 (51,1%)
Adefovir	14 (32,5%)
Entecavir	7 (16,3%)
Tenofovir	19 (44,2%)
Lamivudina+Adefovir	8 (18,6%)
Lamivudina+Tenofovir	4 (9,3%)
Lamivudina+Entecavir	10 (2,3%)
Entecavir+Tenofovir	3 (7%)
Entecavir+Adefovir	1 (2,3%)
Tenofovir+Emtricitabina	2 (4,6%)

Tabla 14. Tratamientos empleados

La respuesta a los distintos tratamientos está reflejada en la tabla 15:

Tratamiento	Respuesta al tratamiento		
	SI	NO	ABANDONO
Interferón	1 (6,2%)	9 (56,2%)	6 (37,5%)
Lamivudina	0 (0%)	20 (90,9%)	2 (9,1%)
Adefovir	5 (35,7%)	8 (57,1%)	1 (7,1%)
Entecavir	4 (57,4%)	3 (42,8)	0 (0%)
Tenofovir	19 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Lamivudina+Adefovir	3 (37,5%)	5 (62,5%)	0 (0%)
Lamivudina+Tenofovir	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Lamivudina+Entecavir	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)
Entecavir+Tenofovir	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Entecavir+Adefovir	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Tenofovir+Emtricitabina	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabla 15. Porcentajes de respuesta al tratamiento.

El tratamiento combinado se utilizó en diecinueve ocasiones obteniéndose respuesta en 13 de ellas (68,4%), fracasando en 6 (31,6%) sin registrarse ningún abandono. En 9 de los tratamientos combinados que tuvieron éxito formaba parte tenofovir (75%).

Respecto al tiempo que tardaron en fracasar los distintos tratamientos, en el caso del interferón cuatro pacientes presentaron cargas positivas a los seis meses de tratamiento y cinco a los doce meses. La media de las cargas virales en el momento del fracaso fue de 13.500.000 copias/mL. La mutación **T1764/A1764** apareció en el 56,3% de los tratados con interferón, aunque el nivel de significación no fue inferior al 5% ($p < 0,005$). La **PC codón 28** se detectó en el 50% e igualmente el nivel de significación no fue inferior al 5% ($p < 0,005$). El único paciente que respondió a interferón era HBeAg+ y seroconvirtió a HBeAg- y posteriormente pasó de HBsAg+ a HbsAg-.

En el caso de los análogos de nucleós(t)idos, los tiempos medios de fracaso fueron los indicados en la tabla 16.

Tratamientos	Tiempos de fracaso a tratamiento en meses			
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
Lamivudina	26,4	18,1	2,6	62
Adefovir	25,6	17,8	4,2	51,6
Entecavir	7,7	4,5	4,7	12,8
Tenofovir	0	0	0	0
Lamivudina+Adefovir	28,8	23	6,7	63
Lamivudina+Tenofovir	0	0	0	0
Lamivudina+Entecavir	2,23	-	2,23	2,23
Entecavir+Tenofovir	0	0	0	0
Entecavir+Adefovir	0	0	0	0

Tabla 16. Tiempos medios de fracaso en análogos de nucleós(t)idos

Las medias de las cargas virales en el momento del fracaso terapéutico en el caso de los análogos de los nucleós(t)idos fueron para lamivudina de 29.000.000 copias/mL, para adefovir de 3.000.000 copias/mL, para entecavir de 700.000 copias/mL, para lamivudina+adefovir de 1.000.000 copias/mL y para lamivudina+entecavir 3.500.000.

Se estudiaron los fracasos en relación a los distintos genotipos. Los resultados se reflejan en la tabla 17.

Tratamiento	Genotipos						
	A	B	C	D	F	H	
Interferón	4 (44,4%)	0	1 (11,1%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)	2 (22,2%)	
Lamivudina	3 (15%)	0	1 (5%)	14 (70%)	1 (5%)	1 (5%)	
Adefovir	1 (12,5%)	0	0	7 (87,5%)	0	0	
Entecavir	0	0	0	3 (100%)	0	0	
Tenofovir	0	0	0	0	0	0	
Lamivudina+Adefovir	0	0	1 (20%)	4 (80%)	0	0	
Lamivudina+Tenofovir	0	0	0	0	0	0	
Lamivudina+Entecavir	0	0	0	1(100%)	0	0	
Entecavir+Tenofovir	0	0	0	0	0	0	

Tabla 17. Genotipos y fracasos terapéuticos

De los cincuenta y un pacientes a los que se realizó estudio de mutaciones de resistencia, en los ocho naïve no se detectó ninguna mutación de resistencia (15,7% del total) y de los cuarenta y tres en los que se realizó algún tratamiento, veintitrés no presentaron mutaciones en el gen de la polimerasa (45,1% del total) y veinte sí (39,2% del total).

Los pacientes tratados con lamivudina fueron veintidós, en ellos las frecuencias de las distintas mutaciones en el gen de la polimerasa asociadas a lamivudina se reflejan en la tabla 18.

Mutación relacionada con lamivudina	Número de pacientes afectados	Porcentaje
V80 (compensatoria)	6	27,3%
I80 (compensatoria)	3	13,6%
L173 (compensatoria)	1	4,5%
M180/A181	6	27,3%
M180/T181 (adefovir)	1	4,5%
M180/V181 (adefovir)	1	4,5%
V204	8	36,8%
I204	9	40,1%
S204	0	0%

Tabla 18. Mutaciones asociadas a lamivudina

El nivel de significación fue inferior al 5% ($p < 0,05$) en **V80, I80, M180/A181, V204 e I204**.

Las mutaciones se presentaron aisladas o en asociación con la siguiente distribución:

- **I204** dos veces (9,1%)
- **I204+V80** (compensatoria) tres veces (13,6%)
- **I204+I80** (compensatoria) dos veces (9,1%)
- **I204+M180/A181** una vez (4,5%)
- **I204+M180/T181+I80** (compensatoria) una vez (4,5%)
- **I204+M180/A181+V80** (compensatoria) una vez (4,5%)
- **I204+V204+M180/A181** una vez (4,5%)
- **V204** tres veces (13,6%)
- **V204+V80** (compensatoria) una vez (4,5%)
- **V204+M180/A181+M180/V181+V80** (compensatoria) una vez (4,5%)
- **V204+ M180/A181+L173** (compensatoria) una vez (4,5%)
- **V204+M180/A181** una vez (4,5%)

La mutación **I204** se detectó de manera aislada en dos pacientes que no habían recibido tratamiento con lamivudina, uno había recibido tres años antes terapia con interferón que había fracasado y en el segundo caso no había recibido ningún tratamiento previo pero se solicitó estudio de resistencias antes de comenzar terapia con tenofovir.

En los dos pacientes que abandonaron el tratamiento con lamivudina no se detectaron mutaciones relacionadas con ella.

Dos pacientes recibieron terapia con lamivudina que fracasó: en el primer caso al año de instaurar tratamiento y en el segundo caso a los cuatro años. En ninguno de los dos se detectó ninguna mutación relacionada con resistencia a lamivudina y parecían cumplir correctamente con el tratamiento.

El número de pacientes que recibió tratamiento con adefovir fue catorce. La frecuencia de las mutaciones en el gen de la polimerasa relacionadas con adefovir se refleja en la tabla 19.

Mutaciones relacionadas con adefovir	Número de pacientes afectados	Porcentaje
M180(lamivudina)/T181	0	0%
M180(lamivudina/V181	1	7,1%
L180/T181	0	0%
L180/V181	1	7,1%
T236	3	21,4%

Tabla 19. Mutaciones relacionadas con adefovir

El nivel de significación fue inferior al 5% ($p < 0,05$) en **T236**.

Las mutaciones se presentaron aisladamente o asociadas de la siguiente manera:

- **T236+M180/V181** una vez (7,1%)
- **T236+L180/V181** una vez (7,1%)
- **T236** una vez (7,1%)

La doble mutación **M180/T181** había aparecido relacionada con uso de lamivudina una vez y no apareció ningún caso en relación a adefovir.

La doble mutación **M180/V181** había aparecido una vez relacionada con lamivudina y una vez en relación con adefovir.

De los ocho pacientes en que fracasó el adefovir, en tres aparecieron las mutaciones de resistencia y en cinco, no. De éstos últimos, uno tuvo que dejar el tratamiento por toxicidad renal, y los cuatro restantes se consideraron fracasos a adefovir. De ellos dos pertenecían al genotipo D, uno al A y otro al F.

Los pacientes tratados con entecavir fueron siete. La frecuencia de las distintas mutaciones se refleja en la tabla 20.

Mutaciones relacionadas con entecavir	Número de pacientes afectados	Porcentaje
S/C/G/A184	0	0%
I/L/F/M184	0	0%
G/C/I202	2	28,6%
V/I/L250	0	0%

Tabla 20. Mutaciones relacionadas con entecavir

El nivel de significación fue inferior al 5% ($p < 0,05$) en **G/C/I202**.

La mutación que apareció fue **G202**. En un caso el paciente tenía previamente las mutaciones **M180/V181** y **V204** y en el otro las mutaciones **M180/A181** e **I204**. En el caso de la tercera paciente, no se consiguió bajar la carga a niveles poco significativos y no se pudo realizar estudio de mutaciones de resistencia por fallecimiento.

En una paciente con las mutaciones **V80** e **I204** que había recibido terapia con lamivudina, se detectó la mutación **V250** sin haber recibido terapia con entecavir previamente.

Diecinueve pacientes recibieron terapia con tenofovir y no se seleccionó en ninguno la mutación **T194**. Solamente en uno de ellos se había detectado la mutación **T194** en una ocasión seis años antes de iniciar tratamiento con tenofovir, aunque posteriormente desapareció.

La frecuencia de las mutaciones en pacientes sometidos al tratamiento combinado lamivudina+adefovir se reflejan en la tabla 21.

Mutaciones relacionadas con lamivudina+adefovir	Número de pacientes afectados	Porcentaje
V80 (compensatoria)	2	25%
I80 (compensatoria)	0	0%
L173 (compensatoria)	0	0%
M180/A181	3	37,5%
M180/T181	0	0%
M180/V181	0	0%
V204	3	37,5%
I204	4	50%
S204	0	0%
L180/T181	0	0%
L180/V181	1	12,5%
T236	1	12,5%

Tabla 21. Mutaciones relacionadas con lamivudina+adefovir.

En los tres pacientes en los que se consiguió respuesta virológica las mutaciones ya estaban presentes en el momento de iniciar la terapia combinada lamivudina+adefovir y no se detectó ninguna nueva. Se asociaron de la siguiente manera:

- **M180/A181+V204+I204** (mutaciones relacionadas con resistencia a lamivudina)
- **V80** (compensatoria)+**V204** (mutaciones relacionadas con resistencia a lamivudina)
- **V80** (compensatoria)+**I204** (mutaciones relacionadas con resistencia a lamivudina)

En cuatro de los cinco pacientes en que no se obtuvo respuesta virológica la asociación de las mutaciones fue:

- **L180/V181** (mutación previa al inicio de tratamiento combinado, relacionada con adefovir)+**T236** (aparición durante tratamiento, relacionada con adefovir)

- **M180/A181+I204** (mutaciones previas al tratamiento combinado, relacionadas con resistencia a lamivudina)
- **M180/A181+V204** (mutaciones previas al tratamiento combinado, relacionadas con resistencia a lamivudina)
- **I80** (compensatoria)+**I204** (momento de aparición desconocido, mutaciones relacionadas con resistencia a lamivudina)

Sólo en uno de ellos apareció una nueva mutación relacionada con adefovir **T236**.

El fracaso en el quinto paciente se debió a mal cumplimiento y no se detectaron mutaciones.

El tratamiento combinado de lamivudina+entecavir se empleó en un paciente que tenía antes del inicio del tratamiento combinado la siguiente asociación de mutaciones relacionadas con lamivudina:

- **V80** (compensatoria)+**M180/A181+I204**

Posteriormente apareció la **G202** con nivel de significación fue inferior al 5% ($p < 0,05$).

El tratamiento combinado de lamivudina+tenofovir se empleó en cuatro ocasiones. La asociación de mutaciones previas a la instauración del tratamiento fue:

- **L180/V181+T236**
- **V80** (compensatoria)+**I204+L250**
- **V80** (compensatoria)+**I204**

En un paciente no existían mutaciones previas al inicio del tratamiento.

No se detectó ninguna mutación tras instaurarse el tratamiento. No hubo fracaso virológico.

En el tratamiento combinado de adefovir+entecavir se instauró en un paciente con la siguiente asociación de mutaciones previas al tratamiento:

- **I80** (compensatoria)+**I204**

No se detectaron nuevas mutaciones ni hubo fracaso virológico

El tratamiento combinado tenofovir+entecavir se aplicó a tres pacientes con las siguientes asociaciones de mutaciones previas:

- **V80** (compensatoria)+**M180/A181**+**M180/V181**+**V204**+**T236**+**G202**
- **V80** (compensatoria)+**M180/A181**+**G202**
- **T236**

No se detectaron nuevas mutaciones tras instaurarse el tratamiento ni hubo fracaso virológico.

El tratamiento de tenofovir+emtricitabina se utilizó en dos pacientes. En uno de ellos la asociación de mutaciones previas al tratamiento fue:

- **L180/V181**+**T236**

En el segundo paciente no se detectaron mutaciones previas a la instauración del tratamiento. No se detectaron nuevas mutaciones ni fracaso serológico.

Se cruzaron las frecuencias de las mutantes *precore/core* con las de las distintas mutaciones en la polimerasa no obteniéndose ninguna con un nivel de significación inferior al 5% ($p < 0,05$).

En las tres que tenían la mutación **BCP A1762/A1764** no se detectó ninguna mutación en la polimerasa.

De las dieciocho que presentaban mutación en **BCP T1762/A1764**, en quince (83,3%) no se detectó ninguna mutación en la polimerasa aunque el nivel de significación fue superior al 5% ($p < 0,05$). En los restantes pacientes se detectaron de forma aislada o asociadas las siguientes mutaciones en el gen de la polimerasa: una **V80** (compensatoria) (5,6%), dos **V204** (11,1%), una **I204** (5,6%) y una **T236** (5,6%). El nivel de significación fue superior al 5% ($p < 0,05$) en todos los casos.

De las veintiuna que presentaban la mutación **PC codón 28**, 16 no presentaron ninguna mutación en el gen de la polimerasa (76,2%), aunque el nivel de significación fue superior al 5% ($p < 0,05$). En los demás pacientes aparecieron las siguientes mutaciones aisladas o asociadas: una **V80** (compensatoria) (4,8%), dos **I80** (compensatorias) (9,5%), dos **V204**

(9,5%), tres **I204** (14,3%), una **M180/T181** (4,8%) y una **T236** (4,8%). El nivel de significación fue superior al 5% ($p < 0,05$) en todos los casos.

Se relacionaron mutaciones de resistencia en el gen de la polimerasa con los distintos genotipos. La **V80** (compensatoria) relacionada con resistencia a lamivudina, apareció en seis ocasiones: 2 veces en el genotipo A (133,3%), 4 en el D (66,7%) y ninguna en el resto de genotipos.

La **I80** (compensatoria) relacionada con resistencia a lamivudina se detectó en dos ocasiones en el genotipo D (66,7%) y en una en el H (33,3%) y no se detectó en ningún otro genotipo

La **L173** (compensatoria) relacionada con resistencia a lamivudina solamente se detectó en una ocasión y fue en el genotipo A.

La mutación de resistencia **M180/A181**, relacionada con resistencia a lamivudina, se observó en el genotipo A tres veces (50%), en el D en dos ocasiones (33,3%) y una en el F (16,7%).

La doble mutación **M180/T181** relacionada con resistencia a lamivudina y adefovir sólo se observó una vez en un paciente genotipo H.

La doble mutación **M180/T181** relacionada con resistencia a lamivudina y adefovir sólo se observó una vez en un paciente genotipo D.

La mutación **V204** que confiere resistencia a lamivudina y telbivudina se detectó en tres ocasiones en el genotipo A (37,5%), en cuatro en el D (50%) y en una en el F (12,5%).

La mutación **I204** que confiere resistencia a lamivudina y telbivudina se observó dos veces en el genotipo A (18,2%), una en el C (9,1%), seis en el D (54,5%), una en el F (9,1%) y una en el H (9,1%).

S204, relacionada con resistencia a lamivudina y telbivudina, no fue detectada en ningún caso.

Respecto a las mutaciones relacionadas con resistencia a adefovir, **L180/T181** no fue detectada en ninguna ocasión, **L180/V181** se observó en dos ocasiones en el genotipo D (100%) y **T236** se detectó cuatro veces, todas en genotipo D (100%).

Las mutaciones relacionadas con resistencia a entecavir **S/C/G/A184 E I/L/F/M184** no se detectaron en ninguna ocasión. **G/C/I202** se detectó en dos ocasiones, una en genotipo A (50%) y otra en D (50%) y **V/I/L250** una vez en el A (100%).

La mutación **T194** relacionada con resistencia a tenofovir apareció una vez en el genotipo A.

No se observó ningún nivel de significación inferior a 5% al cruzar las frecuencias de las mutaciones y los genotipos.

El total de mutaciones observadas fue 47: 55,3% en el genotipo D, 29,8% en el genotipo A, 6,4% en el F, 6,4% en el H y 2,1% en el C.

La infección por el virus de la hepatitis B presenta una incidencia mayor en el sexo masculino, y la edad media de diagnóstico se sitúa alrededor de la cuarta década de la vida. En los estudios realizados en nuestro país y áreas geográficas próximas se confirma la frecuencia de la hepatitis B mayor en hombres que en mujeres y la edad media está en torno a los cuarenta años (Cadranel JF y col., 2007; Zarski JP y col., 2006; Poves Martínez E y col., 2012).

En este estudio los resultados fueron similares con una frecuencia superior en hombres (54,9%) respecto a mujeres (45,1%) y una edad media en el momento del diagnóstico de 37,71 años con una desviación típica de 17,3 años.

En los países desarrollados, la transmisión se produce sobre todo entre adultos jóvenes por contacto sexual o vía parenteral.

En el presente estudio el 54,9% desconocía la forma de transmisión aunque la mayoría tenía familiares con hepatitis B. La frecuencia de las vías sexual y parenteral fue baja, de 3,9% y 2,0%, probablemente porque estas formas de transmisión se dan en población adulta donde la mayoría de las infecciones se resuelven de forma espontánea en el paciente inmunocompetente y es más infrecuente que la hepatitis B crónica. En cambio, la infección adquirida en la infancia tiene más tendencia a cronificarse y nuestro estudio se encontró una frecuencia de 19,6% para la transmisión vertical y de 5,9% para la familiar. Los dos casos de transmisión post-transfusional se produjeron también en la infancia de los pacientes cuando no se realizaban controles en las donaciones de sangre. Las cinco reactivaciones se dieron en pacientes hematológicos en los que no se realizó tratamiento preventivo y fueron sometidos a tratamientos inmunosupresores. Actualmente, con los estudios de cribado en embarazadas y donantes y el tratamiento preventivo de reactivaciones en pacientes que van a ser sometidos a tratamientos inmunosupresores estos casos se habrían evitado.

La coinfección VIH-VHB es frecuente, en principio, debido al hecho de que ambos virus comparten formas de transmisión: sexual, parenteral y vertical. El VIH hace que haya mayor mortalidad y morbilidad hepática (Kellerman SE y col., 2003; Thio Cl y col., 2002; Pérez Olmeda M y col., 2003). En los países occidentales la infección por VHB es diez veces más frecuente en los VIH+ que en la población general (Kellerman S y col., 2003).

En nuestro estudio sólo una paciente presentaba coinfección por ambos virus que había adquirido por vía sexual y no se pudo constatar que el VIH aumentara la morbilidad y mortalidad por enfermedad hepática debido al fallecimiento de la paciente por otras patologías no relacionadas con la coinfección. Hay que tener en cuenta que no se solicitó el estudio de VIH en el 15,7% de los pacientes, a pesar de la frecuencia con que ambos virus se presentan conjuntamente en los países occidentales, es un dato remarcable que incide en el hecho de la infrapetición habitual en clínica de las pruebas VIH, y más cuando se compara con los datos que siguen a continuación en relación a las peticiones de Virus de la hepatitis C.

La coinfección VHC-VHB se da en un 7-15 % de pacientes con hepatitis B crónica (Peters MG., 2009).

En este estudio los coinfectados fueron el 5,9%, algo inferior a lo encontrado en otros análisis. La serología frente al VHC no se solicitó en 3,9% de los pacientes. Uno de los coinfectados desconocía cómo había adquirido las infecciones y no fue tratado y el otro paciente había adquirido ambos virus durante una transfusión en la infancia. Tras ser tratado para la hepatitis C con peginterferón y ribavirina, se trató la hepatitis B con tenofovir logrando una respuesta virológica sostenida. No hay evidencia de que la eficacia antiviral de los análogos se vea afectada por la coinfección por VHB.

A pesar de que VIH, VHB y VHC comparten vías de transmisión, en el presente estudio no se encontró ningún infectados por los tres virus a la vez.

Sin duda la asociación más clásica entre los virus hepatotropos es la coinfección o superinfección entre el VHB y el virus defectivo Delta o VHD. La prevalencia del VHD es de unos 15- 20 millones en el mundo, es decir aproximadamente el 5% de los infectados por VHB / estarían coinfectados con el VHD (Wedemeyer H y col., 2010). Debido a esto y a que la coinfección hace que la hepatitis B crónica evolucione más frecuentemente a cirrosis y exista más riesgo de hepatitis fulminante (Yurdaiyin C y col., 2010) debería realizarse el estudio de VHD en todos los pacientes HBsAg+, especialmente en el área Mediterránea y Este de Europa donde su prevalencia es de un 5-10 % en los pacientes infectados con el VHB (Wedemeyer H y col., 2007) y así poder instaurar tratamiento. Sin embargo, en nuestro estudio la prueba no se realizó en el 62.7 % de los pacientes HBsAg + y en el 37.3 % en los que sí se hizo no se detectó ningún caso.

El HBsAg es el marcador serológico más importante para diagnosticar la infección por VHB, tanto aguda como crónica, aunque existen casos en los que puede que no se detecte y se

encuentre ADN-VHB circulante, en las conocidas como “hepatitis ocultas” (OBI). La prevalencia de las OBI varía según el área geográfica, se detecta en un tercio de los pacientes VHC en el área mediterránea y en un estudio en Italia en pacientes sanos se detectó una prevalencia del 17% (Raimondo G y col., 2008).

En este estudio todos los pacientes fueron HBsAg+.

El estudio serológico de la infección por el VHB muestra en ocasiones combinaciones de los diversos marcadores que no guardan una evolución lógica, se conocen como patrones serológicos atípicos. Antes de etiquetar como tal a uno de estos patrones se debe comprobar su persistencia en el tiempo, solo así se pueden considerar como tales (Muñoz Criado S y col., 1997). Existen casos de pacientes con hepatitis B crónicas, sobre todo HBeAg+, que no presentan en ningún momento HBcAc (Santana OE y col., 1995). Este patrón aparece sobre todo en pacientes VIH positivos y en principio se supone que es debido a alteraciones de su sistema inmune (Ikeda Y y col., 1986). En España este patrón serológico afecta a un 0,3% de los casos, la mayoría VIH + (Santana OE y col., 1995).

En este estudio solamente un paciente fue HBcAc-, pero en el momento del diagnóstico era HBcAc+. Cuando se realizó el VIH era negativo y el HBeAg, positivo.

El patrón serológico atípico en el que aparecen a la vez HBsAg y HBsAc puede ocurrir de manera fugaz en el curso normal de un hepatitis B, en el tratamiento con interferón, en hepatitis crónica activa, en hepatocarcinoma, en reactivaciones en inmunodeprimidos y en ADVP (Gerlich WH, 2007).

En el presente estudio se detectaron dos pacientes con este patrón (3,9%), uno era ADVP y el segundo tenía una hepatitis crónica de larga evolución con cirrosis, lo que coincide con otros análisis.

En los países occidentales la hepatitis B crónica con HBeAg- representa el 70% de los casos de hepatitis crónica (Zarski JP y col., 2006).

En nuestro estudio el 56,8% de los pacientes eran HBeAg negativos, porcentaje inferior a lo esperado, probablemente debido a que se incluyeron pacientes jóvenes que estaban en la fase de inmunotolerancia y habían adquirido la infección por transmisión vertical.

Como ya se ha comentado la hepatitis B es una enfermedad de distribución global, no obstante los diferentes genotipos descritos se distribuyen de manera concreta en las diferentes áreas geográficas, así los genotipos B y C son los más frecuentes en Asia y los genotipos A y D en Europa, área mediterránea y Oriente Próximo (Kramvis y cols., 2005). En concreto en España

predominan los genotipos D (48,1%) y A (39,5%), seguidos del genotipo F (4,1%) y el B, el C y el E (<1%) (Rodríguez-Frías F y col., 2006).

Las frecuencias en nuestro estudio no coinciden ya que el que predominó fue el D (52,9%), seguido a distancia por el A (29,4%). El genotipo F sí presentó una frecuencia similar a la de otros estudios con un 3,9%. El genotipo H, frecuente en América Central, aquí apareció con la misma frecuencia que el F (3,9%), pero en dos pacientes de procedencia española. También fue algo superior a la esperada la frecuencia de los genotipos B (3,9%) y C (5,9%), en este caso todos los pacientes eran de origen asiático.

Respecto a ciertos patrones atípicos y de capital importancia en el estudio actual de la infección por el VHB son las diferentes mutaciones descritas en el virus. Las mutaciones *precore/core* son importantes por su relación con la falta de respuesta a interferón, hepatitis fulminante y hepatocarcinoma (Lok AS y cols., 2000; Rodríguez-Frías F y col., 1995; Liu S y col., 2009; Yin J y col., 2011; Liao Y y col., 2012). La mutación más frecuente es la **G1896A**, que produce una señal de parada en el codón 28 por pasar TGG a TAG y suele ir asociada a genotipos con un nucleótido de timina en la posición 1858 en vez de citosina: B, D, E y parte de los C y F. Por ejemplo, se observa más frecuentemente en el genotipo D (65%) que en el genotipo A (9%) (Gao S y cols., 2015). Las mutaciones en PBC también son más frecuentes en determinados genotipos como el D y el C (Chan HL y cols., 1999). La frecuencia de la mutación en **PC codón 28** se detecta en de manera global en un 60% de los pacientes HBeAg-/HBeAc+: 92% en el área mediterránea, 50% en Asia y 24 % en Estados Unidos. Sobre la PBC existen pocos datos, en Asia está en torno al 77% entre los pacientes HBeAg-. (Funk ML y col., 2002).

En este estudio se investigaron las mutaciones en el *precore/core* en los pacientes HBeAg-/HBeAc+, un 54,9%, ya que la posibilidad de encontrar mutantes en HBeAg+/HBeAc- es muy baja. En el 82,1% de HBeAg-/HBeAc+ se detectó algún tipo de mutación y en 14,3% ninguna. La mutación **PC codón 28** se detectó en el 75% de los HBeAg-/HBeAc+, lejos del 92 % de otros estudios del área mediterránea.

La PBC se detectó en otro 75%: 10,7% para **PBC A1762/A1764** y 64,3% para **PBC T1762/A1764**, es decir con la misma frecuencia que la mutación **PC codón28** que en otros análisis es la más frecuente.

En primer lugar, aparecen las variantes del PBC y después las *precore* (Kay A y col.2007), siendo muy frecuente la detección simultánea de las dos en hepatitis crónicas. En este estudio

en un 60,7% aparecieron asociadas la mutación **PC codón 28** con alguna PBC, especialmente **PBC T1762/A1764**, que es la más frecuente.

El nivel de significación de relacionar HBeAg-/HBeAc+ con las distintas mutaciones fue inferior al 5% en todos los casos ($p < 0.05$), es decir, las mutantes *precore* se asocian de manera significativa a HBeAg-/HBeAc+.

En nuestro estudio, al igual que en otros encontramos frecuentemente la mutación **PC codón 28** asociada al genotipo D, en concreto en un 59,2%. También la encontramos en el genotipo B y el F, y asociada al A en 13,3%.

Las mutaciones PBC se encontraron sobre todo en el genotipo D (40%) seguido del A (26,6%). También se observó en el B y el F. Es decir, que aunque no con tanta frecuencia como con el genotipo D, las mutaciones en *precore/core* se asocian al genotipo A.

En el genotipo C no se realizaron estudios de mutaciones en *precore/core* porque todos eran HBeAg+. Se trataba de pacientes de origen asiático que habían adquirido la infección por vía vertical.

En el momento del diagnóstico 56,8% de los pacientes eran HBeAg-/HBeAg+ y 43,1% HBeAg+/HBeAc-, siendo en ambos grupos el genotipo más frecuente el D: 55,2% para los primeros y 50 % para los segundos. Respecto al genotipo A se halló en un 27,6% en el primer grupo y 31,8% para el segundo. El resto de los genotipos encontrados en los pacientes HBeAg-/HBeAc+ fue: B (3,4%), F (6,9%) y H (6,9%). En HBeAg+/HBeAc-, el resto de los genotipos fue B (4,5%), C (13,6%).

La seroconversión de HBeAg+/HBeAc- a HBeAg-/HBeAc+ es de 5-20 % al año y puede ir precedida de aumento de transaminasas (Sánchez-Quijano A y col., 2006). La seroconversión espontánea HbeAg aparece en pacientes con edades en torno a los 35 años (Yuen MF., 2003) y es más frecuente en el genotipo B que en el C (Chu CJ y cols., 2002) y el porcentaje y la durabilidad de la seroconversión HBeAg es mayor en los genotipos A y D que en los B y C (Gao y cols., 2015). En pacientes tratados con interferón, la seroconversión a HBeAg-/HBeAc+ es del 44% para el genotipo A, del 44% para el B, del 28% para el C y del 25% para el D (Janssen HLA y col., 2005).

En este estudio en el momento del diagnóstico un 15,7%, seroconvirtió a lo largo de los años, lo que coincide con otros estudios, sin embargo la edad media de seroconversión fue de 45,3 años. Aquellos que seroconvirtieron, la mitad tenía el genotipo A y la otra mitad el D, no hallándose relación significativa entre el genotipo y la seroconversión HBeAg. No se produjo ninguna seroconversión en los demás genotipos, incluyendo el B que según estudios realizados

en Asia tiene más probabilidades de hacer seroconversión espontánea, aunque aquí el número de casos era muy bajo. Tan solo un paciente con genotipo A seroinvirtió. En dos pacientes, la seroconversión HBeAg se produjo con interferón, uno pertenecía al genotipo A y otro al D, pero debido al bajo número de casos no se puede comparar con otros estudios.

Posteriormente, en tres de los pacientes que habían seroconvertido, se trataron de detectar mutantes *precore/core* ya que según algunos autores, en primer lugar aparecerían las variantes del PBC y después las *precore* (Kay A y col., 2007), sin embargo en dos apareció en el plazo de dos y cuatro años la mutante **PC codón 28** y en uno la **BCP T1762/A1764** a los tres años.

Un número escaso de pacientes, en países occidentales un 0,5-2% de los mismos y un 0,1-0,8 en el sudeste asiático, pueden hacer una seroconversión HBsAg (Chu CM y col., 2007; Lok AS y col., 1987), con un pronóstico a largo plazo favorable salvo que ya presenten cirrosis (Yuen MF y col., 2004), en ese caso debería ser controlados ya que pueden evolucionar a un hepatocarcinoma (Huo TI y col., 1998). Un 4-6% de los pacientes tratados con interferón logran la seroconversión de HBsAg a HBsAc (Lau GK y col., 2005).

En este estudio un 9,8% de los pacientes hizo seroconversión HBsAg-/HBsAc+, un 5,9% pertenecían al genotipo A y un 3,9% al D. No existen estudios de influencia del genotipo en la seroconversión del HBsAg y tampoco de la influencia de las mutaciones *precore/core*, aunque en este estudio tres de los cinco que seroconvirtieron eran HBeAg+/HBeAc- y en los otros dos, uno tenía mutaciones **PC codón 28** y **BCP T1762/A1764** y el otro no presentaba ninguna mutación. En tratamiento con interferón y seroconversión HBsAg se detectó un 2%, cifra inferior a otros estudios. Sobre la seroconversión de HBsAg, que es un objetivo en el tratamiento de la hepatitis B crónica, durante el tratamiento con análogos existen pocos estudios, pero parece ser un acontecimiento extraordinario (Zoutendijk R y col., 2011). En nuestro estudio sin embargo, cuatro de los cinco pacientes en que se consiguieron cargas indetectables y seroconversión HBsAg, estaban siendo tratados con análogos de nucleós(t)idos: dos con adefovir, uno con tenofovir y el cuarto con la combinación de lamivudina con adefovir. El tiempo que tardaron en hacer la seroconversión una vez instaurado el tratamiento no superó los cinco años.

La existencia de mutaciones en *precore/core* en la hepatitis B crónica conlleva peor pronóstico y las mutaciones PBC hacen que aumente la replicación viral. Sin embargo en este estudio en un 7,8% de pacientes no se instauró tratamiento, dos tenían mutaciones en PBC y PC y otro en PC y la media de sus carga virales estuvo en torno a 5.000 copias/mL (aproximadamente 900

UI/mL). En 47,1% de pacientes se instauró tratamiento y tenían mutación en *precore/core* y solamente en dos no bajó la carga a niveles clínicamente poco significativos, uno poseía la mutación **PC codón 28** y otro la **BCP T1762/A1764**.

Uno de los hechos clínicos esenciales en el curso de una infección por el VHB es la asociación con el desarrollo de un hepatocarcinoma, sin duda es la evolución menos deseable y aquella que produce más temor en el paciente. Se ha observado que de los pacientes que tienen hepatitis crónica, menos de un 10% desarrollará hepatocarcinoma y que un 50% de pacientes con hepatocarcinoma tenían infección previa por VHB (Zoulim F, 2006). En pacientes HBsAg- la incidencia de este tumor es baja: 0,1%, aumenta con hepatitis crónica al 1% y con cirrosis ya alcanza el 10% (Chu CM, 2000, Bréchet y col., 1980), En este punto merecen resaltar estudios realizados en marmotas donde se ha visto que podían desarrollar hepatocarcinoma sin cirrosis previa, sólo con hepatitis crónica activa (Tennant BC y col., 2004). Otros factores de riesgo son la duración de la infección, la edad avanzada, la raza, el alcoholismo, coinfección por VIH, VHC o VHD, cargas elevadas, HBeAg+, exposición a aflotoxinas, diabetes, genotipo C y mutantes en *precore/core* (Ohnishi K y col., 1982; Chen J y col., 2006). La doble mutación **PBC (A1762/A1764)** y mutaciones en **PC codón 28 (G1896A)** son propensas al desarrollo de hepatocarcinoma (Liu S y col., 2009; Yin J y col., 2011; Liao Y y col., 2012). El tratamiento con interferón en pacientes que responden reduce el riesgo de desarrollar hepatocarcinoma.

En nuestro estudio los dos pacientes que desarrollaron hepatocarcinoma no cumplían muchos de los factores de riesgos descritos en otros análisis: uno pertenecía al genotipo D y otro al F, no tenían edad avanzada, aunque en ambos casos llevaban años de evolución, ambos se trataron con interferón y fracasó, ninguno tenía cirrosis y el HBeAg era negativo con HBeAc positivo. Los dos sí tenían cargas altas y las mutaciones **PBC T1762/A1764** asociada a la **PC codón 28**. Ninguno tenía la **PBCA1762/A1764**.

En relación a la respuesta al tratamiento, las mutaciones en *precore/core* también se relacionan con la respuesta al interferón. La mutación en **PC codón 28** está asociada a respuesta pobre a interferón independientemente de cómo sea HBeAg (Fattovich G y cols., 1995) y cuantas menos mutaciones aparezcan en PBC, mejor será la respuesta (Lok AS y cols., 2000).

De dieciséis pacientes sometidos a terapia con interferón en este estudio sólo respondió uno con HBeAg+, el 37,5% abandonó y no respondió el 56,2%. En los tratados encontramos la mutación **T1764/A1764** en el 56,3% y la **PC codón 28** se detectó en el 50%, sin embargo, al contrario que en otros estudios, no existía relación significativa entre la presencia de mutaciones en el *precore/core* y el fracaso.

En pacientes tratados con interferón, un 44% para el genotipo A, un 44% para el B, un 28% para el C y un 25% para el D, logran la seroconversión HBeAg⁺ a HBeAg⁻ (Janssen HLA y col., 2005) y respecto al genotipo responden mejor el A y el B que el C o el D (Janssen HL y col., 2005) aunque se requieren más análisis.

En nuestro estudio el único paciente que respondió era genotipo D y sí se consiguió la seroconversión HBeAg y el 44,4% de los que fracasaron pertenecían al genotipo A, 22,2% al H, 11,1% al C, 11,1% al D y 11,1% al F, por lo que el genotipo no parece influir en el fracaso.

Lamivudina baja rápidamente la carga viral, tiene buena tolerancia y normaliza la ALT (Lai y col., 1998), pero selecciona rápidamente mutantes resistentes: tiene un rango de resistencia anual de 15-20% al año de tratamiento y del 80% a los 5 años (Lok AS y col., 2003; Lai CL y col., 2003). Está contraindicada la monoterapia con lamivudina y actualmente se considera un fármaco de segunda línea debido a la aparición de resistencias. Estas mutaciones reducen la eficacia del fármaco más de 1.000 veces, por lo que no se puede compensar aumentando la dosis. Las mutaciones aparecen en la región de YMDD de la RT en las posiciones 204 (**V/I204**) y en la 180 (**M180**). La **I204** confiere resistencia por sí sola y la **V204** suele acompañarse de la **M180**, mutación que tiene lugar en el subdominio B de la RT y aumenta la actividad enzimática hacia el sustrato natural y así compensa la pérdida de viabilidad del virus haciendo que se recupere el *fitness* (Allen M y col., 1998; Sheldon J y col., 2006). Además pueden asociarse mutaciones compensatorias como **V/I180** (dominio A), que mejora la capacidad de replicación, **T169**, **L173**, **S/G184**, **I202** y **S215** (Bartholomeusz A y col., 2006). Las mutaciones compensatorias son capaces de restaurar la replicación viral a niveles próximos al de la cepa silvestre.

En este estudio, se instauró tratamiento con lamivudina en el 51,1% de los pacientes, se produjo abandono en el 9,1% de los casos y fracasó en el 90,9% siendo el tiempo medio de fracaso de 26,4±18,1 meses, muy por encima del 15-20% al año de tratamiento y del 80% a los 5 años de otros análisis. La mutación **I204** fue la más frecuentemente detectada (40,9%) y aunque confiere resistencia por sí misma, sólo se halló aislada en 9,1% de los pacientes tratados con lamivudina, la mayoría de las veces se presentó asociada a mutaciones compensatorias que hacen que el virus recupere el *fitness*: como con la **V80** (13,6%), la **I80** (9,1%), la **M180** que suele acompañar a la **V204** (4,5%), asociada a la vez con **M180** y **I80** (4,5%) o con **M180** y **V80** (4,5%), asociada a la **V204** y a la **M180** (4,5%). La **V204** suele detectarse asociada a la **M180**, sin embargo en este estudio apareció aislada en 13,6%, asociada únicamente a **V80** en

4,5% pacientes y asociada a **M180** en 13,6% de pacientes: en 4,5% junto a la **V80**, en 4,5% con la **L173** y sólo con la **M180** en 4,5%. El nivel de significación fue inferior al 5% para **V80**, **I80**, **M180/A181**, **V204** e **I204**.

Las variantes YMDD también se encuentran en pacientes *naïve* (Brecht C y col., 2001). Las mutaciones espontáneas en YMDD son más frecuentes en pacientes con genotipo C y carcinoma hepatocelular, lo que parece relacionado con la mayor progresión a carcinoma del genotipo C comparado con el B (Yang J y col., 2014). Recientemente se ha realizado un estudio en China que demuestra que las mutaciones ocurren frecuentemente en pacientes *naïve*, con un 5,73%, siendo más prevalente la **V/I204** con un 4.89%. También se observó que eran ligeramente más frecuentes en el genotipo C, en hombres y HBeAg- (Zhang Q y col., 2015).

Nosotros detectamos, además de las mutaciones detectadas en los pacientes tratados con lamivudina, la mutación **I204** en dos pacientes (3,9%): uno era *naïve* y otro había recibido tres años antes terapia con interferón. Ambos eran genotipo D y HBeAg-.

No es frecuente el fracaso de lamivudina en pacientes sin las mutaciones de resistencia, al contrario que con adefovir. En el presente estudio se detectaron dos casos (4%) en los que los pacientes sí habían cumplido el tratamiento, habían recibido las dosis correctas y lamivudina fracasó, en uno al año de instaurar el tratamiento y en otro a los cuatro años. No se detectaron las mutaciones clásicamente relacionadas con fracaso a lamivudina.

Adefovir dipivoxil induce rápida caída de la viremia con una tasa de selección de resistencias baja: 3% a los 2 años y 29% a los cinco años (Marcellin P y col., 2003; Hadziyannis S y col., 2005; Buti M y col., 2007). Pueden ser más elevadas si existen previamente mutaciones asociadas a análogos (Marcellin P y col., 2008). Las mutaciones relacionadas con resistencia a adefovir son **T236** en el dominio D y **V181** en el dominio B. La **T236** confiere un grado de resistencia mayor que la **V181**. Por otra parte, el grado de resistencia a adefovir es más bajo que a lamivudina por tener menor potencia intrínseca, por lo que con grados más bajos de susceptibilidad se anula su actividad. Existen otras mutaciones secundarias relacionadas con fracaso terapéutico de adefovir como **M84**, **A85** en el dominio A, **T181** en el dominio B, **S215** en el interdominio C-D y **V233**, **H237** y **T/D238** que pueden aparecer sin la **T236** en pacientes que no responden a adefovir (Bartholomeusz A y col., 2006; Schildgen O y col., 2006). En el caso de los pacientes *naïve* en Europa, un 25% no responde al tratamiento con adefovir, esto puede ser debido a la necesidad de tratar con dosis inferiores por la nefrotoxicidad, polimorfismo en el codón **V233** de la RT, mutación **T/S181** seleccionada por lamivudina que crea resistencia cruzada con adefovir o **R217** presente de forma natural en el genotipo A2,

variante del genotipo A que es el más frecuente en Europa (Schildgen O y col., 2006; Thio C y col., 2007; Schildgen O y col., 2004; Chang T y col., 2006; Chueca N y col., 2007).

En nuestro estudio un 32,5% de los pacientes recibió terapia con adefovir. El 9,1% abandonó el tratamiento, sí se obtuvo respuesta virológica en 35,7% y no en el 57,1%. El tiempo medio de fracaso fue de 25,6±17,8 meses, es decir, aunque el porcentaje de fracaso fue sólo ligeramente superior al de otros estudios, el tiempo de fracaso fue mucho más corto. En el 21,4% de los pacientes con adefovir apareció la mutación **T236**: aislada en 7,1% y asociada a **V181** en 14,2%. El nivel de significación para la **T236** fue inferior al 5% ($p < 0,005$). En el 28,5% de los pacientes tratados con adefovir no se obtuvo respuesta y no se observaron mutaciones relacionadas con resistencia a adefovir, porcentaje similar al de otros estudios realizados en Europa, pero en nuestro estudio el 14,3% eran genotipo D, el 7,1% pertenecía al A y otro 7,1% al F. Como ya se ha dicho un objetivo del tratamiento de la hepatitis B crónica es la seroconversión de HBsAg, pero con el tratamiento con análogos existen pocos estudios, parece ser un acontecimiento extraordinario (Zoutendijk R y col., 2011), sin embargo en el presente estudio en dos pacientes (4%) se logró la seroconversión HBsAg tras ser tratados con adefovir.

Entecavir es más potente que lamivudina o adefovir, posee una alta barrera genética y a largo plazo parece capaz de revertir la fibrosis (Chang TT y col., 2010). Las tasas de resistencia a entecavir son de 1.2 % tras cinco años de tratamiento (Tenney DJ y col., 2009; Chang TT y col., 2010), siempre que no existan mutaciones previas que confieran resistencia a lamivudina ya que si se acumulan pueden ser clínicamente significativas y la tasa sube hasta el 19 % tras tres años de tratamiento (Tenney D y col., 2007) y el 57% a los seis años (Tenney DJ y col., 2009). La resistencia a entecavir se relaciona con distintas mutaciones en el gen de la polimerasa: **T169**, **M180** y/o **G184** en el dominio B, **I202** y **V204** en el dominio C y **V250** en el dominio E. La **V250** incrementa la concentración inhibitoria (CI_{50}) en 10 veces mientras que **T169**, **G184** e **I202** tienen poco efecto en la CI_{50} . La resistencia a entecavir es infrecuente, aparece tras una exposición prolongada y siempre junto a mutaciones de resistencia a lamivudina: **M180+V/I204** y **G/S184** o **I/G202** o **V250** (Tenney D y col., 2004; Zoulim F y col., 2009). En estudios *in vitro* se observó que en las cepas que presentaban mutaciones que producían resistencia a lamivudina, para que entecavir fuera efectivo, se necesitaba una concentración mayor, por lo que parece existir cierta resistencia cruzada. Sin embargo, si

estaban presentes **T169** y **V250** o **G184** y **I202**, las cepas se volvían completamente resistentes a entecavir *in vitro* (Zoulim F, 2006).

En este estudio 16,3% de pacientes fueron tratados con entecavir. De ellos, el 57,4 % respondieron al tratamiento y fracasó en el 42,8 %. El tiempo de fracaso fue de $7,7\pm 4,5$ meses. Porcentaje parecido al que en otros estudios se obtiene en pacientes previamente tratados a los seis años, mientras que aquí el tiempo de fracaso fue mucho más corto. En 28,6% de pacientes tratados con entecavir apareció la mutación **G202** con un nivel de significación inferior al 5% ($p<0,005$). Siempre asociada a mutaciones relacionadas con lamivudina: **M180+V204** y **M180+I204**. En una paciente que había recibido terapia con lamivudina y tenía las mutaciones **V80+I204**, apareció la mutación **V250** sin haber recibido terapia previa con entecavir. Con entecavir no se produjo ninguna seroconversión HBsAg.

El tenofovir es un análogo de nucleótidos como adefovir, pero más potente y menos nefrotóxico. Es el fármaco con barrera genética más elevada y hay trabajos que muestran que la falta de respuesta y la aparición de resistencias son excepcionales (Marcellin P y col., 2011; Kitrinos Km y col., 2014). En un estudio multicéntrico europeo con 45 pacientes coinfectados por VIH y VHB tratados con tenofovir en combinación con otros antirretrovirales, dos pacientes presentaron la mutación **T194** junto a otras mutaciones asociadas a resistencia a lamivudina (**M180+V204**) en las semanas 63 y 78 (Sheldon J y col., 2005). La **T194** está asociada a resistencia parcial a tenofovir y disminución de la replicación *in vitro* (Amini-Bavil-Olyae S y col., 2009). Las mutaciones primarias **T236** y **T/V181** pueden ser inducidas por adefovir y tenofovir y conferir resistencia a adefovir. La primera no afecta a lamivudina, telbivudina o entecavir, pero disminuye la eficacia *in vitro* a tenofovir y la segunda reduce la sensibilidad a tenofovir y confiere resistencia parcial a lamivudina y telbivudina (Villet S y col., 2008; Van Bommel F y col., 2010). Debido a esto, en pacientes con estas mutaciones en los que fracasó adefovir, cuando se emplea tenofovir como terapia de rescate, la eficacia antiviral se ve reducida y la eficacia de tenofovir en monoterapia es subóptima en pacientes cargas virales elevadas por recaídas por resistencia a adefovir (Van Bommel F y col., 2010). Otras mutaciones que han mostrado conferir disminución de la sensibilidad *in vitro* e *in vivo* a tenofovir son **G177** y **A249** (Quin B y col., 2013).

En nuestro estudio tenofovir en monoterapia se utilizó en el 44,2% de los pacientes produciéndose respuesta virológica sostenida en todos los casos. En ninguno se seleccionó ninguna mutación relacionada con tenofovir, solamente en uno de ellos había aparecido la mutación **T194** mientras recibía terapia con lamivudina+adefovir, seis años antes de instaurar tratamiento con tenofovir, aunque luego desapareció. Cuatro pacientes en los que había fracasado la terapia con adefovir, recibieron tenofovir en monoterapia sin disminuir su

sensibilidad. Ninguno de los pacientes había presentado mutaciones a adefovir, lo que coincide con otros análisis.

Tenofovir y entecavir se usan en monoterapia como fármacos de primera línea por su alta barrera genética y su capacidad de reducir la viremia. Tras tres años de tratamiento se logra respuesta viral sostenida en la mayoría de los pacientes (Chang TT y col., 2010; Marcellin P y col., 2011; Heathcote EJ y col., 2011), en el caso de entecavir, siempre que no existan mutaciones previas, como ocurrió en este estudio.

Las terapias combinadas poseen unas ventajas teóricas como mayor actividad antiviral y una menor tasa de resistencias y desventajas como mayor coste, mayor toxicidad, interacciones farmacológicas y riesgo de desarrollar resistencias múltiples. No hay datos sobre el beneficio de la terapia combinada con otros antivirales en pacientes no tratados previamente (Lok AS y col., 2011).

Existen estudios de combinación de PEG-IFN con análogos de nucleós(t)idos como lamivudina, adefovir, tenofovir y entecavir (Lau GK y col., 2005; Lutgehetman M y col., 2008; Fleischer RD y col., 2009) y de diferentes análogos como lamivudina con adefovir (Sung JJ y col., 2008) y entecavir con tenofovir (Lok AS y col., 2011), entecavir con adefovir (Lim YS y col., 2012). En estudios de interferón pegilado y lamivudina se observó que al principio, la respuesta era más intensa que en monoterapia, pero la respuesta sostenida al interrumpirlo era similar. La tasa de resistencias a lamivudina fue inferior en el combinado (Janssen HL y col., 2005; Lau G y col., 2005; Chan HLY y col., 2005; Marcellin P y col., 2004). Resultados similares se observaron en estudios realizados combinando adefovir y lamivudina (Sung JJY y col., 2003). En estudios combinando emtricitabina y adefovir, la inhibición de la replicación fue mayor, pero posiblemente debido a la mayor potencia de emtricitabina, no a la combinación (Lau G y col., 2004) y al combinar lamivudina con telbivudina la respuesta también fue más intensa, pero debido a la mayor potencia de telbivudina. En este último estudio además la seroconversión de HBeAg fue inferior en la terapia combinada (Lai CL 2005). La eficacia de entecavir en monoterapia es similar a la de entecavir combinado con tenofovir en pacientes naïve HBeAg+. La terapia combinada sólo resulta beneficiosa en cargas elevadas (Lok AS y col., 2012). Esta falta de efecto sinérgico entre los análogos se debe probablemente a que los dos fármacos usan la misma diana terapéutica, la polimerasa viral. De estos estudios se deduce que la combinación de dos análogos no es más eficaz que el más potente de ellos en monoterapia, pero existe una menor aparición de mutantes resistentes, por lo que actualmente

no se recomienda el uso de tratamientos combinados en pacientes naïve a no ser que se trate de pacientes con enfermedad descompensada en los que es peligroso que desarrollen resistencias. En el caso de haber aparecido alguna resistencia a análogos, el tratamiento combinado parece claramente indicado para evitar resistencias múltiples (Lok A y col., 2007).

En nuestro estudio nunca se utilizó el tratamiento combinado de interferón con un análogo de nucleós(t)ido. En diecinueve ocasiones (46,34%) se combinaron distintos análogos fracasando el 31,6% de las veces y obteniéndose respuesta en el 68,4%. En 9 de los tratamientos combinados que tuvieron éxito formaba parte tenofovir (75%).

Es destacable el hecho que en todos los pacientes excepto uno, el tratamiento combinado se instauró cuando existían mutaciones previas.

El tratamiento de lamivudina más adefovir se empleó en ocho ocasiones (18,6%), fracasando el 62,5% de las veces. Los pacientes en los que se alcanzó la respuesta virológica tenían asociaciones de mutaciones previas a la instauración del tratamiento, todas relacionadas con resistencia a lamivudina y no apareció ninguna nueva: **M180±V204±I204±V80**. En los que el tratamiento fracasó también se detectaron distintas asociaciones de mutaciones, unas previas al tratamiento **V181±M180±I204±V204±I80** y solamente en un paciente apareció la **T236** durante la terapia. En este estudio, este tratamiento combinado en pacientes con alguna resistencia previa a análogos no parece indicado, al contrario que en determinados análisis (Sung JJ y col., 2008).

El tratamiento combinado de lamivudina más entecavir se empleó únicamente en un paciente. Previamente presentaba mutaciones que conferían resistencia a lamivudina: **M180+I204** además de la compensatoria **V80**. La terapia fracasó a los 2,23 meses de instaurarse, no tras un tratamiento prolongado como indican algunos estudios (Tenney D y col., 2004; Zoulim F y col., 2009). La mutación **G202** apareció siendo su nivel de significación fue inferior al 5% ($p < 0,05$). El tratamiento de lamivudina más tenofovir se empleó en 9,3% de los pacientes en los que se instauró tratamiento. Las mutaciones que presentaban los pacientes previamente eran **V181±T236±I204±L250** y la compensatoria **V80**. No hubo fracaso virológico, probablemente no por la combinación de fármacos, sino por la potencia de tenofovir, como indican otros estudios. En un paciente que no había recibido terapia previa, se empleó este tratamiento y hubo respuesta virológica sostenida.

El tratamiento combinado de adefovir más entecavir se empleó en un paciente que tenía como mutaciones previas **I204** y **V80** (compensatoria). No hubo fracaso virológico ni aparecieron nuevas resistencias en nuestro caso, de acuerdo con otros estudios (Lim YS y col., 2012).

En un estudio en pacientes naïve (Lok y col., 2012), entecavir en monoterapia es comparable a entecavir más tenofovir y la terapia combinada era beneficiosa en pacientes con carga viral superior a 10⁸ UI/mL. En este estudio la terapia combinada de tenofovir con entecavir se empleó en tres pacientes (7%) con las mutaciones **M180±V181±V204±T236±G202** y la compensatoria **V80**. La carga media era de 178.000 UI/mL, no aparecieron mutaciones ni hubo fracaso virológico, probablemente debido a tenofovir, ya que en dos pacientes estaban presentes las mutaciones **M180+V204+G202**.

En dos pacientes (4,6%) se utilizó tenofovir más emtricitabina. Uno tenía previamente las mutaciones **V181** y **T236** y el otro era un paciente naïve. No aparecieron mutaciones ni hubo fracaso virológico, como señala un estudio en el que se recomienda este tratamiento combinado cuando falla adefovir (Santos SA y col., 2006), en cambio en fracaso a lamivudina sólo sería necesario tenofovir (Fung S y col., 2014).

Las mutaciones en PBC y en *precore* aumentan la eficacia de la replicación viral en mutantes resistentes a lamivudina (Tacke F y col., 2004).

En este estudio se cruzaron las frecuencias de las mutantes *precore/core* con las de las distintas mutaciones en la polimerasa no obteniéndose ninguna con un nivel de significación inferior al 5% ($p < 0,05$). La mutación **BCP A1762/A1764** no asoció ninguna mutación en la polimerasa. De las dieciocho que presentaban mutación en **BCP T1762/A1764**, en el 83,3% no se detectó ninguna mutación relacionada con resistencia a lamivudina. En el 16,7% se detectaron aisladas o asociadas: **V80** (compensatoria), **V204** e **I204**. En los pacientes que presentaron asociadas mutaciones en PBC y mutaciones relacionadas con lamivudina, la media de las cargas virales al fracasar fue de 2.000.000 copias/mL, mientras que la media de fracaso para lamivudina en general fue de 29.000.000 copias/mL, lo que contradice otros análisis ya que en este estudio la mutación PBC asociada a mutaciones a lamivudina no aumenta la replicación viral. En el caso de la mutación **PC codón 28**, el 76,2% no presentaron ninguna mutación en el gen de la polimerasa. En el 23,8% restante aparecieron las siguientes mutaciones relacionadas con resistencia a lamivudina aisladas o asociadas: **V80**, **I80** (compensatorias), **V204**, **I204** y **M180**. La media de las cargas al fracasar lamivudina fue de 8.000.000 copias/mL y como en el caso anterior, la carga media de fracaso fue más baja que la de lamivudina en general, lo que tampoco coincide con estudios que afirman que la asociación de mutaciones en *precore* y mutaciones relacionadas con lamivudina aumenta la replicación viral.

Diversos autores han relacionado el genotipo con el curso de la infección y la respuesta a los distintos tratamientos (Kramvis y cols., 2005; Liaw YF y cols., 2010; McMahon BJ. 2009).

En el tratamiento con análogos, parece que la resistencia a lamivudina aparece antes en el genotipo A que en el D (Zollner B y col., 2004; Chien RN y col., 2003), y que el genotipo A responde peor a adefovir (Buti M y col., 2007). Desde el punto de vista clínico, los genotipos A y B responden mejor a antivirales que C o D (Gao y cols., 2015).

En nuestro estudio se analizaron las distintas mutaciones de resistencia a antivirales en relación a los genotipos encontrados y no se encontró ninguna relación significativa, al contrario que otros análisis. El mayor porcentaje de mutaciones se dio en el genotipo D (55,3%), probablemente por ser el genotipo más frecuente en el estudio, no porque la respuesta a antivirales sea peor.

En nuestro país, el genotipo A tiene mejor pronóstico que el D ya que las tasas de aclaramiento de HBsAg son mayores y se produce remisión sostenida tras la seroconversión a HBeAg- (Sánchez-Tapias JM y col., 2002). Con respecto a los antivíricos, parece que la resistencia a lamivudina aparece antes en el genotipo A que en el D (Zollner B y col., 2004; Chien RN y col., 2003), y que el genotipo A responde peor a adefovir (Buti M y col., 2007).

En el caso de adefovir, en nuestro estudio, los fracasos se dieron en el 87,5% de las veces en el genotipo D frente a un 12,5% del genotipo A, al contrario que en otros estudios. En el caso de la lamivudina, tuvo más porcentaje de fracaso el genotipo D que el A, lo que sí se corresponde con otros análisis que señalan que tiene mejor pronóstico.

1. El diagnóstico de una infección por VHB en cualquiera de sus fases aguda o crónica debe implicar el estudio de VHC, VIH, y especialmente VHD, debido a la frecuencia e importancia de las coinfecciones. Es necesario concienciar a los clínicos de la importancia de estudiar la coinfección de VHB con VHC, VIH y especialmente VHD.
2. No se han detectado infecciones ocultas (OBIs), a pesar de estar en un área de alta prevalencia según algunos estudios.
3. La frecuencia del genotipo D en nuestro estudio fue de un 52,9 % similar a lo publicado en la literatura, sin embargo la frecuencia del genotipo A es de un 29,9 % un 10% inferior a los estudios previos en nuestro medio. La frecuencia del genotipo D en España es del 48 % y del A del 39%. En este estudio la frecuencia del D fue ligeramente superior (52,9%) y la del A, inferior (29,9%).
4. La mutación *pre core* (PC) /codón 28/ más frecuente en nuestro estudio fue la codón 28 que se detectó en el 75% de los casos HBeAg- en consonancia con las comunicaciones publicadas al respecto.
5. Sin embargo, las mutaciones del Promotor Básico del core (PBC) se detectaron en la misma proporción, 75%, siendo la más abundante la **PBC T17627A1764** (64,3%). En contraste con lo publicado por otros estudios que recogen una menor prevalencia.
6. Tanto la mutación *precore* PC codón 28 como las mutaciones del Promotor Básico del core PBC se asocian con mayor frecuencia al genotipo D (59,2% y 40% respectivamente) y al A (13,3% y 26,6%) en concordancia con la literatura si bien en el caso de genotipo A se observa una mayor asociación de la mutación *precore*
7. Ocho pacientes hicieron seroconversión HBeAg (15,7%), sin encontrar relación con el genotipo o el tratamiento.
8. Cinco pacientes hicieron seroconversión HBsAg, uno en tratamiento con interferón y el resto con análogos de nucleótidos en un tiempo inferior a cinco años, sin relación con los distintos genotipos.
9. Se detectaron mutaciones de resistencia relacionadas con distintos análogos antes de instaurarse tratamiento con los mismos en dos ocasiones antes de lamivudina (**I204**), una sin instaurar entecavir (**V250**) y una antes de instaurar tenofovir (**T194**), por lo que parece interesante realizar estudio de mutaciones de resistencia también en pacientes *naïve* antes de instaurar tratamiento.

10. En dos casos de los fracasos a lamivudina no se detectaron mutaciones ni se observa infradosificación o incumplimiento del tratamiento, hecho no recogido en los estudios revisados
11. Según los resultados, los tratamientos combinados parecen tener la misma eficacia que el más potente por separado.
12. Tenofovir consiguió en el 100% de los casos respuesta viral en pacientes cumplidores del tratamiento por lo se puede postular como fármaco de elección en estos casos
13. No se encontró relación entre mutaciones de resistencia y genotipos.

Abramovitch R, Tavor E, Jacob-Hirsch J, Zeira E, Amariglio N, Appo O, Rechavi G, Galun E, Honigman A. A pivotal role of cyclic AMP-responsive element binding protein in tumor progression. *Cancer Res* 2004; 64:1338-1346.

Akahane Y, Yamanaka T, Suzuki H, Sugai Y, Tsuda F, Yotsumoto S, Omi S, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. Chronic active hepatitis with hepatitis B virus DNA and antibody against e antigen in the serum. Disturbance synthesis and secretion of e antigen, from hepatocytes due to a point mutation in the precore region. *Gastroenterology* 1990; 99:1113-1119.

Allain P. Occult hepatitis B virus infection. *Transfus Clin Biol* 2004; 11:18-25.

Allen M, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL, Brown N, Condeary LD. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. *Hepatology* 1998; 27: 1670-1677.

Alter MJ. Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. *J Hepatol* 2003; 39: S64-69.

Álvarez-Estévez, Chueca Porcuna N, Guillot Suay V, Peña Monje A, García García F, García García F. Baja prevalencia de resistencias primarias frente al virus de la hepatitis B en el sur de España. *Enferm Infecc Microbiol Clín* 2013; 31: 520-522.

Amini-Bavil-Olyae S, Herbers U, Sheldon J, Luedde T, Trautwein C, Tecke F. The rtA194T polymerase mutation impacts viral replication and susceptibility to tenofovir in hepatitis B e antigen-positive and hepatitis B e antigen-negative hepatitis B virus strain. *Hepatology* 2009; 49:1158-1165.

Ampertico P, Del Ninno E, Viganò M, Romeo R, Donato MF, Sablon E, Morabito A, Colombo M. Long-term suppression of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B by 24 month interferon therapy. *Hepatology* 2003; 37: 756-763.

Andrisiani OM, Barnabas S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol* 1999; 15: 373-379.

Asabe S, Wieland SF, Chattopadhyay PK, Roederer M, Engle RE, Purcell RH, Chisari FV. The size of the viral inoculum contributes to the outcome of hepatitis B virus infection. *J Virol* 2009; 83: 9652-9662.

Asociación Española para el estudio del Hígado, Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Sociedad Española de Higiene y Medicina Preventiva Hospitalaria. Sociedad

Española de Medicina Familiar y Comunitaria. Sociedad Española de Pediatría. Recomendaciones sobre estrategias de inmunización para la prevención de la hepatitis B. *Med Clin* 1994; 103: 426-435.

Barnabas S, Hai T, Andrisiani OM. The hepatitis B virus X protein enhances the DNA binding potential and transcription efficacy of bZip transcription factors. *J Biol Chem* 1997; 272: 20684-20690.

Bartenschlager R, Schaller H. Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *EMBO J* 1992; 11: 3413-3420.

Bartenschlager R, Schaller H. The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome -linked protein) believed to prime reverse transcription. *EMBO J*. 1988; 7: 4185-92.

Bartholomeusz A, Locarnini S. Hepatitis B virus mutations associated with antiviral therapy. *J Med Virol* 2006; 78 (Supl 1): 52-55.

Bartholomeusz A, Locarnini SA. Antiviral drug resistance: clinical consequences and molecular aspects. *Semin Liver Dis* 2006; 26: 162-170.

Basuni AA, Butterworth L, Cooksley G, Locarnini S, Carman WF. Prevalence of HBsAg mutants and impact of hepatitis B infant immunisation in four Pacific Island countries. *Vaccine* 2004; 22: 2791-2799.

Baumert TF, Rogers SA, Hasegawa K, Liang TJ. Two core promotor mutations identified in a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis result in enhanced viral replication. *J Clin Invest* 1996; 98: 2268-2276.

Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 48-64.

Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 39: 222-230.

Bedossa P, Poynard T. The METAVIR Cooperative Study Group. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996; 24: 289-293.

Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 1995; 376: 167-170.

Bertoletti A, Ferrari C, Fiaccadori F, Penna A, Margolskee R, Schlicht HJ, Fowler P, Guilhot S, Chisari FV. HLA class I-restricted human cytotoxic T cells recognize endogenously synthesized hepatitis B virus nucleocapside antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10445-10449.

Bertoletti A, Kennedy PT. The immune tolerant phase of chronic HBV infection: new perspectives on an old concept. *Cell Mol Immunol* 2014; Epub ahead of print.

Blumberg BS, Alter HJ and Visnisch S. A new antigen in leukemia sera. *JAMA*. 1965; 191: 541-546.

Blumberg BS, Larouze B, London WY, Werner B, Hesser JE, Millman I, Saimot G, Payet M. The relation of infection with the hepatitis B virus to primary hepatic carcinoma. *Am J Pathol* 1975; 81: 669-682.

Boeck K, Mempel M, Schmidt T, Abeck D. Gianotti-Crosti syndrome: Clinica, serologic and therapeutic data for nine children. *Cutis* 1998; 62: 271-274; quiz 286.

Boletín epidemiológico. Centro Nacional de Epidemiología. Ministerio de Ciencia e Innovación. 2013; Vol. 21 n° 12/143/160 (consultado Noviembre 2014). Disponible en: <http://revista.isciii.es/public/journals/1/pdf.174.pdf>

Bonino F, Brunetto MR. Chronic hepatitis B e antigen (HBeAg) negative, antigen HBe positive hepatitis B: an overview. *J Hepatol* 2003; 39 (Supl 1): 160-163.

Bonnino F, Marcellin P, Lau GK, Hadziyannis S, Jin R, Piratvisuth T, Germanidis G, Yurdaydin C, Diago M, Gurel S, Lai MY, Brunetto MR, Farci P, Popescu M, McCloud P. Peginterferon Alfa-2a HBeAg-Negative Chronic Hepatitis B Study Group. Predicting response to peginterferon alpha-2a, lamivudine and the two combined for HBeAg negative chronic hepatitis B. *Gut* 2007; 56: 699-705.

Bortolotti F, Jara P, Crivellaro C, Hierro L, Cadrobbi P, Frauca E, Camarena C, De La Vega A, Diaz C, De Moliner L, Noventa F. Outcome of chronic hepatitis B in caucasian children during a 20 year observation period. *J Hepatol* 1998; 29: 184-190.

Bosch B, Bartenschlager R, Radziwill G, Schaller H. The duck hepatitis B virus P-gene codes for protein strongly associated with the 5'-end of the viral DNA minus strand. *Virology* 1988; 166: 475-85.

Botha JF, Ritchie MJJ, Dusheiko GM, Mouton HWK, Kew MC. Hepatitis B virus carrier state in Black Children in Ovamboland: role of perinatal and horizontal transmission. *Lancet* 1984; 2: 1210-1212.

Bouchard MJ, Schneider RJ. The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *J Virol* 2004; 78: 12725-12734.

Bouchard MJ, Wang LH, Schneider Rj. Calcium signalling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication. *Science* 2001; 294: 2376-8.

Bouffard P, Lameelin JP, Zoulim F, Pichoud C, Trepo C. Different forms of hepatitis B virus DNA and expression of HBV antigens in peripheral blood mononuclear cells in chronic hepatitis B. *J Med Virol* 1990; 31: 312-317.

Bouffard P, Lameelin JP, Zoulim F, Lepot D, Trepo C. Phytohemagglutinin and concanavalin A activate hepatitis B virus in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Med Virol* 1992; 37: 255-262.

Brechot C, M Hadchouel, J Scotto, M Fonck, F Potet, Vyas GN, Tiollais P. State of hepatitis B virus DNA in hepatocytes of patients with hepatitis B surface antigen-positive and –negative liver diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 3906-3910.

Bréchet C, Kremsdorf D, Soussan P, Pineau P, Dejean A, Paterlini-Bréchet P, Tiollais P. Hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC): Molecular mechanisms and novel paradigms. *Pathol Biol* 2010; 58: 278-287.

Brechot C, Pourcel C, Louise A, Rain B, Tiollais P. Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature* 1980; 286: 533-535.

Bréchet C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S, Paterlini-Bréchet P. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely “occult”? *Hepatology* 2001; 34: 194-203.

Brunetto MR, Giarin MM, Oliveri F, Chiaberge E, Baldi M, Alfarano A, Serra A, Saracco G, Verme G, Will H. Wild-type and e antigen minus hepatitis B viruses and course of chronic hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4186-4190.

Bruss V, Gerhardt E, Vieluf K, Wunderlich G. Functions of the large hepatitis B virus surface protein in viral particle morphogenesis. *Intervirology* 1996; 39: 23-31.

Bruss V. A short linear sequence in the pre –S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation. *J Virol* 1997; 71: 9350-9357.

Buckwold VE, Xu Z, Chen M, Yen TS, Ou JH. Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J Virol* 1996; 70: 5845-5851.

Buendía MA. Hepatitis B viruses and cancerogenesis. *Biomed Pharmacother* 1985; 52: 34-43.

Buster EH, Flink HJ, Cakaloglu Y, Simon K, Trojan J, Tabak F, So TM, Feinman SV, Mach T, Akarca US, Schutten M, Tielemans W, van Vuuren AJ, Hansen BE, Janssen HL. Sustained HBeAg and HBsAg loss after long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with peginterferon alpha-2b. *Gastroenterology* 2008; 135: 459-467.

Buti M, Elefsiniotis I, Jardi R, Vargas V, Rodriguez-Frias F, Schapper M, Bonovas S, Esteban R. Viral genotype and baseline load predict the response to adefovir treatment in lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients. *J Hepatol* 2007; 47: 366-372.

Buti M, García-Samaniego J, Prieto M, Rodríguez M, Sánchez-Tapias JM, Suárez E, Esteban R. Documento de consenso de la AEEH sobre el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis B (2012). *Gastroenterol Hepatol* 2012; 35: 512-528.

Bzowej NH. Hepatitis B. Therapy in pregnancy. *Curr Hepat Rep* 2010; 9: 197-204.

Cabrerizo M, Bartolomé J, Caramelo C, Barril G, Carreño V. Molecular analysis of hepatitis B virus DNA in serum and peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B surface antigen-negative cases. *Hepatology* 2000; 32: 116-123.

Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *New Engl J Med* 1999; 341: 22-26.

Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey M, Makris A, Thomas HC. Mutation preventing formation of e antigen in patients with chronic HBV infection. *Lancet* 1989; 2: 588-591.

Carman WF, Korula J, Wallace L, MacPhee R, Mimms L, Decker R. Fulminant reactivation of hepatitis B due to envelope protein mutant that escaped detection by monoclonal HBsAg ELISA. *Lancet* 1995; 345: 1406-1407.

Carman WF, Zanetti AR, Karayannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990; 336: 325-329.

Carneiro de Moura M, Marinho Rui. Historia natural y manifestaciones clínicas de la hepatitis crónica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26 (Supl 7): 11-18.

Carrión JA. Utilidad del Fibroscan® para evaluar la fibrosis hepática. *Gastroenterol Hepatol* 2009; 32: 415-423.

Caselmann WH, Meyer M, Kekulé AS, Lauer U, Hofschneider PH, Koshy R. A trans-activator function is generated by integration of hepatitis B virus pres/S sequences in human hepatocellular carcinoma DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2970-2974.

Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo. Estudio seroepidemiológico: situación de las enfermedades vacunables en España. Madrid. 2000 (consultado Nov 2014). Disponible en <http://www.iciiii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-científico-técnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/SEROEPIDEMIOLOGICO.pdf>

Chakravarty R, Neogi M, Roychowdhury S, Panda CK. Presence of hepatitis B surface antigen mutant G145R DNA in the peripheral blood leukocytes of the family members of an asymptomatic carrier and evidence of its horizontal transmission. *Virus Res* 2002; 90: 133-141.

Chan HL, Heathcote EJ, Marcellin P, Lai CL, Cho M, Moon YM, Chao YC, Myers RP, Minuk GY, Jeffers L, Sievert W, Bzowej N, Harb G, Kaiser R, Qiao XJ, Brown NA; 018 Study Group. Treatment of hepatitis B e antigen positive chronic hepatitis with telbivudine or adefovir: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007; 147: 745-754.

Chan HL, Hussain M, Lok AS. Different hepatitis B virus genotypes are associated with different mutations in the core promoter and precore regions during hepatitis B e antigen seroconversion. *Hepatology* 1999; 29: 976-984.

Chan HLY, Hui AY, Wong VWS, Chim AML, Wong ML, Sung JJY. Long-term follow up of peginterferon and lamivudine combination treatment in HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Hepatology* 2005; 41:1357-1364.

Chan PC, Chen HL, Kong MS, Huang FC, Lee HC, Lin CC, Liu CC, Lee IH, Wu TC, Wu SF, Ni YH, Hsu HY, Chang MH. Factors affecting the mortality of pediatric fulminant hepatic failure in relation to hepatitis B virus infection. *Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1223-1227.

Chang MH, Hwang LY, Hsu HC, Lee Cy, Beasley RP. Prospective study of asymptomatic HBsAg carrier children infected in the perinatal period: clinical and liver histologic studies. *Hepatology* 1998; 8: 374-377.

Chang T, Lai C. Hepatitis B virus with primary resistance to adefovir. *N Engl J Med* 2006; 355: 322-323.

Chang TT, Lai CL, Kew Yoon S, Lee SS, Coelho HS, Carrilho FJ, Poordad F, Halota W, Horsmans Y, Tsai N, Zhang H, Tenney DJ, Tamez R, Iloeje U. Entecavir treatment for up to 5 years in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Hepatology* 2010; 51: 422-430.

Chang TT, Liaw YF, Wu SS, Schiff E, Han KH, Lai CL, Safadi R, Lee SS, Halota W, Goodman Z, Chi YC, Zhang H, Hindes R, Iloeje U, Beebe S, Kreter B. Long-term entecavir therapy results in the reversal of fibrosis/cirrhosis and continued histological improvement in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2010; 52: 886-893.

Chaudhuri V, Tayal R, Nayak B, Acharya SK, Panda SK. Occult hepatitis B virus infection in chronic liver disease: full-length genome and analysis of mutant surface promoter. *Gastroenterology* 2004; 127: 1356-1371.

Chemin I, Vermot-Desroches C, Baginski I, Saurin JC, Laurent F, Zoulim F, Bernaud J, Lamelin JP, Hantz O, Rigal D. Selective detection of human hepatitis B virus surface and core antigens in peripheral blood mononuclear cell subsets by flow cytometry. *J Viral Hepat* 1994; 1: 39-44.

Chen BF, Liu CJ, Jow GM, Chen PJ, Kao JH, Chen DS. High prevalence and mapping of preS deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. *Gastroenterology* 2006; 130: 1153-1168.

Chen CH, Hung CH, Lee CM, Hu TH; Wang JH, Wang JC, Lu SN, Changchien CS. Pre-S deletion and complex mutations of hepatitis B virus related to advanced liver disease in HBeAg- negative patients. *Gastroenterology* 2007; 133: 1466-1474.

Chen Cj, Yang HI, Su J, Jen CI, You SL, Lu SN, Huang GT, Iloeje UH, REVEAL-HBV Study Group. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient for serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006; 295: 65-73.

Chen HS, Kanako S, Girones R, Anerson RW, Hornbuckle WE, Tennant BC, Cote PJ, Gerin JL, Purcell RH, Miller RH. The woodchuck hepatitis virus X gene is important for the establishment of virus infection in woodchucks. *J Virol* 1993; 67: 1218-1226.

Chien RN, Liaw YF, Chen TC, Yeh CT, Sheen IS. Efficacy of thymosin alpha-1 in patients with chronic type B hepatitis: a randomized controlled trial. *Hepatology* 1998; 27: 1383-1387.

Chien RN, Lin CY, Yeh CT, Liaw YF. Hepatitis B virus genotype B is associated with better response to thymosin alpha-1 therapy than genotype C. *J Viral Hepat* 2006; 13:845-850.

Chien RN, Yeh CT, Tsai DL, Chu CM, Liaw YF. Determinants for sustained HBeAg response to lamivudine therapy. *Hepatology* 2003; 38:1267-1273.

Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 29-60.

Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol Biol* 2010; 58: 258-266.

Cholongitas E, Papatheodoridis GV, Burroughs AK. Liver grafts from antihepatitis B core positive donors: a systematic review. *J Hepatol* 2010; 52: 272-279.

Chu CJ, Hussain M, Lok AS. Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier seroconversion compared with hepatitis B genotype C. *Gastroenterology* 2002; 122: 1756-1762.

Chu CJ, Keeffe EB, Han SH, Perrillo RP, Min AD, Soldevila-Pico C, Carey W, Brown RS, Luketic VA, Terrault N, Lok AS. Hepatitis B virus genotypes in the United States: results of a nationwide study. *Gastroenterology* 2003; 125: 444-451.

Chu CM, Liaw YF. HBsAg seroclearance in asymptomatic carriers of high endemic areas: appreciably high rates during a long-term follow-up. *Hepatology* 2007; 45: 1187-1192.

Chu CM, Liaw YF. Intrahepatic distribution of hepatitis B surface and core antigens in chronic hepatitis B virus infection. Hepatocyte with cytoplasmic/membranous hepatitis B core antigen as a possible target for immune hepatocytolysis. *Gastroenterology* 1987; 92: 220-225.

Chu CM, Yeh CY, Liaw YF. Low level viremia and intracellular expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in HBsAg carriers with concurrent hepatitis C infection. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2084-2086.

Chu CM. Natural history of chronic hepatitis B virus infection in adults with emphasis on the occurrence of cirrosis and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: E25-30.

Chu G, Chang E. Xeroderma pigmentosum group E cells lack a nuclear factor that binds to damaged DNA. *Science* 1988; 242:564-567.

Chueca N, Nogales C, Rodríguez F, Sheldon J, Romero P, Peña A. Hepatitis B virus (HBV) genotyping may influence therapeutics decisions in chronic hepatitis B. 5th European Drug Resistance Workshop. Cascais. 28-30 March 2007 (abstract 88). *Rev Antivir Ther* 2007; 2:86.

Coffin CS, Michalak TI. Persistence of infectious hepadnavirus in the offspring of woodchuck mothers recovered from viral hepatitis. *J Clin Invest* 1999; 104:203-212.

Coffin CS, Mulrooney-Cousins PM, Osiowy C, van der Meer F, Nishikawa S, Michalak TI, van Marle G, Gill MJ. Virological characteristics of occult hepatitis B virus in a North American cohort of human immunodeficiency virus type 1-positive patients on dual active anti HBV/HIV therapy. *J Clin Virol* 2014; 60:347-353.

Coffin CS, Mulrooney-Cousins PM, Peters MG, van Marle G, Roberts JP, Michalak TI, Terrault NA. Molecular characterization of intrahepatic and extrahepatic hepatitis B virus (HBV) reservoirs in patients on suppressive antiviral therapy. *J Viral Hepat* 2011; 18: 415-423.

Coffin CS, Mulrooney-Cousins PM, van Marle G, Roberts JP, Michalak TI, Terrault NA. Hepatitis B virus quasispecies in hepatic and extrahepatic viral reservoirs in liver transplant recipients on prophylactic therapy. *Liver Transpl* 2011; 17: 955-962.

Collins JM, Raphael KL, Terry C, Cartwright EJ, Pillai A, Anania FA, Farley MM. Hepatitis B virus reactivation during successful treatment of hepatitis C virus with sofosbuvir and simeprevir. *Clin Infect Dis* 2015; 61: 1304-1306.

Cortés L, Dominguez M, Simón MA. Hepatitis B. Libro de Gastroenterología y Hepatología. Problemas comunes en la práctica clínica. 2^a Edición. Editores: Montoro, M A.; García Pagán, JC. Editorial: Jarpyo. 2012. P: 769-786.

Cougot D, Wu Y, Cairo S, Caramel J, Renard CA, Levy L, Buendía MA, Neuveut C. The hepatitis B virus X protein functionally interacts with CREB-binding protein/p300 in the regulation of CREB-mediated transcription. *J Biol Chem* 2007; 282: 4277-4287.

Courgaset P, Yvonnet B, Bourdil C, Mevelec MN, Adamowicz P, Barrès JL, Chotard J, N'Doye R, Diop Mar I, Chiron JP. HBsAg positive reactivity in men not due to hepatitis B virus. *Lancet* 1987; 12: 2(85729): 1354-1358.

Crowther RA, Kiselev NA, Bottcher C, Berriman JA, Borisova GP, Ose V, Pumpens P. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* 1994; 77: 943-950.

Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen associated hepatitis. *Lancet*. 1970; 1: 695-8.

De Gaspari G, Bardare M, Constantino D. AU antigen in Crosti-Gianotti acrodermatitis. *Lancet* 1970; 1: 1116-1117.

De Vries-Sluijs TE, Reijnders JG, Hansen BE, Zaaijer HL, Prins JM, Pas SD, Schutten M, Hoepelman AI, Richter C, Mulder JW, de Man RA, Janssen HL, van der Ende ME. Long-term therapy with tenofovir is effective for patients co-infected with human immunodeficiency virus and hepatitis B virus. *Gastroenterology* 2010; 139: 1934-1941.

Dejean A, Sonigo P, Wain-Hobson S, Tiollais P. Specific hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma DNA through a viral 11 base pair direct repeat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 5350-4.

Del Canho R, Grosheide PM, Mazel JA, Heijntink RA, Hop WC, Gerards LJ, de Gast GC, Fetter WP, Zwijneberg J, Schalm SW. Ten-year neonatal hepatitis B vaccination program. The Netherlands, 1982-1992: protective efficacy and long-term immunogenicity. *Vaccine* 1997; 15: 1624-1630.

Desaintes C, Demeret C, Goyat S, Yaniv M, Thierry F. Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *EMBO J* 1997; 16: 504-514.

Dubois MF, Pourcel C, Rousset S, Chany C, Tiollais P. Excretion of hepatitis B surface antigen particles from mouse cells transformed with cloned viral DNA *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 4549-4553.

EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* 2009; 50: 227-242.

EASL. International Consensus Conference on Hepatitis B. Consensus statement. *J Hepatol* 2003; 39: S3-26.

Echevarría JM, Avellón A, Magnius LO. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Spain: Identification of viral genotypes and prediction of antigenic subtypes by limited sequencing. *J Med Virol* 2005; 76: 176-184.

Echevarría JM, León P, Domingo CJ, López JA. Atypical hepatitis B virus in Spain?. *Lancet* 1988; 3: 2 (8623): 1315-1316.

Farcy P. Treatment of chronic hepatitis B: New advances, old challenges. *Hepatology* 2006; 44: 536-539.

Fares MA, Holmes EC. Revised evolutionary history of hepatitis B virus (HBV). *J Mol Evol* 2002; 54: 807-14.

Fattovich G, McIntyre G, Thursz M, Colman K, Giuliano G; Alberti A, Thomas HC, Carman WF. Hepatitis B virus precore/core variation and interferon therapy. *Hepatology* 1995; 22: 1355-1362.

Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004; 127: S35-S50.

Feitelson MA, Marion PL, Robinson WS. Core particles of hepatitis B virus and ground squirrel hepatitis virus. II. Characterization of protein kinase reaction associated with ground squirrel hepatitis virus and hepatitis B virus. *J. Virol.* 1982; 43: 741-8.

Fergin P. Gianotti-Crosti syndrome, non parenterally acquired hepatitis B with a distinctive exanthem. *Med J Aust* 1983; 1: 175-176.

Ferrari C, Missale G, Boni C, Urbani S. Immunopathogenesis of hepatitis B. *J Hepatol* 2003; 39 (Supl 1): S36-42.

Ferrari C, Penna A, Bertoletti A, Valli A, Antoni AD, Giuberti T, Cavalli A, Petit MA, Fiaccadori F. Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol* 1990; 145: 3442: 3449.

FitzSimons D, Hendrickx D, Vorsters A, Van Damme P. Hepatitis B vaccination: a completed schedule enough to control HBV lifelong? *Vaccine* 2013; 31: 584-590.

Fleischer RD, Lok AS. Myopathy and neuropathy associated with nucleos(t)ide analog therapy for hepatitis B. *J Hepatol* 2009; 51: 787-91.

Flink HJ, Sprengers D, Hansen BE, van Zonneveld M, de Man RA, Schalm SW, Janssen HL; HBV 99-01 Study Group. Flares in chronic hepatitis B patients induced by the host or the virus? Relation to treatment response during peg-interferon (alpha)-2b therapy. *Gut* 2005; 54: 1604-1609.

Fleischer RD; Lok AS. Myopathy and neuropathy associated with nucleos(t)ide analog therapy for hepatitis B. *J Hepatol* 2009; 51:787-791.

Fried MW, Piratvisuth T, Lau GK, Marcellin P, Chow WC, Cooksley G, Luo KX, Paik SW, Liaw YF, Button P, Popescu M. HBeAg and hepatitis B virus DNA as outcome predictors during therapy with peginterferon alfa-2a for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Hepatology* 2008; 47: 428-434.

Fung S, Kwan P, Fabri M, Horban A, Pelemis M, Hann HW, Gurel S, Caruntu FA, Flaherty JF, Massetto B, Dinh P, Corsa A, Subramanian GM, McHutchison JG, Hsu P, Gane E. Randomized comparison of

tenofovir disoproxil fumarate vs emtricitabine and tenofovir disoproxil fumarate in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2014; 146: 980-988.

Fung SK, Chae HB, Fontana RJ, Coonjeevaram H, Marrero J, Oberhelman K, Hussain M, Lok ASF. Virological response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2006; 44:283-290.

Funk ML, Rosenberg DM, Lok ASF. World-wide epidemiology of HBeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants. *J Viral Hepat* 2002; 9: 52-61.

Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004; 350: 1118-1129.

Ganem D, Schneider RJ. Hepadnaviridae: The viruses and their replication. Knipe D, Howley P, Ed, *Fundamental Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 2001: 1285-1331.

Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem*. 1987; 56: 651-93.

Gao S, Duan ZP, Coffin CS. Clinical relevance of hepatitis B virus variants. *World J Hepatol* 2015; 7: 1086-1096.

García Bermejo I. Anomalías y patrones serológicos infrecuentes de los marcadores diagnósticos del virus de la hepatitis B. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25 (Supl 3): 21-28.

Gerberding JL. Incidence and prevalence of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, and cytomegalovirus among health care personal at risk for blood exposure: Final report from a longitudinal study. *J Infect Dis* 1994; 170: 1410-1417.

Gerhlich WH. Diagnostic problems caused by HBsAg mutants-a consensus report of an expert meeting. *Intervirology* 2004; 47: 310-313.

Gerlich WH. The enigma of concurrent hepatitis surface antigen (HBsAg) and antibodies to HBsAg. *Clin Infec Dis* 2007; 44: 1170-1172.

Gibb R, Nimmo GR, O'Loughlin P, Lowe P, Drummond D. Detection of HBsAg mutants in a population with a low prevalence of hepatitis B virus infection. *J Med Virol* 2007; 79: 351-355.

Gilbert RD, Wiggenlikhuizen J. The clinical course of hepatitis B virus-associated nephropathy. *Pediatr Nephrol* 1994; 8: 11-14.

Giles M, Visvanathan K, Sasadeusz J. Antiviral therapy for hepatitis B infection during pregnancy and breastfeeding. *Antivir Ther* 2011; 16: 621-628.

Guidotti LG, Matzke B, Pasquinelli C, Schoenberger JM, Rogler CE, Chisari FV. The hepatitis B virus (HBV) precore protein inhibits HBV replication in transgenic mice. *J Virol* 1996; 70: 7056-7061.

Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 1999; 284: 825-829.

Guillevin L, Mahr A, Callard P, Godmer P, Pagnoux C, Leray E, Cohen P; French Vasculitis Study Group. Hepatitis B virus related polyarteritis nodosa: clinical characteristics, outcome, and impact of treatment in a 115 patients. *Medicine (Baltimore)* 2005; 84: 313-322.

Günther S, Fischer T, Pult T, Sterneck M. Naturally occurring variants of hepatitis B virus. *Adv Virus Res* 1999; 52: 25-137.

Günther S, Sommer G, Iwanska A, Will H. Heterogenicity and common features of defective hepatitis B virus genomes derived from spliced pregenomic RNA. *Virology* 1997; 65: 5539-5543.

Guo W, Chen M, Yen TS, Ou JH. Hepatocyte-specific expression of the hepatitis B virus core promoter depends on both positive and negative regulation. *Mol Cell Biol.* 1993; 13: 443-448.

Guo WT, Bell KD, Ou JH. Characterization of the hepatitis B virus ENHI enhancer and X promoter complex. *J Virol.* 1991; 65: 6686-92.

Ha NB, Garcia RT, Trinh HN, Vu AA, Nguyen HA, Nguyen KK, Levitt BS, Nguyen MH. Renal dysfunction in chronic hepatitis B patients treated with adefovir dipivoxil. *Hepatology* 2009; 50:727-734.

Hadziyannis S, Tassopoulos N, Chang T. Long-term adefovir dipivoxil treatment induces regression of liver fibrosis in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B: results after 5 years of treatment. *Hepatology* 2005; 42: 754 A.

Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, Chang TT, Kitis G, Rizzetto M, Marcellin P, Lim SG, Goodman Z, Ma J, Brosgart CL, Borroto-Esoda K, Arterburn S, Chuck SL; Adefovir Dipivoxil 438 Study Group. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B for up to 5 years. *Gastroenterology* 2006; 131: 1743-1751.

Hadziyannis SJ, Vassilopoulos D. Hepatitis e antigen negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001; 34: 617-624.

Hadziyannis S, Tassopoulos N, Heathcote E. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005; 352: 2673-2681.

Han GR, Cao MK, Zhao W, Jiang HX, Wang CM, Bai SF, Yue X, Wang GJ, Tang X, Fang ZX. A prospective and open-label study for the efficacy and safety of telbivudine in pregnancy for the prevention of perinatal transmission of hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2011; 55: 1215-1221.

Han HK, Han CY, Cheon EP, Lee J, Kang KW. Role of hypoxia-inducible factor- α in hepatitis-B-virus X protein-mediated MDR1 activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357: 567-573.

Heathcote EJ, Marcellin P, Buti M, Gane E, De Man RA, Krastev Z, Germanidis G, Lee SS, Flisiak R, Kaita K, Manns M, Kotzev I, Tchernev K, Buggisch P, Weilert F, Kurdas OO, Shiffman ML, Trinh H, Gurel S, Snow-Lampart A, Borroto-Esoda K, Mondou E, Anderson J, Sorbel J, Rousseau F. Three-year efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate treatment for chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2011; 140: 132-143.

Hernando MV, Soler P, Garrido M, Cano R, Llácer A. Vigilancia Epidemiológica de la hepatitis B en España. Años 1997 a 2008. *Bol Epidemiol Semanal* 2010; 18: 169-180.

Hoofnagle JH, Seeff LD, Bales ZB, Zimmerman HJ. Type B hepatitis after transfusion with blood containing antibody to hepatitis B core antigen. *New Engl Med* 1978; 298: 1379-1383.

Hruska JF, Clayton DA, Rubenstein JL, Robinson WS. Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction. *J Virol* 1977; 21: 666-672.

Hsieh YH, Su IJ, Wang HC, Tsai HJ, Huang YJ, Chang WW, Lai MD, Lei HY, Huang W. Hepatitis B virus pre-S2 mutant surface antigen induces degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip 1 through c-Jun activation domain-binding protein-1. *Mol Cancer Res* 2007; 5: 1063-1072.

Hu J, Toft DO, Seeger ST. Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex, which is incorporated into nucleocapsid. *EMBO J.* 1997; 16: 59-68.

Huang X, Qin Y, Zhang P, Tang G, Shi Q, Xu J, Qi F, Shen Q. PreS deletion mutations of hepatitis B virus in chronically infected patients with simultaneous seropositivity for hepatitis-B surface antigen and anti-HBs antibodies. *J Med Virol* 2010; 82: 23-31.

Hughes SA, Wedemeyer H, Harrison PM. Hepatitis delta virus. *Lancet* 2011; 378: 73-85.

Huo TI, Wu JC, Lee PC, Chan GY, Lui WY, Tsang SH, Ting LT, Chang FY, Lee SD. Sero-clearance of hepatitis B surface antigen in chronic carriers does not necessarily imply a good prognosis. *Hepatology* 1998; 28: 231-236.

Hyams KC. Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 992-1000.

Iavarone M, Trabut JB, Delpuech O, Carnot F, Colombo M, Kremsdorf D, Bréchet D, Thiers V. Characterisation of hepatitis B virus X protein mutants in tumour and non-tumor liver cells using laser capture microdissection. *J Hepatol* 2003; 39: 253-261.

Ikeda Y, Lever AML, Thomas HC. *Hepatol* 1986; 6: 962-965.

Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Chen CJ. Risk evaluation of viral load elevation and associated liver disease/cancer-in HBV (the REVEAL-HBV) Study Group. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology* 2006; 130: 678-686.

Iorio R, Giannattasio A, Cirillo F, L.D.A. Vegnente A. Long-term outcome in children with chronic hepatitis B: a 24 year observation period. *Clin Infect Dis*. 2007; 45: 943-949.

Ito K, Tanaka Y, Kato M, Fujiwara K, Sugauchi F, Sakamoto T, Shinkai N, Orito E, Mizokami M. Comparison of complete sequences of hepatitis B virus genotype C between inactive carriers and hepatocellular carcinoma patients before and after seroconversion. *J Gastroenterol* 2007; 42: 837-844.

Janssen HLA, Van Zonneveld M, Senturk H, Zeuzem S, Akarca US, Cakaloglu Y, SimonC, So TM, Gerken G, de Man RA, Niesters HC, Zondervan P, Hansen B, Schalm SW, (HBV 99-01 Study Group). Pegylated interferón alfa 2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet* 2005; 365: 123-129.

Jara P, Bruguera M. Hepatitis B en gestantes y niños. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26 (Supl 7): 66-70.

Jardi R, Rodríguez F, Buti M, Costa X, Valdes X, Allende H, Shaper M, Gallimany R, Esteban R, Guardia J. Mutations in the basic core promoter región of hepatitis B virus. Relationship with precore variants and HBV genotypes in a Spanish population of HBV carriers. *J Hepatol* 2004; 40: 507-514.

Jean-Jean O, Weimer T, de Recondo AM, Will H, Rossignol JM. Internal entry of ribosomes and ribosomal scanning involved in hepatitis B virus P gene expresión. *J Virol* 1989; 63: 5451-5454.

Jonas MM, Kelly D, Pollack H, Mizerski J, Sorbel J, Frederick D, Mondou E, Rousseau F, Sokal E. Safety, efficacy, and pharmacokinetics of adefovir dipivoxil in children and adolescents (age 2 to < 18 years) with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2008; 47: 1863-1871.

Jonas MM, Mizerski J, Badia IB, Areias JA, Schwarz KB, Little NR, Greensmith MJ, Gardner SD, Bell MS, Sokal EM. International Pediatric Lamivudine Investigator Group. Clinical trial of lamivudine in children with chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2002; 346: 1706-1713.

Jung MC, Spengler U, Schraut W, Hoffmann R, Zachovla R, Eisenburg J, Eichenlaub D, Richtmüller G, Paumgartner G, Ziegler-Heitbrock HV, Will H, Pape GR. Hepatitis B virus antigen-specific T-cell activation in patients with acute and chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1991; 13: 310-317.

Junker-Niepmann M, Bartenschlager R, Schaller H. A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsulation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J.* 1990; 9: 3389-96.

Kajiya Y, Hamasaki K, Nakata K, Miyazoe S, Takeda Y, Ohkubo K, Ichikawa T, Nakao K, Kato Y, Eguchi K. Full-length sequence and functional analysis of hepatitis B virus genome in a virus carrier: a case report suggesting the impact of pre-S and core promoter mutations on the progression of the disease. *J Viral Hepat* 2002; 9: 149-156.

Kamili S, Sozzi V, Thompson G, Campbell K, Walker CM, Locarnini S, Krawczynski K. Efficacy of hepatitis B vaccine against antiviral drug-resistant hepatitis B virus mutants in the chimpanzee model. *Hepatology* 2009; 49: 1483-1491.

Kao JH. Diagnosis of hepatitis B virus infection through serological and virological markers. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2008; 2: 553-562.

Kay A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res* 2007; 127: 164-176.

Keasler VV, Hodgson AJ, Madden CR, Slagle BI. Enhancement of hepatitis B virus replication by regulatory X protein *in vitro* and *in vivo*. *J Virol* 2007; 81: 2656-2662.

Kekulé AS, Lauer U, Meyer M, Caselmann WH, Hofschneider PH, Koshy R. The preS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator. *Nature* 1990; 343: 457-461.

Kellerman SE, Hanson DL, McNaghten AD, Fleming PL. Prevalence of chronic hepatitis B and incidence of acute hepatitis B infection in human immunodeficiency virus-infected subjects. *J Infect Dis* 2003; 188: 571-577.

Kew MC. Chronic hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma in Africa. *S Afr J Sci* 1992; 88: 524-528.

Kew MC. Epidemiology of chronic hepatitis B virus infection, hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Pathol Biol* 2010; 58: 273-277.

Kidd AH, Didd-Ljunggren. A revised secondary structure model for the 3' end of hepatitis virus pregenomic RNA. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 3295-301.

Kim D, Ahn S, Chang H, Shim H, Heo J, Cho M, Moon B, Moon Y, Paik Y, Lee K. 563 hepatitis b virus quasispecies in the polymerase gene in treatment-naïve chronic hepatitis B patients. *J Hepatol* 2008; 48: S211.

Kim HS, Kim YK, Ryu, SE, Hong HJ. Production of hepatitis B virus preS polypeptide in *Escherichia coli* by mutation of the 5'-end coding sequence and its purification and characterization. *Gene* 1996; 177: 173-177.

Kitrinos KM, Corsa A, Liu Y, Flaherty J, Snow-Lampart A, Marcelli P, Borroto-Esoda K, Miller MD. No detectable resistance to tenofovir disoproxil fumarate after 6 years of therapy in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2014; 59: 434-442.

Known H, Lok A. Hepatitis B therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8:275-284.

Koike K, Kobayashi M, Gondo M, Hayashi I, Osuga T, Takada S. Hepatitis B virus DNA is frequently found in liver biopsy samples from hepatitis C virus-infected chronic hepatitis patients. *J Med Virol* 1998; 54: 249-255.

Kosovsky M, Qadri I, Siddiqui A. The regulation of hepatitis B virus gene expression: An overview of the cis- and trans-acting components. En: Koshy R, Caselmann WH, eds. *Hepatitis B Virus: Molecular Mechanisms in Disease and Novel Strategies for Therapy*. London: Imperial College Press; 1998.

Koziel MJ, Siddiqui A. Virus de la hepatitis B y virus de la hepatitis delta. En: *Enfermedades Infecciosas. Principios y práctica clínica*. Editores: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Editorial: Elsevier. Barcelona 2006. P: 1864-1890.

Koziel MJ. Hepatitis B immunopathogenesis. En: Thomas HC, ed. *Therapies for Viral Hepatitis*. London: International Medical Press; 1998: 53-64.

Kramvis A, Arakawa K, Yu Mc, Nogueira R, Stram Do, Kew MC. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J Med Virol* 2008; 80: 27-46.

Kramvis A, Kew M, François G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine* 2005; 23: 2409-2423.

Kramvis A, Kew MC. Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy. *J Viral Hepat* 2005; 12: 456-464.

Kramvis A, Kew MC. The core promoter of hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 1999; 6: 415-427.

Kuang SY, Jackson PE, Wang JB, Lu PX, Muñoz A, Qian GS, Kensler TW, Groopman JD. Specific mutations of hepatitis B virus in plasma predict liver cancer development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 3575-3580.

Kuroki K, Floreani M, Mimms LT, Ganem D. Epitope mapping of the preS1 domain of the hepatitis B virus large surface protein. *Virology* 1990; 176: 620-624.

Lai C, Chien R, Leung N. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *N Engl J Med.* 1998; 339: 61-68.

Lai C, Leung N, Teo E. A 1-year trial of telbivudine, lamivudine, and the combination in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2005; 129: 528-536.

Lai CL, Dienstag J, Schiff E, Leung NW, Atkins M, Hunt C, Brown N, Wossner M, Boehme R, Condeary L. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 687-696.

Lai CL, Leung N, Teo EK, Tong M, Wong F, Hann HW, Han S, Poynard T, Myers M, Chao G, Lloyd D, Brown NA; Telbivudine Phase II Investigator Group. A 1-year trial of telbivudine, lamivudine, and the combination in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2005; 129: 528-536.

Lai MW, Yeh CT. The oncogenic potential of hepatitis B virus rtA181T/ surface truncation mutant. *Antivir Ther* 2008; 13: 875-879.

Lalazar G, Rund D, Shouval D. Screening, prevention and treatment of viral hepatitis B reactivation in patients with haematological malignancies. *Br J Haematol* 2007; 136: 699-712.

Lamberts C, Nassal M, Velhagen I, Zentgraf H, Schroder CH. Precore-mediated inhibition of hepatitis virus progeny DNA synthesis. *J Virol* 1993; 67: 3756-3762.

Landers TA, Greenberg HB, Robinson WS. Structure of Hepatitis B Dane particle DNA and nature of endogenous DNA polymerase reaction. *J Virol.* 1977; 23: 368-376.

Lau GK, Cooksley H, Ribiero RM, Powers KA, Bowden S, Mommeja-Marin H, Sorbel J, Mondou E, Rousseau F, Lewin S, Perelson AS, Locarnini S, Naoumov NV. Randomized, double-blind study comparing adefovir dipivoxil (ADV) plus emtricitabine (FTC) combination therapy versus ADV alone in HBeAg+ chronic hepatitis B: efficacy and mechanisms of treatment response. *Hepatology* 2004; 40 (Supl1): 272A

Lau GKK, Piratvisuth T, Luo KX, Marcellin P, Thongsawat S, Cooksley G, Gane E, Fried MW, Chow WC, Paik SW, Chang WY, Berg T, Flisiak R, McCloud P, Pluck N. Peginterferon Alfa-2a HBeAg-Positive Chronic Hepatitis B Study Group. Peginterferon alfa-2a, lamivudine and the combination for HBeAg positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005; 352: 2682-2695.

Lazizi Y, Dubreuil P, Pillot J. Excess HBcAg in HBc antibody-negative chronic hepatitis B virus carriers. *Hepatology* 1993; 17: 966-970.

Lee J, Han KH, Lee JM, Park JH, Kim HS. Impact of hepatitis B virus (HBV) x gene mutations on hepatocellular carcinoma development in chronic HBV infection. *Clin Vaccine Immunol* 2011; 18: 914-921.

Lee JH, Paglieroni TG, Holland PV, Zeldis JB. Chronic hepatitis B virus infection in an antiHBc-nonreactive blood donor: variant virus or defective immune response? *Hepatology* 1992; 16: 24-30.

Lee JM, Ahn SH, Kim HS, Park H, Chang HY, Kim Do Y, Hwang SG, Rim KS, Chon CY, Han KH, Park JY. Quantitative hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen titers in prediction of treatment response to entecavir. *Hepatology* 2011; 53: 1486-1493.

Lee M, Keeffe EB. Hepatitis B: modern end points of treatment and specter of viral resistance. *Gastroenterol Clin North Am* 2011; 40: 495-505.

Lee SA, Kim K, Kim H, Kim BJ. Nucleotide change of codon 182 in the surface gene of hepatitis B virus genotype C leading to truncated surface protein is associated with progression of liver diseases. *J Hepatol* 2012; 56: 63-69.

Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N England J Med* 1997; 337: 1733-1745.

Leon B, Taylor L, Vargas M, Luftig RB, Albertazzi F, Herrero L, Visona K. HBx M130K and V131I (T-A) mutations in HBV genotype F during a follow-up study in chronics carriers. *Virology* 2005; 2: 60.

Leung N, Peng CY, Hann HW, Sollano J, Lao-Tan J, Hsu CW, Lesmana L, Yuen MF, Jeffers L, Sherman M, Min A, Mencarini K, Diva U, Cross A, Wilber R, Lopez-Talavera J. Early hepatitis B virus DNA reduction in hepatitis B e antigen-positive patients with chronic hepatitis B: A randomized international study of entecavir versus adefovir. *Hepatology* 2009; 49: 72-79.

Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2009; 51: 581-592.

Liao Y, Hu X, Chen J, Cai B, Tang J, Ying B, Wang H, Wang L. Precore mutation of hepatitis B virus may contribute to hepatocellular carcinoma risk: evidence from an updated metaanalysis. *PLoS One* 2012; e38394.

Liaw YF, Gane E, Leung N, Zeuzem S, Wang Y, Lai CL, Heathcote EJ, Manns M, Bzowej N, Niu J, Han SH, Hwang SG, Cakaloglu Y, Tong MJ, Papatheodoridis G, Chen Y, Brown NA, Albanis E, Galil K, Naoumov NV; GLOBE Study Group. 2-year GLOBE trial results: telbivudine is superior to lamivudine in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2009; 136: 486-495.

Liaw YF, Kao JH, Piratvisuth T, Chan HLY, Chien RN, Liu CJ, Gane E, Locarnini S, Lim SG, Han KH, Amarapurkar D, Cooksley G, Jafri W, Mohamed R, Hou JL, Chuang WL, Lesmana LA, Sollano JD, Suh DJ, Omata M. Asian Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: A 2012 update. *Hepatol Int* 2012; 6: 531-561.

Liaw YF, Raptopoulou-Gigi M, Cheinquer H, Sarin SK, Tanwandee T, Leung N, Peng CY, Myers RP, Brown RS Jr, Jeffers L, Tsai N, Bialkowska J, Tang S, Beebe S, Cooney E. Efficacy and safety of entecavir versus adefovir in chronic hepatitis B patients with hepatic decompensation: a randomized, open-label study. *Hepatology* 2011; 54: 91-100.

Liaw YF, Sheen IS, Lee CM, Akarca US, Papatheodoridis GV, Suet-Hing Wong F, Chang TT, Horban A, Wang C, Kwan P, Buti M, Prieto M, Berg T, Kitrinou K, Peschell K, Mondou E, Frederick D, Rousseau F, Schiff ER. Tenofovir disoproxil fumarate (TDF), emtricitabine/TDF, and entecavir in patients with decompensated chronic hepatitis B liver disease. *Hepatology* 2011; 53: 62-72.

Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, Farrell G, Lee CZ, Yuen H, Tanwandee T, Tao QM, Shue K, Keene ON, Dixon JS, Gray DF, Sabbat J. Cirrhosis Asian Lamivudine Multicentre Study Group. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 1521-1531.

Lim SG, Cheng Y, Guindon S, Seet BL, Lee LY, Hu P, Wasser S, Peter FJ, Tan T, Goode M, Rodrigo AG. Viral quasi-species evolution during hepatitis B e antigen seroconversion. *Gastroenterology* 2007; 133: 951-958.

Lim YS, Lee TH, Heo NY, Shim JH, Lee HC, Suh DJ. Entecavir plus adefovir combination treatment for chronic hepatitis B patients after failure of nucleoside/nucleotide analogues. *Antivir Ther* 2012; 17: 53-60.

Lin HH, Lee TY, Chen DS, Suns JL, Ohto H, Etoh T, Kawana T, Mizuno M. Transplacental leakage of HBsAg positive maternal blood as the most likely route in causing intrauterine infection with hepatitis B virus. *J Pediatr* 1987; 111: 877-881.

Lin S, Ng T, Kung N, Krastev Z, Volfova M, Husa P, Lee SS, Chan S, Shiffman ML, Washington MK, Rigney A, Anderson J, Mondou E, Snow A, Sorbel J, Guan R, Rousseau F; Emtricitabine FTCB-301 Study Group. A double-blind placebo controlled-study of emtricitabine in chronic hepatitis B. *Arch Intern Med* 2006; 166: 49-56.

Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus--large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis* 1997; 175: 1285-1293.

Liu S, Zhang H, Gu C, Yin J, He Y, Xie J, Cao G. Associations between hepatitis B virus mutations and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 1066-1082.

Locarnini S, Zoulim F. Molecular genetics of HBV infection. *Antivir Ther* 2010; 15 (Supl 3): 3-14.

Locarnini S. Primary resistance, multidrug resistance, and cross-resistance pathways in HBV as a consequence of treatment failure. *Hepatol Int* 2008; 2: 147-151.

Lok A, Zoulim F, Locarnini S, Bartholomeusz A, Ghany MG, Pawlotsky JM, Liaw YF, Mizokami M, Kuiken C; Hepatitis B Virus Drug Resistance Working Group. Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology* 2007; 46: 254-265.

Lok A, McMahon B. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007; 45: 507-539.

Lok AS, Trinh H, Carosi G, Akarca US, Gadano A, Habersetzer F, Sievert W, Wong D, Lovegren M, Cohen D, Llamoso C. Entecavir (ETV) monotherapy with for 96 weeks is comparable to combination therapy with entecavir plus tenofovir (TDF) in nucleos(t)ide naïve patients with chronic hepatitis B; the BE-LOW study. *Hepatology* 2011; 54: 471A.

Lok AS, Hussain M, Cursano C, Margotti M, Gramenzi A, Grazi GL, Jovine E, Bernardi M, Andreone P. Evolution of hepatitis B virus polymerase gene mutations in hepatitis B e antigen-negative patients receiving lamivudine therapy. *Hepatology* 2000; 32: 1145-1153.

Lok AS, Lai CL, Leung N, Yao GB, Cui ZY, Schiff ER, Dienstag JL, Heathcote EJ, Little NR, Griffiths DA, Gardner SD, Castiglia M. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2003; 125: 1714-1722.

Lok AS, Lai CL, Wu PC, Leung EK, Lam T S. Spontaneous hepatitis e antigen to antibody conversion and reversion in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 1987; 92: 1839-1843.

Lok AS, Lai CL. Longitudinal follow-up of asymptomatic hepatitis B surface antigen-positive chinese children. *Hepatology* 1988; 8: 1130-1133.

Lok AS, Liang RH, Chiu EK, Wong KL, Chan TK, Todd D. Reactivation of hepatitis B virus replication in patients receiving cytotoxic therapy: report of a prospective study. *Gastroenterology* 1991; 100: 182-188.

Lok AS, Mc Mahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007; 45: 507-539.

Lok AS, McMahon BJ. AASLD Practice Guideline. Chronic hepatitis B: Update of recommendations. *Hepatology* 2004; 39: 1-5.

Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009. *Hepatology* 2009; 50: 661-662.

Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Bartholomeusz A, Ghany MG, Pawlotsky JM, Liaw YF, Mizokami M, Kuiken C. Antiviral drug-resistant HBV: standarization of nomenclature and essays an recommendations for manegement. *Hepatology* 2007; 46: 254-265.

Loomba R, Rowley A, Wesley R, Liang TJ, Hoofnagle JH, Pucino F, Csako G. Systematic review: the effect of preventive lamivudine on hepatitis B reactivation during chemotherapy. *Ann Intern Med* 2008; 148: 519-528.

López-Cabrera M, Letovsky J, Hu KQ, Siddiqui A. Multiple liver-specific factors bind to the hepatitis B virus core/pregenomic promoter: Trans-activation and repression by CCAAT/enhancer binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87: 5069-5073.

Lu WY, Tan TL, Zhang J, Chen WN. Cellular apoptosis induced by replication of hepatitis B virus: possible link between viral genotype and clinical outcome. *Virol J* 2007; 4: 117.

Lutghetmann M, Volzt T, Quaas A, Zankel M, Fischer C, Dandri, Petersen J. Sequential combination therapy leads to biochemical and histological improvement despite low ongoing intrahepatic hepatitis B virus replication. *Antivir Ther* 2008; 13: 57–66.

Maeng CY, Ryu CJ, Gripon P, Guguen-Guillouzo C, Hong HJ. Fine mapping of virus-neutralizing epitopes on hepatitis B virus PreS1. *Virology* 2000; 270: 9-16.

Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, King AS, Herberg J, Gilson R, Alisa A, Williams R, Vergani D, Naoumov NV, Ferrari C, Bertolotti A. The role of virus-specific CD 8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000; 191: 1269-1280.

Mancini Bourgine M, Bayard F, Soussan P, Deng Q, Lone YC, Kremsdorf D, Michel ML. Hepatitis B virus splice-generated protein induces T-cell responses in HLA-transgenic mice and hepatitis B virus-infected patients. *J Virol* 2007; 81: 4963-4972.

Manesis EK, Hadziyannis SJ. Interferon-alpha treatment and retreatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2001; 121: 101-109.

Manesis EK. HBeAg-negative chronic hepatitis B: from obscurity to prominence. *J Hepatol* 2006; 45: 343-346.

Marcellin P, Avila C, Wursthorn K, Chuang W, Lau GK, Peng CY. Telbivudine (LDT) plus peg-interferon (PEGINF) in HBeAg-positive chronic hepatitis B-very potent antiviral efficacy but risk of peripheral neuropathy (PN). *J Hepatol* 2010; 52 (Supl 1): 6-7.

Marcellin P, Buti M, Gane EJ, Krastev Z, Flisiak R, Germanidis G, Washington MK, Barnes CN, Flaherty JF, Bornstein JD, McHutchison JG, Heathcote EJ. Five years of treatment with tenofovir (TDF) for chronic hepatitis B (CHB) infection is associated with sustained viral suppression and significant regression of histological fibrosis and cirrhosis. *Hepatology* 2011; 54 (Supl 1): 1011A-1012A.

Marcellin P, Chang T, Lim S. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003; 348: 808-816.

Marcellin P, Chang TT, Lim SG, Sievert W, Tong M, Arterburn S, Borroto-Esoda K, Frederick D, Rosseau F. Long-term efficacy and safety of adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Hepatology* 2008; 48: 750-758.

Marcellin P, Heathcote EJ, Buti M, Gane E, de Man RA, Krastev Z, Germanidis G, Lee SS, Flisiak R, Kaita K, Manns M, Kotzev I, Tchernev K, Buggisch P, Weilert F, Kurdas OO, Shiffman ML, Trinh H, Washington MK, Sorbel J, Anderson J, Snow-Lampart A, Mondou E, Quinn J, Rousseau F. Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2008; 359: 2442-2455.

Marcellin P, Heathcote EJ, Buti M, Krastev Z, Jacobson I, de Man R. 740 HBsAg kinetics in patients with chronic hepatitis B (CHB) treated with tenofovir disoproxil fumarate (TDF) for up to 4 years. *J Hepatol* 2011; 54 (Supl):297.

Marcellin P, Heathcote EJ, Corsa A, Liu Y, Miller MD, Kitrinou KM. No detectable resistance to tenofovir disoproxil fumarate (TDF) following up to 240 weeks of treatment in patients with HBeAg+ and HBeAg- chronic hepatitis virus infection. *Hepatology* 2011; 54: 480A.

Marcellin P, Lau Gk, Bonino F, Farci P, Hadziyannis S, Jin R, Lu ZM, Piratvisuth T, Germanidis G, Yurdaydin C, Diago M, Gurel S, Lai MY, Butten P, Pluck N. Peginterferon Alfa-2a HBeAg-Negative Chronic Hepatitis B Study Group. Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Eng J Med* 2004; 351: 1206-1217.

Marion PL, Oshiro LS, Regnery DC, Scullard GH, Robinson WS. A virus in Beechy ground squirrels that are related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980; 77: 2941-5.

Martín Carbonero L. Hepatitis B y hepatitis delta. En *Biología molecular para clínicos*. Editores: Soriano V, González Lahoz J. Editorial: Permanyer. Barcelona 2012. P: 107-121.

Marzano A, Angelucci E, Andreone P, Brunetto M, Bruno R, Burra P, Caraceni P, Daniele B, Di Marco V, Fabrizi F, Fagioli S, Grossi P, Lampertico P, Meliconi R, Mangia A, Puoti M, Raimondo G, Smedile A; Italian Association for the Study of the Liver. Prophylaxis and treatment of hepatitis B immunocompromised patients. *Dig Liver Dis*. 2007; 39: 397-408.

Marzano A, Gaia S, Ghisetti V, Carezzi S, Premoli A, Debernardi-Venon W, Alessandria C, Franchello A, Salizzoni M, Rizzetto M. Viral load at the time of liver transplantation and risk of hepatitis B virus recurrence. *Liver Transpl* 2005; 11: 402-409.

Mason A, Theal J, Bain V, Adams E, Perrillo R. Hepatitis B virus replication in damaged endothelial tissues of patients with extrahepatic diseases. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 972-976.

Mason A, Wick M, White H, Perrillo R. Hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1993; 18: 781-789.

Mason WS, Seal G, Summers J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol*. 1980; 36: 829-836.

Matthews GV, Bartholomeusz A, Locarnini S, Ayres A, Sasaduesz J, Seaberg E, Cooper DA, Lewin S, Dore GJ, Thio CL. Characteristics of drug resistant HBV in an international collaborative study of HIV-HBV-infected individuals on extended lamivudine therapy. *AIDS* 2006; 20: 863-70.

McMahon BJ, Alward WL, Hall DB, Heywood WL, Bender TR, Francis DP, Maynard JE. 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: 599-6003.

McMahon BJ. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. *Hepatol Int* 2009; 3: 334-342.

Michalak TI, Mulrooney PM, Coffin CS. Low doses of hepadnavirus induces infection of the lymphatic system that does not engage the liver. *J Virol* 2004; 78: 1730-1738.

Michalak TI, Pasquinelli C, Guilhot S, Chisari FV. Hepatitis B virus persistence after recovery from acute viral hepatitis. *J Clin Invest* 1994; 93: 230-239.

Milich DR, Jones JE, Hughes JL, Price J, Raney AK, Mclachlan A. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6599-65603.

Miller RH, Kaneko S, Chung CT, Girones R, Purcell RH. Compact organization of the hepatitis B virus genome. *Hepatology* 1989; 9: 322-7.

Miller RH, Robinson WS. Common evolutionary origin of hepatitis B virus and retroviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2531-5.

Montalti R, Nardo B, Beltempo P, Bertelli R, Puviani L, Cavallari D. Liver transplantation in fulminant hepatic failure: experiencia with 40 adult patients over a 17-years period. *Transplant Proc* 2005; 97: 1085-1081.

Moraleda G, Saputelli J, Aldrich CE, Averett D, Condreay L, Mason WS. Lack of effect of antiviral therapy in non-dividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of woodchuck hepatitis virus. *J Virol*. 1997; 71: 9392-9.

Moreno R, García L, García C. Immune response to hepatitis B virus. *Viral Hepatitis*. Ed.: Buti M, Esteban R, Guardia J. (Schering-Plough, SA) 2000.

- Moriarty AM, Alexander H, Lerner RA, Thornton GB. Antibodies to peptides detect new hepatitis B antigen: serological correlation with hepatocellular carcinoma. *Science* 1985; 227: 429-33.
- Moss B, Smith GL, Gerin JL, Purcell RH. Live recombinant vaccinia virus protects chimpanzees against hepatitis B. *Nature* 1984; 311: 67-69.
- Moucari R, Korevaar A, Lada O, Martinot-Peignoux M, Boyer N, Mackiewicz V, Dauvergne A, Cardoso AC, Asselah T, Nicolas-Chanoine MH, Vidaud M, Valla D, Bedossa P, Marcellin P. High rates of HBsAg seroconversion in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients responding to interferon: a long-term follow-up study. *J Hepatol* 2009; 50: 1084-1092.
- Muñoz Criado S, Muñoz Bellido JL, García Rodríguez JA. Patrones serológicos atípicos en la infección por el virus de la hepatitis B. *Rev Clin Esp* 1997; 7: 47-51.
- Murakami S, Cheong J, Ohno S, Matsushima K, Kaneko S. Transactivation of human hepatitis B virus X protein, HBx, operates through a mechanism distinct from protein kinase C and okadaic acid activation pathways. *Virology* 1994; 199: 243-246.
- Murakami S. Hepatitis B virus X protein: structure, function and biology. *Intervirology* 1999; 42: 81-99.
- Nassal M. Hepatitis B virus replication: novel roles for virus-host interactions. *Intervirology* 1999; 42: 100-116.
- Newbold Je, Xin H, Tencza M, Sherman G, Dean J, Bowden S, Locarnini S. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists *in situ* as a heterogenous population of viral minichromosomes. *J Virol* 1995; 69: 3350-3357.
- Nguyen G, Garcia RT, Nguyen N, Trinh H; Keeffe EN, Nguyen MH. Clinical course of hepatitis B virus infection during pregnancy. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 29: 755-754.
- Norder H, CouroucéA, Magnius L. Molecular Basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *J Gen Virol* 1992; 73: 3141-3145.
- Nowak M, Bonhoeffer S, Hill A, Boehme R; Thomas M, Mc Dade H. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4398-4402.
- Ohnishi K, Iida S, Iwama S, Goto N, Nomura F, Takashi M, Mishima A, Kono K, Kimura K, Musha H, Kotota K, Okuda K. The effect of chronic habitual alcohol intake on the development of liver cirrhosis and hepatocellular carcinom: relation to hepatitis B surface antigen carriage. *Cancer* 1982; 49: 672-677.

Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988; 69: 2575-83.

Orito E, Mizokami M, Ina Y, Moriyama EN, Kameshima N, Yamamoto M, Gojobori T. Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7059-62.

Osiowy C, Giles E, Tanaka Y, Mizokami M, Minuk GY. Molecular evolution of hepatitis B virus over 25 years. *J Virol* 2006; 80: 10307-14.

Ou J. Molecular biology of hepatitis B virus e antigen. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12: S178-S187.

Papatheodoridis G, Hadziyannis E, Tsochatzis E, Chrysanthos N, Georgiou A, Kafiri G, Manolakopoulos S, Tiniakos DG, Giannousis I, Manesis EK, Archimandritis AJ. Serum apoptotic caspase activity as diagnostic marker in HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 2007; 132: A760.

Park JH, Cho EW, Lee YJ, Shin SY, Kim KL. Determination of the protective effects of neutralizing anti-hepatitis B virus (HBV) immunoglobulins by epitope mapping with recombinant HBV surface-antigen proteins. *Microbiol Immunol* 2000; 44: 703-710.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics 2002; *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108.

Penna A, Chisari FV, Bertolotti A, Missale G, Fowler P, Giuberti T, Fiaccadori F, Ferrari C. Cytotoxic T lymphocyte recognize an HLA-A2-restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Exp Med* 1993; 177: 751-762.

Pérez Olmeda M, Nuñez M, García Samaniego J, Ríos P, González Lahoz J, Soriano V. Distribution of hepatitis B virus genotypes in HIV-infected patients with chronic hepatitis B: therapeutic implications. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003; 19: 657-659.

Perrillo RP, Lai CL, Liaw YF, Dienstag JL, Schiff ER, Schalm SW, Heathcote EJ, Brown NA, Atkins M, Woessner M, Gardner SD. Predictors of HBeAg loss after lamivudine treatment for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2002; 36: 186-194.

Perrillo RP, Schiff ER, Davis GL, Bodenheimer HC Jr, Lindsay K, Payne J, Dienstag JL, O'Brien C, Tamburro C, Jacobson IM, Sampliner R, Feit D, Lefkowitz J, Kuhns M, Meschievitz C, Sanghvi B,

Albrecht J, Gibas A. The Hepatitis Interventional Therapy Group. A randomized controlled trial of interferon alfa 2b alone after prednisone withdrawal for the treatment of chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 1990; 323:295-301.

Petersen J. HBV treatment and pregnancy. *J Hepatol* 2011; 55: 1171-1173.

Piravitsuth T, Marcellin P, Popescu M, Kapprell HP, Rothe V, Lu ZM. Hepatitis B surface antigen: association with sustained response to peginterferon alfa-2a in hepatitis B e antigen-positive patients. *Hepatol Int* 2011; 7: 429-436.

Pollack JR, Ganem D. An RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsulation. *J Virol* 1993; 67: 3254-63.

Pollicino T, Belloni L, Raffa G, Pediconi N, Squadrito G, Raimondo G, Levrero M. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA bound H3 and H4 histones. *Gastroenterology* 2006; 130: 823-837.

Pontisso P, Vidalino L, Quarta S, Gatta A. Biological and clinical implications of HBV infection in peripheral blood mononuclear cells. *Autoimmun Rev* 2008; 8: 13-17.

Prati D, Taioli E, Zanella A, Della Torre E, Butelli S, Del Vecchio E, Vianello L, Zanuso F, Mozzi F, Milani S, Conte D, Colombo M, Sirchia G. Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels. *Ann Intern Med* 2002; 137: 1-10.

Pungpapong S, Kim WR, Poteruccha JJ. Natural history of hepatitis B virus infection: an update for clinicians. *Mayo Clin Proc* 2007; 82: 967-965.

Qin B, Budeus B, Cao L, Wu C, Wang Y, Zhang X, Rayner S, Hoffmann D, Lu M, Chen X. The amino acids substitutions rtP177G and rtF249A in the reverse transcriptase domain of hepatitis B virus polymerase reduce the susceptibility to tenofovir. *Antiviral Res* 2013; 97: 93-100.

Radziwill G, Tucker W, Schaller H. Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase activity. *J Virol* 1990; 64: 613-20.

Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, Buendía MA, Chen DS, Colombo M, Craxì A, Donato F, Ferrari C, Gaeta GB, Gerlich WH, Levrero M, Locarnini S, Michalak T, Mondelli MU, Pawlotsky JM, Pollicino T, Prati D, Puoti M, Samuel D, Shouval D, Smedile A, Squadrito G, Trépo C, Villa E, Will H, Zanetti AR, Zoulim F. Statements from Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2008; 49: 652-657.

Raimondo G, Navarra G, Mondello S, Costantino L, Colloredo G, Cucinotta E, Di Vita G, Scisca C, Squadrito G, Pollicino T. Occult hepatitis B virus in liver tissue of individuals without hepatic disease. *J Hepatol* 2008; 48: 1001-1026.

Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2007; 46: 160-170.

Raimondo G, Pollicino T, Romano L, Zanetti AR. A 2010 update on occult hepatitis infection. *Pathol Biol (Paris)* 2010; 58: 254-257.

Raney AK, Milich DR, McLachlan A. Characterization of hepatitis B virus major surface antigen gene transcriptional regulatory elements in differentiated hepatoma cell lines. *J Virol* 1989; 63: 3919-3925.

Rawal BK, Parida S, Watkins RP, Ghosh P, Smith H. Symptomatic reactivation of hepatitis B in pregnancy. *Lancet* 1991; 337-364.

Rehermann B, Fowler P, Sidney J, Person J, Redeker A, Brown M, Moss B, Sette A, Chisari FV. The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *J Exp Med* 1995; 181: 1047-1058.

Reijnders JG, Perquin MJ, Zhang N, Hansen BE, Janssen HL. Nucleos(t)ide analogues only induce temporary hepatitis B antigen seroconversion in most patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2010; 139: 491-498.

Rijckborst V, Hansen BE, Cakaloglu Y, Ferenci P, Tabak F, Akdogan M, Simon K, Akarca US, Flisiak R, Verhey E, Van Vuuren AJ, Boucher CA, ter Borg MJ, Janssen HL. Early on-treatment prediction of response to peginterferon alfa-2a for HBeAg-negative chronic hepatitis B using HBsAg and HBV DNA levels. *Hepatology* 2010; 52:454-461.

Rijckborst V, Hansen BE, Ferenci P, Brunetto MR, Tabak F, Cakaloglu Y, Lanza AG, Messina V, Iannaccone C, Massetto B, Regep L, Colombo M, Janssen HL, Lampertico P. Validation of a stopping rule at week 12 using HBsAg and HBV DNA for HBeAg-negative patients treated with peginterferon alfa-2 a. *J Hepatol* 2012; 56:1006-1011.

Robinson WS, Greenman RL. DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate. *J Virol* 1974; 13: 1231-6.

Rockstroh JK, Bhagani S, Benhamou Y, Bruno R, Mauss S, Peters L, Puoti M, Soriano V, Tural C. EACS Executive Committee. European AIDS Clinical Society (EACS) guidelines for the clinical

management and treatment of chronic hepatitis B and C coinfection in HIV infected adults. *HIV Med* 2008; 9: 82-88.

Rodríguez Agulló JL, López Alonso G. Tratamiento de las hepatitis virales crónicas: Presente y futuro. En: *Perspectivas en Medicina Interna*. Editores: de Portugal Alvarez J, Diaz Rubio M. Editorial Panamericana. Madrid 1996, P: 93-122.

Rodríguez Frías F, Jardi R. Virología molecular del virus de la hepatitis B. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26 (Supl 7): 2-10.

Rodríguez-Frías F, Buti M, Jardi R, Cotrina M, Viladomiu L, Esteban R, Guardia J. Hepatitis B virus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. *Hepatology* 1995; 22: 1641-1647.

Rodríguez-Frías F, Jardi R, Buti M, Schaper M, Hermosilla E, Valdés A, Allende H, Martell M, Esteban R, Guardia J. Hepatitis B virus genotypes and G1896A precore mutation in 486 Spanish patients with acute and chronic HBV infection. *J Viral Hepat* 2006; 13: 343-350.

Saldanha J, Gerhlich W, Lelie N, Dawson P, Heermann K, Heath A. An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sanguinis* 2001; 80: 63-71.

Salfeld J, Pfaff E, Noah M, Schaller H. Antigenic determinants and functional domains in core antigen and e antigen from hepatitis B virus. *J Virol* 1989; 63: 798-808.

Salleras L, Domínguez A, Bruguera M, Plans P, Costa J, Cardeñosa N, Batalla J, Plasencia A. Declining prevalence of hepatitis B virus infection in Catalonia (Spain) 12 years after the introduction of universal vaccination. *Vaccine* 2007; 25: 8726-8731.

Samuel CE. Antiviral actions of interferon. Interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities. *Virology* 1991; 183: 1-11.

Samuel D, Muller R, Alexander G, Fasati L, Ducot B, Benhamou JP, Bismuth H, Investigators of the European Concerted Action on Viral Hepatitis Study. Liver transplantation in European patients with the hepatitis surface antigen. *N England J Med* 1993; 320: 1842-1847.

Sánchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodes J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic B in western patients. *Gastroenterol* 2002; 123: 1848-1856.

Santana OE, Francés A, Sierra A, Hernández J, Martín Sánchez AM. Marcadores serológicos de hepatitis B: patrones atípicos detectados en el Hospital Insular de Gran Canaria. *Rev Clin Esp* 1995; 10: 674-677.

Santos SA, Uriel AJ, Park JS, Lucas J, Carriero D, Jaffe D, Dieterich DT. Effect of switching to tenofovir with emtricitabine in patients with chronic hepatitis B failing to respond to an adefovir-containing regimen. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 1247-1253.

Sattler F, Robinson WS. Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends. *J Virol* 1979; 32: 226-33.

Scaglioni PP, Melegari M, Wands JR. Biologic properties of hepatitis viral genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame. *Virology* 1997; 233: 374-381.

Scheuer PJ. The nomenclature of chronic hepatitis: Time for a change. *J Hepatol* 1992; 22: 112-114.

Schildgen O, Schewe CK, Vogel M, Däumer M, Kaiser R, Weitner L, Matz B, Rockstroh JK. Successful therapy of hepatitis B with tenofovir in HIV-infected patients failing previous adefovir and lamivudine treatment. *AIDS* 2004; 18: 2325-2327.

Schildgen O, Sirma H, Funk A, Olotu C, Wend UC, Hartmann H, Helm M, Rockstroh JK, Wulf Willems WR, Will H, Gerlich WH. Variant of hepatitis B virus with primary resistance to adefovir. *N Engl J Med* 2006; 354: 1807-1812.

Schiodt FV, Atillasoy E, Shakil AO, Schiff ER, Caldwell C, Kowdley KV, Stribling R, Crippin JS, Flamm S, Somberg KA, Rosen H, McCashland TM, Hay JE, Lee WM. Etiology and outcome for 295 patients with acute liver failure in the United States. *Liver Transpl Surg* 1999; 5: 29-34.

Schupan D, Stickel F. Markers of progression. En: *Diagnosis of liver diseases*. Editores: Blum HE, Maier KP, Rodes J, Sauerbruch T. Editorial Kluwer. Lancaster 2004; P: 15-25.

Seddigh-Tonekaboni S, Waters JA, Jeffers S, Gehrke R, Ofenloch B, Horsh A, Hess G, Thomas HC, Karayiannis P. Effect of variation in the common "a" determinant on the antigenicity of hepatitis B surface antigen. *J Med Virol* 2000; 60: 113-121.

Seeger C, Ganem D, Varmus HE. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis virus replication strategy. *Science* 1986; 232: 477-484.

Seeger C, Mason WS. 36 hepadnavirus. New York: Cold Spring, Harbor Monograph Archive, 2006: 729-744.

Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 51-68.

Seifer M, Strandring DN. A protease-sensitive hinge linking the two domains of the hepatitis B virus core protein is exposed on the viral capsid surface. *J Virol* 1994; 68: 5548-5555.

Serejo F, Costa A, Oliveira AG, Ramalho F, Batista A, De Moura MC. Alfa interferon improves liver fibrosis in chronic hepatitis C. Clinical significance of the serum-N-terminal propeptide of Procollagen type III. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 1684-1689.

Shao Q, Zhao X, Yao Li MD. Role of peripheral blood mononuclear cell transportation from mother to baby in HBV intrauterine infection. *Arch Gynecol Obstet* 2013; 288: 1257-1261.

Sheldon J, Rodes B, Zoulim F, Bartholomeusz A, Soriano V. Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 2006; 13: 427-434.

Sheldon J, Camino N, Rodés B, Bartholomeusz A, Kuiper M, Tacke F, Núñez M, Mauss S, Lutz T, Klausen G, Locarnini S, Soriano V. Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir. *Antivir Ther* 2005; 10: 727-734.

Sheldon J, Rodés B, Zoulim F, Bartholomeusz A, Soriano V. Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 2006; 13: 427-434.

Shepard CW, Simard DP, Finelli L, Fiore AE, Beth BP. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. *Epidemiol Rev* 2006; 28: 112-125.

Shetty K, Hussain M, Nei L, Reddy KR, Lok AS. Prevalence and significance of occult hepatitis B in a liver transplant population with a chronic hepatitis C. *Liver transpl* 2008; 14:534-540.

Shim JH, Lee HC, Kim KM, Lim YS, Chung YH, Lee YS, Suh DJ. Efficacy of entecavir in treatment-naïve patients with hepatitis B virus-related decompensated cirrhosis. *J Hepatol* 2010; 52: 176-182.

Song CZ, Bai ZL, Song CC, Wang QW. Aggregate formation of hepatitis B virus X protein affects cell cycle and apoptosis. *World J Gastroenterol*. 2003; 9: 1521-1524.

Sonneveld MJ, Rijckborst V, Boucher CA, Hansen BE, Janssen HL. 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: 1251-1257.

Soriano V, Perelson A, Zoulim F. Why are there different dynamics in the selection of drug resistance in HIV and hepatitis B and C viruses? *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 1-4.

Soussan P, Garreau Zylberberg H, Ferray C, Bréchet C, Kremsdorf D. *In vivo* expression of a new hepatitis B virus protein encoded by a spliced RNA. *J Clin Invest* 2000; 105: 55-60.

Soussan P, Pol J, Garreau F, Schneider V, Le Pendeven C, Nalpas B, Lacombe K, Bonnard P, Pol S, Kremsdorf D. Expression of defective hepatitis B particles derived from singly splice RNA is related to liver disease. *J Infect Dis* 2008; 198: 218-225.

Soussan P, Tuveri R, Nalpas B, Garreau F, Zavala F, Masson A, Pol S, Bréchet C, Kremsdorf D. The expression of hepatitis B spliced protein (HBSP) encoded by a spliced hepatitis B virus RNA is associated with viral replication and liver fibrosis. *J Hepatol* 2003; 38: 343-348. Steinmüller T, Seehofer D, Rayes N, Müller AR, Settmacher U, Jonas S, Neuhaus R, Berg T, Hopf U, Neuhaus P. Increasing applicability of liver transplantation for patients with hepatitis B-related liver disease. *Hepatology* 2002; 35: 1528-1535.

Sterneck M, Will H. Naturally occurring variants of hepatitis B virus. *Adv Virus Res* 1999; 52: 25-137.

Stevens CE, Beasley RP, Tsui J, Lee WC. Vertical transmission of hepatitis B antigen in Taiwan. *N Engl J Med* 1975; 292: 771-774.

Stoll-Becker S, Repp R, Glebe D, Schaefer S, Kreuder J, Kann M, Lampert F, Gerlich WH. Transcription of hepatitis B virus in peripheral blood mononuclear cells from persistently infected patients. *J Virol* 1997; 71: 5399-5407.

Su H, Yee JK. Regulation of hepatitis B virus gene expression by its two enhancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2708-12.

Su Q, Schröder CH, Hofmann WJ, Otto G, Pichlmayr R, Bannasch P. Expression of hepatitis B virus X protein in HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 1998; 27: 1109-1120.

Suárez-González A, Solís Sánchez G, Otero Guerra L, Viejo de la Guerra G, Álvarez Navascués C, García López R. Prevalencia de la inmunidad frente a los virus de la hepatitis en gestantes del Área Sanitaria de Gijón. *Gastroenterol Hepatol* 2004; 27: 347-352.

Sugauchi F, Ohno T, Orito E, Sakugawa H, Ichida T, Komatsu M, Kuramitsu T, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Influence of hepatitis B virus genotypes on the development of preS deletions and advanced liver disease. *J Med Virol* 2003; 70: 537-544.

Sumi H, Yokosuka O, Seki N, Arai M, Imazeki F, Kurihara T, Kanda T, Fukai K, Kato M, Saisho H. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 19-26.

Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B virus-like by reverse transcriptase of an RNA intermediate. *Cell* 1982; 29: 403-415.

Summers J, Smolec JM, Snyder R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 4533-7.

Sung JJ, Lai JY, Zeuzem S, Chow WC, Heathcote EJ, Perrillo RP, Brosgart CL, Woessner MA, Scott SA, Gray DF, Gardner SD. Lamivudine compared with lamivudine and adefovir dipivoxil for the treatment of HBeAg-positive chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2008; 48: 728–35.

Sung JJY, Lai JY, Zeuzem S, Chow WC, Heathcote E, Perrillo R. A randomised double-blind phase II study of lamivudine compared to lamivudine plus adefovir dipivoxil for treatment naïve patients with chronic hepatitis B. week 52 analyses. *J Hepatol* 2003; 38: 25-26.

Sung WK, Zheng, Li S, Chen R, Liu X, Li Y, Lee NP, Lee WH, Ariyaratne PN, Tennakoon C, Mulawadi FH, Wong KF, Liu AM, Poon RT, Fan ST, Chan KL, Gong Z, Hu Y, Lin Z, Wang G, Zhang Q, Barber TD, Chou WC, Aggarwal A, Hao K, Zhou W, Zhang C, Hardwick J, Buser C, Xu J, Kan Z, Dai H, Mao M, Reinhard C, Wang J, Luk JM. Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2012; 44: 765-769.

Surmali Onay O, Baskin E, Ozçay F, Melek E, Canan O, Bilezikçi B. Successful treatment of hepatitis B-associated leukocytoclastic vasculitis with lamivudine treatment in a child patient. *Rheumatol Int* 2007; 27: 869-872.

Tacke F, Gehrke C, Luedde T, Heim A, Manns MP, Trautwein C. Basal core promoter and precore mutations in the hepatitis B virus genome enhance replication efficacy of lamivudine-resistant mutants. *J Virol* 2004; 16: 8524-8535.

Tang H, Delgermaa L, Huang F, Oishi N, Liu L, He F, Zhao L, Murakami S. The transcriptional transactivation function of HBx protein is important for its aumentation role in hepatitis B virus replication. *J Virol* 2005; 79: 5548-5556.

Tang H, Oishi N, Kaneko S, Murakami S. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus X protein. *Cancer Sci* 2006; 97: 977-983.

Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, Nakayoshi T, Wakuta M, Miyakawa Y, Mizokami M. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol* 2009; 83:10538-10547.

Tedder RS, Bissett SL, Myers R, Ijaz S. The “Red Queen” dilemma—running to stay in the same place: reflections on the evolutionary vector of HBV in humans. *Antivir Ther* 2013; 18: 489-496.

Tennant BC, Toshkov IA, Peek SF, Jacob JR, Menne S, Hornbuckle WE, Schinazi RD, Korba BE, Cote PJ, Gerin JL. Hepatocellular carcinoma in the woodchuck model of hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 2004; 127: S283-293.

Tenney D, Levine SM, Rose RE, Walsh AW, Weinheimer SP, Discotto L, Plym M, Pokornowski K, Yu CF, Angus P, Ayres A, Bartholomeusz A, Sievert W, Thompson G, Warner N, Locarnini S, Colonno RJ. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3498-3507.

Tenney DJ, Pokorowski KA, Rose RE, Baldick CJ, Eggers BJ, Fang J, Wichroski MJ, Diva U, Xu D, Wilbe RB, Brett-Smith H, Iloeje UH. Entecavir maintains a high genetic barrier to HBV resistance through 6 years naïve patients. *J Hepatol* 2009; 50: (Supl) 1:10.

Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, Levine SM, Pokornowski AK, Walsh AW, Fang J, Yu CF, Zhang S, Mazzurco CE, Hsu M, Plym MJ, Poundstone P, Yang J, Colonno RJ. Two-year assessment of entecavir resistance in lamivudine-refractory hepatitis B virus patients reveals different clinical outcomes depending on the resistance substitutions present. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 902-911

Ter Borg MJ, Leemans WF, de Man RA, Janssen HL. Exacerbation of chronic hepatitis B infection after delivery. *J Viral Hepat* 2008; 15: 37-41.

Terré S, Petit MA, Bréchet C. Defective hepatitis B virus particles are generated by packaging and reverse transcription of spliced viral RNAs in vivo. *J Virol* 1991; 65: 5539-2243.

Thakur V, Kazim SN, Guptan RC, Hasnain SE, Bartholomeusz A, Malhotra V, Sarin Sk. Transmission of G145R mutant of HBV to an unrelated contact. *J Med Virol* 2005; 76: 40-46.

Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J, Reimann KA, Purcell RH, Chisari FV. CD8 (+) T cells mediate clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 2003; 77: 68-76.

Thio C, Locarnini S. Treatment of HIV/HBV coinfection: clinical and virological issues. *AIDS Rev* 2007; 9: 40-53.

Thio CL, Seaberg EC, Skolasky R Jr, Phair J, Visscher B, Muñoz A, Thomas DL; Multicenter AIDS Cohort Study. Multicenter AIDS Cohort Study. HIV-1, hepatitis B virus, and risk of liver related mortality in the Multicenter Cohort Study (MACS). *Lancet* 2002; 360: 1921-1926.

Toberson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 479-486.

Torresi J, Earnest-Silveira L, Civitico G, Walters TE, Lewin SR, Fyfe J, Locarnini SA, Manns M, Trautwein C, Bock TC. Restoration of replication phenotype of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants by compensatory changes in the "fingers" subdomain of the viral polymerase selected as a consequence of mutations in the overlapping S gene. *Virology* 2002; 299: 88-99.

Torresi J. The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *Virology* 2002; 299: 88-99.

Trippler M, Meyer zum Büschenfelde KH, Gerken G. HBV viral load within subpopulations of peripheral blood mononuclear cells in HBV infection using limiting dilution PCR. *J Virol Methods* 1999; 78: 129-147.

Tsui LV, Guidotti LG, Ishikawa T, Chisari FV. Posttranscriptional clearance of hepatitis B virus RNA by cytotoxic T lymphocyte-activated hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 12398-12402.

Tu H, Bonura C, Giannini C, Mouly H, Soussan P, Kew M, Paterlini-Bréchet P, Bréchet C, Kremsdof D. Biological impact of natural COOH-terminal deletions of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues. *Cancer Res* 2001; 61: 7803-7810.

Twu JS, Schloemer RH. Transcriptional trans-activating function of hepatitis B virus. *J Virol* 1987; 61: 3448-3453.

Van Bommel F, de Man RA, Wedemeyer H, Deterding K, Petersen J, Buggisch P, Erhardt A, Hüppe D, Stein K, Trojan J, Sarrazin C, Böcher WO, Spengler U, Wasmuth HE, Reinders JG, Möller B, Rhode P, Feucht HH, Wiedenmann B, Berg T. Long-term efficacy of tenofovir monotherapy for hepatitis B virus-monoinfected patients after failure of nucleoside/nucleotide analogues. *Hepatology* 2010; 51: 73-80.

Van Nunen AB, Hansen BE, Suh DJ, Löhr HF, Chemello L, Fontaine H, Heathcote J, Song BC, Janssen HL, de Man RA, Schalm SW. Durability of HBe Ag seroconversion following antiviral therapy for

chronic hepatitis B: relation to type of therapy and pre-treatment serum hepatitis B virus DNA and alanine aminotransferase. *Gut* 2003; 52:420-424.

Van Zonneveld M, Honkoop P, Hansen, Niesters HG, Darwish Murad S, de Man RA, Schalm SW, Janssen HL. Long-term follow-up of alpha interferon treatment of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2004; 39: 804-810.

Villet S, Pichoud C, Billoud G, Barraud L, Durantel S, Trépo C, Zoulim F. Impact of hepatitis B virus rtA181V/T mutants on hepatitis B treatment failure. *J Hepatol* 2008; 48: 747-755.

Villet S, Pichoud C, Villeneuve JP, Trépo C, Zoulim F. Selection of a multiple drug-resistant hepatitis B virus strain in a liver-transplanted patient. *Gastroenterology* 2006; 131: 1253-1261.

Wands JR, Chura CM, Roll FJ, Maddrey WC. Serial studies of hepatitis-associated antigen and antibody in patients receiving antitumor chemotherapy for myeloproliferative and lymphoproliferative disorders. *Gastroenterology* 1975; 68: 105-112.

Wang HY, Chien MH, Huang HP, Chang CH, Wu CC, Chen PJ, Chang MH, Chen DS. Distinct hepatitis B virus dynamics in the immunotolerant and early immunoclearance phases. *J Virol* 2010; 84: 3454-3463.

Wang J, Lee AS, Ou JH. Proteolytic conversion of hepatitis B virus e antigen precursor to end product occurs in a postendoplasmic reticulum compartment. *J Virol* 1991; 65: 5080-5083.

Wang ML, London WY, Feitelson MA. Hepatitis B x antigen in hepatitis B virus carrier patients with liver cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 4971-4977.

Wang Y, Chen P, Wu X, Sun AL, Wang H, Zhu YA, Li ZP. A new enhancer element, ENII, identified in the X gene of hepatitis B virus. *J Virol* 1990; 64: 3977-3981.

Weber B. Recent developments in the diagnosis and monitoring of HBV infection and role of the genetic variability of the S gene. *Expert Rev Mol Diag* 2005; 5: 75-91.

Wedemeyer H, Heidrich B, Manns MP. Hepatitis D virus infection-not a vanishing disease in Europe. *Hepatology* 2007; 45: 1331-1332; autor reply 1332-1333.

Wedemeyer H, Yurdayin C, Dalekos GN, Erhardt A, Çakaloğlu Y, Değertekin H, Gürel S, Zeuzem S, Zachou K, Bozkaya H, Koch A, Bock T, Hans Dienes HP, Manns MP, HIDIT Study Group. Peginterferon plus adefovir versus either drug alone for hepatitis delta. *N Engl J Med* 2011; 364:322-331.

Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, Buendía M-A. Molecular biology of the hepatitis B virus and the role of the X gene. *Pathol Biol* 2010; 58: 267-272.

Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, Wursthorn K, Petersen J, Lau G, Trepo C, Marcellin P, Goodman Z, Delaney WE 4th, Xiong S, Brosgart CL, Chen SS, Gibbs CS, Zoulim F. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and declining during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* 2004; 126:1750-1758.

Werner T. Models for prediction and recognition of eukarotic promoters. *Mamm Genome*. 1999; 10: 168-75.

Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, Stricker K, Dhein J, Walczac H, Debatin KM, Krammer PH. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV1 Tat and gp 20. *Nature* 1995; 375: 497-500.

Wiegand J, Hasenclever D, Tillmann HL. Should treatment of hepatitis B depend on hepatitis B virus genotype? A hypothesis generated from an explorative analysis of published evidence. *Antivir Ther* 2008; 13: 211-220.

Wieland S, Thimme R, Purcell RH, Chisari FV. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 6669-6674.

Wieland SF, Chisari FV. Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. *J Virol* 2005; 79: 9369-9380.

Will H, Reiser W, Weimer T, Plaff E, Büscher M, Sprengel R, Cattaneo R, Schaller H. Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol* 1987; 61: 904-911.

Williams R. Global challenges in liver disease. *Hepatology* 2006; 44: 521-526.

Wong DK, Cheung AM, O'Rourke K, Naylor CD, Detsky AS, Heathcote J. Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A meta-analysis. *Ann Intern Med* 1993; 119:312-323.

Wong V, Sung J. Diagnosis and personalized management of hepatitis B including significance of genotypes. *Curr Opin Infect Dis* 2012; 25: 570-577.

Wong VW, Wong GL, Yan KK, Chim AM, Chan HY, Tse CH, Choi PC, Chan AW, Sung JJ, Chan HL. Durability of peginterferon alfa-2b treatment at 5 years in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Hepatology* 2010; 51: 1945-1953.

World Health Organization. Fact sheet No. 204. Updated July 2014. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>.

World Health Organization. Hepatitis B vaccines. VHO website: 2003, <http://www.who.int/vaccines/en/hepatitisb.shtml>.

World Health Organization. Hepatitis B. Nota descriptiva N° 204, 2008, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/es/>.

World Health Organization. Hepatitis B. World Health Organization Fact Sheet 2004 (Revised October 2000) WHO Website; 2000, <http://www.who.int/inf-fs/en/fact204.html>.

Wursthorn K, Jung M, Riva A, Goodman ZD, Lopez P, Bao W, Manns MP, Wedemeyer H, Naoumov NV. Kinetics of hepatitis B surface antigen decline during 3 years of telbivudine treatment in hepatitis B e antigen-positive patients. *Hepatology* 2010; 52: 1611-1620.

Xu WM, Cui YT, Wang L, Yang H, Liang ZQ, Li XM, Zhang SL, Qiao FY, Campbell F, Chang CN, Gardner S, Atkins M. Lamivudine in late pregnancy to prevent perinatal transmission of hepatitis B virus infection: a multicentre, randomized, double blind, placebo-controlled study. *J Viral Hepat* 2009; 16: 94-103.

Yamada T, Yamaoka S, Goto T, Tsujimoto Y, Hatanaka M. The human leukemia virus type I Tax protein induces apoptosis which is blocked by Bcl-2 protein. *J Virol* 1994; 68: 3374-3379.

Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 2012; 1: e00049

Yang CH, Kuo TH, Ting LP. Human hepatitis viral e antigen interacts with cellular interleukin 1 receptor accessory protein and triggers interleukin 1 response. *J Biol Chem.* 2006; 281: 34525-34536.

Yang J, Chen X, Zhang H, Chen G. HBV genotype C strains with spontaneous YMDD mutations may be a risk factor for hepatocellular carcinoma. *J Med Virol* 2014; 86: 913-917.

Yeh CT, Liaw YF, Ou JH. The arginine-rich domain of hepatitis B virus precore and core proteins contains a signal for nuclear transport. *J Virol* 1990; 64: 6141-6147.

Yeo W, Zee W, Zhong S, Chan PK, Wong WL, Ho WM, Lam KC, Johnson PJ. Comprehensive analysis of risk factors associating with hepatitis B virus (HVB) reactivation in cancer patients undergoing cytotoxic chemotherapy. *J Med Virol* 2004; 90: 1306-1311.

Yin J, Xie J, Liu S, Zhang H, Han L, Lu W, Shen Q, Xu G, Dong H, Shen J, Zhang J, Han J, Wang L, Liu Y, Wang F, Zhao J, Zhang Q, Ni W, Wang H, Cao G. Association between the various mutations in viral core promoter region to different stages of hepatitis B, ranging of asymptomatic carrier state to hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 81-92.

Yoffe B, Noonan CA, Melnick JL, Hollinger FB. Hepatitis B virus DNA in mononuclear cells and analysis of cell subsets for the presence of replicative intermediates of viral DNA. *J Infect Dis* 1986; 153: 471-477.

Yoo G, Na TY, Seo HW, Seong JK, Park CK, Shin YK, Lee MO. Hepatitis B virus X protein induces the expression of MTA1 and HDAC1, which enhances hipoxia signaling in hepatocellular carcinoma cellas. *Oncogene* 2008; 27: 3405-3413.

Yuen MF, Sablon E, Hui CK, Yuan HJ, Decraemer H, Lai CL. Factors associated with hepatitis B virus DNA breakthrough in patients receiving prolonged lamivudine therapy. *Hepatology* 2001; 34: 785-791.

Yuen MF, Wong DK, Sablon M, Tse E, Nq IO, Yuan HJ, Siu CW, Sander TJ, Bourne EJ, Hall JC, Condreay LD, Lai CL. HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B in the Chinese: virological, histological, and clinical aspects. *Hepatology* 2004; 39: 1694-1701.

Yuen MF, Yuan HJ, Hui CK, Wong DK, Wong WM, Chan AO, Wong BC, Lai CL. A large population study of spontaneous HBeAg seroconversion and acute exacerbation of chronic hepatitis B infection: implications for antiviral therapy. *Gut* 2003; 52: 416-419.

Yuen MF, Yuan HJ, Wong DK, Yuen JC, Wong WM, Chan AO, Wong BC, Lai KC, Lai CL. Prognostic determinants for chronic hepatitis B en Asians: therapeutic implications. *Gut* 2005; 54:1610-1614.

Yurdaiyin C, Idilman R, Bozkaya H, Bozdayi AM. Natural history and treatment of chronic delta hepatitis. *J Viral Hepat* 2010; 17: 749-756.

Zarski JP, Marcellin P, Leroy V, Trepo C, Samuel D, Ganne-Carrie N, Barange K, Canva V, Doffoel M, Cales P, Fédération nationale des Pôles de référence et des Réseaux Hépatites. Characteristics of patients with chronic hepatitis B in France: predominant frequency of HBe antigen negative cases. *J Hepatol* 2006; 45: 355-360.

Zerbini A, Pilli M, Boni C, Fiscaro P, Penna A, Di Vincenzo P, Giuberti T, Orlandini A, Raffa G, Pollicino T, Raimondo G, Ferrari C, Missale G. The characteristics of the cell-mediated immune response identify different profiles of occult hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 2008; 134: 1470-1481.

Zeuzem S, Gane E, Liaw YF, Lim SG, DiBisceglie A, Buti M, Chutaputti A, Rasenack J, Hou J, O'Brien C, Nguyen TT, Jia J, Poynard T, Belanger B, Bao W, Naoumov NV. Baseline characteristics and early on-treatment response predict the outcomes of 2 years of telbivudine treatment of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009; 51: 11-20.

Zhang Q, Liao Y, Cai B, Li Y, Zhang J, An Y, Wang L. Incidence of natural resistance mutations in naïve chronic hepatitis B patients: a systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol* 2015; 30: 252-261.

Zhao H, Kurbanov F, Wan MB. Genotype B and younger patient age associated with better response to low-dose therapy: a trial with pegylated /nonpegylated interferon-alpha 2_b for hepatitis B e antigen-positive patients with chronic hepatitis B in China. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 541-548.

Zhou DX, Yen TS. Differential regulation of the hepatitis B virus surface gene promoters by a second viral enhancer. *J Biol Chem.* 1999; 265: 20731-20734.

Zhou S, Standring DN. Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10046-10050.

Zhu Y, Yamamoto T, Cullen J, Saputelli J, Aldrich CE, Miller DS, Litwin S, Furman PA, Jilbert AR, Mason WS. Kinetics of hepatitis B virus loss from the liver during inhibition of viral DNA synthesis. *J Virol* 2001; 75: 3113-3122.

Zlotnick A, Cheng N, Stahl SJ, Conway JF, Steven AC, Wingfield. Localization of the C terminus of the assembly domain of hepatitis B virus capsid protein: implications for morphogenesis and organization of encapsidated RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 9556-9561.

Zollner B, Petersen J, Puchhammer-Stockl E, Kletzmayer J, Sternecker M, Fischer L, Schöter M, Laufs S, Feucht HH. Viral features of lamivudine-resistant hepatitis B genotypes A and D. *Hepatology* 2004; 39: 42-50.

Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 2009; 137: 1593-1608.

Zoulim F, Saputelli J, Seeger C. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection *in vivo*. *J Virol* 1994; 68: 2026-2030.

Zoulim F. Hepatitis B infection-Implications for public health. En: Virology of hepatitis B. Editores: Violaine Brancourt. Editorial: Elsevier-Masson. Lyon 2006; P: 9-18.

Zoulim F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. *J Hepatol* 2005; 42: 302-308.

Zoulim F. Resistance to antiviral drugs. En: Virology of hepatitis B. Editores: Violaine Brancourt. Editorial: Elsevier-Masson. Lyon 2006; P: 57-74.

Zoutendijk P, Reijnders JG, Brown A, Zoulim F, Mutimer D, Deterding K, Petersen J, Hofmann WP, Buti M, Santantonio T, van Bömmel F, Pradat P, Oo Y, Luetgehetmann M, Berg T, Hansen BE, Wedemeyer H, Janssen HL. VIRGIL Surveillance Study Group. Entecavir treatment for chronic hepatitis B: adaptation is not needed for the majority of naïve patients with a partial virological response. *Hepatology* 2001; 54:443-451.

Zoutendijk R, Hanssen BE, van Vuuren AJ, Boucher CA, Janssen HLA. Serum HBsAg Decline During Long-term Potent Nucleos(t)ide Analogue Therapy for Chronic Hepatitis B and Prediction of HBsAg Loss. *J Infect Dis* 2011; 204:415-418.

VNiVERSITAS
STVDII
SALAMANTIiNI



