



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Medicina**

**Tesis doctoral**

Papel de los microARNs en el diagnóstico del carcinoma hepatocelular relacionado con el virus de la hepatitis B y su papel en la regulación del ADN circular covalente cerrado en pacientes con hepatitis B crónica en la zona gris

**Autor:** Wenting Zhang

**Directores:** Manuel Romero Gómez

Antonio Gil Gómez

**Tutor:** Manuel Romero Gómez



**D. MANUEL ROMERO GÓMEZ, CATEDRÁTICO DE MEDICINA  
DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE  
SEVILLA**

**CERTIFICA:**

Que la Tesis Doctoral que lleva por título: “Papel de los microARNs en el diagnóstico del carcinoma hepatocelular relacionado con el virus de la hepatitis B y su papel en la regulación del ADN circular covalente cerrado en pacientes con hepatitis B crónica en la zona gris”, presentada por D<sup>a</sup>. Wenting Zhang para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Revisado el texto, doy mi conformidad para su presentación y defensa para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Fdo. Prof. Dr. Manuel Romero Gómez

Director y Tutor de la Tesis

1 de septiembre de 2021



**D. ANTONIO GIL GÓMEZ, DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA E INVESTIGADOR DEL INSTITUTO BIOMEDICINA DE SEVILLA.**

**CERTIFICA:**

Que la Tesis Doctoral que lleva por título: “Papel de los microARNs en el diagnóstico del carcinoma hepatocelular relacionado con el virus de la hepatitis B y su papel en la regulación del ADN circular covalente cerrado en pacientes con hepatitis B crónica en la zona gris”, presentada por D<sup>a</sup>. Wenting Zhang para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Revisado el texto, doy mi conformidad para su presentación y defensa para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Fdo. Dr. Antonio Gil Gómez

Co-Director de la Tesis

1 de septiembre de 2021

## **AGRADECIMIENTOS**

En estas breves líneas, me gustaría expresar mi sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado en mi vida.

En primer lugar, mi mayor agradecimiento va dirigido a mis directores Manuel Romero Gómez y Antonio Gil Gómez. Manuel Romero Gómez ha sido un gran maestro para mí, le estaré eternamente agradecido por haberme enseñado tanto durante estos años, por su apoyo incondicional, por su paciencia, por su tiempo y sobre todo gracias por haber confiado en mí. Gracias también a Antonio Gil Gómez, por su apoyo en el desarrollo de esta tesis, por enseñarme y transmitirme el entusiasmo para hacer investigación médica. Además, por toda su dedicación y paciencia conmigo.

También me gustaría darle las gracias a Rocío Gallego Durán, Rocío Montero Vallejo, Rocío Muñoz Hernández y Ángela Rojas del Instituto Biomedicina de Sevilla. Así como Sofía Pérez-Del-Pulgar, Ester García Pras y Xavier Forns del laboratorio de hepatitis viral del Hospital Clínic de Barcelona, y Julio Vargas del Hospital Universitario Virgen de Valme, que me ayudaron y apoyaron en la parte experimental de mi tesis.

Además, quiero dar las gracias a Macarena López Sánchez, Ana María Pérez Gutiérrez, María Peña Chilet y Joaquín Dopazo por sus apoyos bioestadísticos.

A toda mi familia. A mi padre, por creer en mí, por su apoyo, por su sensatez y por sus valiosos consejos. A mi madre, por su incesante esfuerzo, por ser mi ejemplo de la vida, y por haberme dado todo sin pedir nada a cambio. A mis abuelos, por darme ánimos siempre y apoyo incondicional. A mis tías por aprender de ellas el sentido de responsabilidad, y la dedicación.

A todos mis amigos, especialmente Guoxun Zhang y Tao Yang, por sus grandes apoyos.

Por último, pero no menos importante, darle las gracias a mi prometido Shuaishuai Gao por acompañarme siempre en el camino del estudio. También gracias por aguantarme, crearme, apoyarme y estar conmigo en los momentos difíciles. Haces que todo tenga sentido y que cualquier esfuerzo merezca la pena.

## **ABREVIATURAS (EN ORDEN ALFABÉTICO)**

A.C.: Antes de Cristo

AASLD: Asociación Americana para el Estudio de Enfermedades del Hígado

ADAM17: Desintegrina y metaloproteasa 17

ADAM9: Desintegrina y metaloproteasa 9

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNccc: ADN circular covalente cerrado

ADNrc: ADN relajado circular

ADV: Adefovir dipivoxil

AEG-1: Gen-1 de elevación de los astrocitos

AFP: Alfa-fetoproteína

ALT: Alanina aminotransferasa

ANs: Análogos de los nucleótidos

Anti-HBc: Anticuerpo contra el antígeno core del virus de hepatitis B

Anti-HBe: Anticuerpo contra el antígeno “e” del virus de hepatitis B

Anti-HBs: Anticuerpo contra el antígeno de superficie del virus de hepatitis B

AQP5: Acuaporina 5

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNpg: ARN pregenómico

AST: Aspartato aminotransferasa

ATF7: Factor de transcripción activador 7

AUC: Área bajo la curva SROC

BCL-2: Linfoma de células B2

Bcl-xL: Linfoma de células B extra grande

BMPR2: Receptor de proteína morfogenética ósea tipo II

BP: Proceso biológico

BTG1: Gen 1 de translocación de células B

CAM: Moduladores de ensamblaje de la cápside

CC: Componente celular

CCL22: Quimiocina (motivo C-C) ligando 22

CCNA1: Ciclina A1

CCND3: Ciclina D3

CDKN1A: Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1A

CHC: Carcinoma hepatocelular

CHC-VHB: Carcinoma hepatocelular relacionado con el virus de la hepatitis B

CHORDC1: Proteína de unión a zinc 1 de dominio rico en cisteína e histidina

CH-VHB: Cirrosis hepática relacionado con el virus de la hepatitis B

CNKI: *China National Knowledge Infrastructure*

COL1A1: Colágeno, tipo I, alfa 1

CREB-5: Proteína 5 de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico

CsA: Ciclosporina A

DDX3: Polipéptido 3 de la caja DEAD

DGCR8: Síndrome de DiGeorge región cromosómica 8

DNMT1: ADN metiltransferasa 1

DNMT3A: ADN metiltransferasa 3A

DOR: Odds ratio de diagnóstico

E2F1: Factor de transcripción E2F1

E2F5: Factor de transcripción E2F5

EASL: Asociación Europea para el Estudio del Hígado

ED: Expresión diferencial

EDEM1: ER-degradación que mejora la alfa-manosidasa como la proteína 1

ER $\alpha$ : Receptor de estrógeno  $\alpha$

ESR1: Receptor de estrógeno 1

ESRRG: Receptor gamma relacionado con el estrógeno

ETV: Entecavir

FA: Fosfatasa alcalina

FC: *Fold Change*

FDR: *False Discovery Rate*

FEN1: Endonucleasa flap 1

FNDC3B: Dominio de fibronectina tipo III que contiene 3B

FXR $\alpha$ : Receptor X fernesioide alfa

GEO: *Gene Expression Omnibus*

GGT: Gamma glutamil transpeptidasa

GO: *Gene Ontology*

GPC5: Glypican-5

GSEA: *Gene Set Enrichment Analysis*

HBC: Hepatitis B crónica

HBcAg: Antígeno del core del virus de hepatitis B

HBcrAg: Antígeno relacionado con el core del virus de hepatitis B

HBC-ZG: Hepatitis B crónica en la zona gris

HBsAg: Antígeno de superficie del virus de hepatitis B

HBx: Proteína viral X

HBxAg: Antígeno X del virus de hepatitis B

HBXIP: La proteína X de interacción con el virus de la hepatitis B

HDAC: Histona deacetilasa

HNF1 $\alpha$ : Factor nuclear 1 alfa de hepatocito

HNF4 $\alpha$ : Factor nuclear 4 alfa de hepatocito

HO-1: Hemo oxigenasa 1

HPiP: Factor de transcripción de leucemia de células pre-B hematopoyéticas

HSCs: Células estrelladas hepáticas

HUVR: Hospital Universitario Virgen del Rocío

IBiS: Instituto de Biomedicina de Sevilla

IC: Intervalo de confianza.

IGF2BP2: Similar a la insulina factor de crecimiento 2 de ARNm-proteína de unión 2

IFN: interferón

IGF1R: Receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

IL-6: Interleucina 6

IMC: Índice de masa corporal

ING5: Inhibidor de la proteína de crecimiento 5

IRAK1/TRAF6: Quinasa 1 asociada al receptor de interleucina-1 / factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral

IRF1: Factor regulador de interferón 1

KAP1: Proteína 1 asociada a caja asociadas a Kruppel

Kb: Kilobases

KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

KRAB-ZFP: Proteínas de dedos de zinc de caja asociadas a Kruppel

LAM: Lamivudina

LDH: Lactato deshidrogenasa

LdT: Telbivudina

LHBs: Proteína de superficie grande del virus de la hepatitis B

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno

MeSH: *Medical Subject Headings*

MF: Función molecular

MHBs: Proteína de superficie mediana del virus de la hepatitis B

microARNs: miARNs

mTOR: Diana de rapamicina en células de mamífero

NCOR2: Receptor nuclear co-repressor 2

NDRG3: Gen 3 regulado aguas abajo N-myc

NFIA: Factor nuclear I/A

NFIB: Factor nuclear I/B

NF-κB: Factor nuclear kappa B

NLR: Razón de verosimilitud negativa

NOTCH1: Notch receptor 1

NTCP: Péptido cotransportador de taurocolato de sodio

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORFs: Marcos abiertos de lectura

PACT: Activador de la proteína quinasa R

PAK4: Serina/treonina-proteína quinasa 4

PAN: Poliarteritis nodosa

PBC: Promotor básico del core

PBF: Factor de unión del gen 1 transformador tumoral hipofisario

PC: Promotor central

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PD-1: Muerte programada 1

PDCD4: Proteína 4 de muerte celular programada

peg-IFN: Interferón pegilado

PGC1 $\alpha$ : Coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas

PIAS2: Inhibidor de proteínas de STAT2 activado

PKLR: Piruvato quinasa isoenzimas R/L

PLR: Razón de verosimilitud positiva

PPAR $\gamma$ : Receptor de peroxisoma proliferador activado gamma

PRMT5: Proteína arginina metiltransferasa 5

PTEN: Homólogo de fosfatasa y tensina

PTN: Pleiotrofina

PTTG1: Gen transformante tumoral de pituitaria 1

qHBsAg: Cuantificación de HBsAg

qPCR: PCR en tiempo real

RASSF1A: Proteína 1A que contiene el dominio de asociación Ras

RIG-I/NOD-2: Gen 1 inducible por ácido retinoico / agonistas de la proteína 2 del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos

RISC: Complemento silenciador inducido por ARN

RMA: *Robust Multichip Average*

RMN: Resonancia magnética

RNasa: Ribonucleasa

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa con reverso transcripción en tiempo real

SCNN1A: Canal de sodio subunidad alfa no activada por voltaje 1

Se: Sensibilidad

SHBs: Proteína de superficie pequeña del virus de la hepatitis B

siARN: ARN interferente pequeño

SMAD7: Miembro 7 de la familia SMAD

SMARCE1: Regulador de la cromatina dependiente de actina asociado a la matriz y relacionado con SWI / SNF de la subfamilia E, miembro 1

SNC: Sistema nervioso central

SOCS: Supresor de señalización de citoquinas

SOX4: Región determinante del sexo Y recuadro 4

SOX6: Región determinante del sexo Y recuadro 6

Sp: Especificidad

SRCIN1: Inhibidor 1 de señalización de la quinasa SRC

SROC: Curva resumen de características operativas del receptor

STARD13: Dominio de transferencia de lípidos relacionados StAR que contiene 13

STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3

TAC: Tomografía axial computarizada

TAF: Tenofovir alafenamida

TALEN: Activador de la transcripción nucleasas

TAGLN: Transgelina

TDF: Tenofovir disoproxil fumarato

TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante beta

TGIF2: Factor de crecimiento transformante-factor inducido por  $\beta$  homeobox 2

TLR-2: Receptores *Toll-like* tipo 2

TNFAIP3: Proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa

TRAP2A: Factor de transcripción AP-2 alfa  
TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa  
TRBP: Proteína de unión a ARN en respuesta a trans-activación  
Tto: Tratamiento  
TXNRD1: Tiorredoxina reductasa 1  
ULK1: Quinasa activadora de autofagia unc-51 tipo 1  
ULN: Límite superior de la normalidad  
uPA: Activador de plasminógeno de tipo uroquinasa  
UTR: Región no traducida  
VDAC3: Canal 3 de aniones dependiente de voltaje  
VHB: Virus de la hepatitis B  
VHC: Virus de la hepatitis C  
VHD: Virus de la hepatitis Delta  
VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana  
XPO5: Exportina 5  
ZEB2: Dedo de zinc E-box homeobox 2  
ZFN: Nucleasas de dedo de zinc

## **Resumen**

### **Antecedentes:**

La infección por el virus de la hepatitis B (VHB) sigue siendo un problema de salud pública mundial, destacando como el principal factor de riesgo del carcinoma hepatocelular (CHC). La mayoría de los pacientes con hepatitis B crónica (HBC) se encuentran en alguna de las 5 fases de la historia natural del VHB definidas por la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (EASL) en 2017, pero algunos individuos no encajan en ninguno de los estados inmunes habituales y se consideran estar en la “zona gris (ZG)”. El ADN circular covalente cerrado (ADNccc) juega un papel clave en el ciclo de vida del virus y no puede ser eliminado por las terapias actuales. Además, la cuantificación del ADNccc no es fácil de generalizar debido a la naturaleza invasiva de la biopsia hepática. La creciente evidencia indica que los microARNs (miARNs) podrían regular la expresión del ADNccc intrahepático, participar en el diagnóstico y la historia natural de la enfermedad.

### **Objetivos:**

(1) Realizar un metaanálisis para evaluar la precisión diagnóstica de miARN circulante como biomarcador no invasivo en el diagnóstico precoz del CHC relacionado con el VHB (CHC-VHB). (2) Explorar los marcadores subrogados no invasivos para ADNccc intrahepático en pacientes con hepatitis B crónica en la zona gris (HBC-ZG). (3) Explorar el papel regulador de los miARNs en la expresión del ADNccc en pacientes con HBC-ZG, establecer una red de interacción miARN-ARNm y proporcionar una base teórica para encontrar nuevas dianas terapéuticas.

### **Materiales y métodos:**

Después de una revisión sistemática de los estudios relevantes, se combinaron la sensibilidad, la especificidad, la razón de verosimilitud positiva (PLR) y negativa (NLR), la odds ratio de diagnóstico (DOR) y el área bajo la curva (AUC) para

diagnosticar el CHC-VHB. Se realizó un análisis de metarregresión y un análisis de subgrupos para explorar la heterogeneidad y se utilizó el gráfico en embudo de *Deeks* para evaluar el sesgo de publicación.

Se incluyeron un total de 13 pacientes con HBC-ZG. Se cuantificaron el ADNccc intrahepático y los marcadores séricos de actividad virológica (incluido el ARNpg-VHB, ADN-VHB, cuantificación del HBsAg, ALT y AST). Las correlaciones entre el ADNccc intrahepático y los marcadores séricos de actividad virológica se analizaron mediante la prueba de correlación de Spearman. Se consideró estadísticamente significativa cuando  $p < 0,05$ .

Según el nivel de expresión de ADNccc intrahepático, 13 pacientes con HBC-ZG se dividieron en grupo de referencia ( $n = 7$ ) con ADNccc  $< 1$  copia/cel y grupo de control ( $n = 6$ ) con ADNccc  $\geq 1$  copia/cel. Se aislaron miARNs y ARNm de tejido hepático, y su expresión se analizó mediante *Affymetrix GeneChip<sup>TM</sup> miRNA 4.0 Assay* y *Clariom<sup>TM</sup> S Assay, Human*, respectivamente. Se utilizó el software R para analizar la expresión diferencial (ED) de miARNs y ARNm,  $|\logFC| > \log 1,5$  y el valor  $p < 0,05$  se establecieron como valor de corte. A continuación, se realizaron los análisis de enriquecimiento de las vías GO, KEGG y GSEA. Además, las interacciones miARN-ARNm se adquirieron a partir de *miRTarBase*, y se empleó *cytoscape* para construir la red de miARN-ARNm. Se calcularon el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) y su valor  $p$ . Se consideró que la correlación entre miARN-ARNm diana era fuerte cuando el coeficiente era  $r < - 0,7$  y el valor  $p < 0,01$ .

## **Resultados:**

En el metaanálisis actual se incluyeron 19 artículos que incluyen 32 estudios. La sensibilidad, especificidad, PLR, NLR, DOR y AUC generales fueron 0,83 (IC 95%: 0,79 - 0,87), 0,78 (IC 95%: 0,73- 0,83), 3,9 (IC 95%: 3,0 - 4,9), 0,21 (IC 95%: 0,16 - 0,27), 18 (IC 95%: 12 - 27) y 0,88 (IC 95%: 0,85 - 0,91), respectivamente. El análisis de subgrupos muestra que el uso de los *clusters* de miARN junto con un aumento del tamaño de muestra pueden mejorar la precisión diagnóstica. Además, no hay sesgo de

publicación.

En pacientes con HBC-ZG, se vieron correlaciones significativas entre los niveles séricos de ARNpg-VHB, ADN-VHB y cuantificación del HBsAg con ADNccc intrahepático ( $r = 0,790$ ,  $p = 0,001$ ,  $r = 0,660$ ,  $p = 0,013$ , y  $r = 0,730$ ,  $p = 0,004$ , respectivamente). Entre ellos, la correlación entre el ARNpg-VHB sérico y el ADNccc intrahepático es mayor que la del ADN-VHB y la cuantificación del HBsAg. No hubo correlación significativa entre AST y ALT con ADNccc intrahepático ( $r = 0,470$ ,  $p = 0,103$ , y  $r = 0,420$ ,  $p = 0,150$ , respectivamente).

Se cribaron un total de 19 ED miARNs que consisten en 7 ED miARNs *up*-regulados y 12 *down*-regulados, y 340 ED ARNm que consisten en 180 *up*-regulados y 160 *down*-regulados. Los términos GO más enriquecidos estaban relacionados con el proceso biológico del virus, como la regulación del ciclo de vida viral, la regulación del proceso viral y la regulación de la replicación del genoma viral. El análisis de enriquecimiento de la vía KEGG sugirió que estos objetivos predichos estaban vinculados con la hepatitis B. Finalmente, se estableció una posible red reguladora de miARN-ARNm basada en los resultados del análisis de correlación de expresión, entre los cuales miR-4295 - ZNF224 mostró una correlación relativamente alta.

### **Conclusión:**

Los miARNs circulantes (especialmente el miR-125b) podrían servir como un biomarcador no invasivo potencial en el diagnóstico precoz de pacientes con CHC-VHB. Existe una correlación significativa entre el ARNpg-VHB sérico y el ADNccc intrahepático en pacientes con HBC-ZG, lo que indica que el ARNpg-VHB sérico es un potencial biomarcador subrogado fiable del ADNccc intrahepático. La disminución de la expresión de miR-4295 en pacientes con HBC-ZG con bajo nivel de ADNccc está relacionada con el aumento de la expresión de ZNF224, que está involucrado en el proceso biológico de la replicación del virus y la regulación del ciclo de vida. Nuestros hallazgos pueden proporcionar nuevos objetivos potenciales para el tratamiento de HBC. En el futuro, se necesitan más experimentos para verificar nuestros hallazgos.

## **Abstract**

### **Background:**

Hepatitis B virus (HBV) infection remains a global public health problem, which is the main risk factor for hepatocellular carcinoma (HCC). Most chronic hepatitis B (CHB) patients belong to the 5 phases in the natural history of HBV defined by the European Association for the Study of the Liver (EASL) in 2017, but some individuals who do not fit into any of the usual immune states and are considered to be in the “grey zone (GZ)”. Covalently closed circular DNA (cccDNA) plays a key role in the virus life cycle and it cannot be eliminated by present therapies. Furthermore, the quantification of intrahepatic cccDNA is not easy to generalize due to the invasive nature of liver biopsy. Increasing evidence indicates that microRNA (miRNA) could regulate the expression of intrahepatic cccDNA, participate in the diagnosis and natural history of the disease.

### **Aims:**

(1) To evaluate the diagnostic accuracy of circulating miRNA as a non-invasive biomarker in the early diagnosis of HBV-related HCC. (2) To explore non-invasive surrogate markers for intrahepatic cccDNA in patients with chronic hepatitis B in the grey zone (CHB-GZ). (3) To explore the regulatory role of miRNAs on cccDNA expression in CHB-GZ patients, establish a miRNA-mRNA interaction network, and provide a theoretical basis for finding new therapeutic targets.

### **Materials and methods:**

After a systematic review of the relevant studies, the sensitivity, specificity, positive likelihood ratios (PLR), negative likelihood ratios (NLR), diagnostic odds ratio (DOR) and area under the curve (AUC) for diagnosing HBV-related HCC were pooled in this meta-analysis. Meta-regression analysis and subgroup analysis were performed to explore heterogeneity and Deeks' funnel plot was used to assess publication bias.

A total of 13 CHB-GZ patients were enrolled. Intrahepatic HBV cccDNA and serum virological activity markers (including HBV-pgRNA, HBV-DNA, HBsAg quantification, ALT and AST) were measured. Correlations between intrahepatic cccDNA and serum virological activity markers were analyzed by Spearman's correlation analysis. P-value < 0.05 was considered statistically significant.

According to the expression level of intrahepatic cccDNA, 13 CHB-GZ patients were divided into reference group (n=7) with cccDNA < 1 copies/cell and control group (n=6) cccDNA  $\geq$  1 copies/cell. MiRNA and mRNA were isolated from liver tissue, and their expression were analyzed by Affymetrix GeneChip<sup>TM</sup> miRNA 4.0 Assay and Clariom<sup>TM</sup> S Assay, Human, respectively. R software was used to analyze differentially expressed miRNA (DE-miRNA) and mRNA (DE-mRNA),  $|\log_{2}FC| > \log_{2}1.5$  and p-value < 0.05 were set as the cut-off value. Next, enrichment analyzes of the GO, KEGG and GSEA were performed. In addition, miRNA-mRNA interactions were acquired from miRTarBase, and cytoscape was employed to construct miRNA-mRNA network. Pearson's correlation coefficient (r) and its p-value were calculated. The correlation between target miRNA-mRNA was considered to be strong when the coefficient was  $r < -0.7$  and p-value < 0.01.

## **Results:**

19 articles including 32 studies were included in the current meta-analysis. The overall sensitivity, specificity, PLR, NLR, DOR and AUC were 0.83 (95% CI: 0.79 - 0.87), 0.78 (95% CI: 0.73 - 0.83), 3.9 (95% CI: 3.0 - 4.9), 0.21 (95% CI: 0.16 - 0.27), 18 (95% CI: 12 - 27) and 0.88 (95% CI: 0.85 - 0.91), respectively. Subgroup analysis shows that miRNA clusters with a large sample size showed better diagnostic accuracy. In addition, publication bias was not found.

In CHB-GZ patients, serum HBV-pgRNA, HBV-DNA and HBsAg quantification were significantly correlated with intrahepatic cccDNA ( $r = 0.790$ ,  $p = 0.001$ ,  $r = 0.660$ ,  $p = 0.013$  and  $r = 0.730$ ,  $p = 0.004$ , respectively). Among them, the correlation between serum HBV-pgRNA and intrahepatic cccDNA is higher than that of HBV-DNA and

HBsAg quantification. There was no significant correlation between AST and ALT with intrahepatic cccDNA ( $r = 0.470$ ,  $p = 0.103$  and  $r = 0.420$ ,  $p = 0.150$ , respectively).

A total of 19 DE-miRNAs consisting of 7 upregulated and 12 downregulated DE-miRNAs, and 340 DE-mRNAs consisting of 180 upregulated and 160 downregulated DE-mRNAs were screened. The most enriched GO terms were related to the biological process of the virus, such as regulation of the viral life cycle, regulation of the viral process, and regulation of viral genome replication. KEGG pathway enrichment analysis suggested that these predicted targets were linked to hepatitis B. Finally, a potential miRNA-mRNA regulatory network was established based on the results of expression correlation analysis, among which miR-4295 - ZNF224 showed a relative high correlation.

### **Conclusion:**

Circulating miRNAs (especially miR-125b) could serve as a potential non-invasive biomarker in the early diagnosis of HBV-related HCC patients. There is a significant correlation between serum HBV-pgRNA and intrahepatic cccDNA in CHB-GZ patients, indicating that serum HBV-pgRNA is a potential reliable surrogate biomarker for intrahepatic cccDNA. The decreased expression of miR-4295 in CHB-GZ patients with low level of cccDNA is related to the increased expression of ZNF224, which is involved in the biological process of the virus replication and life cycle regulation. Our findings may provide new potential targets for the treatment of patients with CHB infection. In the future, more experiments are needed to verify our findings.

## ÍNDICE:

AGRADECIMIENTOS .....	I
ABREVIATURAS .....	II
<b>Capítulo I: INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1. VIRUS DE LA HEPATITIS B (VHB) .....	2
1.1. Descubrimiento del VHB .....	2
1.2. Estructura de la partícula viral .....	3
1.3. Estructura del genoma viral .....	5
1.3.1. Marcos abiertos de lectura (ORFs) .....	6
1.3.2. Promotores y potenciadores .....	7
1.4. Genotipos del VHB .....	8
1.5. Mutaciones del VHB .....	9
1.6. Ciclo biológico y replicación del VHB .....	11
1.7. Inmunopatogénesis de la infección por el VHB .....	14
1.8. Epidemiología del VHB .....	15
1.9. Historia natural de la infección crónica por el VHB .....	17
1.9.1. Fase de la infección crónica por el VHB según EASL .....	17
1.9.2. Zona gris (ZG) .....	19
1.10. Cuadro clínico de la hepatitis B .....	21
1.10.1. Hepatitis aguda .....	21
1.10.2. Hepatitis B crónica .....	21
1.10.3. Manifestaciones extrahepáticas .....	22
1.10.4. Cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular .....	23
1.11. Métodos diagnósticos de la hepatitis B .....	25
1.11.1. Marcadores serológicos .....	25
1.11.2. Marcadores virológicos .....	26
1.11.3. Marcadores histológicos .....	26
1.11.4. Marcadores subrogados del ADNccc intrahepático .....	27

1.11.4.1. qHBsAg.....	27
1.11.4.2. HBcrAg.....	28
1.11.4.3. ARNpg-VHB sérico.....	28
1.12. Tratamiento de la hepatitis B .....	30
1.12.1. Objetivos del tratamiento .....	30
1.12.2. Indicaciones del tratamiento .....	30
1.12.3. Fármacos antivirales actuales .....	32
1.12.3.1. Interferón.....	32
1.12.3.2. Análogos de nucleótidos .....	32
1.12.4. Nuevas estrategias para el tratamiento del VHB .....	33
1.12.4.1. Nuevos medicamentos dirigidos al ciclo de vida del VHB .....	33
1.12.4.1.1. Inhibidores de entrada del VHB .....	33
1.12.4.1.2. Destrucción de ADNccc por edición genómica.....	34
1.12.4.1.3. Control epigenético de ADNccc del VHB.....	35
1.12.4.1.4. Anti-VHB siARN y microARN .....	36
1.12.4.1.5. Inhibidores de ensamblaje de cápside.....	37
1.12.4.2. Nuevos agentes que modulan la respuesta inmune de huésped .....	37
2. LOS MICROARNS .....	39
2.1. Descubrimiento y características de los microARNs.....	39
2.2. Biogénesis y mecanismo de acción de los microARNs.....	40
2.3. Función biológica de los microARNs.....	43
2.4. MicroARNs y replicación del VHB.....	44
2.4.1. MicroARNs que inhiben la replicación del VHB .....	44
2.4.2. MicroARNs que promueven la replicación del VHB .....	46
2.5. MicroARNs implicados en enfermedades asociadas al VHB.....	50
2.5.1. MicroARNs en HBC.....	50
2.5.2. MicroARNs en fibrosis y cirrosis hepática relacionados con el VHB (CH- VHB) .....	50
2.5.3. MicroARNs en CHC relacionados con el VHB (CHC-VHB) .....	52

<b>CAPÍTULO II: HIPÓTESIS</b> .....	56
<b>CAPÍTULO III: OBJETIVOS</b> .....	58
<b>CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	60
1. METAANÁLISIS DE MICROARN EN CHC-VHB .....	61
1.1. Estudio de identificación y selección.....	61
1.2. Criterios de inclusión y exclusión.....	61
1.3. Extracción de datos y evaluación de calidad .....	62
1.4. Síntesis de datos .....	62
2. CORRELACIÓN ENTRE ADNCCC Y MARCADORES VIROLÓGICOS EN PACIENTES CON HBC-ZG .....	64
2.1. Pacientes y muestras .....	64
2.1.1. Población del estudio .....	64
2.1.2. Obtención de muestras .....	65
2.1.2.1. Recogida de sangre periférica.....	65
2.1.2.2. Obtención de tejido hepático .....	65
2.2. Evaluación general y específica.....	65
2.2.1. Evaluación general.....	65
2.2.2. Evaluación específica.....	66
2.2.2.1. Cuantificación de ARNpg-VHB en suero.....	66
2.2.2.2. Cuantificación de ADN-VHB intrahepático total, ADNccc y ARNpg- VHB intrahepático.....	67
2.2.2.3. Cuantificación de HBsAg en suero.....	68
2.3. Análisis estadístico .....	69
3. MICROARNS EN PACIENTES CON HBC-ZG.....	70
3.1. Obtención del perfil de expresión diferencial de miARNs y ARNm.....	70
3.1.1. Extracción de ARN .....	70
3.1.2. Microarray.....	71
3.1.3. Perfil de expresión de miARN y ARNm en muestras de tejido hepático de	

individuos sanos .....	72
3.2. Análisis bioinformático .....	72
3.2.1. Preprocesado .....	72
3.2.1.1. Preprocesado de los resultados de microarrays .....	72
3.2.1.2. Preprocesado de los resultados combinados de microarray y GEO ...	73
3.2.2. Expresión diferencial (ED) .....	74
3.2.2.1. Análisis de ED de miARNs en muestras de tejido hepático .....	74
3.2.2.2. Análisis de ED de ARNm en muestras de tejido hepático .....	76
3.2.2.3. Análisis de ED de miARNs en muestras de plasma .....	78
3.2.3. Análisis de enriquecimiento funcional.....	79
3.2.4. Construcción de red miARN-ARNm en muestra de tejido hepático .....	79
<b>CAPÍTULO V: RESULTADOS</b> .....	80
1. METAANÁLISIS DE MICROARN EN CHC-VHB .....	81
1.1. Resultados de la investigación .....	81
1.2. Características de los estudios elegibles .....	81
1.3. Precisión diagnóstica de los miARNs circulantes en CHC-VHB.....	85
1.4. Valor diagnóstico de miR-125b en CHC-VHB .....	85
1.5. Análisis de metarregresión.....	88
1.6. Análisis de subgrupos .....	89
1.7. El sesgo de publicación.....	89
2. CORRELACIÓN ENTRE ADNCCC Y MARCADORES VIROLÓGICOS EN PACIENTES CON HBC-ZG .....	91
2.1. Características de la población.....	91
2.2. Correlación entre ADNccc y marcadores virológicos.....	92
2.2.1. Correlación entre los niveles séricos de ARNpg-VHB y los indicadores de replicación intrahepática.....	92
2.2.2. Correlación entre los niveles séricos de ADN-VHB y los indicadores de replicación intrahepática.....	93
2.2.3. Correlación entre los niveles séricos de qHBsAg y los indicadores de	

replicación intrahepática .....	94
2.2.4. Correlación entre los niveles séricos de AST, ALT y los indicadores de replicación intrahepática .....	94
2.2.5. Correlación entre ADNccc y los hallazgos histopatológicos .....	94
3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO: MICROARNs EN HBC-ZG.....	95
3.1. Preprocesamiento de los datos .....	95
3.1.1. Preprocesamiento de miARNs en muestras de tejido hepático .....	95
3.1.2. Preprocesamiento de ARNm en muestras de tejido hepático .....	96
3.1.3. Preprocesamiento de miARNs en muestras de plasma.....	97
3.1.4. Procesamiento de datos combinados del HBC-ZG e individuos sanos en tejido hepático .....	98
3.2. Expresión diferencial .....	99
3.2.1. ED de miARNs en muestra de tejido hepático .....	99
3.2.1.1. ED de miARNs entre HBC-ZG e individuos sanos .....	99
3.2.1.2. ED de miARNs en función del nivel del ADNccc.....	102
3.2.1.3. ED de miARNs en función de qHBsAg .....	104
3.2.1.4. ED de miARNs en función de tratamiento antiviral.....	106
3.2.2. ED de ARNm en muestra de tejido hepático .....	108
3.2.2.1. ED de ARNm entre HBC-ZG e individuos sanos.....	108
3.2.2.2. ED de ARNm en función del nivel del ADNccc.....	109
3.2.2.3. ED de ARNm en función de qHBsAg .....	111
3.2.2.4. ED de ARNm en función de tratamiento antiviral.....	112
3.2.3. ED de miARNs en muestras de plasma .....	113
3.2.3.1. ED de miARNs en función del nivel del ADNccc.....	113
3.2.3.2. ED de miARNs en función de qHBsAg .....	114
3.2.3.3. ED de miARNs en función de tratamiento antiviral.....	115
3.3. Enriquecimiento funcional.....	116
3.3.1. Enriquecimiento funcional entre HBC-ZG e individuos sanos .....	116
3.3.2. Enriquecimiento funcional en función de ADNccc .....	118

3.3.3. Enriquecimiento funcional en función de qHBsAg.....	119
3.3.4. Enriquecimiento funcional en función de tratamiento antiviral .....	121
3.4. Red de interacción miARN-ARNm en muestra de tejido hepático .....	122
3.4.1. Red de miARN-ARNm entre HBC-ZG e individuos sanos .....	122
3.4.2. Red de miARN-ARNm en función de ADNccc .....	125
3.4.3. Red de miARN-ARNm en función de qHBsAg.....	127
3.4.4. Red de miARN-ARNm en función de tratamiento antiviral .....	129
<b>CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN .....</b>	<b>131</b>
1. METAANÁLISIS DE MICROARN EN CHC-VHB .....	132
2. CORRELACIÓN ENTRE ADNCCC Y MARCADORES VIROLÓGICOS EN PACIENTES CON HBC-ZG .....	137
3. MICROARNS EN PACIENTS CON HBC-ZG .....	142
<b>CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES .....</b>	<b>153</b>
<b>CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>155</b>
<b>CAPÍTULO IX: ANEXOS.....</b>	<b>192</b>

# **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN**

# **1. VIRUS DE LA HEPATITIS B (VHB)**

## **1.1. Descubrimiento del VHB**

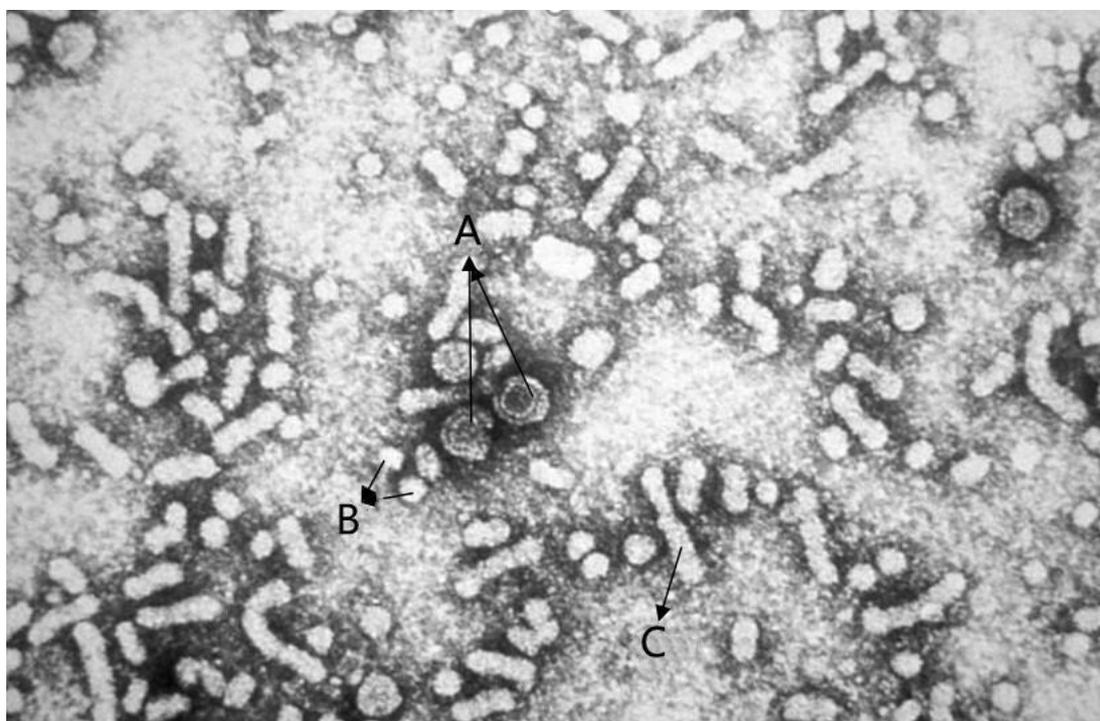
Se considera que es Hipócrates (460-337 A.C.) quien describió por primera vez la hepatitis viral como enfermedad, la cual fue nombrada como “ictericia catarral o ictericia epidémica”<sup>(1)</sup>. F. O. MacCallumen en 1940 se dio cuenta de que parte del ejército al que se le había administrado la vacuna contra la fiebre amarilla, pocos meses después había enfermado de hepatitis<sup>(1)</sup>. Asimismo, este médico concluyó que, usando sin esterilizar agujas y jeringas para tratar enfermedades venéreas o diabetes, era muy probable que se contrajera también la hepatitis<sup>(1)</sup>. En 1950, los médicos descubrieron que, después de una transfusión de sangre, también se corría el riesgo de contraer dicha enfermedad y fue cuando se propuso el concepto de hepatitis sérica<sup>(2)</sup>.

En 1964, Baruch Blumberg y Harvey Alter<sup>(1)</sup> observaron una reacción inusual entre el suero de un paciente hemofílico transfundido y un aborigen australiano, por lo que el nuevo antígeno fue designado como “antígeno australiano”<sup>(3)</sup>. A finales de 1970, tras concluir que el antígeno australiano era una parte del virus que originaba la hepatitis B, David Dane identificó el virus completo en pacientes positivos. A partir de este momento, tomó el nombre de “partículas de Dane”<sup>(4)</sup>. Posteriormente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) cambió la nomenclatura del antígeno australiano, tomando ahora el nombre de antígeno de superficie del VHB (HBsAg). En 1976, Blumberg fue galardonado con el Premio Nobel de Medicina, por descubrir el VHB y desarrollar la primera vacuna contra el VHB. En 1979, Galibert completó toda la secuencia del genoma del VHB y lo mostró como un virus del ácido desoxirribonucleico (ADN) parcialmente bicatenario, con aproximadamente 3.200 pares de bases de longitud<sup>(5)</sup>.

## 1.2. Estructura de la partícula viral

El VHB pertenece a la familia de los Hepadnaviridae (del griego *hepa*, hígado y *dna viridae*, virus de ácido desoxirribonucleico). A su vez, corresponde al género Orthohepadnavirus. El hombre es su hospedador natural; sin embargo, se han podido aislar virus similares en simios, marmotas, ardillas, garzas y patos<sup>(6)</sup>.

Bajo el microscopio, se distinguen tres estructuras distintas: unas partículas esféricas grandes, unas partículas esféricas pequeñas y unas partículas filamentosas similares a bastones (Figura 1).



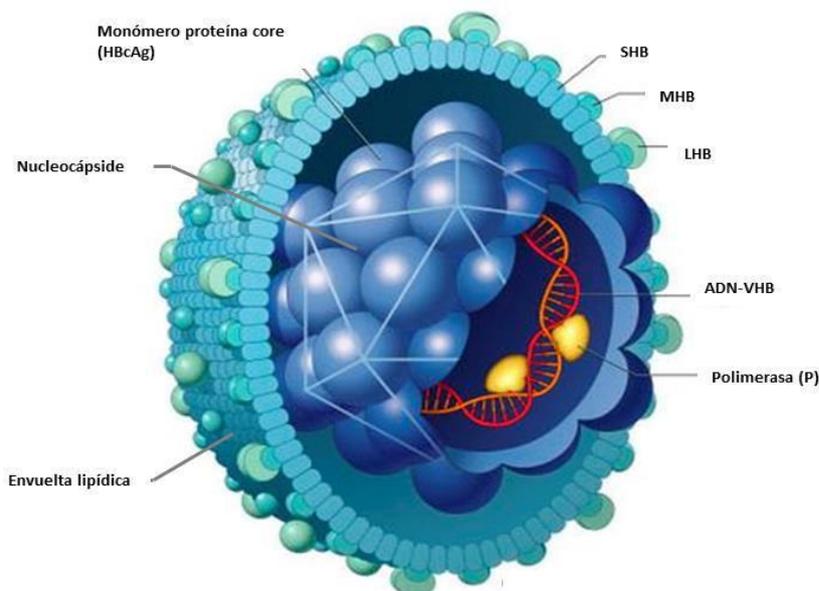
**Figura 1.** Morfología del VHB bajo el microscopio electrónico, en donde se observan: (A) las partículas de Dane; (B) partículas esféricas pequeñas; y (C) partículas filamentosas.

Fuente: imagen de *Wikipedia*.

Las partículas esféricas grandes, también conocidas como partículas de Dane, miden de entre 42 a 47 nm y son partículas completas e infecciosas del VHB. Estas están formadas por una envuelta externa lipídica, así como de una cápside interna proteica. La envuelta, proviene de la célula a la que infecta, y está compuesta de una bicapa de fosfolípidos, la cual lleva el HBsAg, y comprende tres tipos distintos de

glicoproteínas, las cuales tienen una diversidad de superficies, que son: una grande, llamada LHBs, otra mediana, conocida por MHBs y, finalmente, una pequeña o SHBs<sup>(7)</sup>. La cápside interna está formada de una nucleocápside icosaédrica, a la cual se le conoce también con el nombre de “core”, que es la que posee el ADN viral, así como la enzima polimerasa viral multifuncional. Esta última tiene actividad de transcriptasa reversa y de ADN polimerasa, con el genoma asociado. Son los antígenos del core (HBcAg) los que rodean todo este complejo<sup>(8)</sup> (Figura 2).

Las partículas esféricas pequeñas son partículas huecas con un diámetro de 22 nm y su componente principal es el HBsAg. Una partícula esférica posee hasta 100 monómeros de HBsAg, las cuales se acoplan a las membranas del compartimento post-retículo endoplasmático, pre-aparato de Golgi<sup>(9)</sup>. Esta puede ser entre  $10^4$ - $10^6$  veces más cuantiosos en el suero de alguien infectado que en las propias partículas virales<sup>(9)</sup>. Estas partículas provienen de la cubierta o envoltura, por haberse sintetizado en exceso, por lo que no son infecciosas. Por otro lado, las partículas filamentosas poseen alrededor de 22 nm de diámetro, son de longitud variable, más escasas que las esféricas. No obstante, existen 100 veces más que las virales.



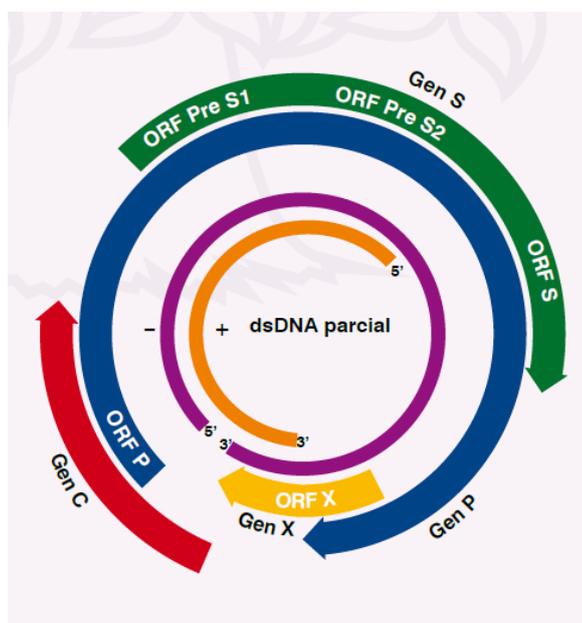
**Figura 2.** Estructura de la partícula de Dane.

Fuente: © 2002 James A. Perkins, *Medical and Scientific illustrations*.

### 1.3. Estructura del genoma viral

El genoma del VHB está formado por una única molécula de ADN circular bicatenario parcial, constituido por una cadena larga y una corta. La cadena larga, que posee polaridad negativa, tiene las siguientes características: es completa; circular; no cerrada; de 3,2kb, aproximadamente; dispone de un polipéptido covalente en el extremo 5', el cual actúa como "primer"<sup>(10)</sup>. La cadena corta, con una polaridad positiva, tiene las siguientes características: es incompleta; posee una longitud variable, llegando a ser un 50% más corta que la primera; su extremo 3' tiene una ADN polimerasa, con poder para completarla, llegando a formar un ADN circular con doble cadena completa durante el comienzo del ciclo de replicación<sup>(11)</sup>.

La cadena larga, que es la negativa, tiene toda la información genética y dispone de algunos marcos abiertos de lectura, llamados ORFs u *Open Reading Frames*, y son cuatro: S, C, P y X, fuertemente solapados. Poseen una capacidad codificante de 1,5 veces mayor que si no se solapan<sup>(12)</sup>. Bajo la regulación conjunta de los cuatro promotores y dos potenciadores, se transcriben distintos transcritos del VHB. (Figura 3)



**Figura 3.** Estructura del genoma del VHB.

Fuente: Medicina & Laboratorio 2011.

### 1.3.1. Marcos abiertos de lectura (ORFs)

El ORF-S, o región S, está formado por las regiones llamadas Pre-S1, Pre-S2 y el gen S, los cuales son capaces de codificar tres tipos de proteínas de la envoltura viral, que son los SHBs, MHBs y LHBs. La primera es una proteína altamente hidrofóbica, compuesta por 226 aminoácidos. De todas ellas, es la que posee mayor cantidad y la que porta la antigenicidad del HBsAg. El gen Pre-S2 es el que codifica la proteína mediana MHBs del HBsAg. Por su parte, el gen Pre-S1, con las otras, produce la proteína larga (HBsAg + Pre S2Ag + Pre S1Ag), la cual quizá es la que tiene la responsabilidad de interactuar sobre la superficie del virus con la membrana de la célula del hepatocito. Por esta razón, se ha visto la posibilidad de que tenga un papel determinante en la patogenia de este proceso.

El ORF-C es conocido también como región C, la cual es capaz de codificar la proteína o antígeno del core (HBcAg). La región pre-core de 90 nucleótidos aproximadamente la precede. Así pues, esta región C, tal y como también lo hacía la región pre-core, tienen la facultad de codificar el antígeno “e” (HBeAg). El HBcAg es determinante a la hora de eliminar el VHB en las personas con inmunocompetencia. El HBeAg es secretado como una proteína soluble, no estructural. A pesar de que no se necesita para el ensamblaje viral o la replicación, es significativo su papel de cara a la infección natural in vivo<sup>(13)</sup>.

El ORF-P o región P, constituye la región más grande del VHB, ya que está formada por 2.436 nucleótidos. Esta se asocia a replicación del virus, al codificar la ADN polimerasa. La forman cuatro dominios: un dominio de proteína terminal, el cual ayuda a que se inicie la síntesis de la cadena negativa de ADN; un dominio espaciador, con una longitud que varía dependiendo del genotipo; un dominio con actividad de transcriptasa reversa y de ADN polimerasa, que interviene en la síntesis del genoma viral y el dominio ribonucleasa (RNasa) H, capaz de degradar al ARN pregenómico (ARNpg) y de facilitar la replicación<sup>(14)</sup>.

El ORF-X o región X, es capaz de codificar una proteína no estructural, conocida por antígeno X del VHB (HBxAg). Funciona como un fuerte transactivador de

transcripción, capacitado para potenciar asimismo la expresión de los genes celulares<sup>(15)</sup>. Además, esta proteína es capaz de unirse a un complejo de proteasoma, imprescindible para el reconocimiento inmune. Se puede decir que, al pegarse la proteína X al proteasoma, habría posibilidad de que se inhibiera la presentación antigénica, por lo que se evadiría la respuesta inmune contra el VHB<sup>(16)</sup>.

### 1.3.2. Promotores y potenciadores

Cada uno de los ARN mensajeros (ARNm) posee una síntesis gracias a su correspondiente promotor. A su vez, estos promotores poseen una actividad regulada por los elementos potenciadores I y II<sup>(17)</sup>, los cuales muestran una especificidad hepática. La causa de ello es porque necesitan para su actividad factores de transcripción hepáticos, localizados en ORF-C. Son cuatro las regiones promotoras y son las siguientes: PreS1, PreS2/S, central y X, ubicadas todas en ORF-P. Por el factor nuclear 4 $\alpha$  de hepatocitos (HNF4 $\alpha$ ) se activa el promotor PreS1 y comienza la transcripción del ARNm, la cual es capaz de codificar la proteína PreS1/L de la envoltura vírica. Por otro lado, el promotor PreS2 o S produce la transcripción de los ARNm, con capacidad para crear el polipéptido preS2/M y al S, y es el potenciador II el que lo controla<sup>(18)</sup>. En cuanto al promotor central, este abarca dos regiones bien definidas: por una parte, se encuentra el promotor básico del core (PBC) y, por la otra, la región reguladora superior. Cuando se une el factor de transcripción al promotor posibilita la transcripción de dos ARNm, de tal forma que uno de ellos es capaz de codificar la proteína pre-core, que posee el HBeAg, mientras que el otro, el ARNpg, lo hace con la polimerasa y el HBcAg, actuando como molde para que se produzca la replicación viral. Por último, el promotor X es el que posee la facultad de controlar la transcripción de la proteína X.

## 1.4. Genotipos del VHB

De acuerdo a su secuencia, se han descrito diez genotipos (A - J) del VHB, los cuales presentan diferencias superiores al 8% en el genoma. Hay un número superior a 30 subgenotipos, distinguidos todos ellos por poseer diferencias entre el 4 - 8%<sup>(19)</sup>, y se distribuyen geográficamente por lugares concretos y poseen orígenes étnicos específicos. Así pues, nos encontramos que el genotipo A es más usual en Asia, África, Europa y América; el genotipo B, en Asia, Oceanía y Canadá; por su parte, el genotipo C tiene una alta prevalencia en Asia y Oceanía, mientras que el genotipo D tiene una distribución global como el genotipo A, circulando principalmente en Europa, Asia, Australia y los Estados Unidos<sup>(20)</sup>. En cuanto al genotipo E, este se encuentra en África occidental y central, aunque algunos casos también han reportado en Europa y Colombia<sup>(21)</sup>. El genotipo G, lo vemos en Francia, Alemania, Estados Unidos, Japón y África. Los genotipos F y H son exclusivos para América: el genotipo F se encuentra en toda América, desde Alaska a Argentina, mientras que el genotipo H, en América Central y el sur de Estados Unidos<sup>(21)</sup>. El genotipo I y J se describieron en muestras obtenidas en pacientes de Laos<sup>(22)</sup> y Japón<sup>(23)</sup>, respectivamente.

Ciertos estudios revelaron que los genotipos B y C predominan sobre todo en China, y que el genotipo C tiene tendencia a producir una enfermedad hepática más severa, en donde se percibe más actividad necroinflamatoria y fibrosis. No obstante, los genotipos más frecuentes que tienen lugar en España son el D y el A. Al respecto, hay algunas investigaciones que han puesto en relación ciertas manifestaciones clínicas con la progresión de la enfermedad hepática con genotipos concretos. Por eso se puede afirmar que el significado clínico de ciertos genotipos no es concluyente. Se requiere, pues, un número mayor de pacientes que permitan corroborar dichos datos.

## 1.5. Mutaciones del VHB

El VHB no es estable, y posee la capacidad de producir distintas variantes o *quasispecies* en un mismo huésped. Estas son diferentes gracias a unas mutaciones pequeñas que, en la mayoría de las veces, ayudan al potencial oncogénico del virus, así como a mitigar la inmunogenicidad y la antigenicidad<sup>(24)</sup>. El genoma del VHB posee una tasa de mutación de  $1,4 - 3,2 \times 10^5$  sustituciones/nucleótido/año, lo que representa un aumento con respecto a otros virus ADN, al ser 100 veces más que ellos<sup>(25)</sup>. Las mutaciones más frecuentes del VHB se presentan en la Figura 4.

- Mutación del gen C

En la región pre-core, la mutación que aparece con más frecuencia ejerce una afección sobre el nucleótido, que está en posición 1896. Allí, el triplete UGG pasa a UAG (G1896A), lo cual produce un codón de parada. Todo ello ocasiona que se termine prematuramente la síntesis de la proteína pre-core<sup>(26)</sup>. La variante citada tiene un efecto sobre la estabilidad de la estructura épsilon, así como sobre la señal de la encapsidación<sup>(27)</sup>. Las mutaciones que tienen lugar en la región PBC tienen posibilidad de regular la transcripción del ARNm preC e inhabilitar la síntesis de HBeAg. La doble mutación T1762A / A1764G está relacionada con la disminución en la síntesis del ARN que codifica la proteína core y la polimerasa. Esto ocasiona un descenso de la carga viral<sup>(28)</sup>.

- Mutación del gen S

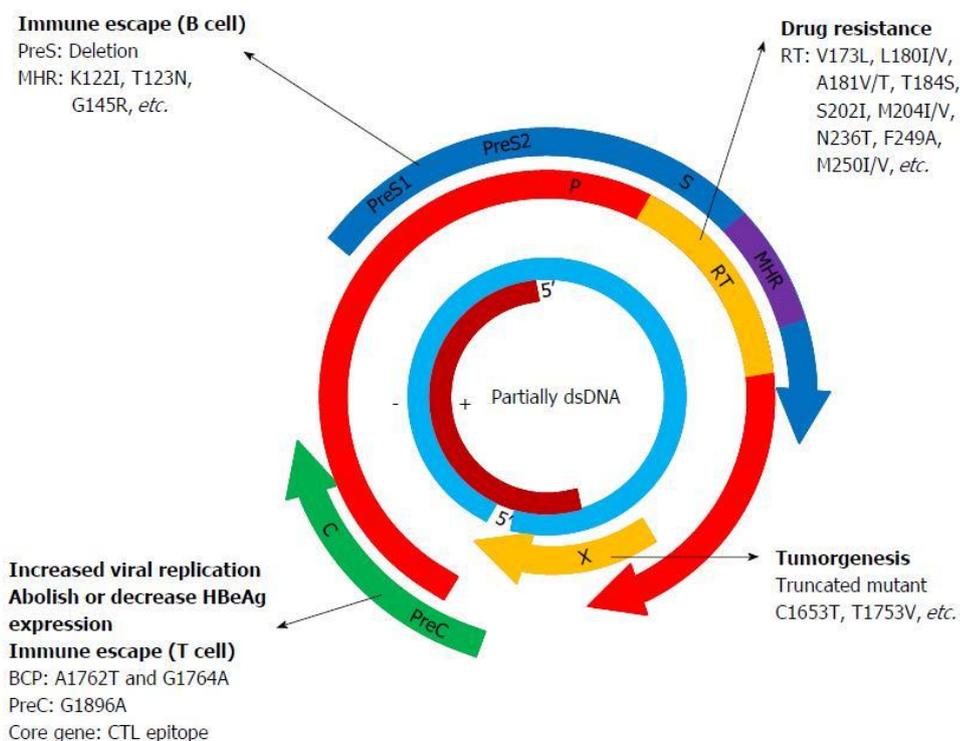
Las mutaciones que tienen efecto sobre este epítipo causan variantes de escape, tanto en cuanto a la inmunidad natural como a la de la vacunación<sup>(29)</sup>. La estructura del HBsAg puede quedar afectada a causa de otras variantes, como son, por ejemplo, las N144R, T131I, K141E, así como las que son producto de la inserción de tres aminoácidos entre las posiciones 123 y 124<sup>(30)</sup>. Aparte de estas, en el determinante “a” se han detectado otras sustituciones.

- Mutación del gen P

Las mutaciones ocasionadas en esta secuencia que tienen efecto sobre dominios catalíticos ocasionan resistencia a los tratamientos con inhibidores de la enzima, los cuales usan análogos de nucleótidos (ANs). En el dominio C encontramos el motivo YMDD (tirosina, metionina, aspartato, aspartato), el cual está altamente conservado en todos los genotipos y es primordial en la replicación del virus. Por otro lado, las mutaciones YVDD (rtM204V) y YIDD (rtM204I) se relacionan con la resistencia a L-nucleótidos, como son, por ejemplo, las lamivudina, telbivudina y entecavir<sup>(31)</sup>.

- Mutación del gen X

Es más probable que el producto viral del gen X intervenga en la patogénesis del carcinoma hepatocelular (CHC), como se viene demostrando desde hace años. Parece ser que el antígeno X origina la carcinogénesis, a causa de su interacción con proteínas que modifican la regulación de distintas vías de señalización. Estas, a su vez, tienen una participación destacada dentro del ciclo celular y la apoptosis<sup>(32)</sup>.



**Figura 4.** Mutaciones del VHB

Fuente: *World Journal of Gastroenterology*<sup>(33)</sup>.

## 1.6. Ciclo biológico y replicación del VHB

El ciclo replicativo del VHB es complejo y comprende varios procesos biológicos que se mencionan a continuación (Figura 5).

- Entrada del virus

La infección tiene lugar cuando se une el virus al receptor celular: péptido cotransportador de taurocolato de sodio (NTCP)<sup>(34)</sup>. El NTCP se trata de un miembro electrogénico, perteneciente a la familia portadora de transportadores de solutos, el cual se expresa fundamentalmente en el hígado y se ubica en la membrana basolateral de los hepatocitos<sup>(35)</sup>. El NTCP transportan predominantemente sales biliares y compuestos sulfatados, pero también es capaz de mediar en el transporte de sustratos adicionales, como por ejemplo las hormonas tiroideas, fármacos y toxinas<sup>(36)</sup>. Pasado el periodo de interacción, las partículas virales crean un endosoma en la parte interna de la célula hepática, en donde las nucleocápsides son liberadas al citoplasma con la molécula de ADN relajado circular (ADNrc) en el interior y se une a la proteína P covalentemente<sup>(37)</sup>.

- Transporte de las cápsides desde el citoplasma al núcleo y liberación del ADNrc en el núcleo

Los microtúbulos son los causantes de que se transporte de forma activa la nucleocápside hasta el complejo del poro nuclear. Los dímeros de HBcAg poseen una señal de localización nuclear, la cual interacciona con la membrana nuclear. Por su parte, el ADNrc se libera en el núcleo, debido a la retención en el complejo del poro nuclear de las nucleocápsides<sup>(38)</sup>.

- Formación del ADN circular covalente cerrado (ADNccc)

En la parte central del núcleo, el ADNrc pasa por ciertos pasos bioquímicos, convirtiéndose en ADNccc<sup>(39)</sup>, que es el intermediario crucial que sirve como plantilla de replicación del VHB durante el ciclo de vida del VHB, en donde se produce lo siguiente: (a) se libera la proteína P, la cual está unida covalentemente al extremo 5' de

la cadena negativa y se elimina el oligonucleótido del ácido ribonucleico (ARN) en el extremo 5' de la cadena positiva, (b) se elimina una de las redundancias terminales de la cadena negativa, (c) finaliza la síntesis de la cadena positiva a causa de la enzima polimerasa y (d) se unen de forma covalente los extremos 5' y 3' de las dos cadenas hasta generarse la ADNccc. Una vez formado, el ADNccc se organizará en un minicromosoma viral similar a la cromatina.

- Transcripción viral del ADNccc y traducción proteica

Después de que el ADNrc se convierte en ADNccc en el núcleo del hepatocito, el ADNccc se usa como plantilla para que se produzca la transcripción de los diferentes ARNm mediante la ARN polimerasa II. Estos son transportados al citoplasma y, posteriormente, traducidos por los ribosomas celulares dando lugar a las proteínas virales<sup>(40)</sup>. Estas proteínas son traducidas partiendo de cinco ARNm diferentes, los cuales son: ARN precore de 3,5 kb (HBeAg), ARNpg 3,5 kb (core y polimerasa), así como tres ARN subgenómicos: de 2,4 kb (LHBs); de 2,1 kb (MHBs y SHBs); y de 0,7 kb (proteína X)<sup>(41)</sup>. Los ARN subgenómicos, los cuales codifican para las proteínas virales de envoltura, así como los ARN genómicos, cuya característica principal es que son bifuncionales, actúan como mensajeros para las proteínas del core y de la polimerasa viral. Son, además, el templado de la transcripción reversa, por la cual se replica el VHB. Por su parte, la HBx se trata de una proteína multifuncional que funciona activando las transcripciones virales y de genes del huésped, afectando en los procesos de reparación del ADN y regulando el crecimiento y, finalmente, la muerte celular<sup>(42)</sup>.

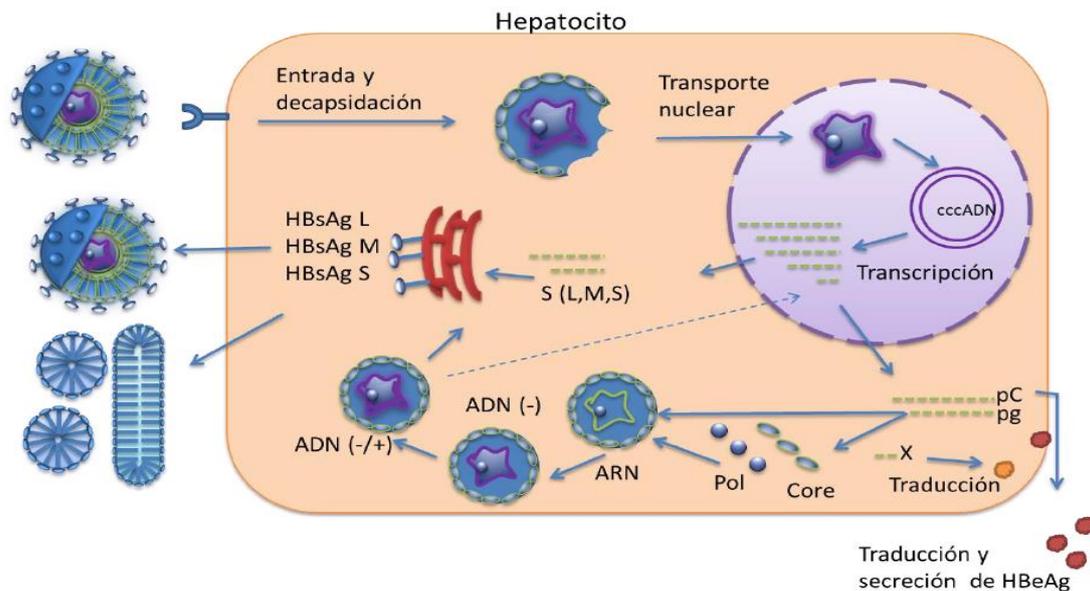
- Formación de las partículas core y transcripción reversa

Se produce una reacción muy específica cuando el ARN genómico es encapsidado en partículas de nucleocápside viral juntamente con la polimerasa. Para ello, no solo necesita las proteínas del core, sino también requiere los productos del gen P. Cuando ya se produce dicha encapsidación, el ARN genómico inicia su transcripción inversa,

dando lugar a la cadena negativa de ADN. Para que se produzca la síntesis de esta primera cadena, usa una proteína codificada por el gen P de la polimerasa viral como iniciador<sup>(43)</sup>. Sin embargo, la segunda cadena de ADN positiva usa como molde a la cadena negativa, así como a un pequeño ARN procedente del extremo 5' del ARN genómico como iniciador<sup>(43)</sup>. Para que la partícula quede envuelta y liberada en este proceso, no se requiere la síntesis completa de la cadena positiva de ADN.

- Maduración y secreción de viriones y partículas subvirales

Tras el proceso de síntesis del ADN viral, brotan desde el retículo endoplasmático las partículas core. Es ahora cuando adquiere la cubierta de glicoproteínas y se forma la partícula completa del VHB. Posteriormente, y como último paso, se produce la secreción del virus fuera de la célula.



**Figura 5.** Ciclo replicativo del VHB.

Fuente: Imagen de Ina Sevic.

## 1.7. Inmunopatogénesis de la infección por el VHB

La interacción del virus con el sistema inmunitario del huésped es fundamental a la hora de que este se infecte por el VHB. La respuesta inmunitaria del huésped contra el VHB incluye principalmente dos partes: inmunidad innata o inespecífica e inmunidad adaptativa. Mientras el paciente esté infectado de forma aguda por el VHB, la mayor parte de las moléculas de ADN del virus son eliminadas rápidamente del hígado gracias a los mecanismos no citopáticos en los que intervienen citocinas liberadas inicialmente por las células del sistema inmunitario innato y, más tarde, por linfocitos CD8+ específicos del VHB que infiltran el hígado<sup>(44)</sup>. La respuesta del sistema inmunitario innato y adaptativo a la infección aguda por el VHB es eficiente y oportuna. El aclaramiento viral implica la inducción de una reacción robusta adaptativa de células T, que induce un efecto antiviral dependiente de citolítico. También un efecto antiviral independiente, a través de la expresión de citoquinas antivirales, así como la inducción de células B, las cuales producen anticuerpos neutralizantes que evitan la propagación del virus<sup>(45, 46)</sup>. El recambio de hepatocitos resultante de la muerte celular infectada conduce a la dilución del ADNccc<sup>(47)</sup>. Sin embargo, las respuestas de los linfocitos T específicos de VHB en los pacientes con infección crónica por el VHB normalmente son débiles, infrecuentes y poco específicas<sup>(48)</sup>. La infección crónica por el VHB está caracterizada desde el punto de vista inmunológico por la reducción de las respuestas de las células T CD4+ y T CD8+ a los antígenos correspondientes del VHB<sup>(49)</sup>, debido a un deterioro de la respuesta inmune innata, incluida la dendrítica<sup>(50)</sup>, o la disfunción de las células NK<sup>(51)</sup>, y la reducción de los receptores *Toll-like* tipo 2 (TLR-2)<sup>(52)</sup>. La infección crónica por el VHB avanza a través de distintas fases de la enfermedad que están fuertemente asociadas con la edad. Se ha detectado que los niños y adultos jóvenes que sufren una infección crónica por el VHB tienen un perfil inmune menos comprometido que el de pacientes de mayor edad<sup>(45)</sup>.

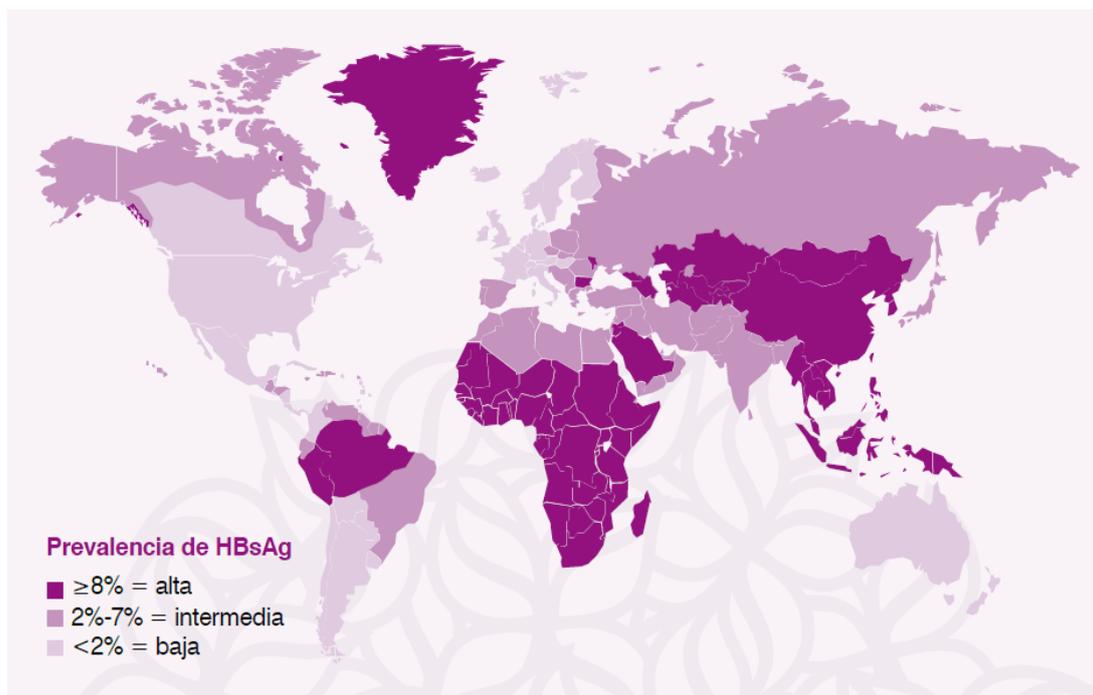
## 1.8. Epidemiología del VHB

La infección por el VHB es realmente uno de los problemas más importantes de salud pública en todo el mundo, pero no en todas las zonas geográficas esta infección prevalece de la misma manera, por lo que se puede valorar su distribución según el número de portadores crónicos de HBsAg que exista en cada área geográfica.

Sí pues, debido a la gran variación regional de pacientes con HBsAg positivos, se han marcado tres niveles de endemidad, a saber, baja ( $\leq 2\%$ ), intermedia (2 - 8%) y alta ( $\geq 8\%$ )<sup>(53)</sup>. Se ha estimado que cerca del 45% de los individuos infectados residen en zonas con endemidad alta, como son África tropical, zonas de Oriente Medio, Sudeste asiático, la mayor parte de la cuenca del Amazonas, muchas islas del Pacífico y Pacífico Oriental, Groenlandia, así como algunas regiones de China y algunas zonas rurales situadas en el norte de Canadá<sup>(54)</sup>. Las coinfecciones con otras infecciones virales ocurren con mayor frecuencia en áreas con endemidad alta del VHB. De esta manera, se considera que entre el 6% y el 13% de las personas que tienen el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) también tienen infección crónica con el VHB, encontrándose la mayor prevalencia en el África subsahariana<sup>(55)</sup>. Del mismo modo, y aproximadamente del 10% al 15% de los pacientes están coinfectados con el virus de la hepatitis C (VHC)<sup>(56)</sup>. Esta circunstancia acrecienta el riesgo de que el paciente desarrolle bien una hepatitis severa o un CHC. Aproximadamente el 5% de las personas están coinfectados con el virus de la hepatitis D (VHD)<sup>(57)</sup>. Se trata de un virus defectuoso que necesita las proteínas de la superficie del VHB con el fin de formar su envoltura en los hepatocitos coinfectados por VHD/VHB. El 43% de los individuos infectados viven en regiones con la endemidad intermedia, como son, por ejemplo, la zona Mediterránea, el norte de África, el este de Europa, Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas, parte de Oriente Medio, Asia Central y Suroeste asiático, así como algunas áreas del centro y sur de América<sup>(58, 59)</sup>. El 12% restante, se sitúa en áreas de la endemidad baja, las cuales están ubicadas en los siguientes lugares: norte, oeste y centro de Europa; norte, centro, sobre todo México, y sur de América y, finalmente, en Australia<sup>(58, 59)</sup> (Figura 6).

En cuando a la manera en el que se transmite el virus, esta cambia con la prevalencia. Así, en las áreas donde es baja la prevalencia, como sucede en Estados Unidos, la mayor parte de las infecciones se contagian tras el periodo de la adolescencia, que es el momento en el que las personas se exponen más al virus, por las relaciones sexuales que tienen sin protección, así como al consumo de drogas parenterales<sup>(8)</sup>. Sin embargo, en las áreas en donde es alta la prevalencia, los bebés se infectan con VHB durante el periodo perinatal.

Según el último informe de la OMS, la hepatitis B se registra más prevalentemente en las zonas del Pacífico Occidental (116 millones) y de África (81 millones), y a finales del año 2019, se considera que había en el mundo 296 millones de enfermos crónicos, con 1,5 millones de nuevas infecciones cada año<sup>(57)</sup>. La hepatitis B provocó un estimado de 820.000 defunciones en 2019, principalmente por cirrosis y CHC<sup>(57)</sup>.



**Figura 6.** Distribución geográfica de la infección por VHB.

Fuente: Imagen de CDC. Hepatitis B.

## **1.9. Historia natural de la infección crónica por el VHB**

### 1.9.1. Fase de la infección crónica por el VHB según EASL

Según las directrices de la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (EASL) marcadas en el año 2017<sup>(47)</sup>, la nueva nomenclatura de la historia natural tiene como base describir las dos características principales de la cronicidad, que son la infección *vs.* hepatitis. Por ello, se ha dividido esquemáticamente en cinco fases, para lo que hay que considerar la presencia de HBeAg, los niveles que hay de ADN-VHB, los valores presentes de alanina aminotransferasa (ALT) y, eventualmente, si está presente o ausente la inflamación del hígado<sup>(47)</sup> (Figura 7). A continuación, vamos a ver estas fases más detenidamente.

#### Fase 1: Infección crónica por VHB con HBeAg positivo

Esta fase con anterioridad fue conocida por “fase de inmunotolerancia”, y está caracterizada por la presencia de HBeAg en suero, así como por niveles muy altos de ADN-VHB y ALT, dentro del rango normal [límite superior de la normalidad (ULN) aproximadamente 40 UI/L] de manera persistente. En el hígado, se produce una necroinflamación o fibrosis hepática mínima o nula, aunque va acompañada de un nivel alto de integración del ADN-VHB. Por otro lado, los hepatocitos clonales se expanden y esto indica que la hepatocarcinogénesis podría estar ya en curso, en esta fase temprana de la infección<sup>(60)</sup>. A causa de los altos niveles de ADN-VHB que poseen estos pacientes, resultan altamente contagiosos.

#### Fase 2: Hepatitis crónica por VHB con HBeAg positivo

Esta segunda fase está caracterizada por la presencia de HBeAg en el suero, así como altos niveles de ADN-VHB y ALT elevada<sup>(47)</sup>. En el hígado, se produce una necroinflamación hepática moderada o grave y una progresión acelerada de la fibrosis. Esta situación puede ocurrir después de varios años de la primera fase y se alcanza con mayor frecuencia y/o rapidez en sujetos infectados durante la edad adulta. El resultado

de esta fase no es fijo sino variable. La mayor parte de los pacientes pueden conseguir la seroconversión de HBeAg, así como la supresión del ADN-VHB, por lo que entran en la fase de infección teniendo HBeAg negativo<sup>(47)</sup>. Sin embargo, algunos de ellos pueden dejar de controlar el VHB y progresar a la fase de hepatitis crónica por VHB con HBeAg positivo durante muchos años.

#### Fase 3: Infección crónica por VHB con HBeAg negativo

Anteriormente, la infección crónica por VHB con HBeAg negativo era llamada “portador inactivo”, y destaca por la presencia de anti-HBe, ADN-VHB indetectables o bajos (< 2.000 IU/ml) y ALT normal, de acuerdo con los valores de corte tradicionales<sup>(47)</sup>. Sin embargo, algunos pacientes en esta fase pueden tener niveles de ADN-VHB mayor de 2.000 IU/ml (generalmente < 20.000 UI/mL), acompañado de ALT persistentemente normal y solo una actividad necroinflamatoria hepática mínima y fibrosis baja<sup>(47)</sup>. Estos pacientes tienen un bajo riesgo de progresión a cirrosis o CHC si permanecen en esta fase, pero puede ocurrir una progresión a hepatitis B crónica (HBC), generalmente en pacientes con HBeAg negativos.

#### Fase 4: Hepatitis crónica por VHB con HBeAg negativo

Esta fase destaca por la falta de HBeAg en el suero, generalmente con anti-HBe detectable, y niveles moderados a altos persistentes de ADN del VHB en suero (a menudo más bajos que en los pacientes con HBeAg positivos), así como valores de ALT fluctuantes o persistentemente elevados<sup>(47)</sup>. La histología del hígado muestra necroinflamación y fibrosis. La mayoría de estos sujetos albergan variantes del VHB en las regiones de precore y/o promotor del núcleo basal que deterioran o anulan la expresión de HBeAg<sup>(47)</sup>.

#### Fase 5: Fase negativa para HBsAg

Esta fase se caracteriza por un HBsAg negativo y anti-HBc positivo en el suero, ya sea con o sin anticuerpos detectables contra HBsAg. También es conocida por

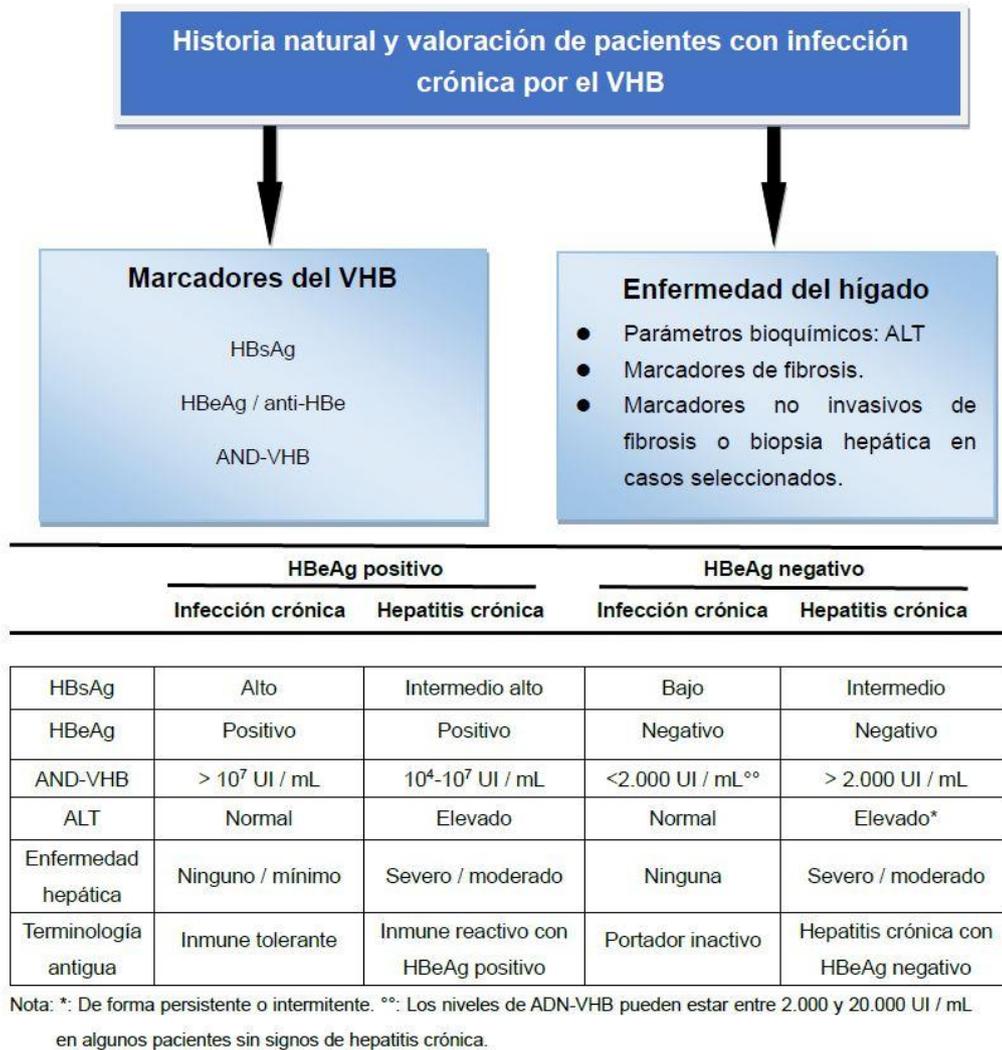
“infección oculta por VHB”. Los pacientes en esta fase tienen valores normales de ALT y ADN del VHB no detectable por lo general, pero no siempre<sup>(47)</sup>.

### 1.9.2. Zona gris (ZG)

La mayoría de los pacientes caen en una de estas fases descritas anteriormente, pero algunos individuos lo hacen en una “zona gris” indeterminada, cuyos niveles séricos de ADN-VHB y ALT no encajan bien en las fases descritas, y en donde la decisión de tratamiento debe ser individualizada<sup>(47)</sup>. Bonacci y colaboradores describieron una “zona gris” situada entre la infección crónica con HBeAg negativo y hepatitis crónica con HBeAg negativo, debido a que los niveles de ADN-VHB y ALT pueden fluctuar con el tiempo, dificultando una clasificación precisa de la situación clínica del paciente<sup>(61)</sup>. Yao<sup>(62)</sup> subdividió a los pacientes que estarían en la zona gris en cuatro categorías, según el estado diferente de HBeAg, ALT y los niveles de ADN-VHB, de acuerdo con guía de hepatitis B de la Asociación Americana para el Estudio de Enfermedades del Hígado (AASLD) de 2018<sup>(63)</sup>: zona gris A (ZG-A): HBeAg positivo, niveles normales de ALT y ADN-VHB en suero  $\leq 10^6$  UI/mL; zona gris B (ZG-B): HBeAg positivo, niveles elevados de ALT y ADN-VHB en suero  $\leq 2 \times 10^4$  UI/mL; zona gris C (ZG-C): HBeAg negativo, niveles normales de ALT y ADN-VHB en suero  $\geq 2 \times 10^3$  UI/mL; zona gris D (ZG-D): HBeAg negativo, niveles elevados de ALT y ADN-VHB en suero  $\leq 2 \times 10^3$  UI/mL (ULN de ALT fue de 25 U/L para mujeres y 35 U/L para hombres). Yao<sup>(62)</sup> sugiere que existe un alto riesgo de fibrosis hepática avanzada o cirrosis en pacientes con ZG-B, además, edad avanzada, estado de HBeAg positivo y niveles altos de ALT eran factores de riesgo independientes en pacientes con HBC-ZG.

En la actualidad, la decisión de la terapia antiviral, la gravedad de la lesión hepática y el pronóstico realizado a largo plazo de los pacientes que caen en la ZG siempre ha sido controvertido. La mayoría de los pacientes en zona gris tienen una historia natural benigna con un buen pronóstico a largo plazo y no se requiere tratamiento. Entonces, en estos casos, es necesario decidir cuál de estos pacientes puede necesitar evaluaciones invasivas de la enfermedad hepática y quién puede beneficiarse

de la terapia antiviral. La presencia de fibrosis hepática avanzada o cirrosis hepática es una indicación de tratamiento y seguimiento urgentes del CHC, que es de gran importancia para tratar y manejar la HBC. Dado que esta es una condición dinámica, se recomienda un seguimiento clínico y virológico a largo plazo para los pacientes con HBC-ZG, especialmente los de edad avanzada, HBeAg positivo y mayor ALT, quienes podrían tener un mayor riesgo de enfermedad avanzada.



**Figura 7.** Historia natural y evaluación de pacientes con infección crónica por el VHB.

Fuente: *Journal of Hepatology*<sup>(47)</sup>.

## **1.10. Cuadro clínico de la hepatitis B**

### **1.10.1. Hepatitis aguda**

Las manifestaciones de la hepatitis aguda pueden aparecer en varios estados. De este modo, podemos verla como una hepatitis anictérica y subclínica, como una hepatitis icterica aguda grave o, incluso, con fallo hepático agudo. Las infecciones agudas van precedidas de un periodo prodrómico de 2 - 4 semanas, con fiebre, artralgias, mialgias, artritis y exantema cutáneo. Después, aparece el cuadro de hepatitis aguda con aumento de las transaminasas y un cuadro gripal con síntomas inespecíficas. Un número bajo de pacientes desarrolla ictericia, asociada siempre a orina de color oscuro, junto a alto nivel de bilirrubina durante días o meses. En algunos casos, se presenta una leve hepatomegalia dolorosa, y en pocos casos, adenopatías o esplenomegalia. En el estudio analítico, lo más notorio es el aumento de ALT. Los síntomas clínicos y la ictericia generalmente desaparecen en 1 a 3 meses, aunque algunos enfermos continúan con fatiga prolongada incluso después de que se hayan normalizado las concentraciones séricas de ALT. Los niveles de ALT y HBsAg suelen disminuir simultáneamente, y en alrededor del 80% de los casos, el HBsAg deja de detectarse a las 12 semanas del comienzo de la enfermedad<sup>(64)</sup>. La mayoría de los pacientes adultos se cura de forma espontánea, y su cuadro clínico agudo y la ictericia queda resuelta en un periodo que va de 1 a 4 meses.

### **1.10.2. Hepatitis B crónica**

La HBC se trata de la persistencia del VHB a lo largo de, al menos, 6 meses. Es habitual que no haya antecedentes de una hepatitis aguda. Tiene la particularidad de que el sujeto afectado con HBC puede no manifestar ningún síntoma durante muchos años. No obstante, cuando existen, es la fatiga la que normalmente suele predominar sobre las demás manifestaciones generales, tales como anorexia y malestar. En algunos casos, es normal que exista dolor en el hipocondrio derecho, aunque de leve intensidad. La exploración puede ser normal, aunque a veces puede detectarse

hepatoesplenomegalia. Las pruebas de laboratorio pueden ser normales o ligero aumento de las transaminasas en los pacientes asintomáticos. En fases de exacerbación antes de la seroconversión con aparición de Anti-HBe, los valores de las transaminasas aumentan, sobre todo la ALT.

### 1.10.3. Manifestaciones extrahepáticas

En pocos casos, alrededor del 10 - 20% de los pacientes aparecen manifestaciones extrahepáticas de la hepatitis B<sup>(65)</sup>. Efectivamente, a veces no son fáciles de detectar, ya que pueden ser atípicas y no mostrar relación temporal clara con los síntomas de la hepatitis. La patogénesis de estas alteraciones extrahepáticas no está del todo clara. Sin embargo, las teorías que más se aceptan son las siguientes: formación local de inmunocomplejos inducidos por los antígenos virales; presencia de autoanticuerpos circulantes con formación y depósito de inmunocomplejos; desarrollo de una reacción viral directa en sitios extrahepáticos y, finalmente, autoanticuerpos generados por el virus (que reaccionan contra antígenos tisulares)<sup>(66)</sup>. Entre las principales manifestaciones extrahepáticas se encuentran las siguientes: glomerulonefritis, poliarteritis nudosa (PAN), crioglobulinemia mixta esencial y polimialgia reumática.

Así pues, la glomerulonefritis membranosa y membranoproliferativa son más frecuentes en aquellos pacientes que sufren infección crónica por el VHB. Normalmente, aparece como síndrome nefrótico. En la biopsia renal se encuentra un depósito de complejos inmunitarios e, incluso, citoplasmáticas en la membrana basal de los glomérulos. El diagnóstico suele basarse en pruebas serológicas relacionadas con antígenos o anticuerpos del VHB, presencia de glomerulonefritis por complejos inmunitarios en una biopsia renal o demostración con técnicas de inmunohistoquímica de depósito glomerulares de uno o varios antígenos del VHB, tales como HBsAg, HBcAg o HBeAg. El pronóstico es variable dependiendo de la edad del paciente. En el 95% de los niños, es una condición autoresolutiva. Sin embargo, en los adultos se da una situación muy diferente, ya que el 25% de ellos progresa a falla renal avanzada<sup>(67)</sup>. El tratamiento que se elige en estos casos son los análogos de los nucleótidos (ANs).

La PAN, da nombre a la vasculitis sistémica que actúa sobre arterias de pequeño y mediano calibre, con elevada morbimortalidad. Sus síntomas son artralgia, mononeuritis, fiebre, dolor abdominal, hipertensión, nefropatía, alteraciones del sistema nervioso central (SNC), así como erupción. Los pacientes, a nivel dermatológico, pueden sufrir púrpura palpable en extremidades inferiores, que puede convertirse en úlceras grandes. A veces, se asocia con nódulos subcutáneos dolorosos, así como con livedo reticularis<sup>(68)</sup>. Sin embargo, no se ha visto correlación entre la gravedad de la hepatopatía y la vasculitis, por lo que se utilizan para su tratamiento antivíricos, ya sean solos o bien combinados con plasmaféresis, porque los esteroides tienen la capacidad de mejorar la PAN, pero normalmente agravan la hepatitis.

La crioglobulinemia mixta esencial da nombre a una enfermedad sistémica que predomina en la infección crónica por el VHC. Su prevalencia es de 1% a 15% en pacientes con el VHB<sup>(68)</sup>. Se manifiesta a través de artralgias, lesiones purpúricas y debilidad y, con menos frecuencia, por medio de glomerulonefritis, compromiso pulmonar, neurológico, y vasculitis generalizada. Sin embargo, normalmente aparece con síntomas leves o, incluso, asintomática<sup>(66)</sup>. De todas formas, el interferón es utilizado con éxito en la crioglobulinemia sintomática asociada a la HBC.

#### 1.10.4. Cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular

Normalmente, la infección crónica no controlada por el VHB puede progresar a la cirrosis y CHC. En ausencia de tratamiento antiviral, la cirrosis anualmente incide del 2% al 6% en la hepatitis B crónica con HBeAg positivo, y del 8% al 10%, si el HBeAg es negativo<sup>(69)</sup>. El riesgo anual de progresión de cirrosis compensada a descompensada es del 3% al 5%, mientras que solo el 14% a 35% de los pacientes con cirrosis sobreviven tras 5 años de cirrosis<sup>(70)</sup>. Una vez desarrollada esta enfermedad, se puede manifestar de esta manera: hipertrofia de parótidas, aparición o empeoramiento de la ictericia, ascitis que se observará de diferentes grados, nevus en araña de predominio en tórax, circulación colateral, edema de miembros inferiores, distribución ginecoide del vello<sup>(8)</sup>. En estudios complementarios, también se ha visto que pueden aparecer

hipoalbuminemia, trombocitopenia, hiperbilirrubinemia y prolongación del tiempo de protrombina, en donde van a aumentar las inmunoglobulinas cuando se manifiestan formas avanzadas.

El VHB provoca el 80% de los CHC en zonas de alta endemicidad<sup>(71)</sup>. El riesgo de desarrollar un CHC en los pacientes portadores del VHB, según demuestran los estudios epidemiológicos, se incrementa debido a una serie de factores como los que siguen: sexo masculino, edad avanzada (relacionado con un largo período de infección por el VHB), raza (asiático o africano), grado de la enfermedad (cirrosis), exposición a aflatoxinas, historia familiar de CHC, la coinfección con el VHC y el VHD, consumo de alcohol y/o tabaco, y más recientemente, la presencia del HBeAg.

La incidencia anual de CHC en pacientes no cirróticos es de aproximadamente 0,5% a 1,0%<sup>(70)</sup>, mientras que en pacientes cirróticos, la incidencia anual de CHC aumenta a 3 - 6%<sup>(69)</sup>. Ultrasonidos, resonancia magnética (RMN) y tomografía axial computarizada (TAC) son los métodos que se utilizan para diagnosticar CHC. La prueba de alfa-fetoproteína (AFP) también se usa actualmente como biomarcador diagnóstico, aunque tiene sensibilidad y especificidad bajas. Como opciones terapéuticas de primera elección, el trasplante hepático y la resección quirúrgica son las más utilizadas.

## 1.11. Métodos diagnósticos de la hepatitis B

La clínica de la infección por el VHB no es patognomónica, por lo tanto, el diagnóstico se deben usar marcadores serológicos, virológicos e histológicos.

### 1.11.1. Marcadores serológicos

El diagnóstico serológico de la hepatitis B pone su foco en detectar el HBsAg, de forma que su positividad debe poner en marcha un estudio de valoración de la replicación viral y del daño hepático, encaminado a seleccionar la mejor opción terapéutica antiviral. Así también, podemos confirmar la curación exitosa de la infección en pacientes portadores de anticuerpo contra el antígeno de superficie del virus de hepatitis B (Anti-HBs) o vacunación contra la hepatitis B. La presencia del anticuerpo contra el antígeno core del virus de hepatitis B (Anti-HBc) de la clase IgM normalmente viene interpretándose como indicador de una reciente infección. De todas formas, en ocasiones también se detecta en la infección crónica con replicación viral. El sello distintivo de la exposición previa al VHB está relacionado con la presencia de anti-HBc de la clase IgG, la cual persiste en el VHB agudo y crónico resuelto. El HBeAg es una proteína vírica soluble que se encuentra en el suero de las fases primeras de la infección aguda provocada por el VHB. Así pues, la presencia de HBeAg en el suero de un portador de HBsAg es un signo de mayor infectividad, un alto grado de replicación vírica, en el que hay un elevado riesgo de que exista enfermedad hepática y que, por tanto, se necesite instaurar un tratamiento antivírico. Sin embargo, el que no esté presente no quiere decir que el virus no esté presente, debido a que pueden hallarse formas de HBC con HBeAg negativo. La presencia del anticuerpo contra el antígeno “e” del virus de hepatitis B (Anti-HBe) indica baja infectividad y baja replicación viral. Sin embargo, la seroconversión anti-HBe no es un signo de que el paciente haya mejorado, ya que en ocasiones es producto de la selección de mutantes Pre-C del VHB, asociados a una replicación vírica alta.

### 1.11.2. Marcadores virológicos

El ADN-VHB no solo es un marcador sensible y específico para la replicación del VHB, sino que también es una parte importante de la evaluación del efecto de la terapia antiviral de HBC. Por lo general, los portadores inactivos tienen un nivel de ADN-VHB  $< 2.000$  UI/mL, los pacientes con HBC inmunoactiva tienen un nivel de ADN-VHB  $> 20.000$  UI/mL y los HBC con HBeAg negativos tienen niveles más bajos que los positivos. Los niveles de ADN-VHB de algunos HBC fluctúan mucho y pueden pasar de indetectables a  $> 2.000.000$  UI/mL<sup>(72)</sup>. Por lo tanto, la monitorización continua de los niveles de ADN-VHB es más importante que cualquier valor de corte arbitrario para predecir y determinar la necesidad de tratamiento.

### 1.11.3. Marcadores histológicos

El método con más fiabilidad para conocer el grado de actividad necroinflamatoria y de fibrosis hepática es, sin duda, la biopsia hepática, aunque se trata de una técnica invasiva y que puede ocasionar complicaciones. El Dr. Peter Scheuer planteó un sistema simplificado de puntuación para valoración de las hepatitis crónicas, el cual es ampliamente usado tanto en Europa como en Estados Unidos<sup>(73)</sup>.

La infección crónica por el VHB está caracterizada por una infiltración de los espacios portales por células mononucleares. Normalmente, la inflamación periportal ocasiona la rotura de la lámina limitante de los hepatocitos. Hay presencia de hepatocitos en vidrio esmerilado, que viene a ser la única manifestación histológica visible con microscopía óptica específica de la HBC. Se puede apreciar que se han acumulado partículas de HBsAg de 20 a 30 nm de diámetro, concretamente en el retículo endoplásmico dilatado<sup>(74)</sup>. Debido a las elevadas concentraciones de cisteína en el HBsAg, estas células tienen una gran afinidad por determinados colorantes, por lo que la inmunofluorescencia es muy útil en estudio histológico. Durante los períodos de intensa actividad hepática, no es difícil observar el antígeno central teñido en el citoplasma de los hepatocitos. Tras el tratamiento satisfactorio, la tinción citoplasmática del antígeno central normalmente desaparece, aunque su tinción nuclear es posible que

se mantenga. Esto es señal de que persiste un molde de ADNccc del VHB.

#### 1.11.4. Marcadores subrogados del ADNccc intrahepático

El ADNccc se encuentra principalmente en los hepatocitos, siendo la forma genómica clave como responsable de la persistencia de la infección. Por lo tanto, la monitorización dinámica del nivel de ADNccc intrahepático debería ser útil para evaluar con precisión la eficacia de la terapia antiviral, así como el riesgo de progresión de la enfermedad. La biopsia hepática es actualmente el estándar de oro para la replicación intrahepática. Sin embargo, debido a la naturaleza invasiva del procedimiento y el potencial de error de muestreo, la biopsia hepática dinámica no se tolera bien, lo que limita en gran medida el uso de ADNccc intrahepático en la práctica clínica. Se necesita, pues, seguir investigando en marcadores convenientes no invasivos que sean útiles para reflejar el nivel de ADNccc intrahepático. La cuantificación de HBsAg (qHBsAg) y el antígeno relacionado con el core del VHB (HBcrAg) y ARNpg-VHB se han propuesto como biomarcadores subrogados establecidos, los cuales van a reflejar la actividad del ADNccc intrahepático.

##### 1.11.4.1. qHBsAg

La qHBsAg es una herramienta establecida no invasiva, utilizada para determinar la actividad de ADNccc intrahepático. Aunque qHBsAg refleja ADNccc y niveles de ADN intrahepático, también mide el HBsAg que surge del ADN integrado, reduciendo así su especificidad como biomarcador para la replicación viral<sup>(63)</sup>. Brunetto y sus colegas demostraron que los genotipos del VHB pueden afectar a los niveles cuantitativos de HBsAg (más altos para genotipo A) y su cinética<sup>(75)</sup>. Los niveles de qHBsAg también se pueden utilizar para hacer una distinción entre los portadores inactivos de HBsAg y los sujetos que sufran hepatitis B crónica con antígeno “e” negativo. Brunetto demostró que los niveles de HBsAg eran significativamente más bajos en los portadores inactivos<sup>(76)</sup>. La qHBsAg en pacientes no tratados, puede servir para identificar la fase de la enfermedad, así como predecir la posible eliminación sérica de HBsAg y el riesgo de complicaciones relacionadas con el hígado<sup>(77)</sup>. De manera

similar, en pacientes tratados con terapia antiviral, qHBsAg es mejor para predecir la respuesta al tratamiento antiviral y proporciona una regla de interrupción, que actualmente es la indicación más fuerte para la medición cuantitativa de HBsAg en suero<sup>(77)</sup>.

#### 1.11.4.2. HBcrAg

El HBcrAg consta de tres especies de proteínas relacionadas que comparten una secuencia idéntica de 149 aminoácidos: HBcAg, HBeAg y una proteína prenúcleo truncada de 22 kDa. El HBcrAg puede representar un marcador sustituto útil no solo para el nivel de ADNccc intrahepático, sino también para su actividad transcripcional. Los estudios muestran que el HBcrAg exhibió una buena correlación con el ADNccc intrahepático, el ADN-VHB y qHBsAg<sup>(78)</sup>. El HBcrAg puede ser detectable en situaciones donde los niveles de ADN-VHB en suero se vuelven indetectables o se alcanza la pérdida de HBsAg. Es un buen marcador sustituto del ADNccc intrahepático para individuos con HBeAg positivo, como con HBeAg negativo. Los niveles séricos de HBcrAg varían significativamente dependiendo de las fases de la infección por el VHB en las que se encuentren. Este marcador es útil para diferenciar la hepatitis crónica con HBeAg negativa de la infección crónica con HBeAg negativa, prediciendo la seroconversión de HBeAg espontánea o inducida por el tratamiento, respuesta sostenida a los ANs, riesgo de reactivación del VHB en la infección oculta por el VHB bajo terapias inmunosupresoras y riesgo de desarrollo de CHC, así como la recurrencia postoperatoria de CHC<sup>(78)</sup>.

#### 1.11.4.3. ARNpg-VHB sérico

El ARN-VHB en suero, particularmente el ARNpg, es la medida más directa de la actividad transcripcional del ADNccc, en donde los datos recientes muestran que los niveles de ARNpg-VHB en suero se correlacionan con ARNpg-VHB intrahepático y ADNccc intrahepático<sup>(79)</sup>. En segundo lugar, la evidencia creciente respalda las correlaciones de ARNpg-VHB en suero con el HBsAg y HBcrAg en suero y con el

ADN-VHB antes del tratamiento<sup>(80)</sup>. Además de los marcadores replicativos virales intrahepáticos, el ARNpg-VHB en suero se correlacionó con la lesión hepática o la histopatología. Wang y colaboradores demostraron que el ARNpg-VHB en suero podría servir como un marcador sustituto clínico útil para estimar la actividad intrahepática de las moléculas de ADNccc que persisten en pacientes infectados con VHB<sup>(81)</sup>. El ARNpg-VHB en suero puede servir como marcador sustituto de la actividad del ADNccc en pacientes con supresión viral que reciben terapia de ANs<sup>(82)</sup>.

## 1.12. Tratamiento de la hepatitis B

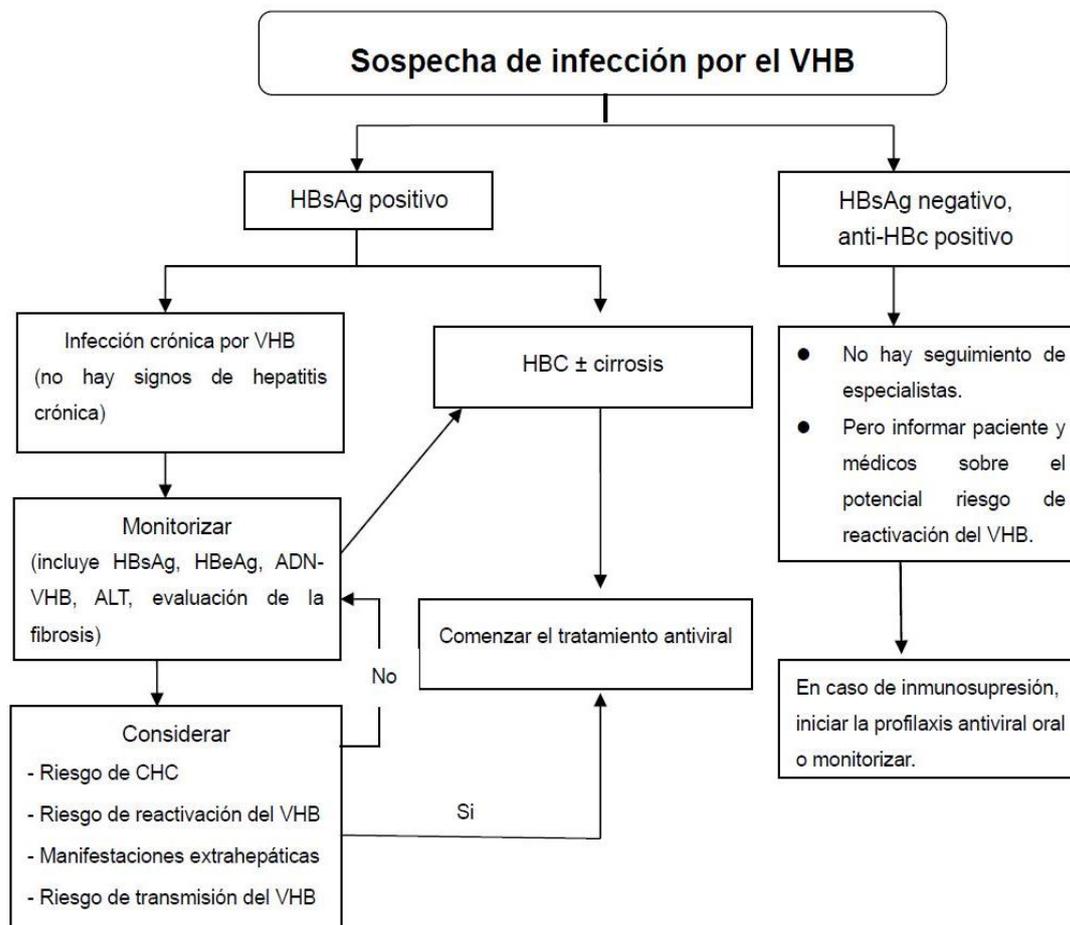
### 1.12.1. Objetivos del tratamiento

La curación de la infección con la eliminación de todas las formas del VHB potencialmente replicantes es el objetivo final del tratamiento, lo que es difícil de lograr con la terapia antiviral actual, a causa de que persiste el ADNccc en el núcleo de los hepatocitos. Así pues, el objetivo principal del tratamiento no puede ser otro que la mejora de la supervivencia y de la calidad de vida del paciente, previniendo la progresión de la enfermedad y, en consecuencia, el desarrollo de CHC<sup>(47)</sup>. Una “cura funcional” definida como la pérdida o seroconversión de HBsAg y la supresión sostenida del ADN-VHB es, para nosotros, un objetivo realista y puede lograrse en una proporción de pacientes elegibles con HBC mediante la optimización de estrategias antivirales<sup>(83)</sup>. Otros objetivos secundarios de la terapia antiviral son los siguientes: prevenir la transmisión de madre a hijo, reactivar la hepatitis B, prevenir y tratar las manifestaciones extrahepáticas asociadas al VHB.

### 1.12.2. Indicaciones del tratamiento

La hepatitis B aguda no necesita un tratamiento específico, debido a que la mayoría de los pacientes se recupera de manera espontánea, sin que le queden secuelas. El HBC, sin embargo, necesita de un tratamiento, con el fin de evitar un daño progresivo del hígado. Según guías de práctica clínica de EASL 2017<sup>(47)</sup>, las principales recomendaciones para el tratamiento son las siguientes: (1) todas HBC con HBsAg positivo o negativo (definidas como: ALT > ULN (~40 IU/L), ADN-VHB > 2.000 IU/mL), en donde exista, al menos, actividad necroinflamatoria y/o fibrosis moderadas necesitan tratamiento; (2) sujetos con cirrosis compensada o descompensada requieren tratamiento, con cualquier nivel detectable de ADN-VHB e independientemente de los niveles de ALT; (3) pacientes con ADN-VHB > 20.000 UI/mL y ALT > 2 x ULN debe comenzar el tratamiento, sin que se atienda al grado de fibrosis en el que se encuentren. Las guías de la AASLD de 2018 recomendaron utilizar los niveles de ALT de 35 U/L

para hombres y 25 U/L para mujeres como ULN, en lugar de ULN de laboratorio local para guiar el inicio del tratamiento antiviral en pacientes con HBC no cirróticos<sup>(63)</sup>. Para los pacientes HBsAg positivo con cirrosis descompensada, las directrices de la AASLD de 2018 recomiendan una terapia antiviral indefinida, independientemente del nivel de ADN-VHB, el estado de HBeAg o el nivel de ALT, con el fin de disminuir el riesgo de empeoramiento de las complicaciones relacionadas con el hígado<sup>(63)</sup>. Debe notarse que la HBC es una enfermedad dinámica y las personas con HBC pueden hacer la transición a través de diferentes fases con niveles variables de antígenos del VHB, ADN-VHB y ALT; por lo tanto, se requieren pruebas en serie para asignar fase de infección y/o necesidad de tratamiento<sup>(63)</sup> (Figura 8).



**Figura 8.** Algoritmo para el tratamiento de la infección por VHB.

Fuente: *Journal of Hepatology*<sup>(47)</sup>.

### 1.12.3. Fármacos antivirales actuales

#### 1.12.3.1. Interferón

El interferón  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) fue el primer fármaco que se usó para tratar HBC. Interferón no ha ocasionado resistencias, a diferencia de los ANs, y tiene propiedades inmunomoduladores directas. Por otro lado, se consigue potenciar la expresión del antígeno HLA de clase I en la superficie de los hepatocitos infectados y, por último, con interferón se logra aumentar la actividad de los LTC CD8+. Desde un punto de vista físico, y con el fin de reducir la cantidad de ADNccc del VHB, estos efectos son relevantes. Cuando se suspende, provoca que la recidiva sea habitual en pacientes con HBeAg negativo. Actualmente, la forma pegilada de IFN (peg-IFN) ha sustituido a la convencional. Esto es debido a la mayor comodidad de administración, al deberse tomar solo una vez a la semana; así como a la ausencia de resistencias y a una mayor posibilidad de pérdida de HBsAg<sup>(84)</sup>.

Las ventajas del interferón son las siguientes: no conlleva la selección de mutantes resistentes; normalmente, se logra una respuesta virológica sostenida después del tratamiento con seroconversión a anti-HBe y anti-HBs, y, finalmente, posee una duración determinada. Entre los principales inconvenientes, se encuentran los siguientes: se utiliza por vía subcutánea y posee numerosos y frecuentes efectos secundarios, como son: aumento de la concentración de anticoagulantes, teofilina y zidovudina; suele interactuar con psicofármacos, posibilidad de que ocasione síntomas pseudogripales e infiltrados pulmonares, neutropenia, trombopenia y depresión. No está recomendado cuando existe insuficiencia hepática, renal o cardíaca, ni tampoco cuando el paciente sufre de alteraciones de médula ósea, epilepsia, hepatitis autoinmunes, hipertiroidismo no controlado, embarazo, enfermedad cerebral o hepatitis acompañada de una cirrosis avanzada y descompensada.

#### 1.12.3.2. Análogos de nucleótidos

Actualmente, hay seis ANs aprobados para el tratamiento antiviral con HBC:

adefovir dipivoxil (ADV), lamivudina (LAM), entecavir (ETV), tenofovir disoproxil fumarato (TDF), telbivudina (LdT), y tenofovir alafenamida (TAF). Los ANs no solo son capaces de inhibir la actividad de la transcriptasa inversa del VHB, sino que también compiten con los sustratos de nucleótidos naturales para su incorporación en la cadena de ADN alargado; por lo tanto, interrumpen la síntesis de ADN del VHB<sup>(85)</sup>. La terapia de AN a largo plazo puede disminuir el conjunto de ADNccc de hepatocitos infectados al inhibir el reciclaje de las nucleocápsides; sin embargo, no tienen la capacidad de prevenir que se forme ADNccc cuando se encuentran en fase inicial en los hepatocitos infectados recientemente<sup>(86)</sup>.

Estos fármacos tienen multitud de ventajas, como el administrarse por vía oral, la no presencia de efectos adversos relevantes y su excelente perfil de seguridad. Todo ello posibilita su uso de forma prolongada, en mayoría de los pacientes, es decir los que tienen HBC asintomática y los que sufren cirrosis hepática compensada y descompensada<sup>(87)</sup>. Sin embargo, están limitados a causa de la emergencia de cepas del VHB con mutaciones asociadas con resistencia a estos fármacos, los cuales normalmente son frecuentes cuando el tratamiento es prolongado<sup>(87)</sup>. Así pues, en estudios se ha visto que para los sujetos que presentan cepas del VHB resistentes al tratamiento, hay más probabilidad de que progrese la enfermedad hepática, así como más riesgo de que presenten ciertas complicaciones<sup>(88)</sup>.

#### 1.12.4. Nuevas estrategias para el tratamiento del VHB

Aunque los medicamentos antivirales actuales pueden suprimir el ADN-VHB a niveles indetectables, tienen poco efecto sobre el nivel y la actividad del ADNccc dentro de los hepatocitos infectados. Por lo tanto, se necesitan nuevos fármacos terapéuticos, ya sea dirigidos a diferentes pasos del ciclo de vida del VHB o la modulación del sistema inmunitario del huésped.

##### 1.12.4.1. Nuevos medicamentos dirigidos al ciclo de vida del VHB

###### 1.12.4.1.1. Inhibidores de entrada del VHB

Myrcludex B y ciclosporina A (CsA) son dos nuevos fármacos que están desarrollando, y dirigidos al receptor de entrada viral NTCP. Myrcludex B se trata de un lipopéptido sintético, que se deriva del dominio preS1 del VHB. Al unirse al NTCP, el Myrcludex B no sólo previene eficazmente la propagación del VHB entre las células intrahepáticas, sino que también puede dificultar la amplificación del grupo de ADNccc intrahepático en los hepatocitos infectados<sup>(89)</sup>. Los análogos de CsA, un péptido no ribosómico cíclico, pueden inhibir potencialmente la actividad transportadora de NTCP, bloqueando así entrada de VHB en los hepatocitos<sup>(90)</sup>.

#### 1.12.4.1.2. Destrucción de ADNccc por edición genómica

Actualmente, varias tecnologías de edición genómica, incluyendo las nucleasas de dedo de zinc (ZFN), efector similar a un activador de la transcripción nucleasas (TALEN) y sistema de CRISPR / Cas, se han utilizado para interrumpir el ADNccc del VHB.

Los dedos de zinc son abundantes proteínas de mamíferos multifuncionales que se producen naturalmente como factores de transcripción. Al explotar el objetivo específico de los tripletes de nucleótidos de dedos de zinc individuales, estas proteínas pueden ser diseñadas para formar matrices con propiedades de unión al ADN definidas<sup>(91)</sup>. Los ZFN anti-VHB se describieron en un experimento de prueba de concepto en el que el 36% de las secuencias virales derivadas de plásmidos se interrumpieron en un modelo de cultivo viral de replicación viral<sup>(92)</sup>. Weber y colaboradores diseñaron tres ZFN dirigidos a la polimerasa del VHB, el gen X y el núcleo, y los entregaron a las células HepAD38 mediante vectores virales adeno-asociados y autocomplementarios, respectivamente<sup>(93)</sup>. Descubrieron que estos ZFN dirigidos al VHB producían una supresión sostenida de los niveles del VHB durante el transcurso del experimento.

Los TALEN comprenden un dominio de nucleasas Fok1 no específico fusionado a un dominio de unión a ADN específico de secuencia personalizable<sup>(94)</sup>, el cual se puede diseñar fácilmente para atacar e interrumpir esencialmente cualquier secuencia

de ADN específica. Se ha informado que los TALEN que se dirigen a sitios específicos del VHB dentro del genoma viral condujeron a la interrupción dirigida de aproximadamente el 31% del ADNccc en las células HepG2 y la replicación viral reducida en el modelo murino de replicación del VHB sin toxicidad evidente<sup>(95)</sup>.

El sistema CRISPR / Cas se deriva del sistema inmune adquirido de bacterias y arqueas contra la invasión de ADN extraño a través de la escisión de ADN guiada por ARN. Recientemente, varios estudios han demostrado que el sistema CRISPR / Cas puede interrumpir o inactivar el ADNccc del VHB y los genomas del VHB integrados<sup>(96, 97)</sup>. Li *et al.* demostraron que los sistemas CRISPR / Cas9 específicos del VHB provocaban de manera eficaz la destrucción del ADNccc en líneas celulares estables del VHB<sup>(98)</sup>.

Aunque la edición del genoma sigue siendo un área de investigación muy activa, existen varias advertencias y limitaciones. Por ejemplo, necesita ser consciente de los riesgos de los efectos fuera del objetivo (*off-target effects*); necesita hacer mayor fuerza para favorecer el sistema CRISPR / Cas9 se dirige a la orientación directa al ADNccc; necesita ensayos confiables y convenientes para la cuantificación de alto rendimiento del ADNccc, entre otras.

#### 1.12.4.1.3. Control epigenético de ADNccc del VHB

La epigenética hace referencia al estudio de los mecanismos que son capaces de regular la expresión de los genes, sin la presencia de una modificación en la secuencia del ADN. Las modificaciones epigenéticas del ADNccc del VHB, tal y como ocurre en la metilación del ADN y la acetilación de histonas, poseen un papel relevante en el control de la replicación del VHB, por el hecho de que suprimen la transcripción del ADNccc a los ARNm virales.

La transcripción del ADNccc del VHB se reguló mediante la metilación de CpG durante la infección crónica por el VHB<sup>(99)</sup>. Se ha demostrado que la metilación de la isla II de CpG disminuye significativamente la transcripción del ADNccc y la posterior replicación del ADN del núcleo viral, mientras que la metilación de la isla III de CpG

se ha asociado con títulos bajos de HBsAg en el suero<sup>(99)</sup>.

La replicación del VHB también está regulada por el estado de acetilación de la histona 3 y la histona 4 ligadas al ADNccc del VHB. La curcumina puede inhibir la replicación del VHB mediante la regulación por disminución de la acetilación de la histona unida a ADNccc<sup>(100)</sup>. Además, se encontró que las mutaciones del promotor del núcleo basal inhiben la replicación viral mediante la modulación de la acetilación y desacetilación de histonas unidas a ADNccc, mientras que se ha demostrado que las mutaciones precore no tienen efecto sobre la replicación viral<sup>(101)</sup>.

#### 1.12.4.1.4. Anti-VHB siARN y microARN

Los ARNs interferentes pequeños (siARN) son una herramienta poderosa en el silenciamiento génico. Varios medicamentos basados en siARN contra el VHB se prueban actualmente en ensayos clínicos. ARC-520 es un fármaco de siARN, dirigido directamente a secuencias conservadas entre diferentes cepas del VHB<sup>(102)</sup>. La transfección con ARC-520 puede reprimir significativamente el ARN viral, las proteínas y el ADN en los hepatocitos humanos que replican el VHB y los ratones transgénicos del VHB<sup>(102)</sup>.

Los microARNs (o miARNs) son, concretamente, ARN pequeños, no codificantes, que tienen la función de regular la expresión génica, mediando la degradación de otros ARNm dianas. Los miARNs, a su vez, destacan por participar en procesos biológicos cruciales, en donde se incluyen el desarrollo, la diferenciación, la apoptosis y, finalmente, la proliferación celular<sup>(103)</sup>. Los miARNs tienen una secuencia muy conservada entre especies y están frecuentemente desregulados en las enfermedades humanas, lo que sugiere que pueden ser dianas terapéuticas para el tratamiento de dichas enfermedades. Las estrategias farmacológicas desarrolladas tienen como objetivo modular la expresión de los miARNs para restaurar los niveles de expresión fisiológicos, consiguiendo así restaurar su función y recuperando una correcta regulación de sus genes diana. Para ello, se han desarrollado moléculas sintéticas que aumentan o disminuyen los niveles de miARNs. La primera aproximación es el

restablecimiento de la función del miARN con moléculas sintéticas de doble cadena denominados mimics, ya que mimetizan el miARN. La segunda aproximación es la inhibición de la función del miARN usando oligonucleótidos de secuencia complementaria denominados anti-miR. Por ejemplo, Huang demostró que miR-130a puede inhibir la replicación de VHB y la expresión génica mediante el receptor de peroxisoma proliferador activado gamma (PPAR $\gamma$ ) and coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1 $\alpha$ )<sup>(104)</sup>. Estos dos factores pueden estimular respectivamente la transcripción potenciadora/promotora en células de pacientes con hepatitis B. Se han reportado varios miARNs que pueden influir en la replicación del VHB (ver detalladamente en 2.4.).

#### 1.12.4.1.5. Inhibidores de ensamblaje de cápside

Los moduladores de ensamblaje de la cápside (CAM) pueden interferir con la capsidación de ARN<sub>v</sub>g y la replicación de ADN-VHB al transferir o acelerar la formación de estructuras similares a las cápsides<sup>(105)</sup>. El estudio de perfiles antivirales con BAY41-4109 (HAP) y JNJ-632 (SBA) en hepatocitos humanos primarios ha revelado que las CAM no sólo inhiben la replicación del VHB sino también la transcripción del ARN del VHB y la producción de antígeno, lo que sugiere que las CAM tienen un doble mecanismo de acción, inhibiendo etapas iniciales y tardías del ciclo de vida viral<sup>(106)</sup>.

#### 1.12.4.2. Nuevos agentes que modulan la respuesta inmune del huésped

Los agentes terapéuticos inmunomoduladores en la inmunidad anti-VHB incluyen agonistas TLR-7 y TLR-8, gen 1 inducible por ácido retinoico / agonistas de la proteína 2 del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (RIG-I/NOD-2) e inhibidores de muerte programada 1 (PD-1) y otros como IFN- $\lambda$ , IL-12, IL-21<sup>(107)</sup>.

Se demostró que el agonista TLR-7 GS-9620 provoca que se reduzca de forma sostenida la carga viral del VHB y los niveles de HBsAg en suero, principalmente a través de un mecanismo dependiente de IFN- $\alpha$  tipo I en los hepatocitos humanos<sup>(108)</sup>.

El agonista TLR-8 GS-9688 induce una eficacia sostenida y una conversión serológica de HBsAg en el modelo de marmota con hepatitis B crónica<sup>(109)</sup>.

RIG-I y NOD-2 funcionan como receptores de reconocimiento de patrones, los cuales son capaces de reconocer los patrones característicos de ARN extraños, como resultado de activar la vía de señalización de IFN- $\alpha$  y la posterior inducción de citocinas proinflamatorias<sup>(110)</sup>. El agonista RIG-I SB 9200 (inarigivir) se trata de un nuevo modulador oral, caracterizado por su inmunidad innata. Este modulador ha sido investigado en un ensayo clínico multicéntrico de fase II<sup>(111)</sup>.

El receptor de PD-1 es el receptor inhibidor más altamente expresado en las células T específicas del VHB, juntamente con el aumento de la expresión de PD-L1 en los hepatocitos infectados con el VHB, probablemente contribuye al agotamiento de la T células y los altos niveles de replicación del VHB en pacientes con HBC<sup>(112)</sup>. Nivolumab, que es un inhibidor PD-1, promovería la proliferación de células T específicas de VHB, restaurando así la función de las células T para controlar el VHB<sup>(113)</sup>.

## 2. LOS MICROARNS

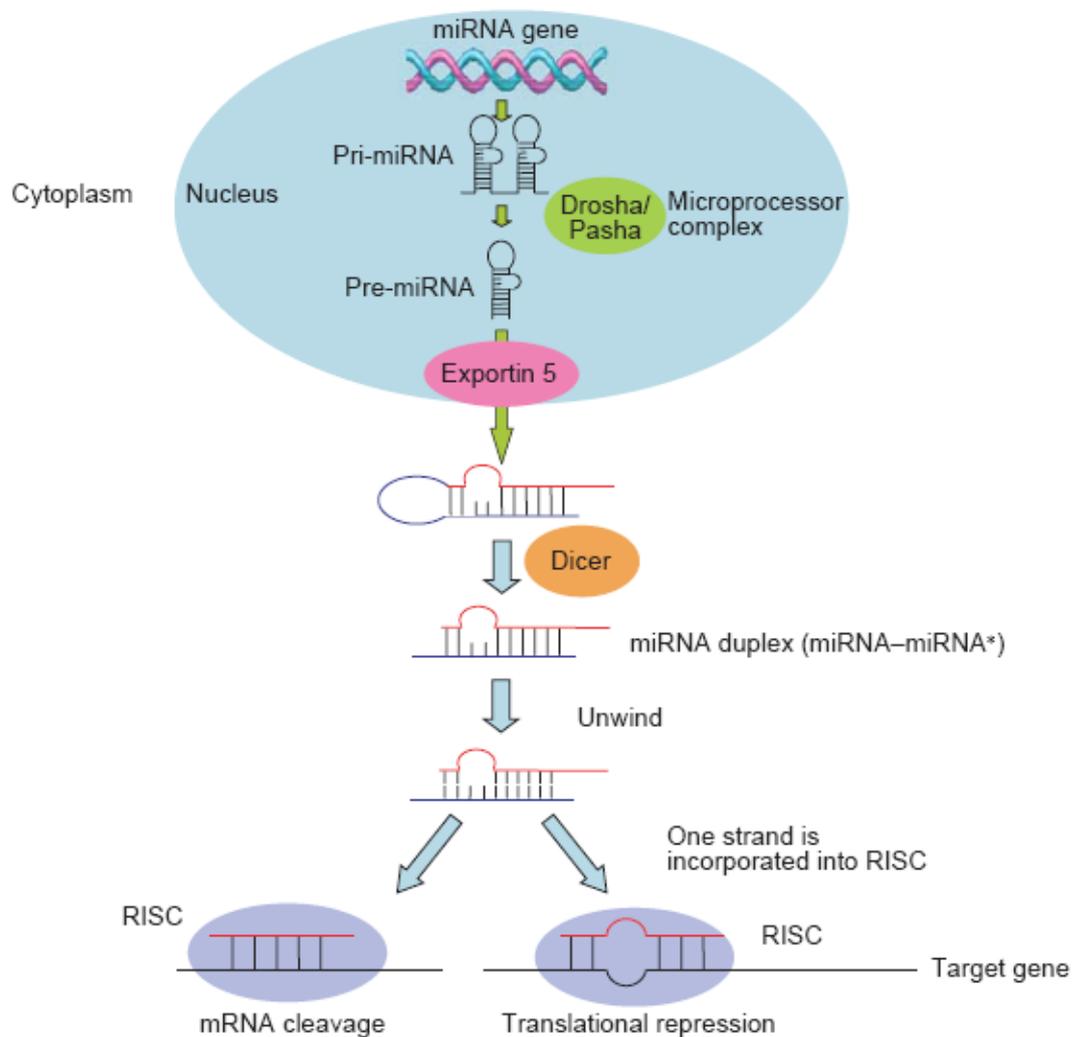
### 2.1. Descubrimiento y características de los microARNs

Los microARNs son ARN que destacan por ser no codificantes y de pequeño tamaño (18 - 25 nucleótidos de longitud), cuya función es regular la expresión génica mediando la inhibición de la traducción del ARNm a proteína.

En 1993, los investigadores Victor Ambros, Rosalind Lee y Rhonda Feinbaum descubrieron miARN en *Caenorhabditis elegans*<sup>(114)</sup>. Observaron que lin-4, un gen que operaba en el control del desarrollo de *C. elegans*, no codificaba proteína, pero, en cambio, era capaz de producir dos ARNs pequeños: un ARN de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud, correspondiente con el miARN maduro, así como un segundo de 61 nucleótidos, con forma de tallo-bucle (del inglés: *stem-loop*) en su estructura, correspondiente al precursor del miARN maduro<sup>(103)</sup>. Cuando estos investigadores aislaron el lin-4 no encontraron un ARNm, sino un ARN no codificante con complementariedad de múltiples secuencias en la zona 3'-UTR (región no traducida) del ARNm del gen lin-14<sup>(114)</sup>. Posteriormente, se ha demostrado que la regulación por medio de esta zona complementaria ocasiona que se disminuyan de las proteínas productos del gen lin-14, sin que se llegue a modificar la cantidad de su ARNm. Estos descubrimientos fueron capaces de apoyar el modelo en el que se unían a la región 3' UTR del gen lin-14 a los ARNs de lin-4, y esto sucedía con el fin de regular de manera post-transcripcional el ARNm de lin-14<sup>(115)</sup>. Posteriormente, en el año 2000, fue descubierto el segundo miARN, let-7, concretamente en nematodos<sup>(116)</sup>. Este descubrimiento marcó la posibilidad de que estos miARNs estuvieran presentes en otras especies distintas. Posteriormente, se tiene conocimiento de que la expresión de los miARNs se puede utilizar específicamente en tejidos, en distintas fases del desarrollo e incluso, son válidos para el tratamiento. Por ello, existe cada vez hay más interés por su potencial utilización en la clínica.

## 2.2. Biogénesis y mecanismo de acción de los microARNs

Los genes que tienen la facultad de codificar para los miARNs están ubicados normalmente en el interior de los intrones de genes, que lo pueden codificar para proteínas. No obstante, también se encuentran en zonas intergénicas o exónicas<sup>(117)</sup>. Los miARNs maduros se trata de unas moléculas de ARN, caracterizados por tener una doble cadena de 20 - 25nt de longitud y que poseen un grupo fosfato situado en el extremo 5', así como otro hidroxilo ubicado en el extremo 3'. Su síntesis tiene lugar en el núcleo de la célula y su maduración comienza allí, completándose más tarde en el citoplasma, como se puede apreciar en el esquema presentado en la Figura 9.



**Figura 9.** Biogénesis de los microARNs.

Fuente: *James RB. Drug Discovery Today*<sup>(118)</sup>.

Los genes de miARNs destacan por ser, en su mayor parte, transcritos por la ARN polimerasa II. En pocas ocasiones, sucede por la ARN polimerasa III<sup>(119)</sup>. Esto ocasiona un transcrito primario, conocido por pri-miARN, caracterizado por poseer varias kilobases de longitud y con una formación estructural en forma de tallo-bucle. Es posible que el pri-miARN contenga la secuencia de uno o más miARNs. En la primera fase de maduración se escinde la estructura en tallo-bucle del pri-miARN, debido a la endonucleasa RNasa III, conocida por Drosha<sup>(120)</sup>, la cual está asociada con la proteína DGCR8 (en mamíferos), o bien por Pasha (en *Drosophila* y *C. elegans*)<sup>(121)</sup>. Esto produce una estructura de más o menos 65 nucleótidos, que recibe el nombre de pre-miARN. Más tarde, el pre-miARN es remitido al citoplasma gracias a la exportina 5 (XPO5), el cual forma parte de la familia de receptores de transporte nuclear<sup>(122)</sup>. Así pues, cuando está en el citoplasma, el pre-miARN es dividido por la endonucleasa Dicer, la cual está asociada a las proteínas de unión a ARN en respuesta a trans-activación (TRBP)<sup>(123)</sup> y activador de la proteína quinasa R (PACT)<sup>(124)</sup>. Como resultado, obtenemos una molécula de doble cadena, de aproximadamente 22 nucleótidos, la cual conocemos como miARN dúplex. Seguidamente, las dos cadenas se separan, en donde una de ellas perteneciente al dúplex miARN-miARN\* creará el miARN maduro. De manera predominante, esta cadena formará parte del complejo ribonucleoproteína, famoso por ser un complemento silenciador inducido por ARN (RISC)<sup>(125)</sup>, que recibirá el nombre ahora de miRISC. Tras ser procesado el pre-miARN por Dicer, la hebra más numerosa fue llamada 'miARN', mientras que la menos cuantiosa recibió el nombre de 'hebra pasajera o miARN\*'. El miARN\* no suele tener actividad inhibitoria y es degradada. Sin embargo, en ocasiones presenta la actividad silenciadora, aunque menos potente que miARN. El complejo RISC es el responsable de la degradación del ARNm diana y/o de la inhibición de la traducción, al funcionar como una maquinaria catalítica, conteniendo, entre otras proteínas, a Dicer, así como a otras proteínas pertenecientes a la familia argonauta (Ago). Todas ellas son fundamentales a la hora de la mediación de la función de silenciamiento del miARN.

El complejo RISC ayuda a que se una el miARN a su ARNm diana. Los miARNs

pueden realizar de una manera negativa la expresión génica por medio de dos mecanismos fundamentales: la degradación del ARNm diana y la represión traduccional. La función específica de las dianas de los miARNs viene definida, sobre todo, por la complementariedad existente entre las posiciones 2 - 8 de la región 5' del miARN (conocida como 'secuencia semilla') con la región UTR 3' de sus ARNm diana (denominado 'sitio de unión')<sup>(126)</sup>. El emparejamiento entre estas dos zonas debe ser perfecto y cualquier defecto supondría una menor eficacia en la represión. Cuando el miARN se incorpora en el RISC, operará uno o más mecanismos, según el grado de complementariedad que posea miARN con su diana. De este modo, cuando esta es elevada o total, dará lugar a la degradación del ARNm y, cuando no es total o es insuficiente, originará una inhibición de la traducción de ARNm a proteínas<sup>(127)</sup>. Fuera el que fuere el mecanismo usado, en el resultado final se verán reducidos los niveles proteicos. En humanos, encontramos que el mecanismo más habitual es la represión de la traducción. Otras investigaciones han demostrado que los miARNs también tienen la capacidad de regular la expresión génica al juntarse de forma directa al ADN<sup>(128)</sup>.

En resumen, los miARNs son capaces de regular de forma negativa la expresión de los genes por medio de tres mecanismos fundamentales, a saber, la degradación del ARNm diana debido a la unión de forma complementaria a este; la inhibición de la traducción, en el caso de que la unión en la zona UTR 3' no sea totalmente complementaria (lo que recibe el nombre de 'represión traduccional') y, finalmente, la interacción con el ADN, lo cual ocasiona el silenciamiento de la cromatina<sup>(103)</sup>.

### **2.3. Función biológica de los microARNs**

Los miARNs poseen varias funciones regulatorias en cuanto a su desarrollo, diferenciación, apoptosis, así como en relación a la proliferación celular en distintos organismos<sup>(103)</sup>. Asimismo, los miARNs intervienen en algunos procesos en tumorigénesis, como son la inflamación, la regulación del ciclo celular, la diferenciación, la apoptosis y, finalmente, la invasión. Los miARNs también ejercen la función de oncogenes, así como genes supresores de tumores.

Los miARNs también son críticos en el desarrollo normal del hígado y en el ajuste de los procesos biológicos fundamentales de este órgano, ya que el opera como un órgano endocrino y exocrino con numerosas funciones, en el que se incluyen: metabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos, síntesis de urea, desintoxicación de fármacos y compuestos endógenos tóxicos, producción de bilis y secreción de proteínas plasmáticas<sup>(129)</sup>. La desregulación de la expresión de miARNs en tejidos se ha observado en el contexto de patologías hepáticas específicas, como son: hepatitis, cirrosis y CHC, así como también en casos de colestasis crónica.

Por otro lado, los miARNs tienen diferentes funciones en relación a las células madre de tejidos somáticos, en donde se pueden incluir la regulación de múltiples pasos de la hematopoyesis, la diferenciación osteogénica y de la piel, así como la modulación de la miogénesis y cardiogénesis<sup>(130)</sup>. Los miARNs también son fundamentales en el desarrollo del cerebro, ya que están involucrados en los trastornos del SNC, al alterar la función neuronal o la regeneración. Muchos estudios sugieren que los miARNs también son primordiales en el desarrollo y trastornos cardíacos, así como en el desarrollo de las células inmunes y el mantenimiento de las principales funciones del sistema inmunitario<sup>(131)</sup>. La expresión alterada de los miARNs se han asociado con trastornos autoinmunes, como son, por ejemplo, el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoide<sup>(132)</sup>.

## 2.4. MicroARNs y replicación del VHB

Las interacciones de las moléculas de la célula huésped - virus son procesos fundamentales que determinan el estado de la infección durante la infección viral. Los miARNs celulares pueden influir positiva o negativamente en la fase de replicación del virus, al poder regular la expresión de genes virales y/o factores celulares relevantes para el curso de la enfermedad inducida por el virus. Al mismo tiempo, los virus pueden alterar la expresión de miARNs en la célula. Se han descubierto hasta la fecha numerosos miARNs que inhiben o promueven la replicación del VHB mediante la interacción directa con las transcripciones del VHB o indirectamente dirigiéndose a factores celulares cruciales para el ciclo de vida del VHB (Tabla 1).

### 2.4.1. MicroARNs que inhiben la replicación del VHB

El primer intento de buscar los miARNs que se dirigen directamente a las transcripciones del VHB fue realizado por Zhang, utilizando un enfoque de pérdida de función del miARN<sup>(133)</sup>. Un total de 328 miARNs humanos fueron eliminados individualmente en células HepG2.2.15, las cuales están diseñadas para soportar el ciclo de vida del VHB<sup>(133)</sup>. Entre estos, el análisis bioinformático reveló que miR-199a-3p y miR-210 inhibieron el VHB, al dirigirse directamente a la región codificada por HBsAg y la región pre-S1 del genoma del VHB, respectivamente<sup>(133)</sup>. La capacidad para afectar la expresión de HBsAg también se demostró para miR-125a-5p, que se une al ARNm de HBsAg e inhibe su traducción<sup>(134)</sup>.

MiR-122 es un miARN específico y el más abundante para el hígado. Tiene un papel esencial en varios aspectos de la función hepática, incluido el crecimiento hepatocelular, la diferenciación, el metabolismo de los lípidos y la transformación neoplásica<sup>(135)</sup>. MiR-122 está involucrado en una red de señalización compleja, la cual afecta a la infectividad del VHB. Varios estudios informaron de la existencia de una disminución notable en la replicación del VHB cuando la expresión se reguló positivamente, tanto en las líneas celulares como en los tejidos del hígado. La ciclina G1 es uno de los objetivos de miR-122 y participa en la regulación de la replicación del

VHB. Wang y sus colaboradores demostraron que las interacciones entre ciclina G1 y p53 bloquean la unión específica de p53 a los elementos potenciadores del VHB y anulan simultáneamente la inhibición mediada por p53 de la transcripción del VHB<sup>(136)</sup>. Por su parte, Qiu sugirió que el miR-122 inhibía la replicación del VHB a través del aumento de la expresión de hemo oxigenasa 1 (HO-1), que se trata de una enzima citoprotectora que disminuye los niveles de ADNccc del VHB tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>(137)</sup>. Fan *et al.* mostró una correlación inversa entre el nivel de expresión de miR-122 y el gen NDRG3 en muestras de carcinoma hepatocelular relacionados con el virus de la hepatitis B, lo que podría acelerar la secreción de HBeAg y HBsAg y la replicación del ADN del VHB<sup>(138)</sup>. Chen y colaboradores demostraron que el miR-122 podría atacar directamente la expresión de la polimerasa del VHB, con el fin de reprimir la replicación viral<sup>(139)</sup>.

Se ha demostrado que miR-1231 suprime la replicación del VHB, al actuar sobre a la proteína del núcleo del VHB<sup>(140)</sup>. En células HepG2 transfectadas con el VHB, la sobreexpresión de miR-1231 resultó en el proceso de supresión de la replicación viral, al tener la capacidad de atacar la proteína central del VHB.

El receptor  $\alpha$  activado por proliferador de peroxisoma (PPAR $\alpha$ ), que se une y transactiva a los promotores del VHB, se describió como un objetivo de miR-141<sup>(141)</sup>. La transfección del miR-141 sintético en las células HepG2 transfectadas con VHB suprimió la expresión de PPAR $\alpha$ , lo que condujo a una transcripción reducida del VHB<sup>(141)</sup>. La inhibición dirigida por miR-125b al canal de sodio subunidad alfa no activada por voltaje 1 (SCNN1A), reprimió la expresión de la proteína del VHB<sup>(142)</sup>. Otras secuencias virales críticas para la replicación del VHB, incluida la región de codificación para la polimerasa del VHB y la región de superposición entre la polimerasa del VHB y el HBx, se mostraron como objetivos potenciales para el grupo miR-15a / miR-16-1<sup>(143)</sup>. Se informó que los niveles elevados de miR-26a en los hepatocitos dieron como resultado una disminución marcada en el ADN del VHB y la expresión de proteínas. Análisis posteriores demostraron que miR-26b inhibía la expresión de la proteína de unión a zinc 1 de dominio rico en cisteína e histidina

(CHORDC1), el cual funciona como un regulador positivo de las actividades potenciadoras / promotoras del VHB<sup>(144)</sup>. Por lo tanto, es concebible que estos miARNs puedan contribuir a escapar de la erradicación del VHB del sistema inmunitario del huésped, al suprimir la replicación viral.

#### 2.4.2. MicroARNs que promueven la replicación del VHB

Otros miARNs promueven la replicación del VHB, dirigiéndose a los reguladores negativos de la actividad del VHB o mejorando un regulador positivo. Dai y colaboradores informaron que miR-15b inhibió directamente la expresión del factor nuclear 1 alfa de hepatocito (HNF-1 $\alpha$ ), con el fin de activar el potenciador I del VHB; en consecuencia, miR-15b promueve la replicación del VHB<sup>(145)</sup>. Otro estudio demostró el miR-372/373 promueve la expresión del VHB a través del factor nuclear I/B (NFIB), un factor de transcripción con capacidad para disminuir los niveles de proteína viral HBsAg y HBeAg, así como los niveles de ADN asociados al núcleo viral, debido a su unión al potenciador I y promotor central del VHB<sup>(146)</sup>. Además, la familia miR-99, que incluye miR-99a, miR-99b y miR-100, también fue capaz de mejorar la autofagia dirigida a la replicación del VHB a través de la vía proteína quinasa B-diana de rapamicina en células de mamífero (Akt-mTOR)<sup>(147)</sup>.

Las modificaciones epigenéticas del ADNccc del VHB, como la metilación y desacetilación del ADN, son primordiales en el proceso de control de la replicación del VHB, al suprimir la transcripción del ADNccc a los ARNm virales. Epi-miARN, miR-1 se ha implicado en la regulación de las modificaciones epigenéticas del ADNccc del VHB. Zhang demostró que miR-1 se dirige directamente a las histonas deacetilasas-4 (HDAC4), y la transfección de miR-1 en células HepG2.2.15 condujo a una expresión marcadamente reducida de HDAC4 y mejora la transcripción del VHB<sup>(148)</sup>. Además, Zhang informó que miR-1 mejoraba la actividad del promotor central del VHB, al promover la expresión del receptor X fernesioide alfa (FXR $\alpha$ ), el cual es un factor de transcripción enriquecido en el hígado activado por los ácidos biliares<sup>(148)</sup>. Un estudio reciente reveló que miR-548ah promueve la replicación y expresión del VHB, a través

de la regulación de HDAC4. La inhibición de HDAC4 por miR-548ah podría influir en el estado de desacetilación de las histonas que se unen al ADNccc, mejorando así la replicación del ADNccc<sup>(149)</sup>.

También hay algunos miARNs que funcionan de forma sinérgica con las proteínas del VHB, con el fin de promover la replicación viral. Así pues, se aisló originalmente la proteína X de interacción con el virus de la hepatitis B (HBXIP), como si fuera una proteína humana que se une a la proteína HBx. En este caso, se puede reducir la replicación del VHB, al interactuar con un dominio necesario para la transactivación de HBx. Jin y colaboradores demostraron que HBXIP, un inhibidor de la replicación del VHB, es un objetivo potencial de miR-501, cuya represión activa es la replicación del VHB<sup>(150)</sup>.

Estudios recientes han encontrado que miR-137 promueve la expresión génica del VHB y la replicación del virus, al dirigirse a la expresión de inhibidor de proteínas de STAT2 activado (PIAS2)<sup>(151)</sup>. PIAS2 se trata de un transductor de señal, que funciona como activador de proteínas de transcripción, capaz de regular la expresión génica al poder bloquear la interacción de los factores de transcripción con el ADN<sup>(151)</sup>.

**Tabla 1.** MicroARNs relacionados con la replicación de VHB.

<b>MiARNs</b>	<b>Dianas</b>	<b>Expresión</b>	<b>Efecto</b>	<b>Bib.</b>
miR-1	HDAC4, FXR $\alpha$ , E2F5	<i>Down</i>	Promueve VHB replicación	(148)
miR-3	ARNpg	<i>Up</i>	Inhibe VHB replicación	(152)
let-7	preS2	<i>Up</i>	Inhibe VHB replicación	(153)
miR-15a/miR-16-1	HBx	<i>Down</i>	Inhibe VHB replicación	(143)
miR-15b	HNF1 $\alpha$	<i>Down</i>	Promueve VHB replicación	(145)
miR-17-92 cluster	c-Myc	<i>Up</i>	Inhibe VHB replicación	(154)
miR-26b	CHORDC1	<i>Down</i>	Inhibe VHB replicación	(144)
miR-29a	SMARCE1	<i>Up</i>	Promueve VHB replicación	(155)
miR-29c	TNFAIP3	<i>Down</i>	Inhibe VHB replicación	(156)
miR-99 family	mTOR/ULK1	<i>Down</i>	Promueve VHB replicación	(147)
miR-101	FOXO1	<i>Down</i>	Inhibe VHB replicación	(157)
	SOCS3	<i>Down</i>	Promueve VHB replicación	(158)
miR-122	Cyclin G1, HO-1, NDRG3, AND-VHB polimerasa	<i>Down</i>	Inhibe VHB replicación	(136-139)
miR-125a	HBx	<i>Up</i>	Inhibe VHB replicación	(159)
miR-125a- 5p	HBsAg	<i>Up</i>	Inhibe VHB replicación	(134)
miR-125b	SCNN1A	<i>Down</i>	Inhibe VHB replicación	(142)
miR-125b- 5p	LIN28B/let-7 axis	<i>Up</i>	Promueve VHB replicación	(160)
miR-129-2	SOX4	<i>Up</i>	Promueve VHB replicación	(161)
	PGC1 $\alpha$ y PPAR	<i>Down</i>	Inhibe VHB replicación	(104)
miR-130a	PKLR, ER $\alpha$	<i>Down</i>	Promueve VHB replicación	(162, 163)
miR-137	PIAS2	<i>Up</i>	Promueve VHB replicación	(151)
miR-138	HBx	<i>Up</i>	Inhibe VHB replicación	(164)
miR-141	PPAR $\alpha$ , Sirt1	<i>Down</i>	Inhibe VHB replicación	(141, 165)
miR-146	ZEB2	<i>Up</i>	Promueve VHB replicación	(166)
miR-146a-5p	XIAP- MDM2/p53 axis	<i>Up</i>	Promueve VHB replicación	(167)
	SOCS1, IFN- $\gamma$	<i>Up</i>	Inhibe VHB replicación	(168, 169)
miR-155	PTEN, C/EBP- $\beta$	<i>Down</i>	Inhibe VHB replicación	(169, 170)
miR-185-5p	ELK1	<i>Up</i>	Inhibe VHB replicación	(171)
miR-199a	DDX3	<i>Down</i>	Inhibe VHB replicación	(172)
miR-199a-3p	HBsAg	<i>Up</i>	Inhibe VHB replicación	(133)
miR-200c	NFIA	<i>Down</i>	Inhibe VHB replicación	(173)
miR-203	SOX4	<i>Up</i>	Promueve VHB replicación	(161)
miR-204	STAT3	<i>Down</i>	Inhibe VHB replicación	(174)
miR-210	VHB pre-S1	<i>Up</i>	Inhibe VHB replicación	(133)

miR-302c-3p	BMPR2, HNF4 $\alpha$	<i>Down</i>	Inhibe VHB replicación	(175)
miR-335	SOX4	<i>Up</i>	Promueve VHB replicación	(161)
miR-370	NFIA	<i>Up</i>	Inhibe VHB replicación	(176)
miR-372/373	NFIB	<i>Up</i>	Promueve VHB replicación	(146)
miR-449a	FXR $\alpha$	<i>Up</i>	Promueve VHB replicación	(177)
miR-501	HBXIP	<i>Up</i>	Promueve VHB replicación	(150)
miR-520a	Akt	<i>Down</i>	Inhibe VHB replicación	(178)
miR-520e	MAPK	<i>Down</i>	Inhibe VHB replicación	(179)
miR-548ah	INF $\gamma$ R1	<i>Down</i>	Promueve VHB replicación	(180)
	HDAC4	<i>Up</i>	Promueve VHB replicación	(149)
miR-581	Dicer, EDEM1	<i>Down</i>	Promueve VHB replicación	(181)
miR-802	SMARCE1	<i>Up</i>	Inhibe VHB replicación	(182)
miR-939	CEBP $\alpha$	<i>Up</i>	Inhibe VHB replicación	(183)
miR-1231	HBcAg	<i>Up</i>	Inhibe VHB replicación	(140)

Nota: Bib: bibliografía; *Up*: up-regulado; *Down*: down-regulado; VHB: virus de la hepatitis B; HDAC4: histonas desacetilasas-4; FXR $\alpha$ : receptor X fernesioide alfa; E2F5: factor de transcripción E2F5; ARNpg: ARN pregenómico; HBx: proteína viral X; HNF1 $\alpha$ : factor nuclear 1 alfa de hepatocito; CHORDC1: proteína de unión a zinc 1 de dominio rico en cisteína e histidina; SMARCE1: regulador de la cromatina dependiente de actina asociado a la matriz y relacionado con SWI / SNF de la subfamilia E, miembro 1; TNFAIP3: proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa; SOCS3: supresor de señalización de citoquinas 3; HO-1: hemo oxigenasa 1; NDRG3: gen 3 regulado aguas abajo N-myc; HBsAg: antígeno de superficie del virus de hepatitis B; SCNN1A: canal de sodio subunidad alfa no activada por voltaje 1; SOX4: región determinante del sexo Y recuadro 4; PGC1 $\alpha$ : coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas; PPAR: receptor de peroxisoma proliferador activado; PKLR: piruvato quinasa isoenzimas R/L; ER $\alpha$ : receptor de estrógeno  $\alpha$ ; PIAS2: inhibidor de proteínas de STAT2 activado; PPAR $\alpha$ : receptor  $\alpha$  activado por proliferador de peroxisoma; ZEB2: dedo de zinc E-box homeobox 2; SOCS1: supresor de señalización de citoquinas 1; IFN- $\gamma$ : interferón  $\gamma$ ; PTEN: homólogo de fosfatasa y tensina; DDX3: polipéptido 3 de la caja DEAD; NFIA: factor nuclear I/A; STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3; BMPR2: receptor de proteína morfogenética ósea tipo II; HNF4 $\alpha$ : factor nuclear 4 alfa de hepatocito; NFIB: factor nuclear I/B; HBXIP: la proteína X de interacción con el virus de la hepatitis B; MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno; EDEM1: ER-degradación que mejora la alfa-manosidasa como la proteína 1; HBcAg: antígeno del core del virus de hepatitis B.

## 2.5. MicroARNs implicados en enfermedades asociadas al VHB

La hepatitis B posee un curso clínico que destaca por ser dinámico, variando ampliamente desde el estado de portador asintomático hasta expresiones graves de la enfermedad, incluida la HBC, la cirrosis hepática y el CHC. La evidencia creciente revela que los miARNs son fundamentales en el proceso de la patogénesis y la identificación de enfermedades relacionadas con el VHB.

### 2.5.1. MicroARNs en HBC

Un número creciente de estudios han demostrado que miR-122, un miARN específico del hígado, está asociado con enfermedad hepática crónica. Ji y colaboradores mostraron que miR-122 está significativamente *up*-regulado en muestras de sangre tomadas de pacientes con hepatitis crónica con HBeAg positiva<sup>(184)</sup>. Wang y colaboradores mostraron que la expresión de miR-122 en el hígado se redujo significativamente en 41 pacientes chinos infectados por el VHB, con respecto a 10 controles sanos<sup>(136)</sup>. También señalaron que los niveles de miR-122 se correlacionaron negativamente con la carga viral intrahepática y con el grado de necroinflamación.

Por su parte, Momeni mostró que la expresión de miR-1, miR-21 y miR-125a en las células inmunes de sangre periférica aumentó significativamente en sujetos con infección crónica por el VHB, con respecto a controles sanos, y que la expresión ectópica de estos miARNs fue la responsable de las respuestas inmunes deterioradas en el VHB crónico transportistas<sup>(185)</sup>. Un estudio mostró que los niveles de miR-372/373 aumentan, a medida que aumenta el título de ADN del VHB y, por lo tanto, pueden servir como un marcador de hepatitis crónica<sup>(146)</sup>. Otro estudio reveló que miR-23b, let-7c, miR-150 y miR-122 podrían servir para diagnosticar la infección oculta por el VHB<sup>(186)</sup>.

### 2.5.2. MicroARNs en fibrosis y cirrosis hepática relacionados con el VHB (CH-VHB)

Se ha demostrado que la inflamación persistente provocada por un largo periodo expuesto a la infección por el VHB es la fuerza impulsora que conduce a la fibrosis

hepática, generado por un desequilibrio entre la producción de matriz extracelular por las células estrelladas hepáticas (HSCs)<sup>(187)</sup>. La cirrosis se produce principalmente debido a los depósitos de colágeno secretados por las HSCs en la matriz extracelular de los hepatocitos. Se ha informado que los miembros de la familia de miR-29 se asocian negativamente con el avance de la cirrosis fibrosis, así como con el grado de necroinflamación<sup>(188)</sup>. Los informes indicaron que miR-29 suprime la cirrosis/fibrosis tras su regulación positiva, al reprimir los genes que secretan colágeno, concretamente en las HSCs, por medio de las vías del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B)<sup>(189)</sup>.

Lakner y colaboradores informaron que miR-19b inhibió la fibrogénesis mediada por HSCs, al regular la TGF- $\beta$  en HSCs activadas<sup>(190)</sup>. Además, Venugopal mostró que la fibrosis hepática puede causar una regulación negativa de miR-150 y miR-194 en HSCs y que su sobreexpresión podría reprimir la activación de HSCs<sup>(191)</sup>. Otro estudio informó que los niveles de miR-33a en el tejido hepático de individuos con infección crónica por el VHB aumentaron significativamente durante la progresión de fibrosis<sup>(192)</sup> (Tabla 2).

**Tabla 2.** MicroARNs en fibrosis hepática relacionados con el VHB.

MiARNs	Dianas	Expresión	Efecto	Bib.
miR-19b	TGF- $\beta$	<i>Down</i>	Inhibe la activación de HSCs inducida por TGF- $\beta$ y previene la fibrosis	(190)
miR-27a	PPAR $\gamma$	<i>Up</i>	Estimula la activación de HSCs	(193)
miR-29	COL1A1	<i>Down</i>	Inhibe la expresión de colágeno en HSCs y previene la fibrosis	(189)
miR-33a	SMAD7	<i>Up</i>	Estimula la activación de HSCs inducida por TGF- $\beta$ y promueve la fibrosis	(192)
miR-125b	STARD13	<i>Up</i>	Promueve la activación de HSCs	(194)
miR-150	c-myb	<i>Down</i>	Inhibe la expresión de colágeno I y la activación de HSCs	(191)
miR-194	Rac1	<i>Down</i>	Inhibe la expresión de colágeno I y la activación de HSCs	(191)

Nota: Bib: bibliografía; *Up*: up-regulado; *Down*: down-regulado; HSCs: células estrelladas hepáticas; TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante beta; PPAR $\gamma$ : receptor de peroxisoma proliferador activado gamma; COL1A1: colágeno, tipo I, alfa 1; SMAD7: miembro 7 de la familia SMAD; STARD13: dominio de transferencia de lípidos relacionados StAR que contiene 13.

### 2.5.3. MicroARNs en CHC relacionados con el VHB (CHC-VHB)

La infección crónica ocasionada por el VHB sigue siendo un factor etiológico significativo de CHC, en el que el riesgo de desarrollar CHC aumenta en 100 veces, si lo comparamos con personas no infectadas<sup>(195)</sup>. Los miARNs desempeñan un papel fundamental en la hepatocarcinogénesis asociada al VHB, ya que pueden actuar como tumores supresores, al regular negativamente la expresión de oncogenes, o bien como tumores promotores, al limitar la expresión de proteínas oncosupresoras, dependiendo de la función celular que tengan los genes dianas. Un estudio realizado por Ura demostró que la infección por el VHB indujo conjuntos específicos de miARN durante la hepatocarcinogénesis, entre sus objetivos, se incluían genes involucrados en vías relacionadas con la proliferación celular, la apoptosis, el daño del ADN y la transducción de señales<sup>(196)</sup>. Se muestran los miARNs de CHC-VHB y sus posibles dianas en Tabla 3.

Varios grupos de investigación encontraron que el miR-122 se encontraba reprimido en líneas celulares de CHC que expresan el VHB y en muestras clínicas de tumores. La supresión de miR-122 condujo a la regulación positiva de NDRG3, un promotor tumoral que contribuye a un fenotipo maligno<sup>(197)</sup>. En otro estudio, se demostró que los bajos niveles de miR-122 promovieron una sobreexpresión del factor de unión al gen transformante tumoral de pituitaria 1 (PTTG1), lo que favorece el crecimiento tumoral del CHC y la invasión celular<sup>(138)</sup>.

HBx da nombre a una proteína multifuncional codificada por el VHB, la cual actúa como un transactivador pleiotrópico y modula la expresión del gen del huésped al interactuar con varios factores de transcripción celular y vías de señalización<sup>(198)</sup>. Así, por ejemplo, la disminución de la expresión de miR-101 por HBx resultó en la sobreexpresión de ADN metiltransferasa 3A (DNMT3A), promoviendo la hipermetilación de ADN aberrante de varios genes supresores de tumores<sup>(199)</sup>. Se demostró que miR-152 está dirigido y regulado negativamente por HBx, lo que provoca una regulación positiva de la actividad de ADN metiltransferasa 1 (DNMT1) y la consiguiente metilación del ADN de los promotores de muchos genes supresores de

tumores<sup>(200)</sup>. Además, otro estudio demostró que el miR-148a fue reprimida por HBx, a través de la inhibición de la activación mediada por p53. Esto condujo a una mayor expresión de la proteína que interacciona con el factor de transcripción de leucemia de células pre-B hematopoyéticas (HPIP), que es fundamental en relación al crecimiento de las células cancerosas<sup>(201)</sup>. Estudios posteriores informaron que miR-22, miR-26a, miR-29c, miR-145 y miR-199a-3p, miR-216b, miR-325-3p, miR-338-3p, miR-378, etc. participan en la inhibición de la proliferación celular, y fueron regulados negativamente en CHC-VHB<sup>(156, 202-213)</sup>.

Se ha descubierto que varios miARNs de tipo oncogénico pueden promover el desarrollo de CHC-VHB. Connolly identificó que el *cluster* miR-17-92 (miR-17-5p, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a y miR-92a-1) estaba regulado hacia arriba en CHC-VHB<sup>(214)</sup>. Esta regulación positiva, facilitada principalmente por la proteína HBx, los factores de transcripción c-Myc y E2F1, contribuye a un fenotipo maligno, al promover la proliferación celular y el crecimiento independiente del anclaje<sup>(214)</sup>. MiR-21 promueve la proliferación celular, al dirigirse a genes supresores de tumores, incluidos el homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) y la proteína 4 de muerte celular programada (PDCD4)<sup>(215)</sup>. La sobreexpresión de miR-143 inhibió la expresión del dominio de fibronectina tipo III que contiene 3B (FNDC3B), un regulador de la motilidad celular, estimulando así la metástasis de CHC<sup>(216)</sup>. Así pues, miR-155 puede promover el CHC, apuntando a la región determinante del sexo Y recuadro 6 (SOX6), un regulador transcripcional que inhibe el crecimiento celular al estimular el regulador de crecimiento p21 de una manera dependiente de p53<sup>(217)</sup>. Otro estudio informó que el miR-3928v regula el gen supresor de tumores canal 3 de aniones dependiente de voltaje (VDAC3) para promover el crecimiento, la migración e invasión de CHC, acelerando así su progresión<sup>(218)</sup>.

**Tabla 3.** microARNs en CHC relacionados con el VHB.

<b>MiARNs</b>	<b>Dianas</b>	<b>Expresión</b>	<b>Efecto</b>	<b>Bib.</b>
miR-1	HDAC4, MET	<i>Down</i>	Proliferación (-)	(219)
let-7	Bcl-xL, c-Myc, RAS, STAT3	<i>Down</i>	Proliferación (-), Migración (-), Apoptosis (+)	(220-224)
miR-15a	SMAD7	<i>Down</i>	Apoptosis (-), Carcinogénesis (+)	(225)
miR-15a/16	BCL-2	<i>Down</i>	Apoptosis (-), Carcinogénesis (+)	(226)
miR-16	Cyclin D1, NCOR2	<i>Down</i>	Proliferación (-), Apoptosis (+), Clonogenicidad (-)	(227)
miR-17-92	E2F1	<i>Up</i>	Proliferación (+)	(214)
miR-18a	ER $\alpha$ , ESR1	<i>Up</i>	Proliferación (+)	(228, 229)
miR-21	PDCD4, PTEN, SMAD7	<i>Up</i>	Proliferación (+), Migración (+), Apoptosis (-)	(215, 230)
miR-22	CDKN1A, HDAC4, ER $\alpha$	<i>Down</i>	Proliferación (-)	(202-204)
miR-23b	uPA, MET	<i>Down</i>	Proliferación (-), Migración (-)	(231)
miR-26a	ER $\alpha$ , IL-6, Cyclin D2, Cyclin E2	<i>Down</i>	Proliferación (-), Metástasis (-)	(205)
miR-29a	PTEN	<i>Up</i>	Migración (+)	(232)
miR-29c	TNFAIP3	<i>Down</i>	Proliferación (-), Apoptosis (+)	(156)
miR-34a	CCL22, MET	<i>Down</i>	Metástasis (-)	(233)
miR-34c	TGIF2	<i>Down</i>	Proliferación (-), Apoptosis (+)	(234)
miR-99a	IGF1R, mTOR	<i>Down</i>	Proliferación (-)	(235)
miR-101	DNMT3A	<i>Down</i>	Inducir la metilación de ADN aberrante	(199)
miR-101-3p	Rap1b	<i>Down</i>	Proliferación (+), Migración (+), Apoptosis (-)	(236)
miR-122	PBF, NDGR3	<i>Down</i>	Proliferación (-), Migración (-), Apoptosis (+)	(138, 197)
miR-125a-5p	ErbB3	<i>Up</i>	Proliferación (-), Apoptosis (+)	(237)
miR-126	ADAM9	<i>Down</i>	Proliferación (-), Metástasis (-)	(238)
miR-129-2	SOX4	<i>Down</i>	Proliferación (-), Clonogenicidad (-)	(239)
miR-132	Akt	<i>Down</i>	Proliferación (-)	(240)
miR-136	AEG-1	<i>Down</i>	Migración (-)	(241)
miR-138	CCND3	<i>Down</i>	Tumorogénesis (+)	(242)
miR-143	FNDC3B	<i>Up</i>	Metástasis (+)	(216)
miR-145	HDAC2, ADAM17	<i>Down</i>	Proliferación (-), Invasión (-)	(206, 207)
miR-148a	HPIP	<i>Down</i>	Proliferación (-), Metástasis (-)	(201)
miR-152	DNMT1	<i>Down</i>	Metástasis (-), Apoptosis (+)	(200)
miR-155	SOX6	<i>Up</i>	Proliferación (+)	(217)
miR-181a	FAS, E2F5	<i>Up</i>	Proliferación (+), Apoptosis (-)	(243, 244)
miR-199a-3p	PAK4, mTOR	<i>Down</i>	Proliferación (-), Apoptosis (+)	(208, 209)
miR-205	HBx	<i>Down</i>	Carcinogénesis (-)	(245)
miR-216b	IGF2BP2	<i>Down</i>	Proliferación (-), Migración (-), Invasión (-)	(210)

miR-221	ER $\alpha$	<i>Up</i>	Proliferación (+)	(246)
miR-223	c-myc	<i>Down</i>	Proliferación (+)	(247)
miR-325-3p	AQP5	<i>Down</i>	Proliferación (-), Apoptosis (+)	(211)
miR-331-3p	ING5	<i>Up</i>	Proliferación (+)	(248)
miR-338-3p	Cyclin D1	<i>Down</i>	Proliferación (-)	(212)
miR-340	ATF7	<i>Down</i>	Proliferación (+), Apoptosis (-)	(249)
miR-371a-5p	SRCIN1	<i>Up</i>	Proliferación (+), Metástasis (+)	(250)
miR-375	AEG-1	<i>Down</i>	Migración (+)	(241)
miR-378	IGF1R	<i>Down</i>	Proliferación (-)	(213)
miR-384	PTN	<i>Down</i>	Proliferación (+), Metástasis (+)	(251)
miR-429	NOTCH1	<i>Up</i>	Proliferación (-), Apoptosis (+)	(252)
miR-499a	MAPK6	<i>Up</i>	Proliferación (+), Migración (+)	(253)
miR-545/374a	ESRRG	<i>Up</i>	Tumorigénesis (+)	(254)
miR-602	RASSF1A	<i>Up</i>	Proliferación (+), Apoptosis (-)	(255)
miR-1271	CCNA1	<i>Up</i>	Proliferación (-), Migración (-), Apoptosis (+)	(256)
miR-3928v	VDAC3	<i>Up</i>	Proliferación (+), Migración (+), Invasión (+)	(218)

Nota: Bib: bibliografía; (+): promoción; (-): inhibición; *Up*: *up*-regulado; *Down*: *down*-regulado; HDAC4: histonas desacetilasas-4; Bcl-xL: linfoma de células B extra grande; STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3; SMAD7: miembro 7 de la familia SMAD; BCL-2: linfoma de células B2; NCOR2: receptor nuclear co-represor 2; E2F1: factor de transcripción E2F1; ER $\alpha$ : receptor de estrógeno  $\alpha$ ; ESR1: receptor de estrógeno 1; PDCD4: proteína 4 de muerte celular programada; PTEN: homólogo de fosfatasa y tensina; CDKN1A: inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1A; uPA: activador de plasminógeno de tipo uroquinasa; TNFAIP3: proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa; CCL22: quimiocina (motivo C-C) ligando 22; TGIF2: factor de crecimiento transformante-factor inducido por  $\beta$  homeobox 2; IGF1R: receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina; mTOR: diana de rapamicina en células de mamífero; DNMT3A: ADN metiltransferasa 3A; PBF: factor de unión del gen 1 transformador tumoral hipofisario; ADAM9: desintegrina y metaloproteasa 9; SOX4: región determinante del sexo Y recuadro 4; AEG-1: gen 1 de elevación de los astrocitos; CCND3: ciclina D3; FNDC3B: dominio de fibronectina tipo III que contiene 3B; HDAC2: histonas desacetilasas-2; ADAM17: desintegrina y metaloproteasa 17; HPIP: factor de transcripción de leucemia de células pre-B hematopoyéticas; DNMT1: ADN metiltransferasa 1; SOX6: región determinante del sexo Y recuadro 6; E2F5: factor de transcripción E2F5; PAK4: serina/treonina-proteína quinasa 4 ; HBx: proteína viral X; IGF2BP2: similar a la insulina factor de crecimiento 2 de ARNm-proteína de unión 2; AQP5: acuaporina 5; ING5: inhibidor de la proteína de crecimiento 5; ATF7: factor de transcripción activador 7; SRCIN1: inhibidor 1 de señalización de la quinasa SRC; PTN: pleiotrofina; NOTCH1: notch receptor 1; MAPK6: proteína quinasa activada por mitógeno 6; ESRRG: receptor gamma relacionado con el estrógeno; RASSF1A: proteína 1A que contiene el dominio de asociación Ras; CCNA1: ciclina A1; VDAC3: canal 3 de aniones dependiente de voltaje.

## **CAPÍTULO II: HIPÓTESIS**

## **HIPÓTESIS**

La infección crónica causada por el VHB sigue siendo un problema de la salud pública mundial, la cual puede ser la causante de varias enfermedades graves, como son la fibrosis hepática, la cirrosis hepática o, incluso, el CHC. Una proporción de pacientes con HBC que no encajan en ninguno de los estados inmunitarios habituales se considera que se encuentran en la “zona gris”. El ADNccc intrahepático es determinante en el ciclo vital del virus, y las terapias actuales no tienen posibilidad de eliminarlo. Actualmente, la cuantificación del ADNccc intrahepático no es fácil de generalizar debido a la naturaleza invasiva de la biopsia hepática, por lo que puede haber marcadores subrogados del ADNccc intrahepático. Los miARNs circulantes se han usado de manera considerable en el diagnóstico precoz y en el tratamiento terapéutico de varias enfermedades. Los miARNs circulantes pueden servir como biomarcador no invasivo en el diagnóstico precoz de CHC-VHB. Y el hecho de determinar el papel regulador de la red de interacción miARN-ARNm específica en la expresión del ADNccc en pacientes con hepatitis B crónica en la zona gris (HBC-ZG) puede proporcionarnos una base teórica, con el fin de localizar nuevas dianas terapéuticas.

## **CAPÍTULO III: OBJETIVOS**

## **1. METAANÁLISIS DE MICROARN EN CHC-VHB**

- Evaluar el valor diagnóstico del miARN circulante como biomarcador no invasivo en el diagnóstico precoz del CHC-VHB.
- Explorar los factores que producen la heterogeneidad en los resultados.

## **2. CORRELACIÓN ENTRE ADNCCC Y MARCADORES VIROLÓGICOS**

- Analizar la correlación entre ADNccc intrahepático y otros marcadores virológicos en pacientes con HBC-ZG.
- Explorar los marcadores subrogados no invasivos para ADNccc intrahepático en pacientes con HBC-ZG.

## **3. MICROARNS EN PACIENTES CON HBC-ZG**

- Explorar la función reguladora de los miARNs en la expresión del ADNccc en pacientes con HBC-ZG, establecer una red de interacción entre miARN-ARNm, y proporcionar una base teórica que nos ayude a buscar nuevos objetivos terapéuticos.
- Identificar posibles vías reguladoras de miARN-ARNm, que sean capaces de contribuir a la patogénesis de HBC-ZG.
- Estudiar el perfil de expresión diferencial de miARN y ARNm de pacientes con HBC-ZG basado en diferentes niveles de qHBsAg, y explorar su posible red de interacción.
- Investigar el perfil de expresión diferencial de miARN y ARNm entre pacientes con HBC-ZG que reciben terapia antiviral y aquellas que no recibieron terapia antiviral, y explorar su potencial red de interacción.

## **CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS**

# 1. METAANÁLISIS DE MICROARN EN CHC-VHB

## 1.1. Estudio de identificación y selección

Dos investigadores (Wenting Zhang y Antonio Gil Gómez) realizaron una búsqueda exhaustiva de forma independiente en *PubMed*, *Embase*, *Web of Science*, *WanFang Database* y *China National Knowledge Infrastructure (CNKI)*. Se utilizaron las bases de datos con el fin de identificar estudios adecuados que hubieran sido publicados hasta una fecha límite: el 12 de mayo de 2021. Se utilizaron términos y palabras clave MeSH (del inglés: *Medical Subject Headings*), y los términos de búsqueda incluyeron los siguientes: “*hepatocellular carcinoma*” o “*liver cancer*” o “*HCC*” y “*microRNA*” o “*miRNA*” o “*miR*” y “*hepatitis b virus*” o “*HBV*” o “*chronic hepatitis*”. Las búsquedas se limitaron a publicaciones con sujetos humanos, sin restricciones de idioma. También se realizó una búsqueda manual, a través de las referencias enumeradas en los artículos originales y los artículos de revisión recuperados. Este metaanálisis se efectuó de acuerdo con la declaración PRISMA<sup>(257)</sup>.

## 1.2. Criterios de inclusión y exclusión

Los citados investigadores independientes consideraron las referencias, atendiendo a los 5 criterios de inclusión siguientes: (1) los estudios clínicos tienen como objetivo valorar la capacidad de diagnóstico de los miARNs circulantes para el diagnóstico de CHC-VHB; (2) todos los pacientes con CHC-VHB han sido diagnosticados mediante exámenes histopatológicos, y no han recibido ningún tratamiento (cirugía, radioterapia y quimioterapia) antes de ser seleccionados; (3) el grupo de control compuesto por individuos infectados con VHB sin CHC, incluida la HBC y CH-VHB; (4) los miARN obtenidos se miden en muestras de suero o plasma; (5) los estudios contenían datos suficientes sobre sensibilidad, especificidad y tamaño de la muestra, que van a servir para la realización de una tabla de diagnóstico de dos por dos.

Por el contrario, los criterios de exclusión fueron: (1) informes que estuvieran duplicados o publicaciones que no tuvieran una información completa; (2) los miARNs obtenidos provenían de líneas celulares, de animales, del tejido hepático o de la orina; (3) comentarios, revisiones, informes de casos, cartas a los editores y (4) revisiones sistemáticas o metaanálisis.

### **1.3. Extracción de datos y evaluación de calidad**

Los dos investigadores hicieron una selección de los estudios más relevantes de forma independiente, guiándose por el título, el resumen y el texto completo, que se revisó para una evaluación adicional si el estudio fue recogido por cualquiera de los dos investigadores. Posteriormente, de cada una de las publicaciones seleccionadas, ambos investigadores extrajeron los datos más reveladores, previamente determinados, como son los siguientes: nombre del primer autor, año de publicación, perfil de miARN, modo de regulación (*up*- o *down*-regulado), tamaño de la muestra (número de pacientes con CHC-VHB / HBC / CH-VHB), tipo de muestras (suero o plasma), así como datos de tablas de dos por dos, sensibilidad, especificidad, AUC y la calidad metodológica (selección de pacientes, prueba de índice, estándar de referencia, flujo y tiempo, selección de pacientes para la preocupación aplicable, texto de índice para preocupación aplicable y estándar de referencia para la preocupación aplicable). Cuando el estudio se publicó la misma población en varias revistas, eligieron el que estaba más completo o el que ofrecía más información, con el fin de evitar una duplicación. Finalmente, dos revisores evaluaron de forma independiente la calidad de los estudios elegibles utilizando la herramienta de evaluación de calidad para estudios de precisión diagnóstica (QUADAS-2)<sup>(258)</sup>. Cuando hubo desacuerdo, este se solucionó consultando a un tercer autor, para que con su criterio se pudiera llegar a un consenso.

### **1.4. Síntesis de datos**

En este metaanálisis, se anotó el número de verdaderos positivos, falsos positivos, falsos negativos y verdaderos negativo para los pacientes en cada estudio. La

heterogeneidad se evaluó mediante estadísticas  $I^2$ . Si el valor de  $I^2$  es superior al 50%, se tomó como indicativo de heterogeneidad significativa y se realizó un modelo de efectos aleatorios. Así pues, por medio del análisis de metarregresión y del análisis de subgrupos, se exploraron las posibles fuentes de heterogeneidad. También, se calcularon la sensibilidad (SE), la especificidad (SP), razón de verosimilitud positiva (PLR), razón de verosimilitud negativa (NLR) y el odds ratio de diagnóstico (DOR). Además, se generó una curva resumen de características operativas del receptor (SROC) y se calculó el área bajo la curva SROC (AUC) para el análisis general y el análisis de subgrupos de los indicadores de evaluación del desempeño. En cuanto a los criterios de evaluación para la eficacia diagnóstica: AUC = 1,00 es perfecto, AUC > 0,90 es excelente, AUC > 0,80 es bueno, AUC < 0,80 es medio<sup>(259)</sup>. Finalmente, se evaluó el posible sesgo de publicación, utilizando la prueba de asimetría de gráfico en embudo de *Deeks*, en la que  $p < 0,05$  indicaba significación estadística. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando Review Manager 5.4 y STATA versión 15.1.

## **2. CORRELACIÓN ENTRE ADNCCC Y MARCADORES VIROLÓGICOS EN PACIENTES CON HBC-ZG**

### **2.1. Pacientes y muestras**

#### **2.1.1. Población del estudio**

La totalidad de los pacientes que participaron en este estudio fueron diagnosticados con HBC-ZG, los cuales se reclutaron en la Unidad de Aparato Digestivo del Hospital Universitario Virgen del Rocío (HUVR). Se obtuvieron consentimientos informados de cada uno de los participantes y todos los procedimientos realizados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospitales Universitarios Virgen Macarena-Virgen del Rocío.

#### Criterios de inclusión:

1. Pacientes diagnosticados de HBC-ZG.
2. Edad mayor de 18 años.
3. Pacientes que estuvieron indicados y aceptaron someterse a una biopsia hepática.
4. Pacientes que consintieron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado.

#### Criterios de exclusión:

1. Pacientes menores de 18 años.
2. Pacientes con otros tipos de infecciones ocasionados por el virus de hepatitis, como el VHA, VHC, VHD.
3. Pacientes con otras causas de daño hepático como, por ejemplo, hepatitis autoinmune, hepatitis alcohólica, hepatocarcinoma y otras.
4. Pacientes con otros tipos de infecciones virales, como el VIH.
5. Pacientes habían recibidos alguna vez terapia antiviral contra el VHB.
6. Pacientes con enfermedades sistémicas importantes como diabetes, hipertensión arterial, cáncer y otras.

7. Pacientes embarazadas y lactantes.
8. Pacientes que tienen contraindicaciones para someterse a biopsia hepática y/o los que rechazan realizársela.
9. Pacientes que no consienten participar en el estudio.

### **2.1.2. Obtención de muestras**

#### **2.1.2.1. Recogida de sangre periférica**

Las muestras de sangre periférica de los pacientes fueron extraídas mediante punción venosa, y se depositaron en tubos conteniendo anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético. Todas ellas se procesaron dentro de las 4 horas posteriores a la recolección. La muestra se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente el plasma y el suero fueron transferidos a un tubo libre de RNasa y almacenadas a -80° C hasta su uso.

#### **2.1.2.2. Obtención de tejido hepático**

Las muestras de tejido hepático de los pacientes fueron obtenidas mediante biopsia hepática percutánea. Para obtener dichos tejidos, se utilizó la pistola de biopsia semiautomática, así como la aguja de 16G bajo la guía de la ecografía. Todas las muestras fueron almacenadas a -80° C hasta su uso en el biobanco del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS).

## **2.2. Evaluación general y específica**

### **2.2.1. Evaluación general**

La información que se iban tomando de los sujetos de estudio se plasmaba en una hoja de recogida de datos (Anexo 1). Aquí fue donde se registraron los datos generales y los parámetros serológicos, biológicos e histopatológicos de los individuos que formaban la muestra. Las variables fueron las siguientes:

1. Demográficas y antropométricas: edad, sexo, peso, talla e índice de masa corporal

(IMC).

2. Estudio serológico: HBsAg, Anti-HBs, Anti-HBc IgG, Anti-HBc IgM, HBeAg, Anti-HBe.

3. Estudio de genotipo: A, B, C, D, E o no aplica.

4. Estudio virológico: cuantificación del ADN-VHB en suero.

5. Estudio biológico: AST, ALT, Albumina, GTT, fosfatasa alcalina, proteína total, bilirrubina total, colinesterasa, lactado deshidrogenasa, creatinina, colesterol, HDL, LDL, triglicérido, glucemia, HOMA, hemoglobina, plaquetas, índice de Forns, índice de APRI, índice FIB-4, tiempo de protrombina, INR, y tiempo de cefalina.

6. Elastografía hepática: fibroscan.

7. Estudio histológico: nivel de infiltración portal (nivel: 0 - 1 o nivel: 2 - 4), nivel de infiltración lobulillar (nivel: 0 - 1 o nivel: 2 - 4), y nivel de fibrosis (nivel: 0 - 1 o nivel: 2 - 4).

8. Seguimiento de pacientes por 3 años: evaluar si el paciente necesitaba tratamiento antiviral. Se visitó a los pacientes cada 6 meses o con más frecuencia si estaba clínicamente indicado. En cada visita se realizaron evaluaciones clínicas, bioquímica y de marcadores séricos del VHB.

## **2.2.2. Evaluación específica**

### **2.2.2.1. Cuantificación de ARNpg-VHB en suero**

El proceso de extracción de ARN se va a describir de forma detallada posteriormente (ver 3.1.1.). El ARNpg-VHB en suero se purificó utilizando *QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen)*, seguido de un tratamiento con ADNasa a 25°C durante 15 minutos (*RNase-Free DNase set, Qiagen*). Con el fin de monitorear la extracción y amplificación adecuadas de ácido nucleico, se agregó una dosis fija de un control interno en cada muestra (*Internal RNA extraction control kit, Primer Design, Camberley, UK*). Se evaluó el ARN-VHB de 3,5 kb (ARN pre-genómico y ARNm pre-core) mediante la reacción en cadena de la polimerasa con reverso transcripción en tiempo real (RT-qPCR) utilizando cebadores específicos y sonda TaqMan, tal y como

se muestra a continuación.

3,5kb VHB-ARN	<i>Forward</i>	GGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCT	2363–2386
	<i>Reverse</i>	CATTGAGATTCCCGAGATTGAGAT	2450–2427
	<i>Probe</i>	TCTCAATCGCCGCGTCGCAGA	2404–2424

*TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)* se utilizó para realizar la RT-qPCR. La cuantificación absoluta se realizó usando diluciones en serie de un plásmido transcrito in vitro que contenía 1,8 kb del genoma del VHB (incluida la región diana para la detección del ARN del VHB de 3,5 kb) bajo el control del promotor T7<sup>(260)</sup>. Todo este proceso se realizó en laboratorio de hepatitis viral del Hospital Clínic de Barcelona.

#### 2.2.2.2. Cuantificación de ADN-VHB intrahepático total, ADNccc y ARNpg-VHB intrahepático

Los ácidos nucleicos totales se extrajeron de biopsias de hígado humano congeladas utilizando *MasterPure™ DNA y RNA purification kit (Epicentre, Illumina, San Diego, CA, USA)*. Las muestras se dividieron en dos partes, siendo tratadas con ARNasa o DNasa para las consecuentes extracciones de ADN o ARN, respectivamente. La cantidad de ADN y ARN purificados se midió mediante el espectrofotómetro *NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)* y el fluorómetro *Qubit® 3.0 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)*. El ADN-VHB intrahepático total y el ADNccc intrahepático se determinaron mediante PCR en tiempo real (qPCR), y la cuantificación se realizó utilizando el sistema de PCR en tiempo real *ViiA 7*. Los cebadores y la sonda *TaqMan* se muestran a continuación.

ADNccc	<i>Forward</i>	CCGTGTGCACTTCGCTTCA	1577–1595
	<i>Reverse</i>	GCACAGCTTGGAGGCTTGA	1884–1866
	<i>Probe</i>	CATGGAGACCACCGTGAACGCC	1609–1631

Para la determinación de ADNccc intrahepático, el ADN purificado se pretrató con

*Plasmid-Safe™ DNase* (Epicentre, Lucigen Corporation, Middleton, WI, USA) a 37°C durante 4 horas. La curva estándar se preparó a partir de diluciones en serie de un plásmido que contenía un monómero de VHB (pBR322-VHB). El rango de cuantificación fue de  $10^1$  a  $10^7$  genomas por reacción para ADN-VHB intrahepático total y de  $5 \times 10^1$  a  $10^7$  copias por reacción para ADNccc intrahepático. Las copias del genoma viral se normalizaron frente al número de células, estimado por el número de copias del gen de la  $\beta$ -globina humana (*ID Hs00758889\_s1*, ABI, Thermo Fisher). El programa de ciclos consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos y 40 ciclos del paso 1 (95°C durante 1 segundo) y el paso 2 (65°C durante 1 minuto)<sup>(261)</sup>.

Para el ARNpg-VHB intrahepático de 3,5 kb seguimos el mismo protocolo descrito anteriormente para el ARNpg-VHB en suero. El ARN se midió con el fluorómetro *Qubit® 3.0* y se trataron 100 ng de ARN con DNasa a 25°C durante 15 minutos (*RNase-Free DNase set*, Qiagen) seguido de una qPCR, usando los cebadores específicos que describimos con anterioridad. Todo este proceso se realizó en laboratorio de hepatitis viral del Hospital Clínic de Barcelona.

#### 2.2.2.3. Cuantificación de HBsAg en suero

Para determinar la qHBsAg sérico, se utilizó el ensayo *LIAISON XL MUREX HBsAg Quant* ([REF] 310250), el cual utiliza la tecnología de inmunoensayo por quimioluminiscencia. El rango dinámico de cuantificación del *LIAISON XL* se establece entre 0,03 y 150 UI/mL, en donde el sistema tiene una dilución automática a bordo, típicamente 1: 400, lo que aumenta el límite superior de detección a más de 50.000 UI/mL<sup>(262)</sup>. Todo este proceso se realizó en la Unidad de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de Valme, en Sevilla. Varios factores pueden afectar a los resultados de la qHBsAg. Por ejemplo, la qHBsAg puede volverse inexacta o engañosa, si predominan los mutantes de escape de HBsAg<sup>(263)</sup>. Además, el HBsAg suele estar parcialmente enmascarado en los complejos inmunes, lo que podría influir en los resultados<sup>(264)</sup>.

### **2.3. Análisis estadístico**

La tabulación de los datos y el análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS versión 25.0 para Windows y R versión 4.0.4. Los datos cualitativos se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar ( $\bar{x} \pm SD$ ), y los datos cuantitativos, como número de casos y porcentaje. Los datos fueron agrupados y analizados a través de una prueba paramétrica (Test t de Student) en las muestras que presentaban una distribución normal, o utilizando una prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney) cuando no se superaban los test de normalidad y/o igualdad de varianzas. Dado que no se pudo alcanzar el supuesto de distribución normal, se usó la prueba de correlación de Spearman, con el propósito de evaluar la correlación existente entre ADNccc intrahepático y otros marcadores de actividad virológica en pacientes con HBC-ZG. El nivel de significación estadística se estableció en  $p < 0,05$ .

### **3. MICROARNS EN PACIENTS CON HBC-ZG**

#### **3.1. Obtención del perfil de expresión diferencial de miARNs y ARNm**

##### **3.1.1. Extracción de ARN**

El ARN total, conjuntamente con la fracción de miARNs, fue extraído de las biopsias de tejido hepático de los pacientes, usando el kit comercial *mirVana™ miRNA Isolation Kit* (Ambion® Life Technologies, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante<sup>(265)</sup>. Este kit se basa en una extracción orgánica, a la que le sigue una inmovilización del ARN en filtros de fibra de vidrio o sílica en condiciones específicas, con el fin de purificar el ARN total o el ARN enriquecido con ARNs de pequeño tamaño. En primer lugar, las muestras se lisan con un tampón de lisis desnaturizante que estabiliza el ARN e inactiva las ARNsas. Seguidamente, el lisado se extrajo con ácido-fenol: que es un cloroformo que elimina la mayor parte de otros componentes celulares que incluyen la mayor parte del ADN, dejando una muestra de ARN semipura. Además, esto se purificó sobre un filtro de fibra de vidrio, con el objetivo de conseguir el ARN total, en el que quedan incluidas las especies de ARN muy pequeñas. El filtro de fibra de vidrio usó soluciones formuladas específicamente para la retención de los miARNs y también con el fin de impedir que se pierdan los ARNs pequeños. Por esa razón, a las muestras se añadió etanol y se pasó a través del filtro de fibra de vidrio, mediante ciclos cortos de centrifugación con la idea de inmovilizar el ARN. Seguidamente, el filtro se lavó varias veces y, en último lugar, el ARN se eluyó en agua libre de nucleasas.

La concentración y pureza del ARN se cuantificó mediante *NanoDrop™ 2000c* (Thermo Scientific), que se trata de un espectrofotómetro ultravioleta visible. La pureza se estableció a partir de la relación de absorbancias a las longitudes de onda de 260nm y 280nm (ratio A260 / A280). Todas las muestras de ARN se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

### 3.1.2. Microarray

Un microarray de miARNs consiste en una superficie sólida, en la cual están fijadas una recopilación de sondas específicas, cuya función es hibridar con los miARNs dianas, con el fin de determinar el nivel de expresión de estos. El nivel de hibridación entre la sonda específica y los miARNs dianas se muestra mediante fluorescencia y se mide a través de un análisis de imagen, el cual revela el nivel de expresión de cada uno de los miARNs dianas de la muestra. Por tanto, de cada una de las muestras (microarray) se obtienen los niveles de expresión (fluorescencia) de muchas sondas (miARNs)<sup>(266)</sup>.

Para la determinación del perfil de expresión de los miARNs en suero y tejido hepático se utilizó *GeneChip™ miRNA 4.0 Assay* (Affymetric, ThermoFisher CA, USA) con 4.603 sondas diferentes entre pre-miARNs y miARNs maduros. Los experimentos de microarrays se elaboraron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De cada muestra se marcaron 130 ng de ARN total, utilizando para ello el *FlashTag™ Biotin ARN Labeling kit* (Genisphere, Hatfield, PA, USA). Posteriormente, el ARN marcado se cuantificó, fraccionó e hibridó con el microarray de miARN, siguiendo una serie de pautas consecutivas. Así pues, en primer lugar, las muestras de ARN etiquetadas se calentaron a 99°C durante 5 minutos y luego, de nuevo a 45°C durante otros 5 minutos. En segundo lugar, se llevó a cabo la hibridación con la matriz de ARN con agitación continua a 60 rpm durante 16 horas a 48°C con *Affymetrix® 450 Fluidics Station*. A continuación, se lavaron y tiñeron los chips de microarrays de miARN, utilizando la *GeneChip™ Fluidics Station 450* (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Y, por último, los chips de microarrays de miARN fueron escaneados usando el *GeneChip™ Scanner 3000* (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), en donde los valores de señal fueron evaluados utilizando el *Affymetrix® GeneChip™ Command Console Software*<sup>(267)</sup>.

Un microarray de ARNm consiste en una superficie sólida, en la que están fijadas una colección de sondas específicas, las cuales hibridan juntamente con los ARNm dianas, con el objetivo de determinar el nivel de expresión. Para determinar el perfil de expresión de ARNm en tejido hepático se utilizó *Clariom™ S Assay, Human*, y se llevó

a cabo, de acuerdo con las instrucciones marcadas por el fabricante.

### **3.1.3. Perfil de expresión de miARN y ARNm en muestras de tejido hepático de individuos sanos**

Las muestras de tejido hepático de individuos sanos tienen su origen en la base de datos GEO (del inglés: *Gene Expression Omnibus*). En el proceso de búsqueda de conjuntos de datos relevantes, solo se incluyen estudios que tratan la comparación de la expresión de miARN y ARNm en tejidos hepáticos, entre enfermedades relacionadas con la hepatitis B e individuos sanos. Para ello, se realizó un examen de la información de conjuntos de los datos seleccionados que contenían títulos y resúmenes. Posteriormente, estos conjuntos de datos de interés se evalúan con detalle y se recopilan los datos sobre la expresión de miARN y ARNm en tejidos hepáticos de individuos sanos. En último lugar, y basado en el conjunto de datos GSE57555 en plataforma *Agilent-046064 Unrestricted\_Human\_miRNA\_V19.0\_Microarray (Feature Number version)* del perfil de expresión de miARN de muestras de tejido hepático normal y el conjunto de datos GSE121248 en plataforma *GPL570 [HG-U133\_Plus\_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array* del perfil de expresión de ARNm de muestras de tejido hepático normal se seleccionaron para el análisis posterior. El conjunto de datos GSE57555 está formado por 64 muestras de tejido hepático, en donde se incluyen 16 muestras de individuos sanos; el conjunto de datos GSE121248 está formado, a su vez, por 107 muestras, en donde están incluidas 37 muestras de individuos sanos.

## **3.2. Análisis bioinformático**

### **3.2.1. Preprocesado**

#### **3.2.1.1. Preprocesado de los resultados de microarrays**

La información obtenida a partir de cada uno de los microarrays es la intensidad de cada una de las sondas que forman parte del microarray. La lectura de los microarrays puede quedarse afectada por algunas condiciones experimentales, como son, por

ejemplo, el fondo en las hibridaciones o las diferentes intensidades entre los microarrays. Con el fin de poner solución a estos problemas, hacer desaparecer el ruido de fondo, y colocar a la misma escala, tanto las distintas zonas como los distintos microarrays, y el punto cero, se va a establecer la normalización. Por tanto, realizaremos un control de calidad antes del procesamiento, y comprobaremos si los datos son de mala calidad, para controlar la calidad de la prenormalización. Dicha normalización de los datos nos va a permitir comparar las intensidades que existen entre las distintas sondas del microarray y entre la totalidad de los microarrays. Lo que pretende la normalización es hacer desaparecer estas variaciones sistemáticas en los datos de la forma más completa que se pueda, pero salvaguardando la variación biológica real. En nuestro caso, se puso en práctica el método de normalización RMA (del inglés: *Robust Multichip Average*) del paquete *oligo* de Bioconductor en R, que se basa en el ajuste de las intensidades de fondo y en la normalización mediante cuantiles las señales de las sondas ajustadas<sup>(268)</sup>.

### 3.2.1.2. Preprocesado de los resultados combinados de microarray y GEO

Cuando combinamos las muestras de tejido hepático de pacientes con HBC-ZG e individuos sanos que provienen la base de datos GEO, habrá un cierto efecto de lote, a causa de que los lotes experimentales, los datos de expresión del chip de la plataforma y los métodos de procesamiento de las muestras experimentales son distintos. El efecto de lote hace referencia a la desviación técnica sistemática, que no tiene relación con el estado biológico introducido por la muestra en los distintos procesamientos y mediciones de los lotes. En ocasiones, una buena parte de los factores pueden ocasionar efectos de lote, como las distintas condiciones experimentales, reactivos de diferentes compañías, diferentes lotes de reactivos, equipo de prueba, distintos operadores, tiempo de desarrollo del experimento, diferentes lotes de secuenciación, entre otros. Por ello, en primer lugar, debemos eliminar, tanto como sea posible, los efectos por lotes, mientras dure el análisis de datos conjuntos. Para procesar efectos por lotes, utilizamos la función *ComBat* del paquete *sva*.

### 3.2.2. Expresión diferencial (ED)

Primeramente, se realizaron el filtrado y anotación de miARNs y ARNm por separado, en donde se seleccionaron los pertenecientes solamente a humanos. Con posterioridad, se llevó a cabo un filtrado de miARNs y ARNm, basado en la varianza de los niveles de expresión de cada miARN y ARNm. Para este fin, se utilizó el paquete de Bioconductor *genefilter*, con el fin de buscar los miARNs y ARNm que manifestaron un mayor nivel de dispersión en los niveles de expresión entre las diferentes muestras. Después, realizamos la ED de los miARNs y ARNm, por medio del test estadístico de la *t* limma<sup>(269)</sup>. Las técnicas de análisis de microarrays estándar se prueban para comparar cada una de las sondas, de tal forma que se obtiene un p valor “bruto” para cada miARN y ARNm. En este examen, pues, no se tiene en cuenta que la comparación global está compuesta por cientos o miles de test, y que esto conlleva la necesidad de corregir estos p valores, con el fin de minimizar el número de falsos positivos. En nuestro estudio, aguantamos el ajuste por FDR (del inglés: *False Discovery Rate*), que se trata de una modificación del ajuste por múltiples comparaciones de *Benjamini & Hochberg*<sup>(270)</sup>.

#### 3.2.2.1. Análisis de ED de miARNs en muestras de tejido hepático

El análisis de ED de miARNs en las muestras de tejido hepático, se dividió en dos partes. Su esquema se muestra en la Figura 10.

- ED de miARNs entre HBC-ZG e individuos sanos (valor de corte:  $p_{\text{adjust}} < 0,01$ ).
- ED de miARNs en tres diferentes agrupaciones en pacientes con HBC-ZG (valor de corte:  $p < 0,05$  y  $|\log FC| > \log 1,5$ ).
- Análisis de ED en función del nivel del ADNccc

Dividimos a los pacientes en dos grupos dependiendo del nivel de ADNccc intrahepático que tuvieran y usamos 1 copia/cel como estándar de agrupación, porque el valor medio de ADNccc en pacientes infectados por el VHB es de 0,01 a 1 copia/cel<sup>(271)</sup>. Además, Liang *et al.* reveló que el ADNccc intrahepático basal  $> 1$  copia/cel es un predictor independiente de la inflamación hepática<sup>(272)</sup>. Entonces, el

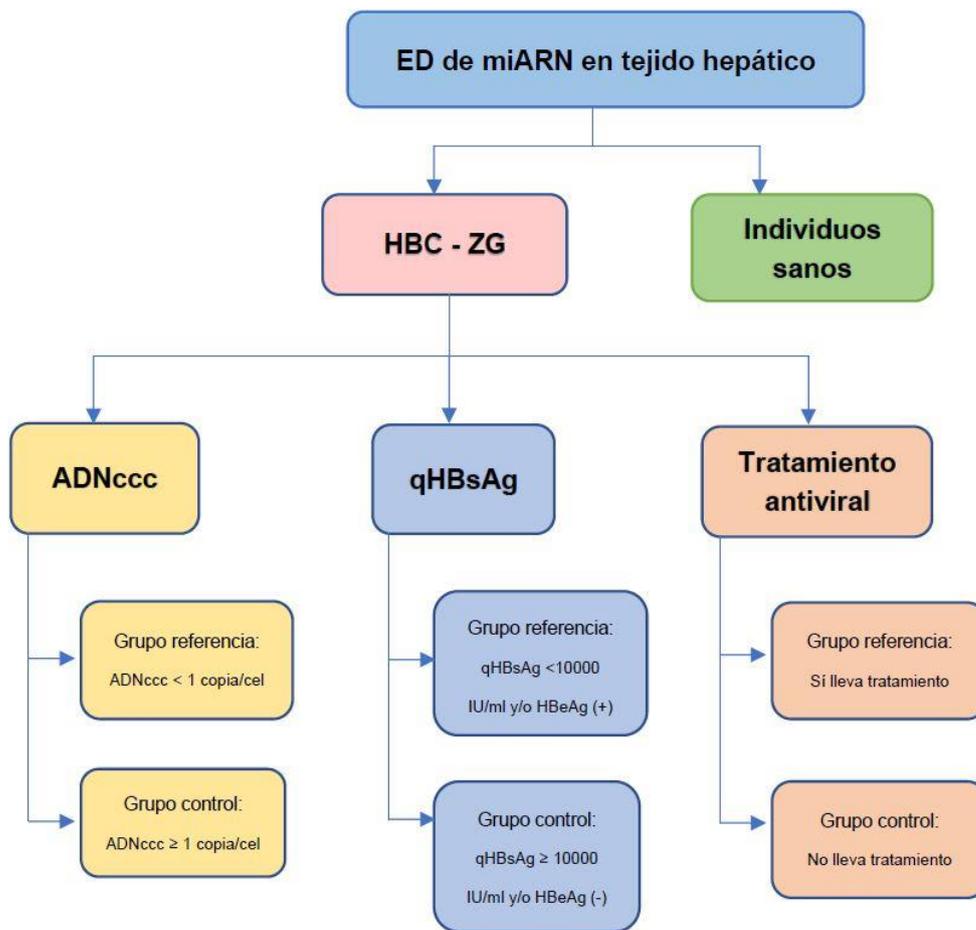
grupo de referencia ( $n = 7$ ) estaría formado por los pacientes con  $ADNccc < 1$  copia/cel, mientras que el grupo de control ( $n = 6$ ) estaría formado por los pacientes con  $ADNccc \geq 1$  copia/cel.

➤ Análisis de ED en función de la qHBsAg

Con el fin de corregir la variación que se encontró en función de la variable qHBsAg, se usó la presencia del antígeno HBeAg como covariable. Para realizar este estudio se utilizó un modelo de interacción entre ambas variables, en el que el grupo de referencia para la variable principal lo formaban aquellos individuos que tenían una cuantificación de HBsAg  $< 10000$  IU/mL, así como los positivos para HBeAg. Así pues, en el modelo de interacción, la totalidad de los pacientes que pertenecían al grupo de referencia para algunas de las dos variables (o para las dos) formaron el nuevo grupo de referencia del modelo conjunto, para el que, al final, se evaluó la ED de los miARNs.

➤ Análisis de ED en función de si lleva tratamiento antiviral durante un seguimiento de tres años

El grupo de referencia ( $n = 8$ ) estaba compuesto por aquellos pacientes que fueron tratados con el tratamiento antiviral durante un seguimiento de tres años, así como el grupo de control ( $n = 5$ ), formado por pacientes que no habían recibido el tratamiento antiviral durante un seguimiento de tres años.



**Figura 10.** Esquema de análisis de ED de miARNs en tejido hepático.

### 3.2.2.2. Análisis de ED de ARNm en muestras de tejido hepático

Dividimos en dos partes el análisis de ED de ARNm en muestras de tejido hepático. El esquema se muestra en la Figura 11.

- ED de ARNm entre HBC-ZG e individuos sanos (valor de corte:  $p$ . adjust < 0,01).
- ED de ARNm en tres distintas agrupaciones en pacientes con HBC-ZG (valor de corte:  $p < 0,05$  y  $|\logFC| > \log 1,5$ ).

#### ➤ Análisis de ED en función del nivel del ADNccc

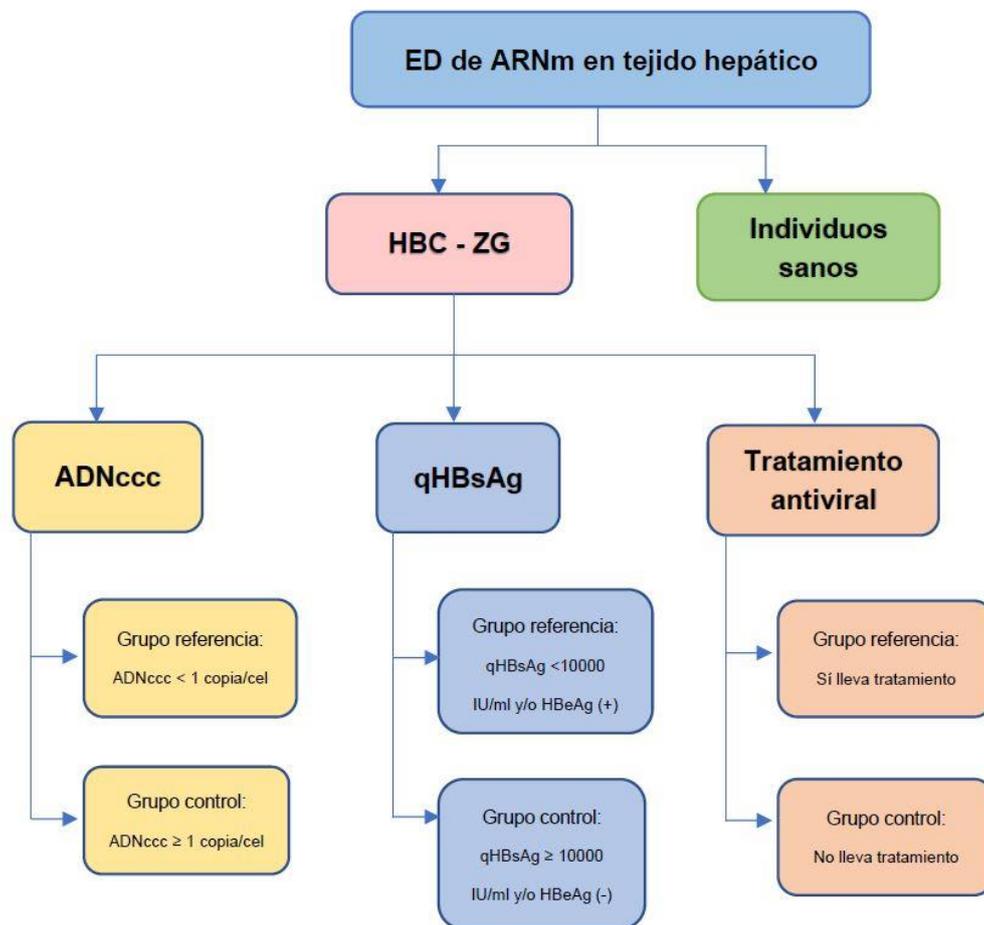
El grupo de referencia ( $n = 7$ ) estaría compuesto por los pacientes con  $ADNccc < 1$  copia/cel, mientras que el grupo de control ( $n = 6$ ) estaría formado por los pacientes con  $ADNccc \geq 1$  copia/cel.

➤ Análisis de ED en función de la qHBsAg

El grupo de referencia (n = 8) sería formado por aquellos individuos con qHBsAg < 10000 IU/mL y/o HBeAg positivo. Mientras que el grupo de control (n = 5) estaría formado por los pacientes con qHBsAg ≥ 10000 IU/mL y/o HBeAg negativo.

➤ Análisis de ED en función de si lleva tratamiento antiviral durante un seguimiento de tres años

El grupo de referencia (n = 8) estaba formado por aquellos pacientes que recibieron un tratamiento antiviral, mientras que el grupo de control (n = 5), por los que no habían recibido dicho tratamiento antiviral durante un seguimiento de tres años.



**Figura 11.** Esquema de análisis de ED de ARNm en tejido hepático.

### 3.2.2.3. Análisis de ED de miARNs en muestras de plasma

Realizamos ED de miARNs en plasma, según tres agrupaciones diferentes en pacientes con HBC-ZG (valor de corte:  $p < 0,05$  y  $|\logFC| > \log 1,5$ ) (Figura 12).

➤ Análisis de ED en función del nivel del ADNccc

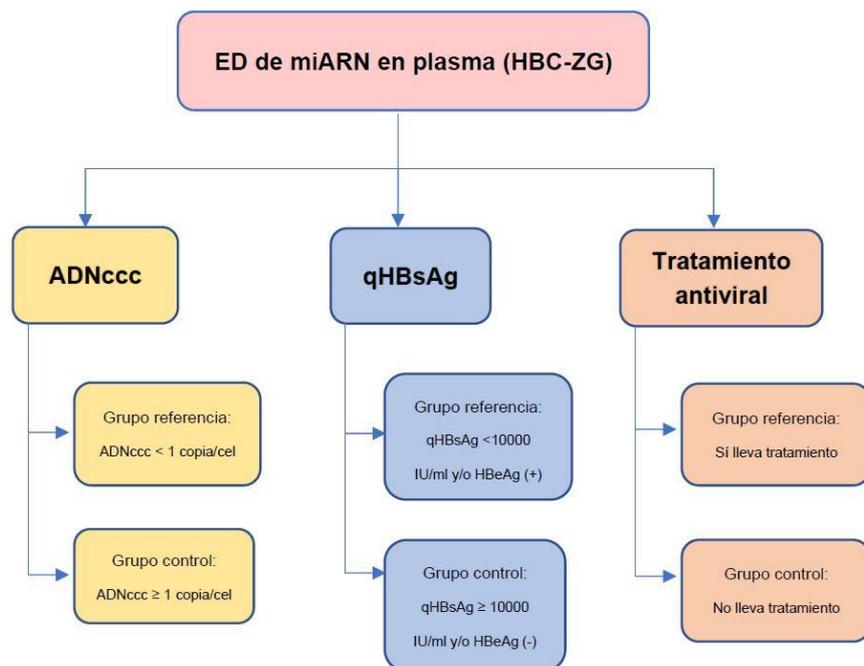
El grupo de referencia (n = 7) estaba formado por los pacientes con ADNccc < 1 copia/cel, mientras que el grupo de control (n = 5) con ADNccc  $\geq 1$  copia/cel.

➤ Análisis de ED en función de la qHBsAg

El grupo de referencia (n = 7) estaba formado por aquellos individuos con qHBsAg < 10000 IU/mL y/o HBeAg positivo, mientras que el grupo de control (n = 5) estaba formado por los pacientes con qHBsAg  $\geq 10000$  IU/mL y/o HBeAg negativo.

➤ Análisis de ED en función de si lleva tratamiento antiviral durante un seguimiento de tres años

El grupo de referencia (n = 7) estaba compuesto por pacientes a los que se les puso un tratamiento antiviral durante un seguimiento de tres años, mientras que el grupo de control (n = 5), por aquellos que no habían recibido el tratamiento antiviral durante un seguimiento de tres años.



**Figura 12.** Esquema de análisis de ED de miARNs en plasma.

### 3.2.3. Análisis de enriquecimiento funcional

Se realizaron unos análisis de enriquecimiento funcional, como *Gene Ontology* (GO), *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) y *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA), para conseguir información relativas a las funciones diferencialmente representadas en los distintos grupos del estudio. La ontología GO está formada por tres categorías, que son: el proceso biológico (BP), la función molecular (MF) y el componente celular (CC), que caracterizan a grupos de genes. KEGG presenta redes de interacciones moleculares. El análisis de GSEA es un método computacional que determina si un conjunto de genes definido a priori revela la existencia de diferencias concordantes estadísticamente significativas entre dos estados biológicos. Del listado obtenido con los ED de miARNs se pasa a una lista con los genes diferencialmente expresados y a la función de estos grupos de genes. Para ello, se utilizó el paquete *clusterProfiler* del software R, con el fin de proceder la realización del análisis de enriquecimiento de GO, KEGG y GSEA, con el objetivo de encontrar las funciones comunes y las vías relacionadas de una gran cantidad de genes en el conjunto de genes expresados diferencialmente. Cuando  $p < 0,05$  se estableció como punto de corte para la significación.

### 3.2.4. Construcción de red miARN-ARNm en muestra de tejido hepático

Utilizamos la función *cor.test* para obtener el coeficiente de correlación de Pearson, así como su p valor. Como se sabe, los genes diana estaban regulados a la inversa por los miARNs, de manera que, cuanto mayor era el coeficiente de correlación (r), mayor era el efecto de regulación mutua. Primeramente, se retienen las interacciones que manifiestan una correlación negativa, así como los pares que existen en la base de datos *miRTarBase*. El software *Cytoscape* (versión 3.8.2) se empleó para construir y analizar la red de interacción miARN-ARNm. Después, tras filtrar los valores de correlación que tienen un  $p > 0,05$ , obtenemos aquellos resultados que tenían un  $p < 0,05$ . Se consideran que los miARNs que están fuertemente correlacionados negativamente con el gen diana cuando  $r < -0,7$  y  $p < 0,01$ .

## **CAPÍTULO V: RESULTADOS**

# 1. METAANÁLISIS DE MICROARN EN CHC-VHB

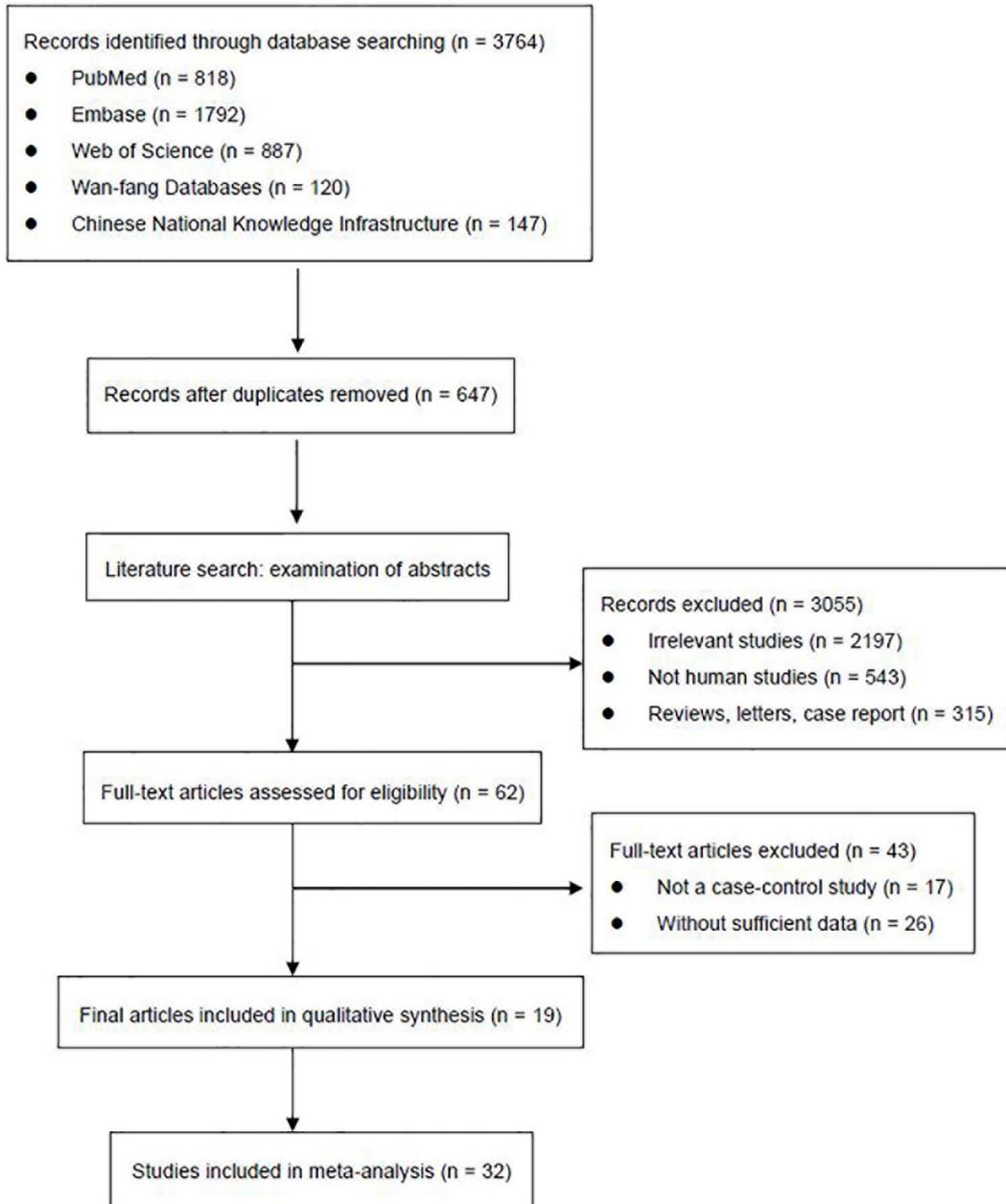
## 1.1. Resultados de la investigación

El proceso de selección de artículos se puede observar en el diagrama de flujo detallado, tras realizar las búsquedas independientes (Figura 13). Primeramente, se identificaron un total de 3.764 artículos, tras la primera búsqueda de artículos de investigación, de los cuales 818 eran de *PubMed*, 1.792 eran de *Embase*, 887 eran de *Web of Science*, 120 eran de *WanFang Database* y 147 eran de CNKI. Se dejaron 3.117 artículos para la detección después de que se eliminaron 647 duplicados. Después de revisar sus resúmenes y títulos, se eliminaron 3.055 artículos, los cuales eran 2.197 estudios irrelevantes, 543 investigaciones realizadas en animales o líneas celulares, y 315 revisiones y cartas. Posteriormente, se leyeron los textos completos de los 62 artículos restantes, de los cuales se excluyeron 43. Finalmente, se incluyeron 32 estudios de 19 artículos en el metaanálisis actual.

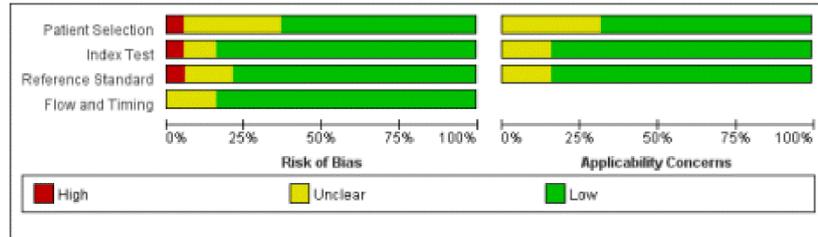
## 1.2. Características de los estudios elegibles

Las características principales de los 19 artículos incluidos se resumen en la Tabla 4, que, como se aprecia, están presentadas de forma ordenada por el año de su publicación (2010-2021).

En total, en el estudio se incluyeron 2.590 pacientes con CHC-VHB y 1.963 controles. De todos ellos, 15 artículos se refieren a un solo miARN, y 4 artículos se centraron en múltiples miARNs. Además de todo ello, se utilizó la RT-qPCR con el fin de detectar los niveles de expresión de miARN en muestras de suero en 15, y 4 que se hicieron en muestras de plasma. La mayoría de los estudios provienen de China, en donde la etnia dominante de los sujetos del estudio es la asiática. Las evaluaciones de calidad metodológica de los artículos incluidos, de acuerdo con la herramienta QUADAS-2, se muestran en un gráfico de barras (Figura 14).



**Figure 13.** Diagrama de flujo de la selección de artículos.



	Risk of Bias				Applicability Concerns		
	Patient Selection	Index Test	Reference Standard	Flow and Timing	Patient Selection	Index Test	Reference Standard
Cao, X.2020	+	+	+	+	+	+	+
Chen, S.2017	?	+	+	+	?	+	+
Chen, Y.2015	+	?	+	+	+	+	+
Ghosh, A.2016	?	+	+	+	?	+	+
Li, L.2012	-	+	?	+	?	+	?
Li, LM.2010	+	-	+	+	+	?	+
Li, X.2021	+	+	+	?	+	+	+
Lin, L.2016	+	+	+	+	+	?	+
Moradi, N.2019	?	+	+	?	?	+	+
Qi, P.2011	?	+	+	+	?	+	+
Tan, Y.2014	?	+	?	+	?	+	?
Xie, Y.2014	+	?	+	+	+	?	+
Xiong, F.2016	?	+	-	+	+	+	?
Xu, LJ.2018	+	+	+	+	+	+	+
Yu, F.2015	+	+	+	?	+	+	+
Zhang, W.2020	+	+	+	+	+	+	+
Zhao, Q.2018	+	+	+	+	+	+	+
Zhou, J.2011	+	+	?	+	+	+	+
Zhu, HT.2017	+	+	+	+	+	+	+

**Figure 14.** Evaluación de calidad según los criterios QUADAS-2.

**Tabla 4.** Características de los estudios incluidos.

Autor	Años	País	microARNs	Modo*	Tamaño de la muestra				Tipo de muestra	Poder de diagnóstico		
					Caso	No.	Control	No.		Se	Sp	AUC
<b>MiARN simple</b>												
Qi, P. <sup>(273)</sup>	2011	China	miR-122	<i>Up</i>	CHC	70	HBC	48	Suero	0,78	0,58	0,63
Li, L. <sup>(274)</sup>	2012	China	miR-18a	<i>Up</i>	CHC	101	HBC+CH	30	Suero	0,77	0,70	0,78
Xie, Y. <sup>(275)</sup>	2014	China	miR-101	<i>Down</i>	CHC	67	CH	61	Suero	0,96	0,90	0,98
Yu, F. <sup>(276)</sup>	2015	China	miR-150	<i>Down</i>	CHC	120	HBC	110	Suero	0,79	0,77	0,88
Chen, Y. <sup>(277)</sup>	2015	China	miR-96	<i>Up</i>	CHC	104	HBC	100	Suero	0,78	0,75	0,80
Ghosh, A. <sup>(278)</sup>	2016	Indian	miR-126	<i>Up</i>	CHC	49	HBC+CH	38	Plasma	0,63	0,58	0,67
Ghosh, A. <sup>(278)</sup>	2016	Indian	miR-142-3p	<i>Up</i>	CHC	49	HBC+CH	38	Plasma	0,32	0,91	0,55
Xiong, F. <sup>(279)</sup>	2016	China	miR-99a	<i>Down</i>	CHC	32	HBC	30	Suero	0,84	0,57	0,69
Xiong, F. <sup>(279)</sup>	2016	China	miR-125b	<i>Down</i>	CHC	32	HBC	30	Suero	0,91	0,57	0,70
Xiong, F. <sup>(279)</sup>	2016	China	miR-99a	<i>Up</i>	CHC	32	CH	30	Suero	0,97	0,56	0,70
Lin, L. <sup>(280)</sup>	2016	China	miR-224	<i>Up</i>	CHC	122	HBC+CH	135	Suero	0,87	0,71	0,84
Lin, L. <sup>(280)</sup>	2016	China	miR-224	<i>Up</i>	CHC	122	CH	61	Suero	0,87	0,67	0,83
Lin, L. <sup>(280)</sup>	2016	China	miR-224	<i>Up</i>	CHC	122	HBC	74	Suero	0,87	0,75	0,85
Chen, S. <sup>(281)</sup>	2017	China	miR-125b	<i>Down</i>	CHC	64	HBC	63	Plasma	0,94	0,86	0,96
Chen, S. <sup>(281)</sup>	2017	China	miR-125b	<i>Down</i>	CHC	64	CH	59	Plasma	0,89	0,88	0,96
Chen, S. <sup>(281)</sup>	2017	China	miR-125b	<i>Down</i>	CHC	31	HBC+CH	102	Plasma	1,00	0,76	0,94
Zhao, Q. <sup>(282)</sup>	2018	China	miR-143	<i>Down</i>	CHC	85	HBC	50	Suero	0,78	0,86	0,81
Zhao, Q. <sup>(282)</sup>	2018	China	miR-145	<i>Down</i>	CHC	85	HBC	50	Suero	0,88	0,78	0,85
Xu, L.J. <sup>(283)</sup>	2018	China	miR-125b	<i>Up</i>	CHC	100	HBC	100	Suero	0,81	0,87	0,80
Xu, L.J. <sup>(283)</sup>	2018	China	miR-125b	<i>Up</i>	CHC	100	CH	100	Suero	0,78	0,96	0,91
Moradi, N. <sup>(284)</sup>	2019	Iran	miR-214	<i>Down</i>	CHC	23	HBC	25	Plasma	0,85	0,43	0,52
Moradi, N. <sup>(284)</sup>	2019	Iran	miR-6510	<i>Down</i>	CHC	23	HBC	25	Plasma	0,81	0,39	0,53
Moradi, N. <sup>(284)</sup>	2019	Iran	miR-5193	<i>Down</i>	CHC	23	HBC	25	Plasma	0,80	0,82	0,82
Moradi, N. <sup>(284)</sup>	2019	Iran	miR-34a	<i>Down</i>	CHC	23	HBC	25	Plasma	0,40	0,87	0,62
Zhang, W. <sup>(285)</sup>	2020	China	miR-375	<i>Down</i>	CHC	63	HBC	74	Suero	0,94	0,64	0,77
Cao, X. <sup>(286)</sup>	2020	China	miR-487b	<i>Up</i>	CHC	87	HBC	68	Suero	0,76	0,90	0,86
Li, X. <sup>(287)</sup>	2021	China	miR-487b	<i>Up</i>	CHC	116	HBC	66	Suero	0,84	0,67	0,82
<b>MiARN cluster</b>												
Li, L.M. <sup>(288)</sup>	2010	China	miARN cluster	<i>Down</i>	CHC	65	HBC	75	Suero	0,96	0,99	0,99
Zhou, J. <sup>(289)</sup>	2011	China	miARN cluster	<i>Up</i>	CHC	196	HBC	72	Plasma	0,79	0,76	0,84
Zhou, J. <sup>(289)</sup>	2011	China	miARN cluster	<i>Up</i>	CHC	196	CH	56	Plasma	0,75	0,91	0,88
Tan, Y. <sup>(290)</sup>	2014	China	miARN cluster	<i>Up</i>	CHC	103	CH	78	Suero	0,82	0,85	0,89
Zhu, H.T. <sup>(291)</sup>	2017	China	miARN cluster	<i>Up</i>	CHC	121	CH	63	Suero	0,79	0,79	0,86

Nota: \*: Modo de regulación; CHC: carcinoma hepatocelular; HBC: hepatitis B crónica; CH: cirrosis hepática; *Up*: *up*-regulado;

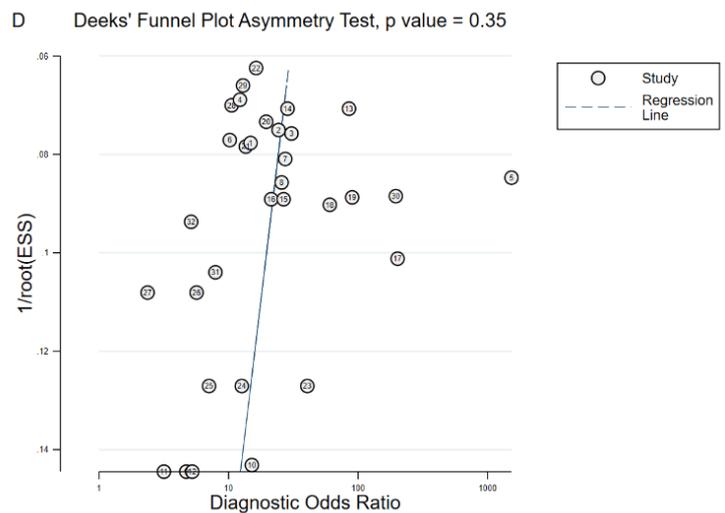
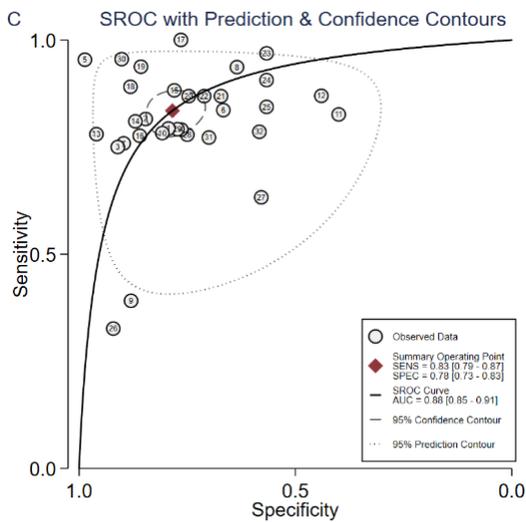
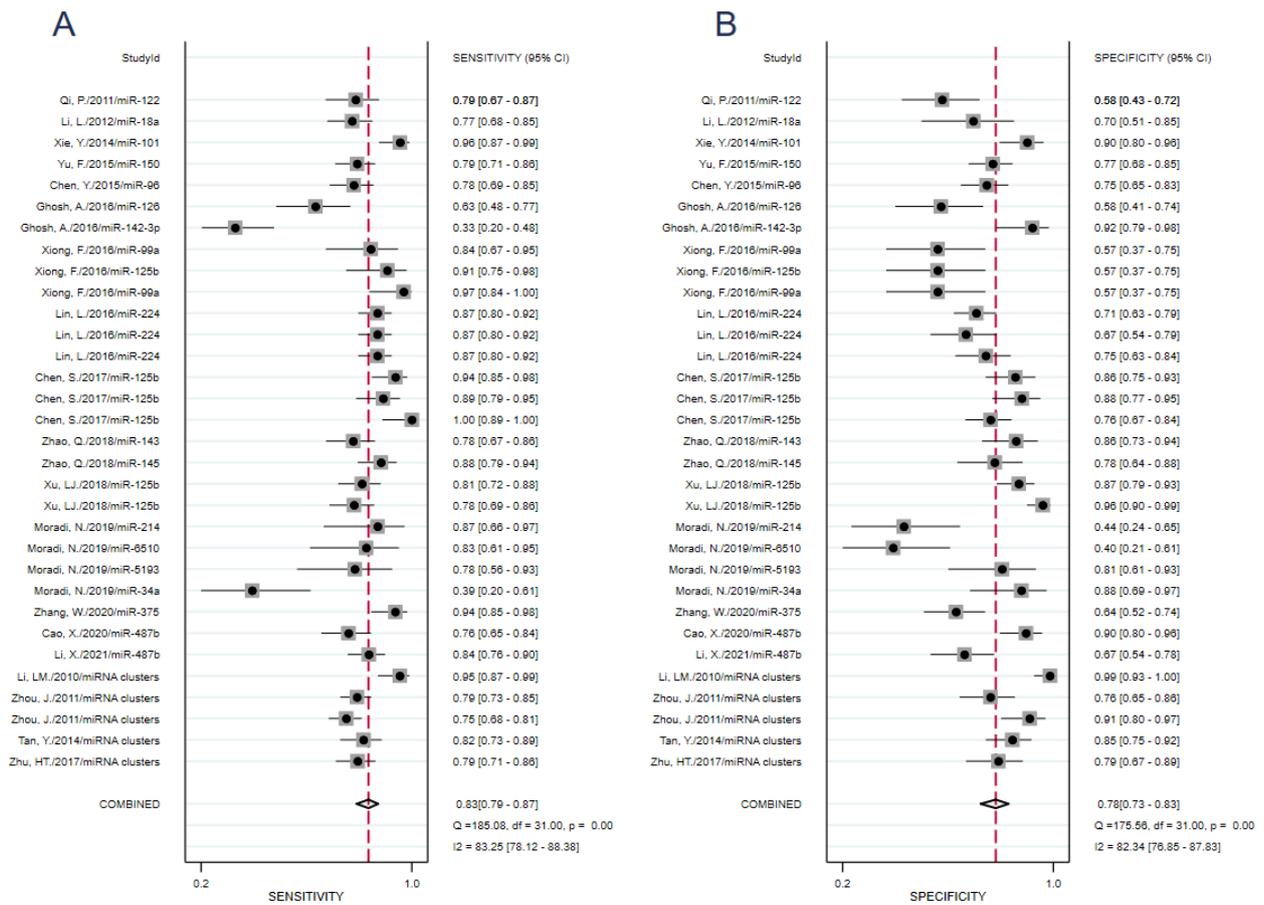
*Down*: *down*-regulado; Se: sensibilidad; Sp: especificidad; AUC: área bajo la curva.

### **1.3. Precisión diagnóstica de los miARNs circulantes en CHC-VHB**

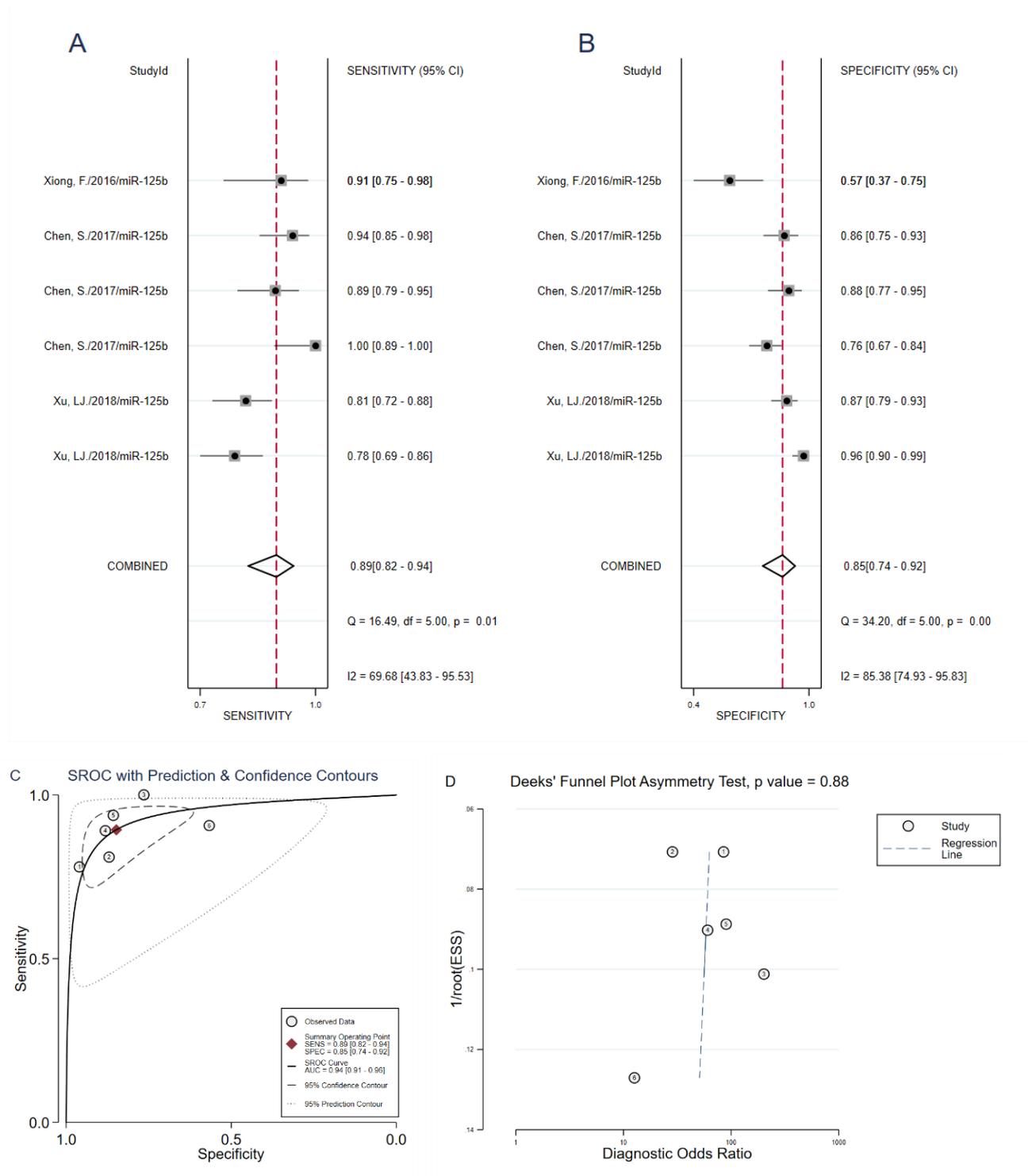
Las sensibilidades y especificidades de los miARNs en 32 estudios, en los que se incluyeron a 2.590 pacientes con CHC-VHB y 1.963 controles (HBC y CH-VHB), se analizaron a través de *Forest plot*. Se presentó una heterogeneidad significativa entre los estudios ( $I^2 = 83,25\%$  para sensibilidad e  $I^2 = 82,34\%$  para especificidad) y, por lo tanto, el modelo de efectos aleatorios se seleccionó en nuestro metaanálisis. Los resultados agrupados se mostraron de la siguiente manera: sensibilidad, 0,83 (IC 95%: 0,79 - 0,87), especificidad, 0,78 (IC 95%: 0,73 - 0,83), PLR, 3,9 (IC 95%: 3,0 - 4,9), NLR, 0,21 (IC 95%: 0,16 - 0,27), DOR, 18 (IC 95%: 12 - 27) y AUC fue 0,88 (IC 95%: 0,85 - 0,91). Los resultados evidenciaron que los miARNs circulantes tenían una excelente precisión diagnóstica para pacientes con CHC-VHB (Figura 15).

### **1.4. Valor diagnóstico de miR-125b en CHC-VHB**

De entre todos, hay 6 estudios dirigidos al miR-125b como marcador de diagnóstico para CHC-VHB, en el que se incluyen a 391 pacientes con CHC-VHB y 454 controles. La sensibilidad combinada fue 0,89 (IC 95%: 0,82 - 0,94), la especificidad fue 0,85 (IC 95%: 0,74 - 0,92), la PLR fue 5,5 (IC 95%: 3,9 - 9,9), la NLR fue 0,13 (IC 95%: 0,08 - 0,21), la DOR fue de 47 (IC 95%: 26 - 83) y el AUC fue de 0,94 (IC 95%: 0,91 - 0,96). Los resultados indicaron que el miR-125b tiene una alta precisión diagnóstica en el diagnóstico de pacientes con CHC-VHB (Figura 16).



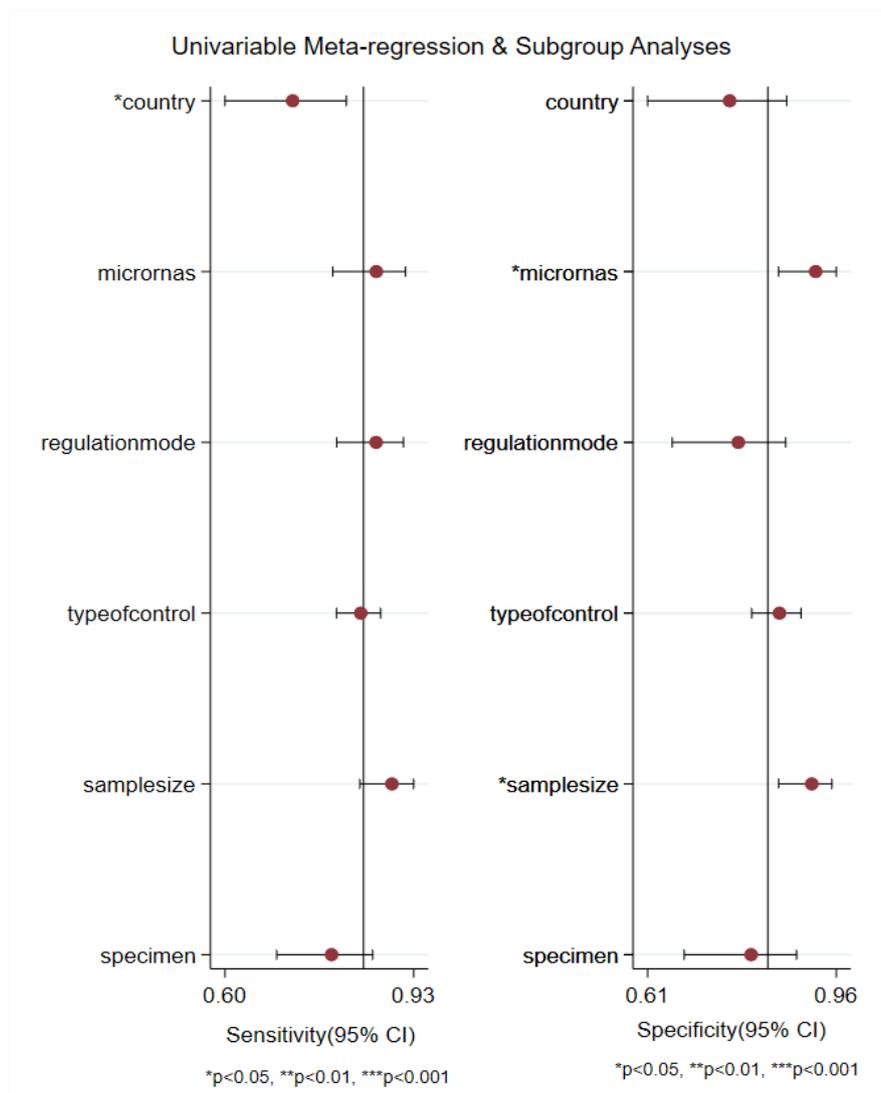
**Figura 15.** Diagrama de bosque de (A) sensibilidad, (B) especificidad, (C) área bajo la curva (AUC) y (D) diagrama de embudo de los miARNs circulantes para diagnosticar pacientes con CHC-VHB.



**Figura 16.** Diagrama de bosque de (A) sensibilidad, (B) especificidad, (C) área bajo la curva (AUC) y (D) diagrama de embudo de miR-125b para diagnosticar pacientes con CHC-VHB.

## 1.5. Análisis de metarregresión

Realizamos un análisis de metarregresión para explorar posibles fuentes de heterogeneidad entre los estudios en términos de sensibilidad y especificidad, según el país de origen, perfil de miARN, modo de regulación, tipo de control, tamaño y tipo de muestra. El análisis de metarregresión mostró que el país puede ser un factor que explique la heterogeneidad de la sensibilidad ( $p < 0,05$ ), y el perfil de miARN y el tamaño de muestra pueden considerarse como fuentes potenciales para heterogeneidad de la especificidad ( $p < 0,05$ ) (Figura 17).



**Figura 17.** Diagramas de bosque de metarregresión multivariable para sensibilidad y especificidad.

## 1.6. Análisis de subgrupos

Los análisis de subgrupos se realizaron con el fin de localizar fuentes probables de heterogeneidad. Se llevaron a cabo según el país, el perfil de miARN, el modo de regulación, tipo de control, tamaño y tipo de muestra. La sensibilidad, especificidad, PLR, NLR, DOR y AUC agrupadas para cada análisis de subgrupos se enumeran en la Tabla 5. Encontramos que los estudios con la población china evidenciaron un mejor valor diagnóstico que otra población: sensibilidad (0,85 vs. 0,64), especificidad (0,80 vs. 0,71), PLR (4,2 vs. 2,2), NLR (0,19 vs. 0,51), DOR (22 vs. 4), y AUC (0,90 vs. 0,72). El ensayo con los *clusters* de miARN exhibió un mejor valor diagnóstico que miARN simples: sensibilidad (0,83 vs. 0,84), especificidad (0,89 vs. 0,76), PLR (7,3 vs. 3,5), NLR (0,20 vs. 0,21), DOR (37 vs. 16), y AUC (0,91 vs. 0,87). Asimismo, la capacidad del miARN para distinguir el CHC-VHB del CH-VHB es mejor que el HBC: sensibilidad (0,85 vs. 0,83), especificidad (0,85 vs. 0,76), PLR (5,6 vs. 3,5), NLR (0,17 vs. 0,22), DOR (31 vs. 16), y AUC (0,91 vs. 0,87). Por otro lado, los estudios con tamaño de muestra superior a 100 mostraron un mejor rendimiento: sensibilidad (0,85 vs. 0,77), especificidad (0,82 vs. 0,66), PLR (4,6 vs. 2,2), NLR (0,19 vs. 0,35), DOR (24 vs. 6) y AUC (0,90 vs. 0,77). Respecto del tipo de muestra, el análisis en suero mostró un valor diagnóstico un poco más alto que en plasma: sensibilidad (0,84 vs. 0,80), especificidad (0,78 vs. 0,78), PLR (3,9 vs. 3,7), NLR (0,20 vs. 0,26), DOR (20 vs. 14) y AUC (0,89 vs. 0,86). Además, los miARNs *down*-regulados mostraron una mejor precisión diagnóstica que los miARNs *up*-regulados: sensibilidad (0,88 vs. 0,79), especificidad (0,78 vs. 0,79), PLR (4,0 vs. 3,8), NLR (0,15 vs. 0,26), DOR (26 vs. 14) y AUC (0,91 vs. 0,86).

## 1.7. El sesgo de publicación

El sesgo de publicación de los estudios incluidos se verificó mediante la prueba de diagrama de embudo de *Deeks*. El resultado de la prueba de *Deeks* agrupada para estudio general fue  $p = 0,35$  (Figura 15D) y el de la prueba de *Deeks* para miR-125b

fue  $p = 0,88$  (Figura 16D), lo que indicó que, en este metaanálisis, no hay sesgo de publicación significativo.

**Tabla 5.** Resumen de estimaciones del poder diagnóstico y sus intervalos de confianza del 95%.

Subgrupos	Se (IC 95%)	Sp (IC 95%)	PLR (IC 95%)	NLR (IC 95%)	DOR (IC 95%)	AUC (IC 95%)
<b>País</b>						
China	0,85 [0,82-0,88]	0,80 [0,74-0,84]	4,2 [3,3-5,3]	0,19 [0,15-0,23]	22 [15-32]	0,90 [0,87-0,92]
Non-China	0,64 [0,45-0,80]	0,71 [0,49-0,86]	2,2 [1,4-3,4]	0,51 [0,36-0,71]	4 [3-7]	0,72 [0,68-0,76]
<b>Perfil de miARN</b>						
MiARN simple	0,84 [0,78-0,88]	0,76 [0,70-0,81]	3,5 [2,8-4,4]	0,21 [0,16-0,28]	16 [11-24]	0,87 [0,84-0,90]
MiARN <i>cluster</i>	0,83 [0,74-0,89]	0,89 [0,75-0,95]	7,3 [3,0-17,7]	0,20 [0,12-0,33]	37 [10-144]	0,91 [0,88-0,93]
<b>Modo de regulación</b>						
<i>Up</i> -regulado	0,79 [0,74-0,84]	0,79 [0,72-0,84]	3,8 [2,9-4,9]	0,26 [0,21-0,33]	14 [10-21]	0,86 [0,83-0,89]
<i>Down</i> -regulado	0,88 [0,82-0,93]	0,78 [0,68-0,86]	4,0 [2,6-6,1]	0,15 [0,09-0,24]	26 [12-57]	0,91 [0,88-0,93]
<b>Tipo de control</b>						
HBC	0,83 [0,79-0,87]	0,76 [0,68-0,83]	3,5 [2,6-4,8]	0,22 [0,17-0,28]	16 [10-26]	0,87 [0,84-0,90]
CH-VHB	0,85 [0,79-0,90]	0,85 [0,75-0,91]	5,6 [3,4-9,1]	0,17 [0,12-0,24]	31 [18-58]	0,91 [0,89-0,94]
HBC+ CH-VHB	0,79 [0,49-0,94]	0,75 [0,64-0,83]	3,1 [2,1-4,7]	0,28 [0,10-0,81]	11 [3-42]	0,80 [0,77-0,84]
<b>Tamaño de la muestra</b>						
<100	0,77 [0,60-0,88]	0,66 [0,52-0,78]	2,2 [1,7-3,0]	0,35 [0,22-0,57]	6 [4-11]	0,77 [0,73-0,80]
≥100	0,85 [0,81-0,87]	0,82 [0,77-0,86]	4,6 [3,6-6,0]	0,19 [0,16-0,23]	24 [16-36]	0,90 [0,87-0,92]
<b>Tipo de la muestra</b>						
Suero	0,84 [0,81-0,87]	0,78 [0,72-0,84]	3,9 [2,9-5,2]	0,20 [0,16-0,24]	20 [13-30]	0,89 [0,85-0,91]
Plasma	0,80 [0,65-0,89]	0,78 [0,67-0,87]	3,7 [2,4-5,7]	0,26 [0,15-0,46]	14 [6-32]	0,86 [0,82-0,88]

Nota: HBC: hepatitis B crónica; CH-VHB: cirrosis hepática relacionado con el VHB; Se: sensibilidad; Sp: especificidad; PLR: razón de verosimilitud positiva; NLR: razón de verosimilitud negativa; AUC: área bajo la curva; IC: intervalo de confianza.

## 2. CORRELACIÓN ENTRE ADNCCC Y MARCADORES VIROLÓGICOS EN PACIENTES CON HBC-ZG

### 2.1. Características de la población

La población de estudio estaba formada por 13 individuos de HBC-ZG, los cuales tenían una edad media de 46,6 años. Los hombres representaban el 38,5% y las mujeres el 61,5%. Las características biológicas e histológicas de dichos sujetos se especifican en la Tabla 6.

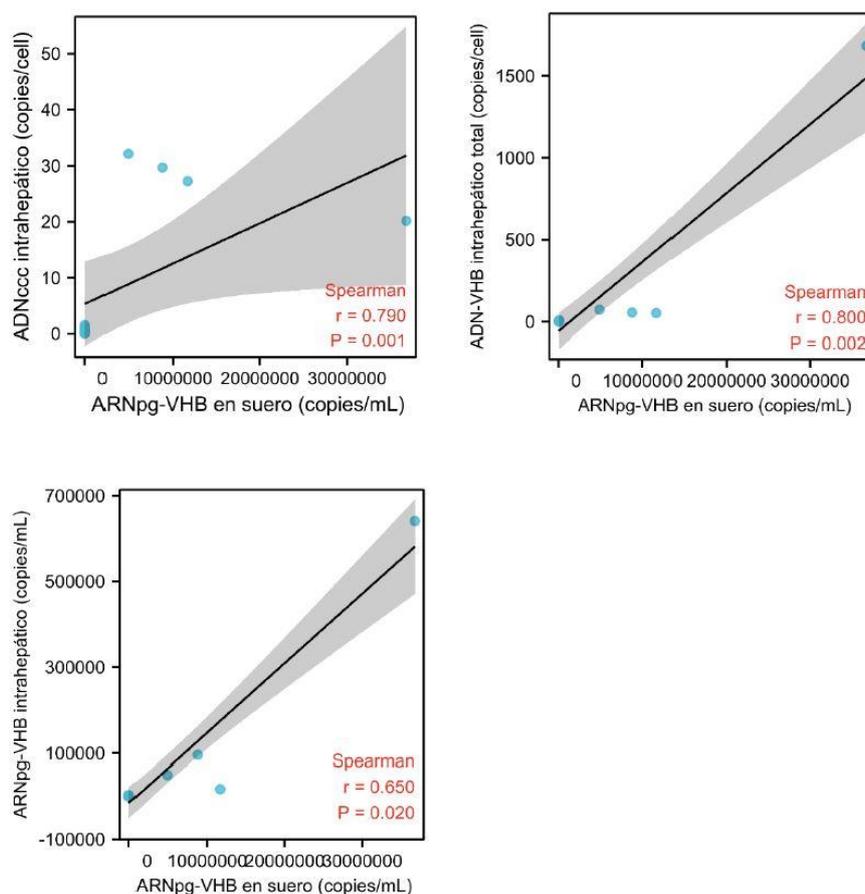
**Tabla 6.** Características biológicas e histológicas (n=13). Los valores se expresan mediante media  $\pm$  desviación estándar o porcentaje.

<b>Características biológicas (n = 13)</b>			
AST (U/L)	36,9 $\pm$ 28,7	ALT (U/L)	44,5 $\pm$ 43,4
GTT (U/L)	20,9 $\pm$ 12,5	Fosfatasa alcalina (U/L)	60,9 $\pm$ 24,2
Proteína total (g/dL)	7,1 $\pm$ 0,5	Bilirrubina total (mg/dL)	0,6 $\pm$ 0,2
Colinesterasa	8862 $\pm$ 3342	Lactato deshidrogenasa (U/L)	258,5 $\pm$ 273,7
Creatinina (U/L)	0,8 $\pm$ 0,2	Colesterol (mg/dL)	193,4 $\pm$ 28,4
Triglicéridos (mg/dL)	89,2 $\pm$ 44,2	HDL (mg/dL)	62,3 $\pm$ 15,6
LDL (mg/dL)	110,4 $\pm$ 25,2	Índice de Forns	3,9 $\pm$ 1,4
Índice de APRI	0,5 $\pm$ 0,5	Índice de FIB-4	1,3 $\pm$ 1,0
Glucemia (mg/dL)	115,2 $\pm$ 103,8	HOMA	1,3 $\pm$ 0,7
Hemoglobina (g/dL)	13,7 $\pm$ 1,5	Plaquetas (K/uL)	205,8 $\pm$ 64,5
INR	1,04 $\pm$ 0,03	Tiempo de protrombina (seg)	13,4 $\pm$ 0,4
Tiempo de cefalina (seg)	33,7 $\pm$ 4,9	Actividad de protrombina (%)	92,9 $\pm$ 5,4
<b>Características histológicas (n = 13)</b>			
Nivel de infiltración portal	Nivel de infiltración lobulillar		Nivel de fibrosis
Nivel 0 - 1 (n=4) 30,8%	Nivel 0 - 1 (n=5) 38,5%	Nivel 0 - 1 (n=5) 53,9%	
Nivel 2 - 4 (n=9) 69,2%	Nivel 2 - 4 (n=8) 61,5%	Nivel 2 - 4 (n=8) 46,1%	

## 2.2. Correlación entre ADNccc y marcadores virológicos

### 2.2.1. Correlación entre los niveles séricos de ARNpg-VHB y los indicadores de replicación intrahepática

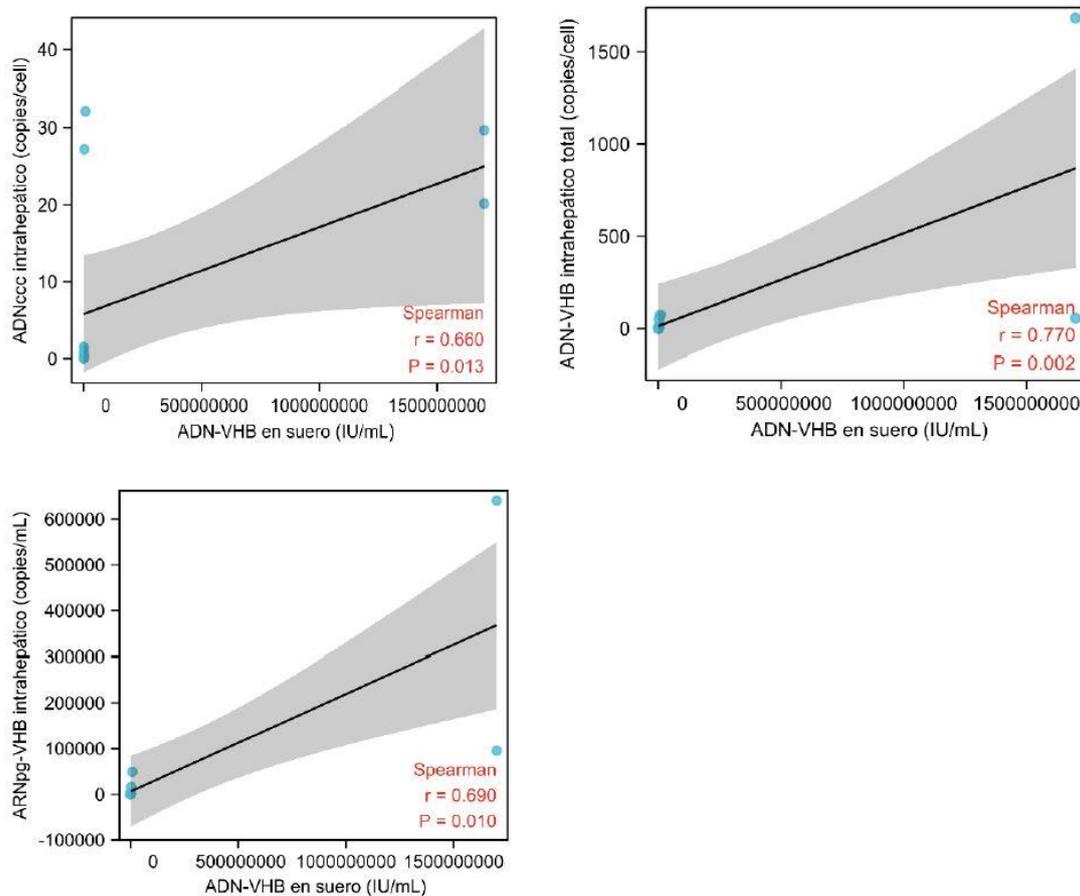
En pacientes con HBC-ZG presenciaron correlaciones positivas significativas entre los niveles séricos de ARNpg-VHB con ADNccc intrahepático, ADN-VHB intrahepático total y ARNpg-VHB intrahepático ( $r = 0,790$ ,  $p = 0,001$ ,  $r = 0,800$ ,  $p = 0,002$ , y  $r = 0,650$ ,  $p = 0,020$ , respectivamente) (Figura 18).



**Figura 18.** La correlación entre los niveles séricos de ARNpg-VHB y los indicadores de replicación intrahepática. (A): La correlación entre los niveles séricos de ARNpg-VHB y ADNccc intrahepático; (B): La correlación entre los niveles séricos de ARNpg-VHB y ADN-VHB intrahepático total; (C): La correlación entre los niveles séricos de ARNpg-VHB y ARNpg-VHB intrahepático.

## 2.2.2. Correlación entre los niveles séricos de ADN-VHB y los indicadores de replicación intrahepática

En HBC-ZG hubo correlaciones positivas significativas entre los niveles séricos de ADN-VHB con ADNccc intrahepático, ADN-VHB intrahepático total y ARNpg-VHB intrahepático ( $r = 0,660$ ,  $p = 0,013$ ,  $r = 0,770$ ,  $p = 0,002$  y  $r = 0,690$ ,  $p = 0,010$ , respectivamente) (Figura 19).



**Figura 19.** La correlación entre los niveles séricos de ADN-VHB y los indicadores de replicación intrahepática. (A): La correlación entre los niveles séricos de ADN-VHB y ADNccc intrahepático; (B): La correlación entre los niveles séricos de ADN-VHB y ADN-VHB intrahepático total; (C): La correlación entre los niveles séricos de ADN-VHB y ARNpg-VHB intrahepático.

### **2.2.3. Correlación entre los niveles séricos de qHBsAg y los indicadores de replicación intrahepática**

En HBC-ZG se vieron correlaciones positivas significativas entre los niveles séricos de qHBsAg y ADNccc intrahepático ( $r = 0,730$ ,  $p = 0,004$ ). Pero, no hubo correlaciones entre los niveles séricos de qHBsAg con ADN-VHB intrahepático total y ARNpg-VHB intrahepático ( $r = 0,410$ ,  $p = 0,163$  y  $r = 0,390$ ,  $p = 0,189$ , respectivamente).

### **2.2.4. Correlación entre los niveles séricos de AST, ALT y los indicadores de replicación intrahepática**

En HBC-ZG no se vieron correlaciones entre los niveles séricos de AST con ADNccc intrahepático, ADN-VHB intrahepático total y ARNpg-VHB intrahepático ( $r = 0,470$ ,  $p = 0,103$ ,  $r = 0,390$ ,  $p = 0,190$  y  $r = 0,340$ ,  $p = 0,254$ , respectivamente). Además, tampoco se detectaron correlaciones entre los niveles séricos de ALT con ADNccc intrahepático, ADN-VHB intrahepático total y ARNpg-VHB intrahepático ( $r = 0,420$ ,  $p = 0,150$ ,  $r = 0,470$ ,  $p = 0,120$  y  $r = 0,240$ ,  $p = 0,132$ , respectivamente).

### **2.2.5. Correlación entre ADNccc y los hallazgos histopatológicos**

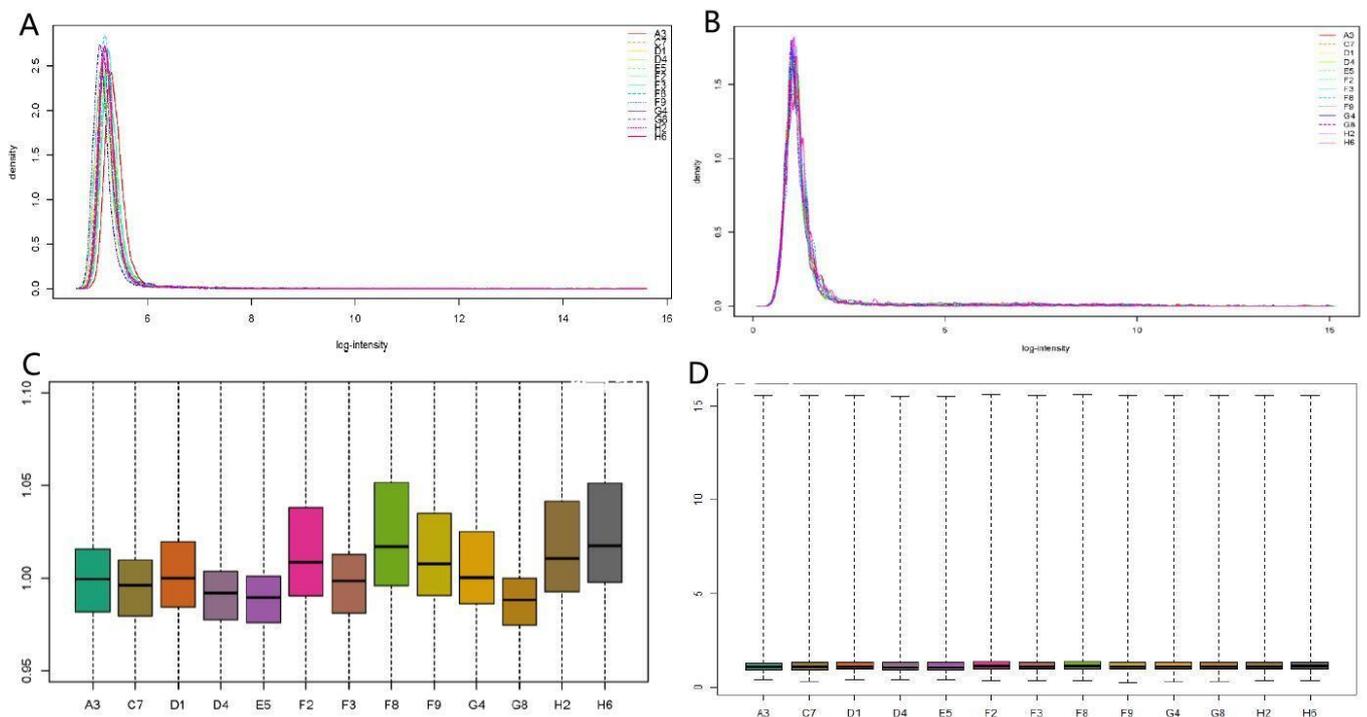
En HBC-ZG no hubo correlaciones entre los niveles de ADNccc intrahepático con el grado de inflamación portal, el grado de inflamación lobulillar y el grado de fibrosis ( $r = 0,400$ ,  $p = 0,174$ ,  $r = 0,300$ ,  $p = 0,326$  y  $r = 0,000$ ,  $p = 1,000$ , respectivamente).

### 3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO: MICROARNS EN HBC-ZG

#### 3.1. Preprocesamiento de los datos

##### 3.1.1. Preprocesamiento de miARNs en muestras de tejido hepático

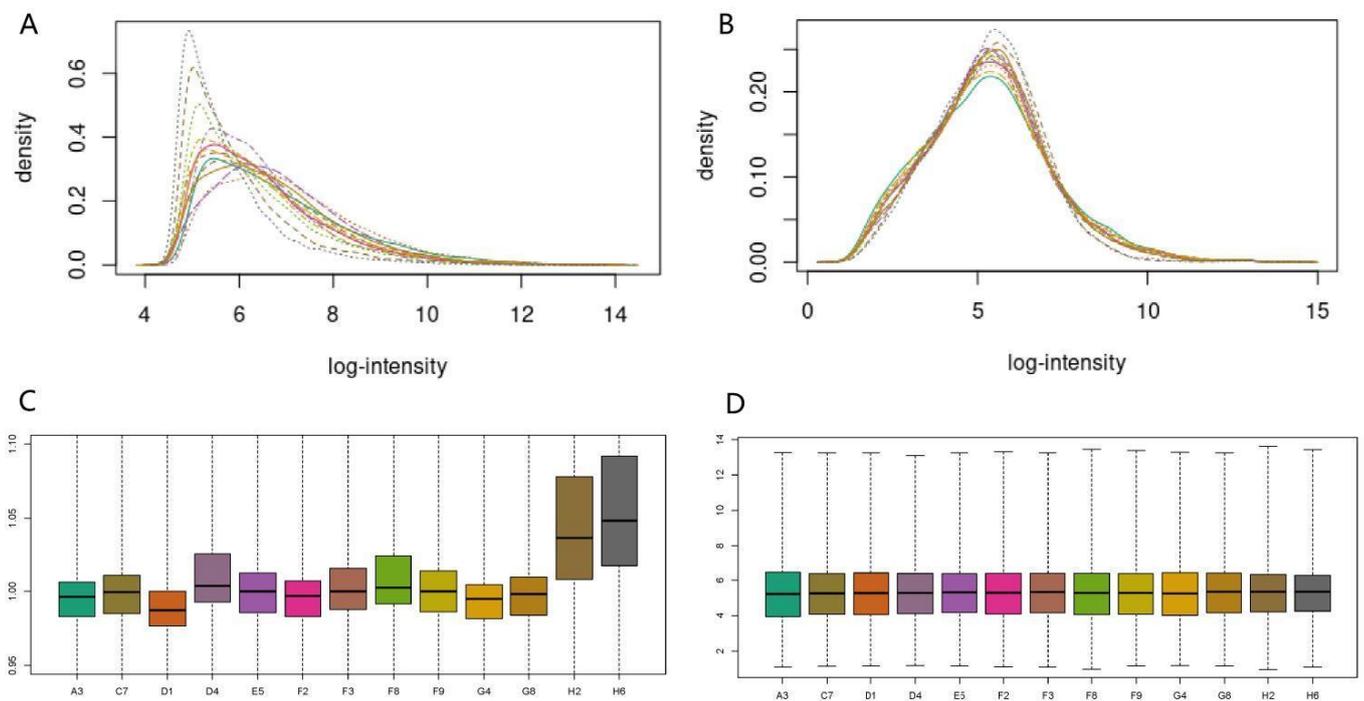
En total, hemos manejado 13 muestras de tejido hepático, que hemos utilizado para hacer los microarrays. Así pues, mediante la realización del control de calidad previo al procesamiento comprobamos no partimos de unos datos de mala calidad. Seguidamente, normalizamos los datos con el objetivo de comparar la intensidad entre diferentes sondas del microarray, así como entre todos los microarrays. Las diferencias observadas en la distribución de la señal de intensidades de las sondas se corrigieron después del proceso de normalización (Figura 20).



**Figura 20.** (A) Distribución de los datos preprocesados de miARNs en tejido hepático; (B) Distribución de los datos normalizados de miARNs en tejido hepático; (C) Diagrama de caja de los datos preprocesados de miARNs en tejido hepático; (D) Diagrama de caja de los datos normalizados de miARNs en tejido hepático.

### 3.1.2. Preprocesamiento de ARNm en muestras de tejido hepático

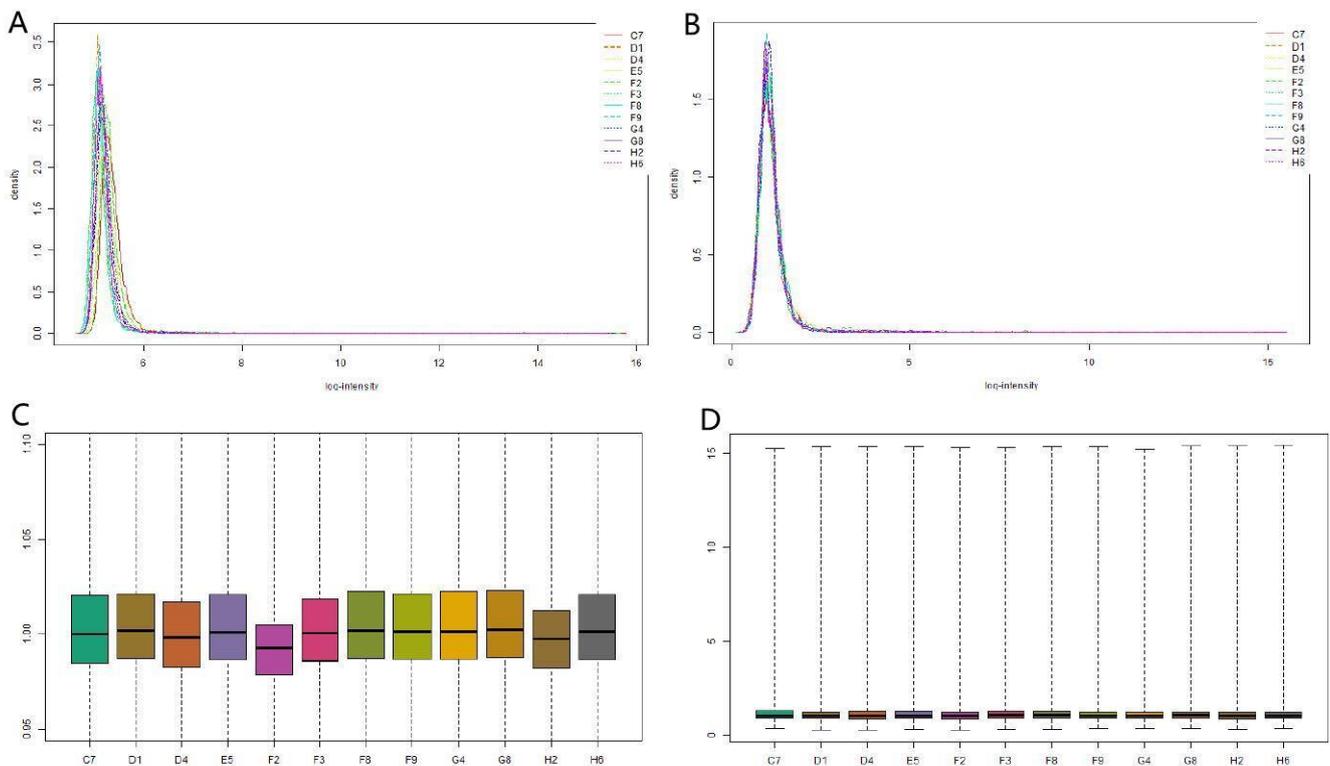
Como hemos adelantado arriba, manejamos un total de 13 muestras de tejido hepático para hacer los microarrays. Igual que en el caso anterior, gracias a la realización del control de calidad previo al procesamiento, comprobamos que no partíamos de unos datos de mala calidad. Así pues, se corrigieron posteriormente las diferencias observadas en la distribución de la señal de intensidades de las sondas, mediante la normalización de los datos (Figura 21).



**Figura 21.** (A) Distribución de los datos preprocesados de ARNm en tejido hepático; (B) Distribución de los datos normalizados de ARNm en tejido hepático; (C) Diagrama de caja de los datos preprocesados de ARNm en tejido hepático; (D) Diagrama de caja de los datos normalizados de ARNm en tejido hepático.

### 3.1.3. Preprocesamiento de miARNs en muestras de plasma

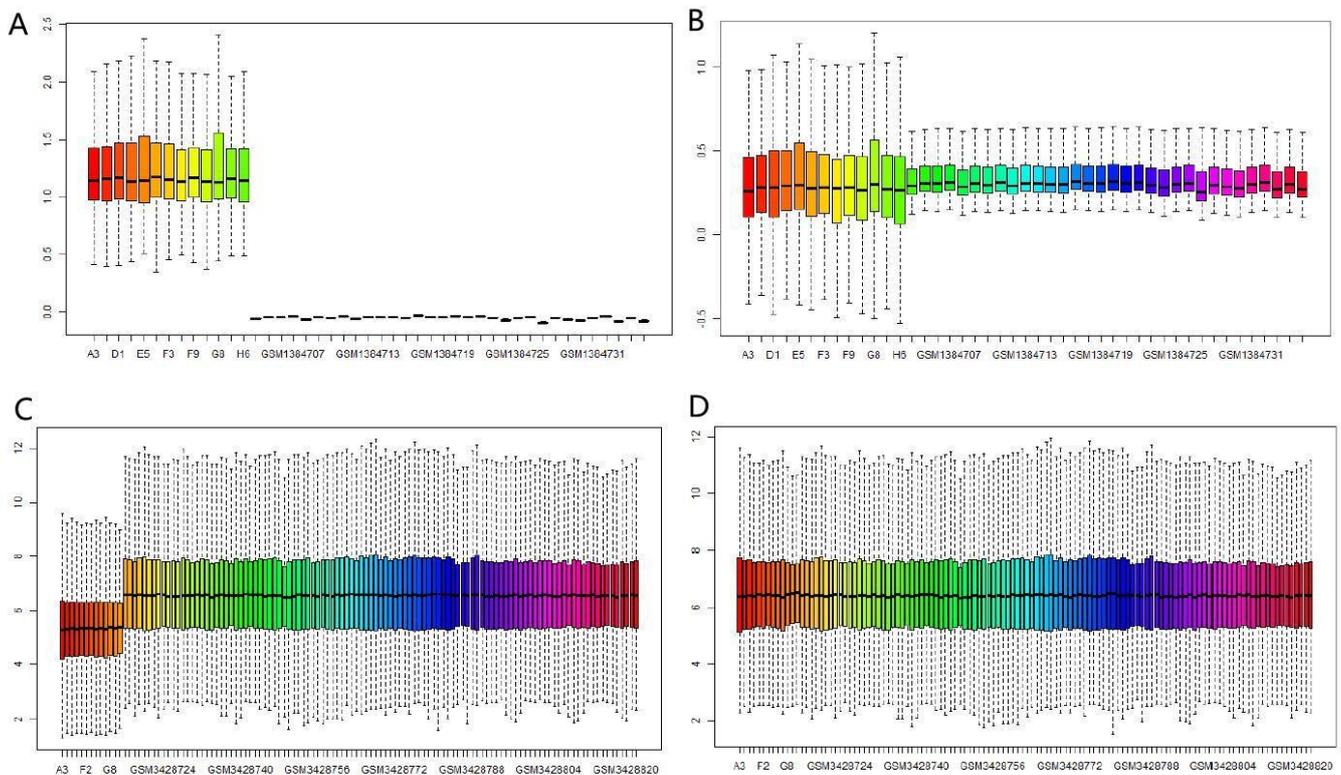
A causa de la pérdida de una muestra de plasma, logramos tener un total de 12 plasmas para realizar los microarrays. De este modo, a través de la realización del control de calidad previo al procesamiento, pudimos observar que los datos eran de buena calidad. A continuación, mediante la normalización de los datos, comparamos la intensidad existente entre diferentes sondas del microarray, así como entre todos los microarrays. Las diferencias observadas en la distribución de la señal de intensidades de las sondas se corrigieron tras el proceso de la normalización (Figura 22).



**Figura 22.** (A) Distribución de los datos preprocesados de miARNs en plasma; (B) Distribución de los datos normalizados de miARNs en plasma; (C) Diagrama de caja de los datos preprocesados de miARNs en plasma; (D) Diagrama de caja de los datos normalizados de miARNs en plasma.

### 3.1.4. Procesamiento de datos combinados del HBC-ZG e individuos sanos en tejido hepático

En primer lugar, combinamos los miARNs del HBC-ZG e individuos sanos en tejido hepático, en donde pudimos observar diferencias significativas en las dos plataformas (Figura 23A). Después de la normalización y de eliminar el efecto de lote, se corrigieron las diferencias observadas antes de la normalización (Figura 23B). En segundo lugar, combinamos los datos de ARNm. Como se muestra en las Figura 23C y 23D, los ARNm son significativamente diferentes en las dos plataformas antes de la normalización y las diferencias observadas se corrigieron después de normalización.



**Figura 23.** (A) Diagrama de caja de miARNs preprocesados entre HBC-ZG e individuos sanos en tejido hepático; (B) Diagrama de caja de miARNs normalizados entre HBC-ZG e individuos sanos en tejido hepático; (C) Diagrama de caja de ARNm preprocesados entre HBC-ZG e individuos sanos en tejido hepático; (D) Diagrama de caja de ARNm normalizados entre HBC-ZG e individuos sanos en tejido hepático.

## 3.2. Expresión diferencial

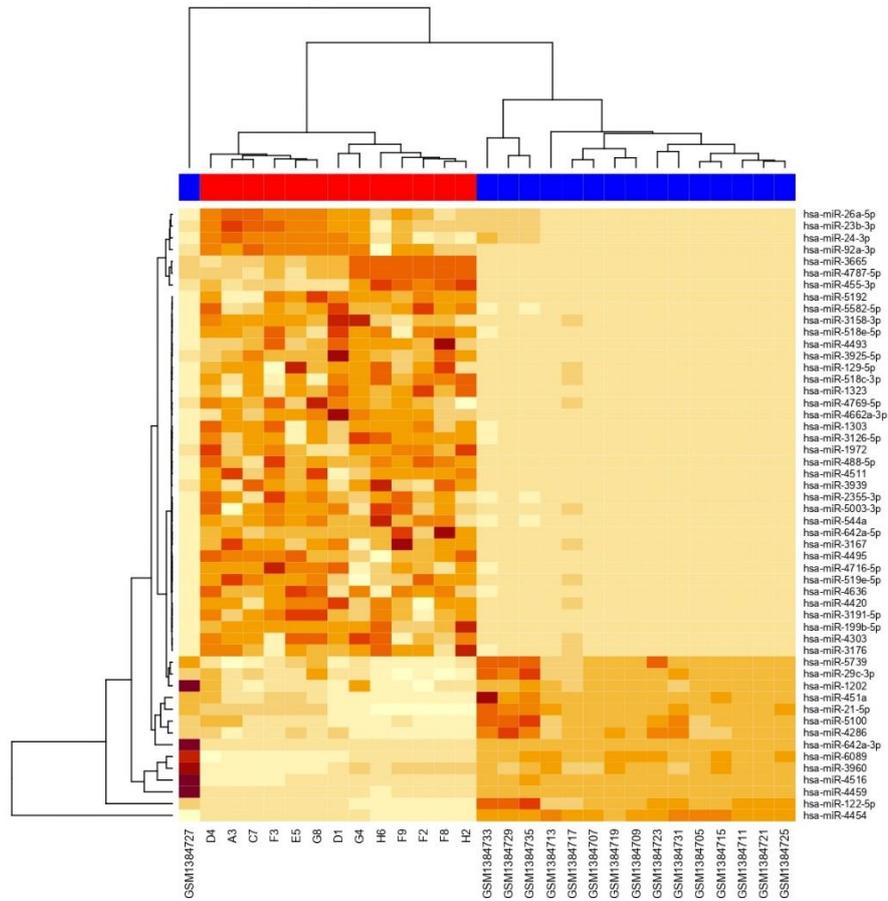
### 3.2.1. ED de miARNs en muestra de tejido hepático

#### 3.2.1.1. ED de miARNs entre HBC-ZG e individuos sanos

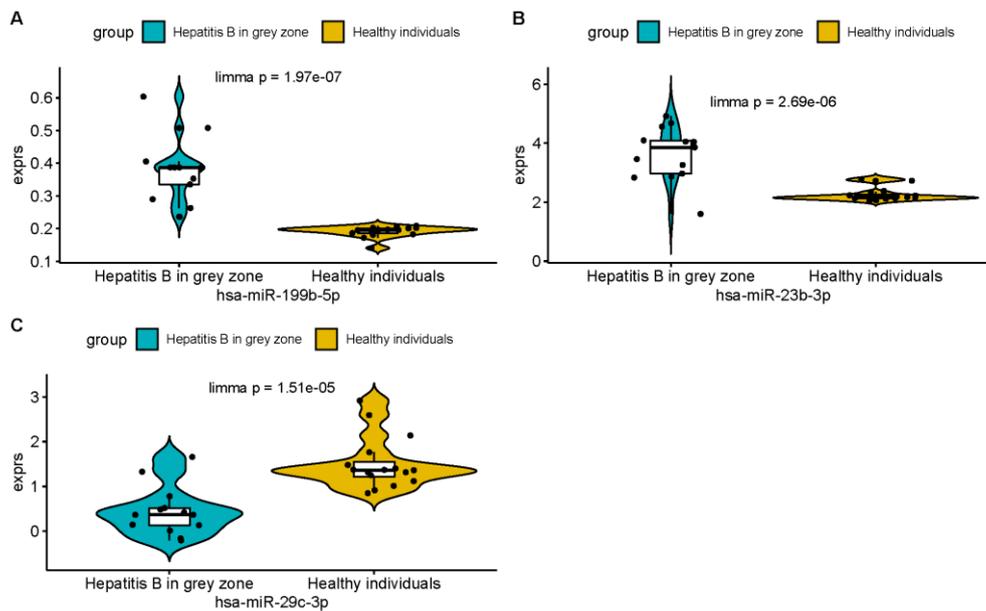
Del análisis de ED de miARNs en tejido hepático entre HBC-ZG e individuos sanos, se lograron 52 miARNs con ED ( $p. \text{ adjust} < 0,01$ ). Debido a que la plataforma de las muestras es distinta, el nivel de expresión alcanzado en las muestras de individuos sanos es representado por los datos después del proceso de normalización y procesar el efecto de lote, y en donde no representa el nivel real de expresión del chip. Por ello, no limitamos el valor de *Fold Change* (FC), debido a que el valor de FC depende de la expresión absoluta del chip. La lista de los ED de los miARNs obtenidos se detalla en la Tabla 7, en donde se puede observar la presencia de 38 miARNs *up*-regulados y 14 miARNs que están *down*-regulados. Entre ellos, la expresión de miR-199b-5p, miR-23b-3p están *up*-regulados, y miR-29c-3p está *down*-regulado. El mapa de calor correspondiente se muestra en la Figura 24. Los niveles de expresión de miR-199b-5p, miR-23b-3p y miR-29c-3p entre HBC-ZG e individuos sanos se muestran en la Figura 25.

**Tabla 7.** ED de miARNs en tejido hepático entre pacientes con hepatitis B en zona gris e individuos sanos.

<b>MiARN</b>	<b>p</b>	<b>p. adjust</b>	<b>MiARN</b>	<b>p</b>	<b>p. adjust</b>
hsa-miR-4454	1,41E-10	2,70E-07	hsa-miR-4716-5p	1,18E-05	0,000833978
hsa-miR-6089	1,29E-08	1,23E-05	hsa-miR-2355-3p	1,25E-05	0,000834573
hsa-miR-122-5p	1,94E-08	1,24E-05	hsa-miR-5192	1,27E-05	0,000834573
hsa-miR-26a-5p	9,06E-08	4,33E-05	hsa-miR-518e-5p	1,31E-05	0,000834573
hsa-miR-1303	1,49E-07	5,66E-05	hsa-miR-29c-3p	1,51E-05	0,000930724
hsa-miR-199b-5p	1,97E-07	5,66E-05	hsa-miR-4511	1,58E-05	0,00094309
hsa-miR-488-5p	2,09E-07	5,66E-05	hsa-miR-642a-5p	1,85E-05	0,001072043
hsa-miR-4286	2,64E-07	5,66E-05	hsa-miR-1323	2,68E-05	0,001507782
hsa-miR-21-5p	2,92E-07	5,66E-05	hsa-miR-3191-5p	3,44E-05	0,001881446
hsa-miR-92a-3p	2,96E-07	5,66E-05	hsa-miR-3158-3p	6,06E-05	0,00321939
hsa-miR-3665	5,51E-07	9,58E-05	hsa-miR-4662a-3p	6,24E-05	0,003226715
hsa-miR-544a	8,29E-07	0,000132298	hsa-miR-3167	6,94E-05	0,003494243
hsa-miR-5582-5p	9,39E-07	0,000138304	hsa-miR-3939	7,48E-05	0,003646027
hsa-miR-5739	1,04E-06	0,000141766	hsa-miR-4303	7,62E-05	0,003646027
hsa-miR-3126-5p	1,73E-06	0,000220713	hsa-miR-3176	8,42E-05	0,00393078
hsa-miR-4787-5p	2,38E-06	0,000285188	hsa-miR-4493	9,67E-05	0,004408026
hsa-miR-23b-3p	2,69E-06	0,000303022	hsa-miR-4420	0,0001142	0,005081212
hsa-miR-451a	3,64E-06	0,00038674	hsa-miR-518c-3p	0,000134165	0,005836194
hsa-miR-5100	4,68E-06	0,000471628	hsa-miR-519e-5p	0,000138994	0,005861753
hsa-miR-4459	7,89E-06	0,000755105	hsa-miR-1972	0,000143725	0,005861753
hsa-miR-4495	9,18E-06	0,000833978	hsa-miR-4769-5p	0,000146019	0,005861753
hsa-miR-642a-3p	9,64E-06	0,000833978	hsa-miR-5003-3p	0,000147025	0,005861753
hsa-miR-4636	1,01E-05	0,000833978	hsa-miR-24-3p	0,000150066	0,005861753
hsa-miR-4516	1,08E-05	0,000833978	hsa-miR-1202	0,000210864	0,008071857
hsa-miR-3960	1,12E-05	0,000833978	hsa-miR-129-5p	0,000219163	0,008225066
hsa-miR-3925-5p	1,16E-05	0,000833978	hsa-miR-455-3p	0,000245276	0,00902806



**Figura 24.** Mapa de calor de los ED de miARNs entre HBC-ZG e individuos sanos en muestra de tejido hepático.



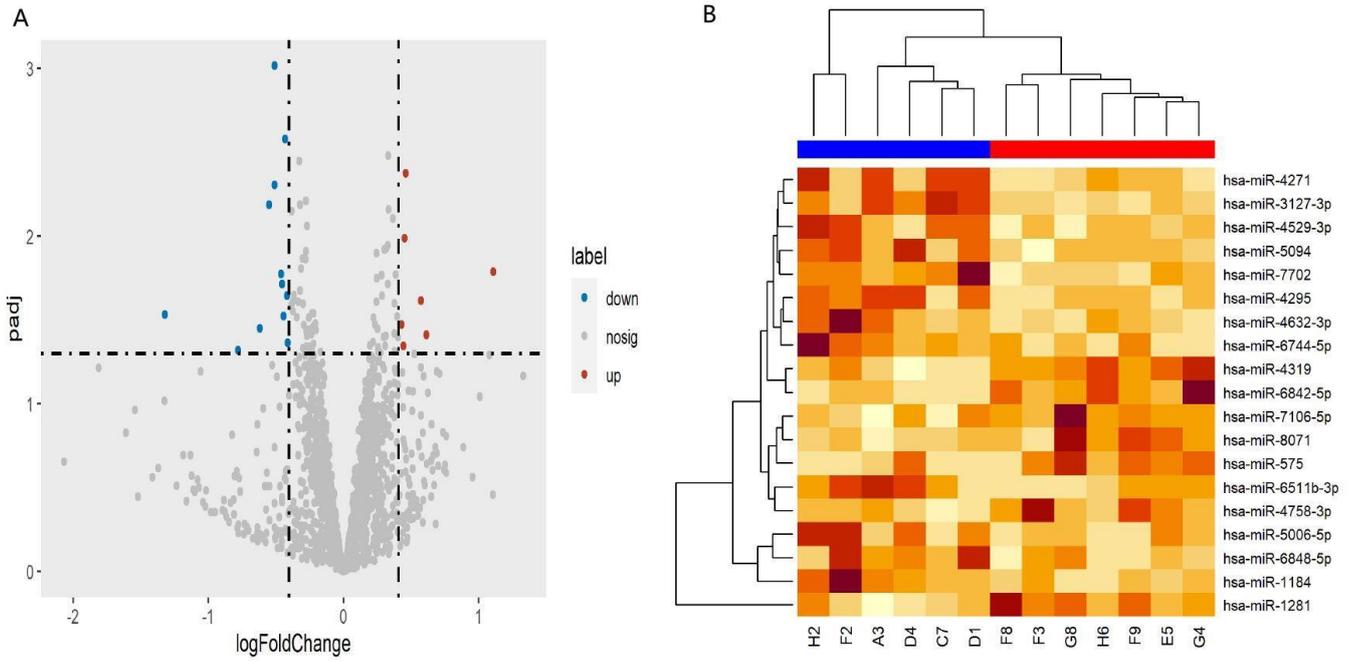
**Figura 25.** Los niveles de expresión de (A) miR-199b-5p, (B) miR-23b-3p y (C) miR-29c-3p entre HBC-ZG e individuos sanos.

### 3.2.1.2. ED de miARNs en función del nivel del ADNccc

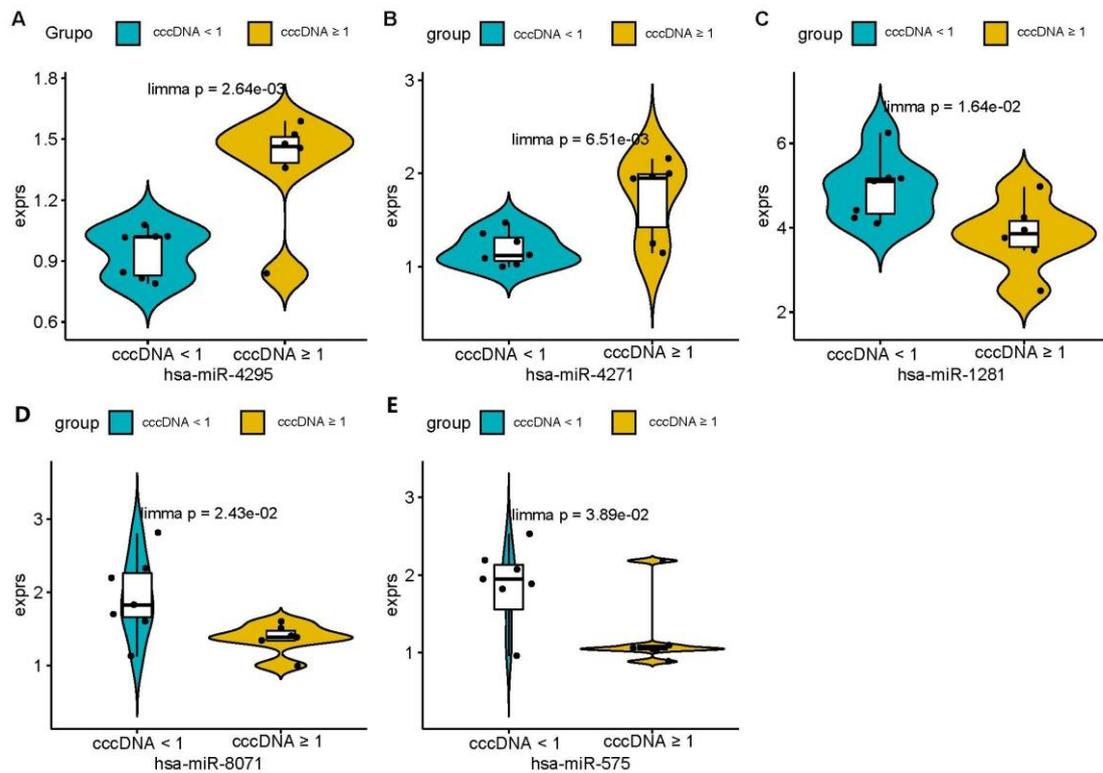
Del estudio de ED de miARNs en función del nivel de ADNccc se lograron 19 ED de miARNs ( $p < 0,05$  y  $|\logFC| > \log 1,5$ ), entre los cuales hay 7 miARNs que están *up*-regulados y 12 miARNs que están *down*-regulados. Entre ellos, la expresión de miR-4295 y miR-4271 están *down*-regulados, miR-1281, miR-8071 y miR-575 están *up*-regulados. La lista de los ED de miARNs obtenidos se detalla en la Tabla 8. El gráfico de volcán y el mapa de calor correspondientes se muestran en la Figura 26. Los niveles de expresión de miR-4295, miR-4271, miR-1281, miR-8071 y miR-575 según el nivel de ADNccc se muestran en la Figura 27.

**Tabla 8.** ED de miARNs en tejido hepático según el nivel del ADNccc.

MiARN	logFC	p	MiARN	logFC	p
hsa-miR-3127-3p	-0,5109266	0,0009641625	hsa-miR-8071	0,5721555	0,0243396751
hsa-miR-4295	-0,4325373	0,0026442244	hsa-miR-1184	-1,3228400	0,0294136390
hsa-miR-4319	0,4584928	0,0042367844	hsa-miR-6744-5p	-0,4429873	0,0300972514
hsa-miR-7702	-0,5109432	0,0049672135	hsa-miR-4758-3p	0,4267034	0,0337243156
hsa-miR-4271	-0,5531198	0,0065058301	hsa-miR-6848-5p	-0,6189110	0,0356082829
hsa-miR-6842-5p	0,4515115	0,0102891657	hsa-miR-575	0,6128658	0,0389215042
hsa-miR-1281	1,1073487	0,0163867099	hsa-miR-6511b-3p	-0,4150877	0,0432125178
hsa-miR-5094	-0,4614936	0,0169013305	hsa-miR-7106-5p	0,4435691	0,0453312829
hsa-miR-4529-3p	-0,4533420	0,0193707378	hsa-miR-5006-5p	-0,7812021	0,0478816617
hsa-miR-4632-3p	-0,4205945	0,0227768875			



**Figura 26.** (A) El gráfico de volcán de ED de miARNs en tejido hepático según el nivel del ADNccc; (B) Mapa de calor de ED de miARNs en tejido hepático según el nivel del ADNccc.



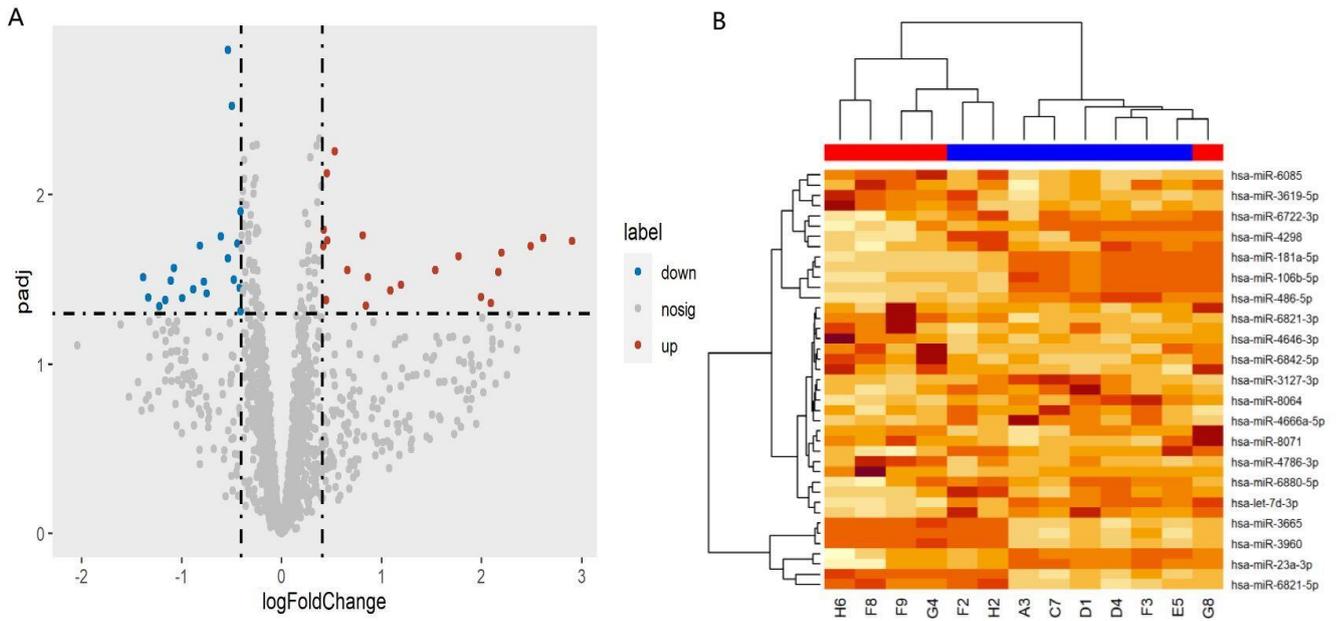
**Figura 27.** Los niveles de expresión de (A) miR-4295, (B) miR-4271, (C) miR-1281, (D) miR-8071 y (E) miR-575 en tejido hepático según el nivel del ADNccc.

### 3.2.1.3. ED de miARNs en función de qHBsAg

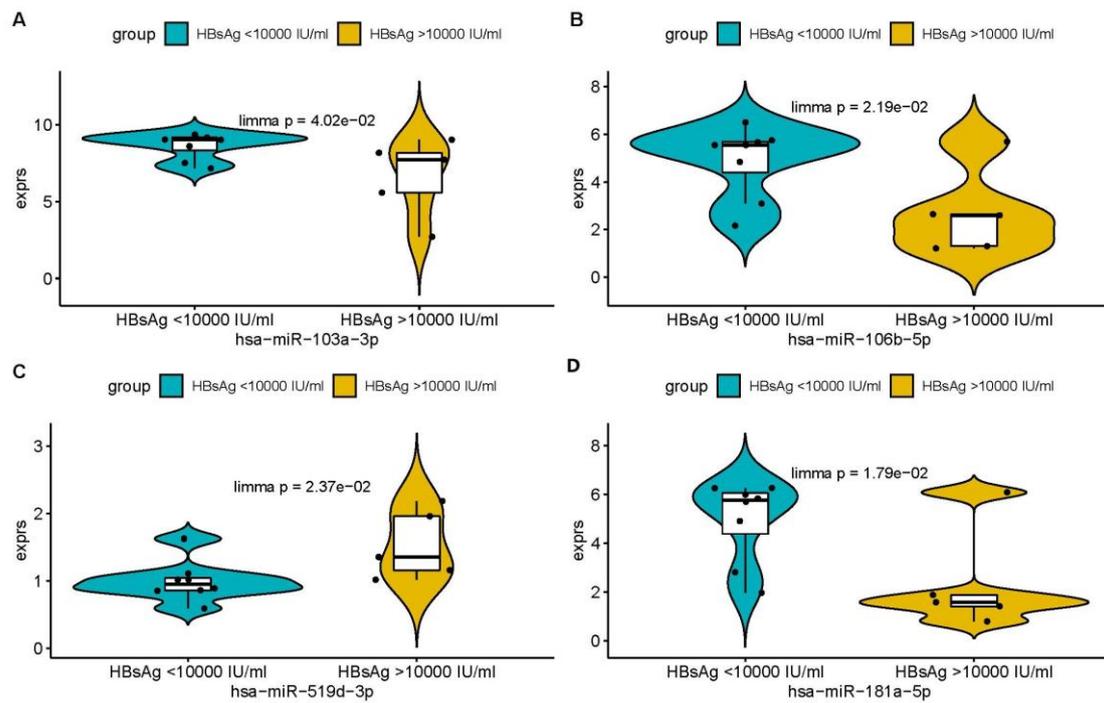
Del estudio de ED de miARNs en función de qHBsAg se obtuvieron 41 ED de miARNs ( $p < 0,05$  y  $|\logFC| > \log1,5$ ), entre los cuales hay 21 miARNs que están *up*-regulados y 20 miARNs que están *down*-regulados. Entre ellos, la expresión de miR-103a-3p, miR-106b-5p y miR-181a-5p están *up*-regulados, y miR-519d-3p está *down*-regulado. La lista de los ED de los miARNs logrados se detalla en la Tabla 9. El gráfico de volcán y el mapa de calor correspondientes se muestran en la Figura 28. Los niveles de expresión de miR-103a-3p, miR-106b-5p, miR-519d-3p y miR-181a-5p según grupo de qHBsAg se exponen en la Figura 29.

**Tabla 9.** ED de miARNs en tejido hepático según qHBsAg.

MiARN	logFC	p	MiARN	logFC	p
hsa-miR-6842-5p	-0,5398865	0,001396738	hsa-miR-27a-3p	2,168103	0,028542
hsa-miR-6769a-5p	-0,4982181	0,003004884	hsa-miR-2861	-1,38493	0,030599
hsa-miR-8064	0,5312516	0,005554571	hsa-miR-5006-5p	0,86095	0,030608
hsa-miR-3127-3p	0,4530150	0,007477369	hsa-miR-7106-5p	-0,4818	0,031658
hsa-miR-1293	-0,4083503	0,012582888	hsa-miR-4787-5p	-1,10828	0,03227
hsa-miR-6763-3p	0,4201551	0,016130117	hsa-miR-4786-3p	-0,77856	0,032631
hsa-let-7d-3p	0,8091149	0,017419709	hsa-miR-6722-3p	1,193015	0,0341
hsa-miR-8071	-0,6105844	0,017670384	hsa-miR-4646-3p	-0,42161	0,035427
hsa-miR-181a-5p	2,6148544	0,017936194	hsa-miR-3960	-0,88678	0,036304
hsa-miR-7702	0,4572419	0,018693778	hsa-miR-4484	1,085138	0,036689
hsa-miR-486-5p	2,9021953	0,018721815	hsa-miR-4539	-0,75045	0,038228
hsa-miR-6821-3p	-0,4439273	0,019383751	hsa-miR-103a-3p	1,99484	0,040244
hsa-miR-6085	-0,8204965	0,020027216	hsa-miR-3619-5p	-1,33278	0,040438
hsa-miR-23a-3p	2,4915566	0,020120311	hsa-miR-1281	-0,99459	0,040747
hsa-miR-4666a-5p	0,4154665	0,020123721	hsa-miR-766-3p	0,443452	0,04191
hsa-miR-106b-5p	2,1996878	0,021930807	hsa-miR-6821-5p	-1,16403	0,042003
hsa-miR-4298	1,7678689	0,023073942	hsa-miR-28-3p	2,090953	0,043689
hsa-miR-519d-3p	-0,5395939	0,023709461	hsa-miR-6880-5p	0,840792	0,045181
hsa-miR-3665	-1,0786392	0,027077714	hsa-miR-1233-5p	-1,22357	0,045368
hsa-miR-3135b	1,5327053	0,027773556	hsa-miR-943	-0,41131	0,048825
hsa-miR-6848-5p	0,657703	0,027822			



**Figura 28.** (A) El gráfico de volcán de ED de miARNs en tejido hepático según qHBsAg; (B) Mapa de calor de ED de miARNs en tejido hepático según qHBsAg.



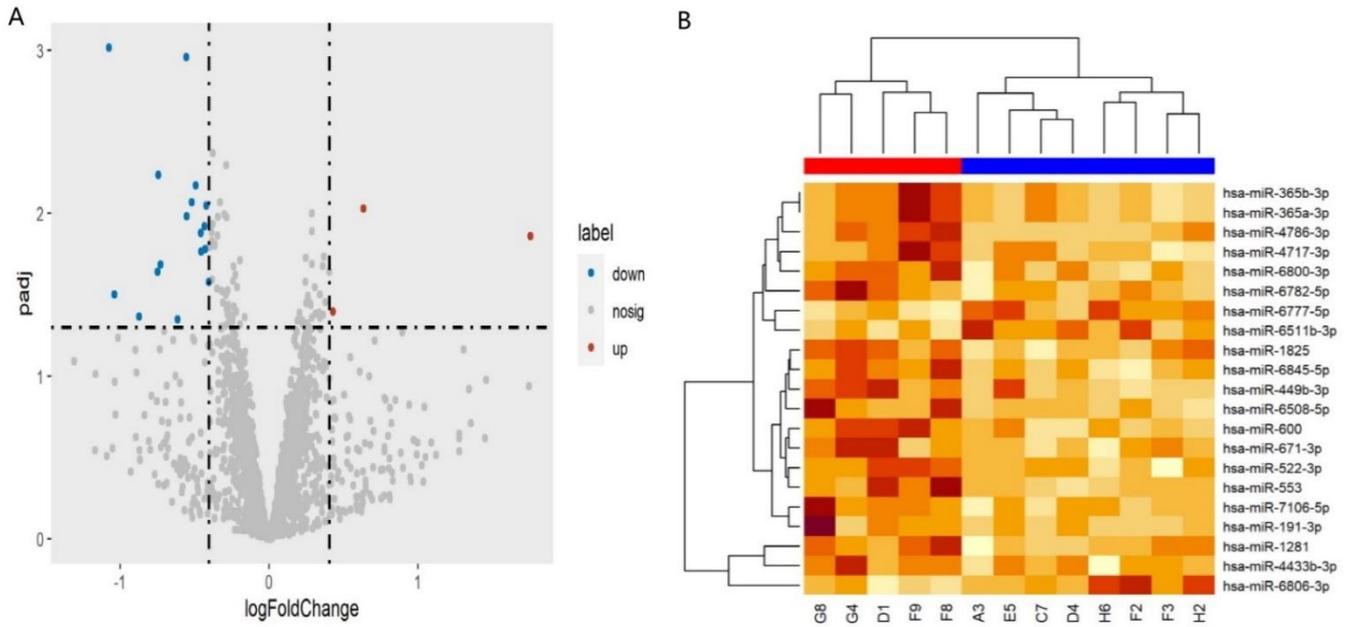
**Figura 29.** Los niveles de expresión de (A) miR-103a-3p, (B) miR-106b-5p, (C) miR-519d-3p y (D) miR-181a-5p en tejido hepático según qHBsAg.

### 3.2.1.4. ED de miARNs en función de tratamiento antiviral

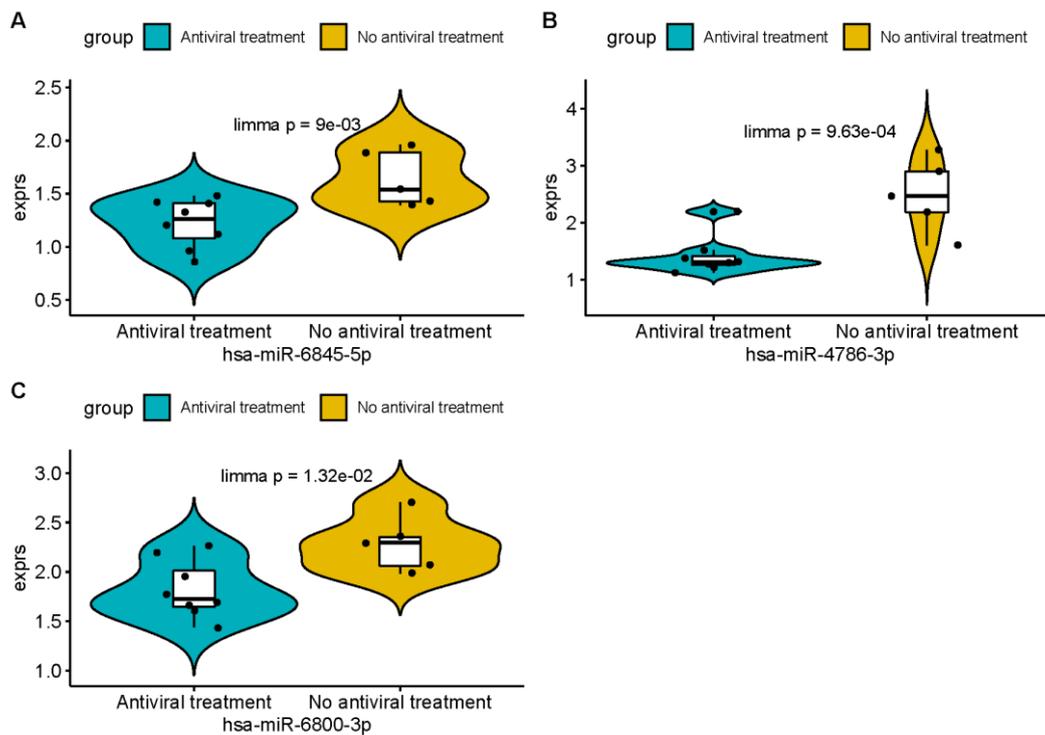
Del estudio de ED de los miARNs en función de tratamiento antiviral se obtuvieron 21 ED de miARNs ( $p < 0,05$  y  $|\logFC| > \log1,5$ ), entre los que hay 3 miARNs que están *up*-regulados y 18 miARNs que están *down*-regulados. Entre ellos, la expresión de miR-6845-5p, miR-4786-3p y miR-6800-3p están *down*-regulados. La lista de los ED de miARNs logrados se detalla en la Tabla 10. El gráfico de volcán y el mapa de calor correspondientes se muestran en la Figura 30. Los niveles de expresión de miR-6845-5p, miR-4786-3p y miR-6800-3p en función de tratamiento antiviral se pueden observar en la Figura 31.

**Tabla 10.** ED de miARNs en tejido hepático en función de tratamiento antiviral.

miARN	logFC	p	miARN	logFC	p
hsa-miR-4786-3p	-1,0748718	0,0009627045	hsa-miR-6806-3p	1,7560811	0,0138155809
hsa-miR-600	-0,5564231	0,0011008051	hsa-miR-6508-5p	-0,4281426	0,0165620117
hsa-miR-365a-3p	-0,7442373	0,0058156960	hsa-miR-449b-3p	-0,4557648	0,0172179709
hsa-miR-365b-3p	-0,7442373	0,0058156960	hsa-miR-6782-5p	-0,7305518	0,0206834191
hsa-miR-553	-0,4921500	0,0067317371	hsa-miR-4717-3p	-0,7487536	0,0229571651
hsa-miR-1825	-0,5205601	0,0085694853	hsa-miR-671-3p	-0,4055788	0,0264098189
hsa-miR-6845-5p	-0,4211670	0,0090013737	hsa-miR-1281	-1,0382067	0,0315462926
hsa-miR-6777-5p	0,6352397	0,0094053782	hsa-miR-6511b-3p	0,4304547	0,0402840748
hsa-miR-7106-5p	-0,5544729	0,0104322015	hsa-miR-4433b-3p	-0,8732049	0,0433301488
hsa-miR-522-3p	-0,4346260	0,0120394633	hsa-miR-191-3p	-0,61567	0,044979
hsa-miR-6800-3p	-0,4593651	0,0132401099			



**Figura 30.** (A) El gráfico de volcán de ED de miARNs en tejido hepático en función de tratamiento antiviral; (B) Mapa de calor de ED de miARNs en tejido hepático en función de tratamiento antiviral.

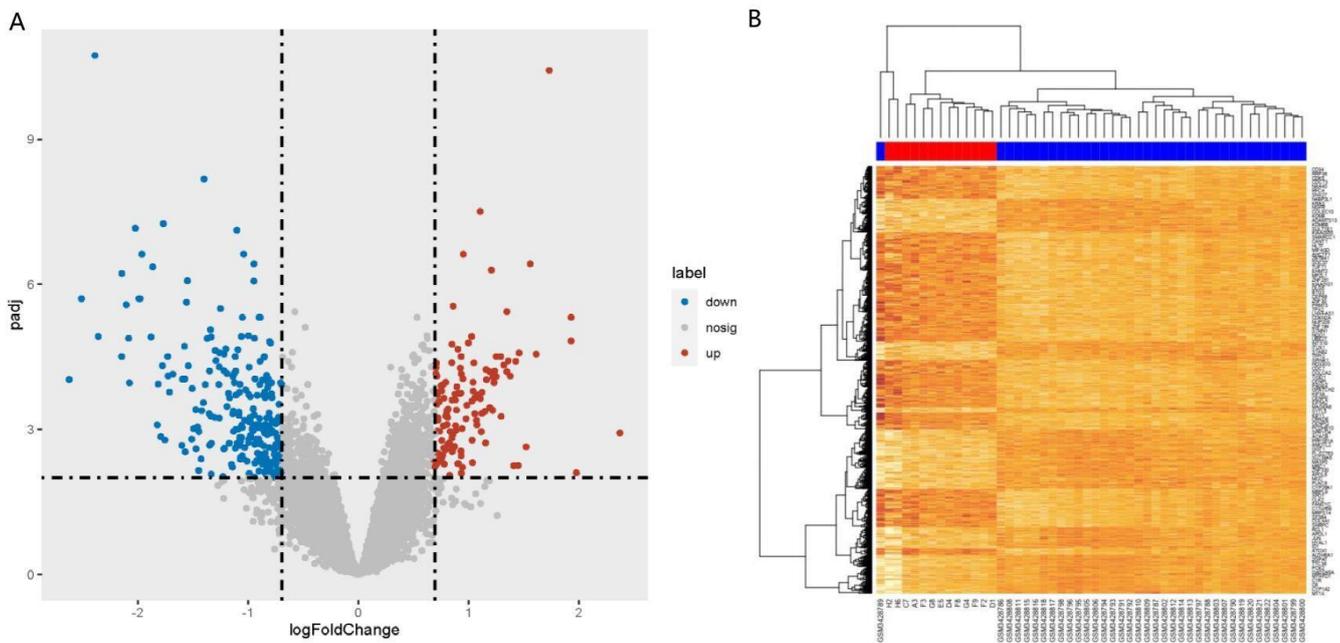


**Figura 31.** Los niveles de expresión de (A) miR-6845-5p, (B) miR-4786-3p y (C) miR-6800-3p en tejido hepático en función de tratamiento antiviral.

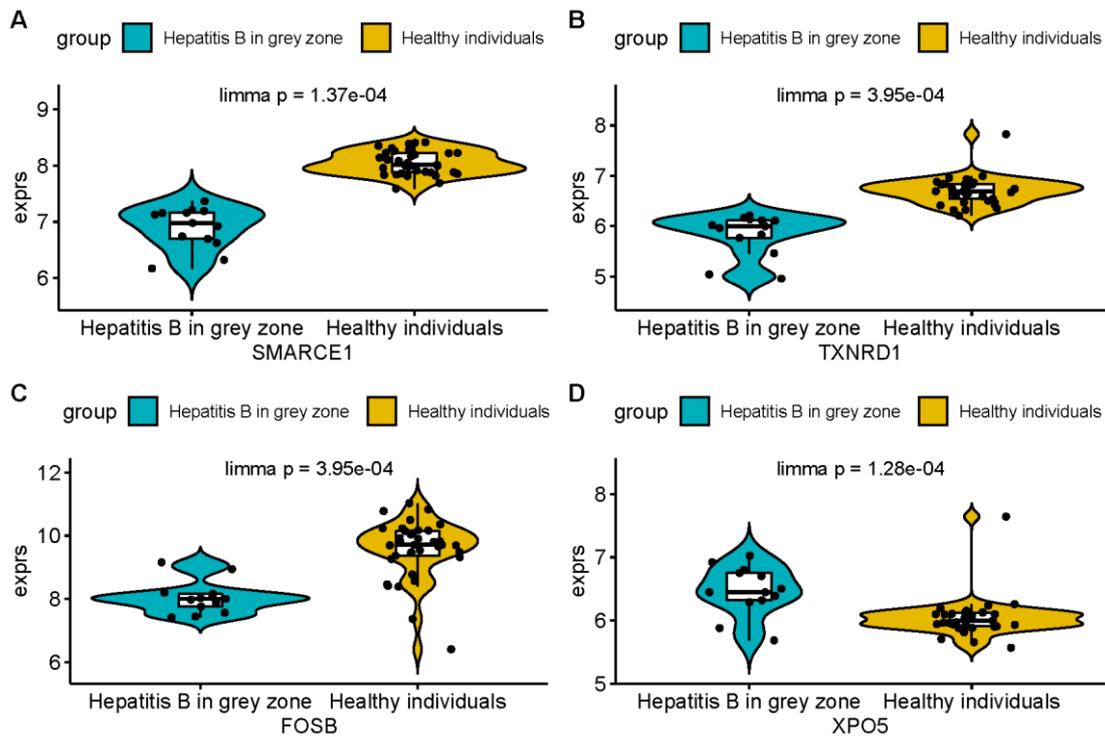
### 3.2.2. ED de ARNm en muestra de tejido hepático

#### 3.2.2.1. ED de ARNm entre HBC-ZG e individuos sanos

Se obtuvieron 1.110 ED de ARNm ( $p. \text{adjust} < 0,01$ ) en tejido hepático entre HBC-ZG e individuos sanos. Cuando se restringe aún más  $|\log\text{FC}| > \log 2$ , se mostró 383 ED de ARNm, de los cuales 128 están *up*-regulados y 255 están *down*-regulados. Entre ellos, la expresión de SMARCE1, TXNRD1 y FOSB están *down*-regulados, y XPO5 está *up*-regulado. El gráfico de volcán y el mapa de calor correspondientes se muestran en la Figura 32. Los niveles de expresión de SMARCE1, TXNRD1, FOSB y XPO5 entre HBC-ZG e individuos sanos se muestran en la Figura 33.



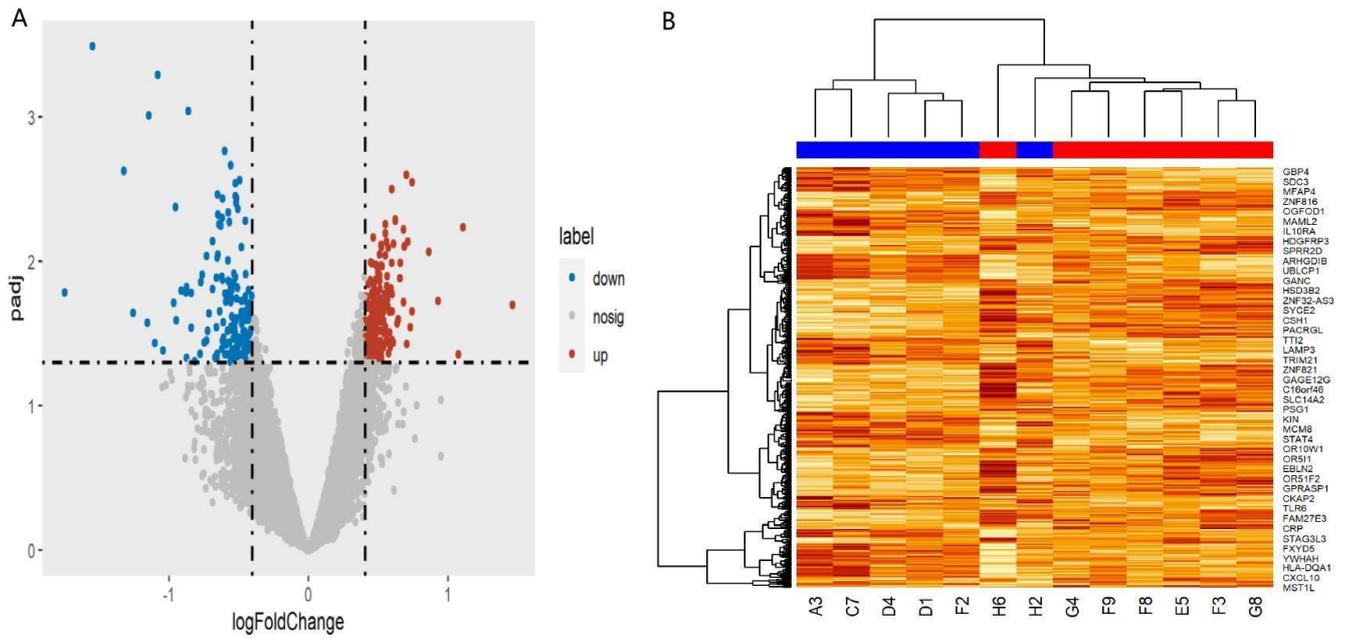
**Figura 32.** (A) El gráfico de volcán de ED de ARNm entre HBC-ZG e individuos sanos en muestra de tejido hepático; (B) Mapa de calor de ED de ARNm entre HBC-ZG e individuos sanos en muestra de tejido hepático.



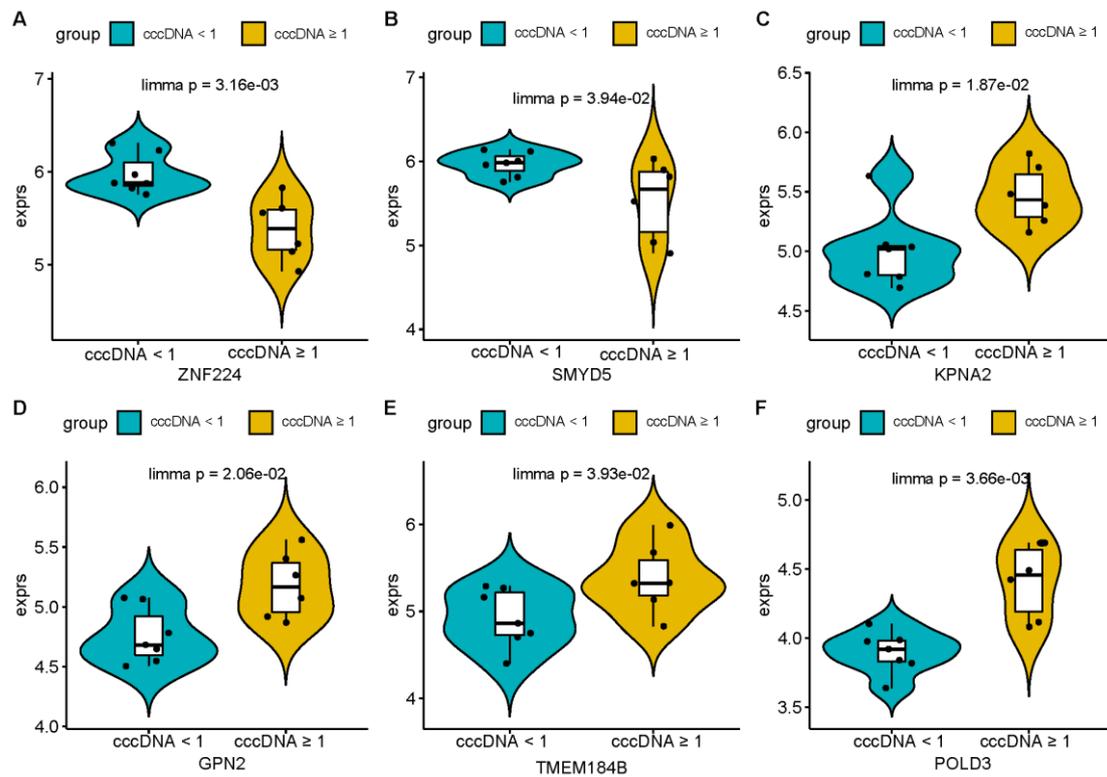
**Figura 33.** Los niveles de expresión de (A) SMARCE1, (B) TXNRD1, (C) FOSB y (D) XPO5 entre HBC-ZG e individuos sanos en muestra de tejido hepático.

### 3.2.2.2. ED de ARNm en función del nivel del ADNccc

Del estudio de ED de ARNm en función del nivel de ADNccc, se consiguieron 340 ARNm ( $p < 0,05$  y  $|\log_{2}FC| > \log_{2}1,5$ ), entre los cuales hay 180 ARNm que están *up*-regulados y 160 ARNm que están *down*-regulados. Entre ellos, la expresión de ZNF224 y SMYD5 están *up*-regulados, KPNA2, GPN2, TMEM184B y POLD3 están *down*-regulados. El gráfico de volcán y el mapa de calor correspondientes se exponen en la Figura 34. Los niveles de expresión de ZNF224, SMYD5, KPNA2, GPN2, TMEM184B y POLD3 según grupo de ADNccc se pueden observar en la Figura 35.



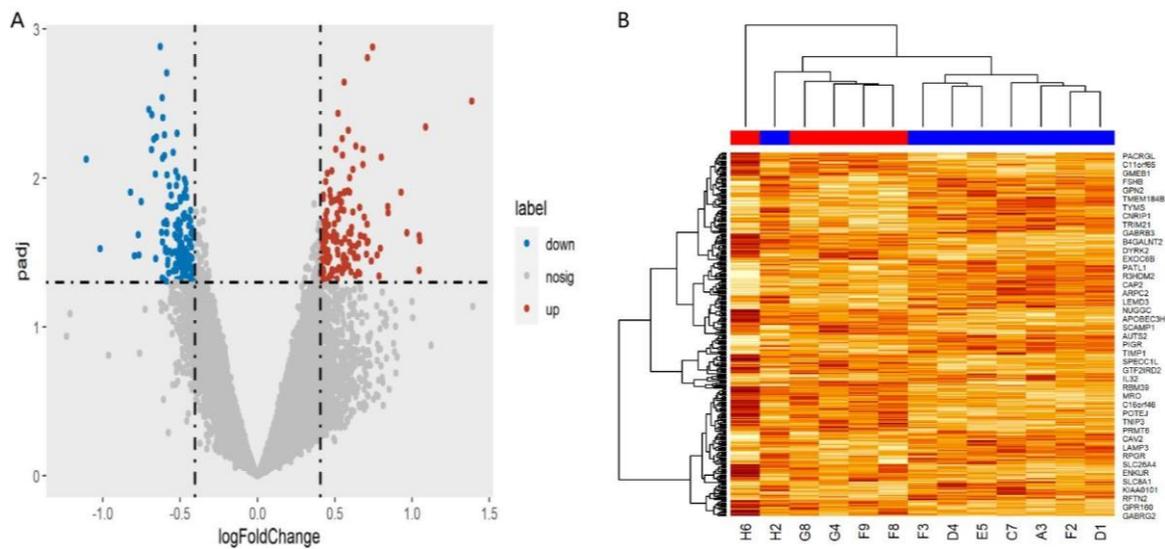
**Figura 34.** (A) El gráfico de volcán de ED de ARNm en tejido hepático según el nivel del ADNccc; (B) Mapa de calor de ED de ARNm en tejido hepático según el nivel del ADNccc.



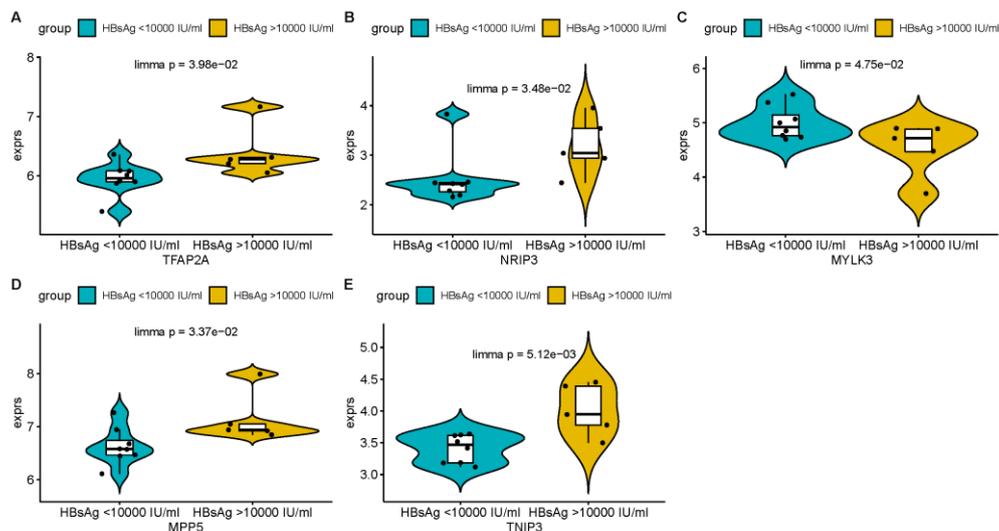
**Figura 35.** Los niveles de expresión de (A) ZNF224, (B) SMYD5, (C) KPNA2, (D) GPN2, (E) TMEM184B y (F) POLD3 según el nivel del ADNccc.

### 3.2.2.3. ED de ARNm en función de qHBsAg

Del estudio de ED de ARNm en función de qHBsAg se obtuvieron 297 ARNm ( $p < 0,05$  y  $|\logFC| > \log1,5$ ), entre los que hay 151 ARNm que están *up*-regulados y 146 ARNm *down*-regulados. Entre ellos, la expresión de TFAP2A, NRIP3, MPP5 y TNIP3 están *down*-regulados, MYLK3 está *up*-regulado. El gráfico de volcán y el mapa de calor se pueden ver en la Figura 36. Los niveles de expresión de TFAP2A, NRIP3, MYLK3, MPP5 y TNIP3 según grupo de qHBsAg se muestran en la Figura 37.



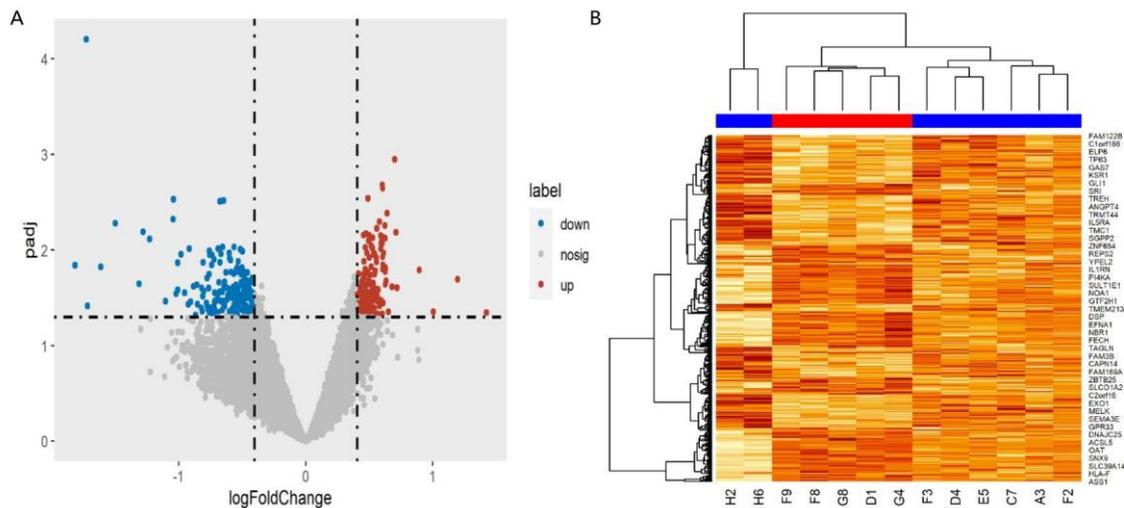
**Figura 36.** (A) El gráfico de volcán de ED de ARNm en tejido hepático según qHBsAg; (B) Mapa de calor de ED de ARNm en tejido hepático según qHBsAg.



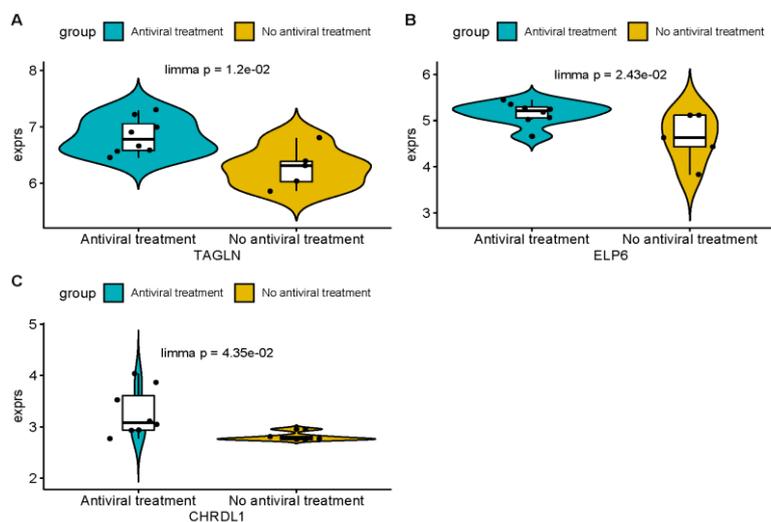
**Figura 37.** Los niveles de expresión de (A) TFAP2A, (B) NRIP3, (C) MYLK3, (D) MPP5 y (E) TNIP3 según qHBsAg.

### 3.2.2.4. ED de ARNm en función de tratamiento antiviral

Se obtuvieron 353 ED de ARNm en función de tratamiento antiviral ( $p < 0,05$  y  $|\logFC| > \log_2 1,5$ ), 177 ARNm que están *up*-regulados y 176 ARNm que están *down*-regulados. Entre ellos, la expresión de TAGLN, ELP6 y CHRDL1 están *up*-regulados. El gráfico de volcán y el mapa de calor correspondientes se muestran en la Figura 38. Los niveles de expresión de TAGLN, ELP6 y CHRDL1 en función de tratamiento antiviral se pueden apreciar en la Figura 39.



**Figura 38.** (A) El gráfico de volcán de ED de ARNm en tejido hepático en función de tratamiento antiviral; (B) Mapa de calor de ED de ARNm en tejido hepático en función de tratamiento antiviral.



**Figura 39.** Los niveles de expresión de (A) TAGLN, (B) ELP6 y (C) CHRDL1 en función de tratamiento antiviral.

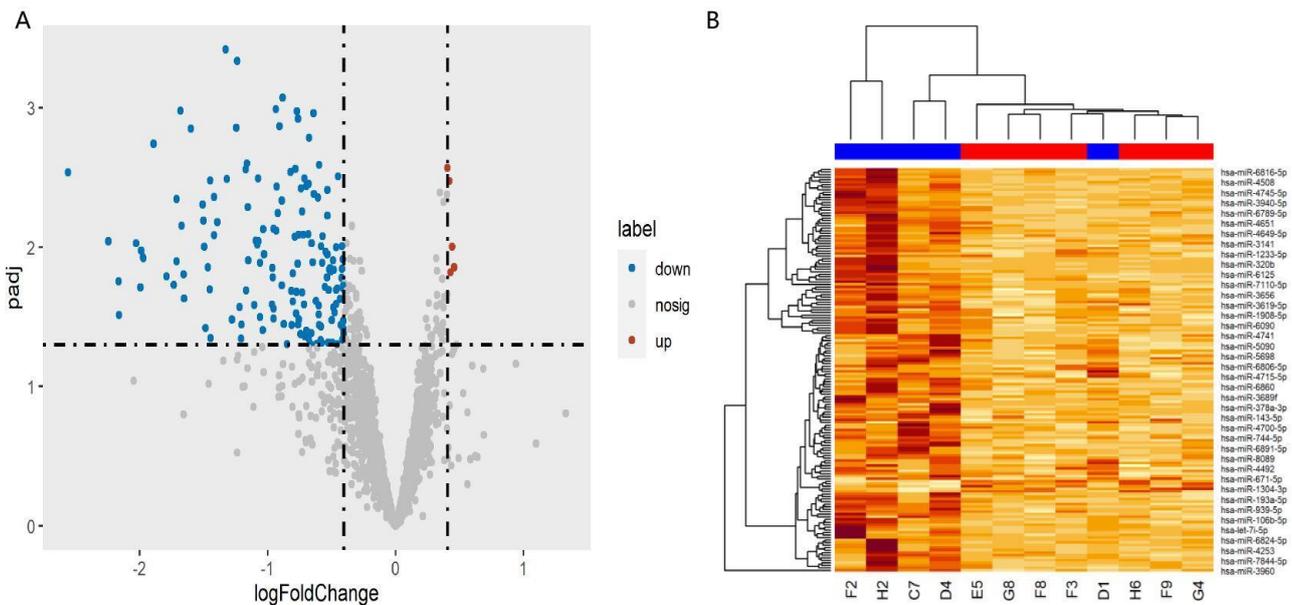
### 3.2.3. ED de miARNs en muestras de plasma

#### 3.2.3.1. ED de miARNs en función del nivel del ADNccc

De los 158 ED de miARNs obtenidos, en función del nivel de ADNccc ( $p < 0,05$  y  $|\logFC| > \log(1,5)$ ), hay 5 miARNs que están *up*-regulados y 153 miARNs que están *down*-regulados. Las ED de los miARNs obtenidos en plasma son diferentes de las ED de los miARNs obtenidos de tejido hepático. Los 10 principales miARNs de ED en plasma, según el nivel del ADNccc, se exponen en la Tabla 11. El gráfico de volcán y el mapa de calor correspondientes se pueden observar en la Figura 40.

**Tabla 11.** Los 10 principales ED de miARNs en plasma según el nivel del ADNccc.

miARN	logFC	p	miARN	logFC	p
hsa-miR-4502	-1.3280687	0.0003816233	hsa-miR-6089	-2.5583734	0.0029231952
hsa-miR-4632-5p	-1.2359962	0.0004611034	hsa-miR-4516	-1.8910244	0.0018155118
hsa-miR-6850-5p	-1.6806691	0.0010481134	hsa-miR-6849-5p	-1.1584181	0.0025003982
hsa-miR-328-5p	-1.2446167	0.0013950942	hsa-miR-6805-5p	-1.1680087	0.0027821775
hsa-miR-4687-3p	-1.5989833	0.0014203908	hsa-miR-6802-5p	-0.9340960	0.0010229121



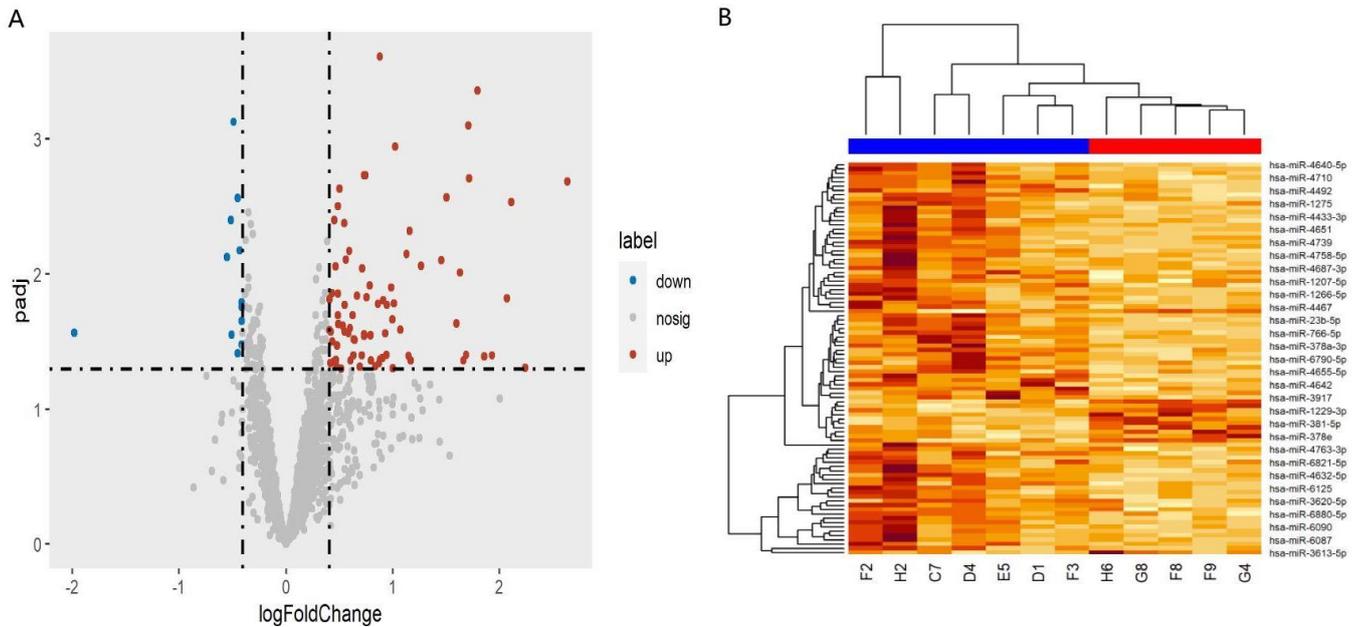
**Figura 40.** (A) El gráfico de volcán de ED de miARNs en plasma según el nivel del ADNccc; (B) Mapa de calor de ED de miARNs en plasma según el nivel del ADNccc.

### 3.2.3.2. ED de miARNs en función de qHBsAg

Se lograron 91 ED de miARNs en función de qHBsAg ( $p < 0,05$  y  $|\logFC| > \log(1,5)$ ), entre los cuales hay 79 miARNs que están *up*-regulados y 12 miARNs que están *down*-regulados. Las ED de los miARNs obtenidos en plasma son diferentes de las ED de los miARNs obtenidos de tejido hepático. La Tabla 12 presenta los 10 principales miARNs de ED en plasma, según qHBsAg. El gráfico de volcán y el mapa de calor correspondientes son mostrados en la Figura 41.

**Tabla 12.** Los 10 principales ED de miARNs en plasma según qHBsAg.

miARN	logFC	p	miARN	logFC	p
hsa-miR-4710	0.8793738	0.0002461813	hsa-miR-6794-5p	1.7152921	0.0019698131
hsa-miR-6765-5p	1.7917231	0.0004398911	hsa-miR-6089	2.6323786	0.0020770148
hsa-miR-6724-5p	1.7077915	0.0007945112	hsa-miR-6880-5p	1.5035699	0.0027028630
hsa-miR-6763-5p	1.0211075	0.0011430778	hsa-miR-3665	2.1098408	0.0029477257
hsa-miR-4459	0.7321059	0.0018659834	hsa-miR-6775-5p	1.1566666	0.0048070867



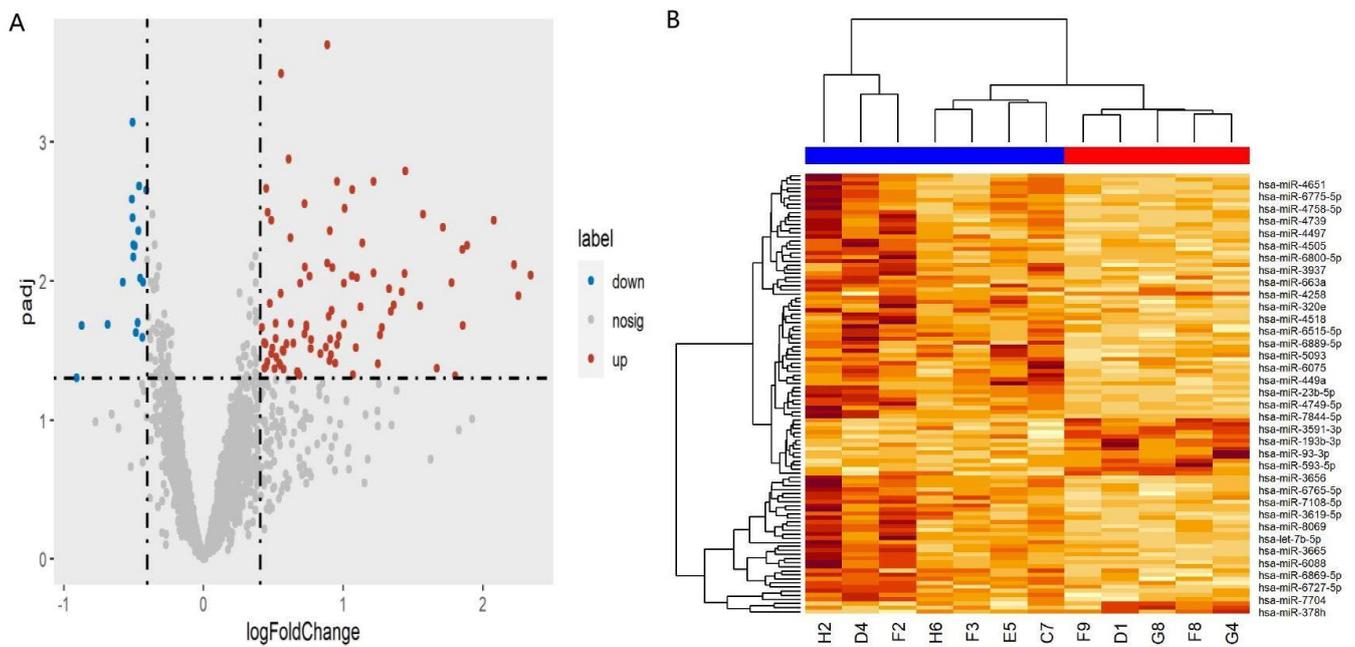
**Figura 41.** (A) El gráfico de volcán de ED de miARNs en plasma según qHBsAg; (B) Mapa de calor de ED de miARNs en plasma según qHBsAg.

### 3.2.3.3. ED de miARNs en función de tratamiento antiviral

Se obtuvo 108 ED de miARNs que se lograron, en función de tratamiento antiviral ( $p < 0,05$  y  $|\logFC| > \log1,5$ ), hay 90 miARNs que están *up*-regulados y 18 miARNs que están *down*-regulados. Las ED de los miARNs obtenidos en plasma son diferentes de las ED de los miARNs obtenidos de tejido hepático. Los 10 principales miARNs de ED, en función de tratamiento antiviral, son presentados en la Tabla 13. El gráfico de volcán y el mapa de calor correspondientes se muestran en la Figura 42.

**Tabla 13.** Los 10 principales ED de miARNs en plasma en función de tratamiento antiviral.

miARN	logFC	p	miARN	logFC	p
hsa-miR-4710	0.8863180	0.0001999575	hsa-miR-4640-5p	0.7218908	0.0027831456
hsa-miR-1908-5p	1.4426671	0.0016164355	hsa-miR-6869-5p	1.0096146	0.0030030590
hsa-miR-4763-3p	0.9560773	0.0019175986	hsa-miR-6803-5p	1.5705613	0.0033187693
hsa-miR-6743-5p	1.2171422	0.0019258403	hsa-miR-3665	2.0758299	0.0036602923
hsa-miR-6729-5p	1.0639912	0.0021966346	hsa-miR-3656	1.7126908	0.0041216199

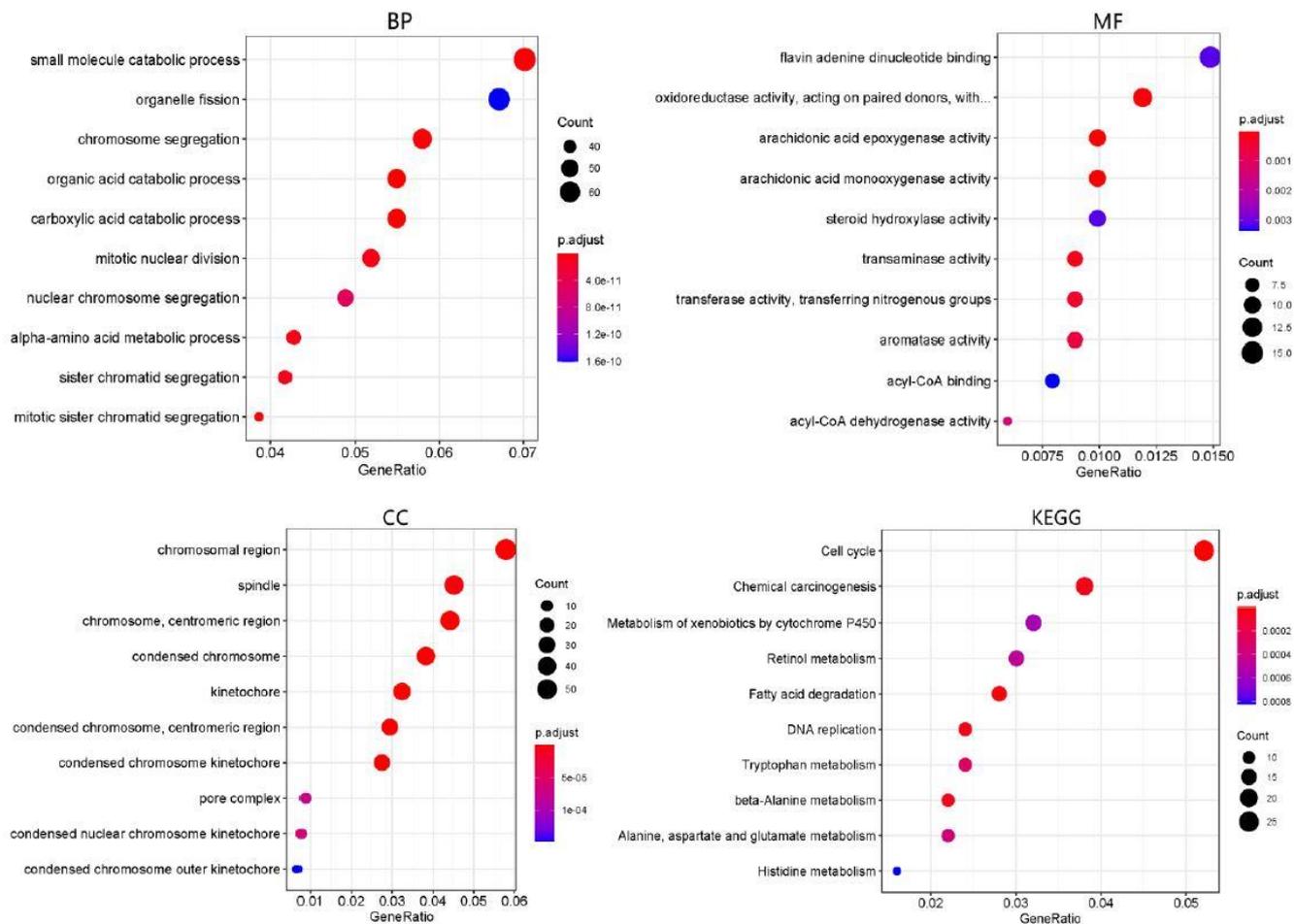


**Figura 42.** (A) El gráfico de volcán de ED de miARNs en plasma en función de tratamiento antiviral; (B) Mapa de calor de ED de miARNs en plasma en función de tratamiento antiviral.

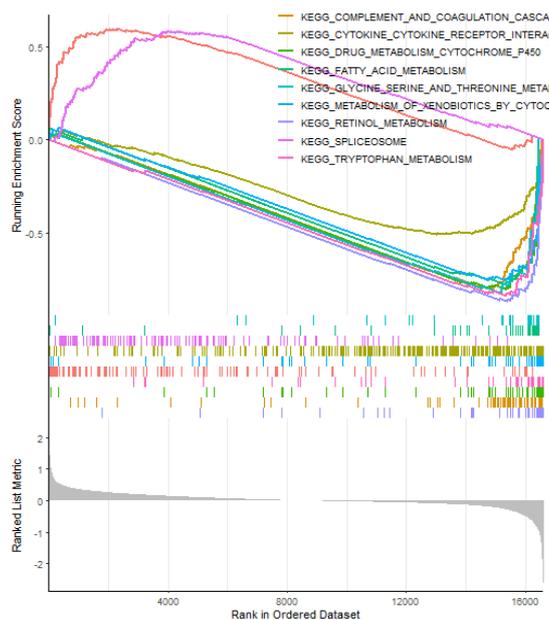
### **3.3. Enriquecimiento funcional**

#### **3.3.1. Enriquecimiento funcional entre HBC-ZG e individuos sanos**

Con el fin de realizar el análisis de enriquecimiento funcional entre HBC-ZG e individuos sanos, primero se realizaron tres categorías de GO, los cuales comprendían el proceso biológico (BP), la función molecular (MF) y el componente celular (CC), juntamente con el enriquecimiento de KEGG, específicamente para los ED genes (Figura 43). Los términos GO más enriquecidos en BP era “proceso catabólico de molécula pequeña”, que en MF era “unión a dinucleótidos de flavina y adenina” y que en CC era “región cromosómica”. Para el análisis de la vía KEGG, los ED genes se enriquecieron principalmente en el ciclo celular, carcinogénesis química, metabolismo de xenobióticos por el citocromo P450, metabolismo del retinol, degradación de ácidos grasos, replicación del ADN, metabolismo del triptófano, metabolismo de beta-alanina, metabolismo de alanina, aspartato y glutamato y metabolismo de histidina. Los resultados de GSEA mostraron que los ED genes con la puntuación de enriquecimiento más alta estaban estrechamente asociados con las vías de señalización relacionadas con el complemento y las cascadas de coagulación, la interacción del receptor de citoquinas y citoquinas, el metabolismo de los fármacos citocromo P450 y el metabolismo de los ácidos grasos (Figura 44).



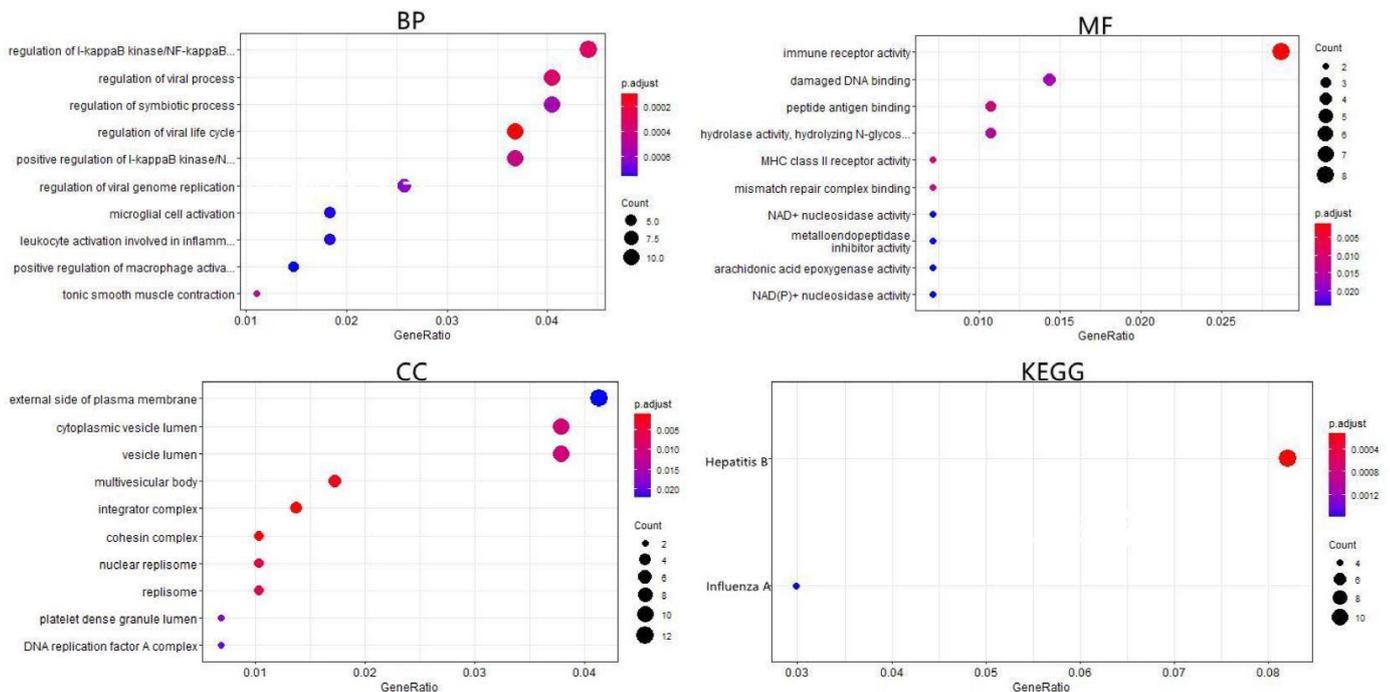
**Figura 43.** Los 10 principales términos GO (BP, MF, CC) y vías de KEGG entre HBC-ZG e individuos sanos.



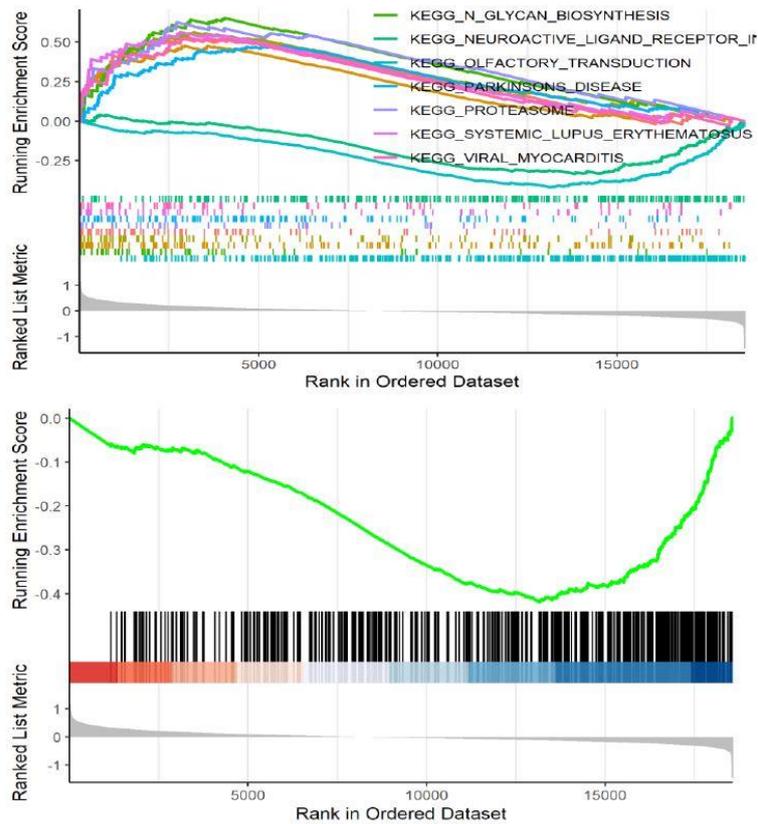
**Figura 44.** Las vías principales de los resultados del análisis de GSEA entre HBC-ZG e individuos sanos.

### 3.3.2. Enriquecimiento funcional en función de ADNccc

Los términos GO más enriquecidos en BP están relacionados con el proceso biológico del virus, como son la regulación del ciclo de vida viral, regulación del proceso viral, regulación de la replicación del genoma viral, regulación de la quinasa I- $\kappa$ B / NF- $\kappa$ B. Los términos GO más enriquecidos en MF fue “actividad del receptor inmunológico” y los términos GO más enriquecidos en CC fue “lado externo de la membrana plasmática”. Las vías KEGG se enriquecieron principalmente en hepatitis B e influenza A (Figura 45). Los resultados de GSEA mostraron que los ED genes más enriquecimientos estaban estrechamente asociados con biosíntesis de glucanos, interacción de neuro-activo liga al receptor, transducción olfativa, proteasoma, miocarditis viral (Figura 46).



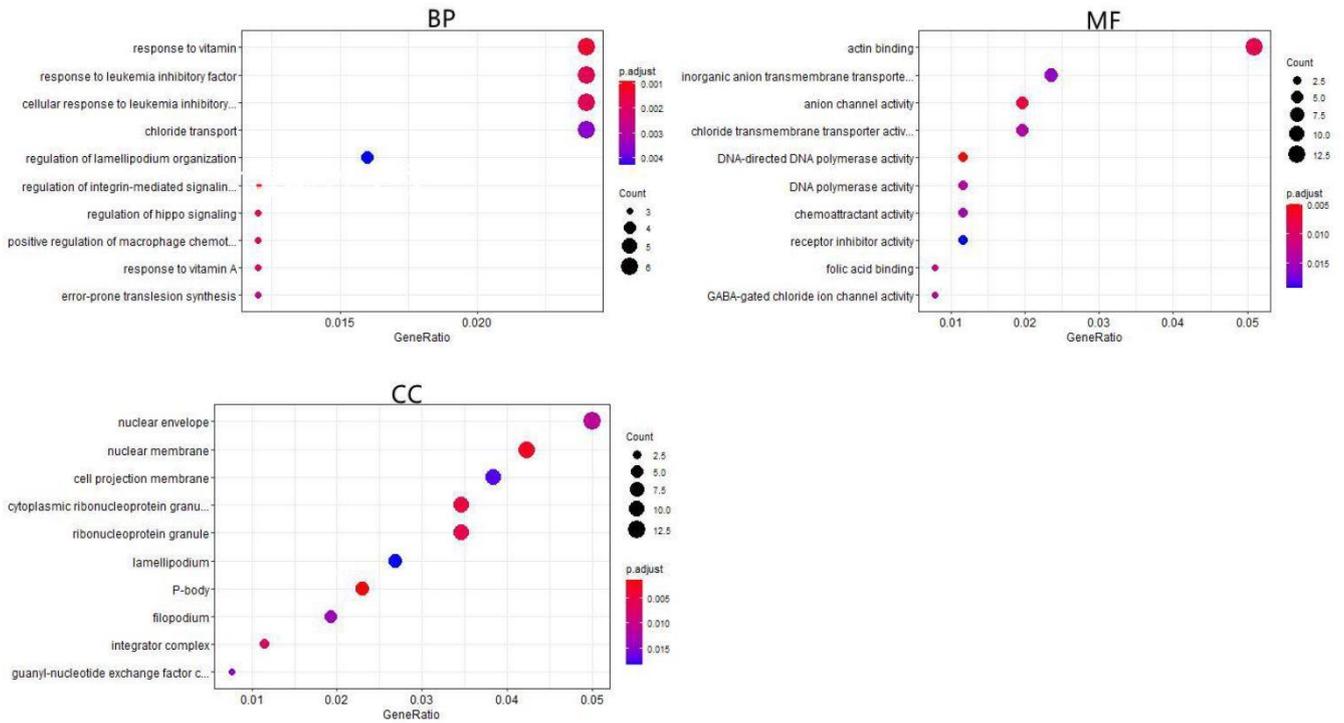
**Figura 45.** Los principales términos GO (BP, MF, CC) y vías de KEGG en función de ADNccc.



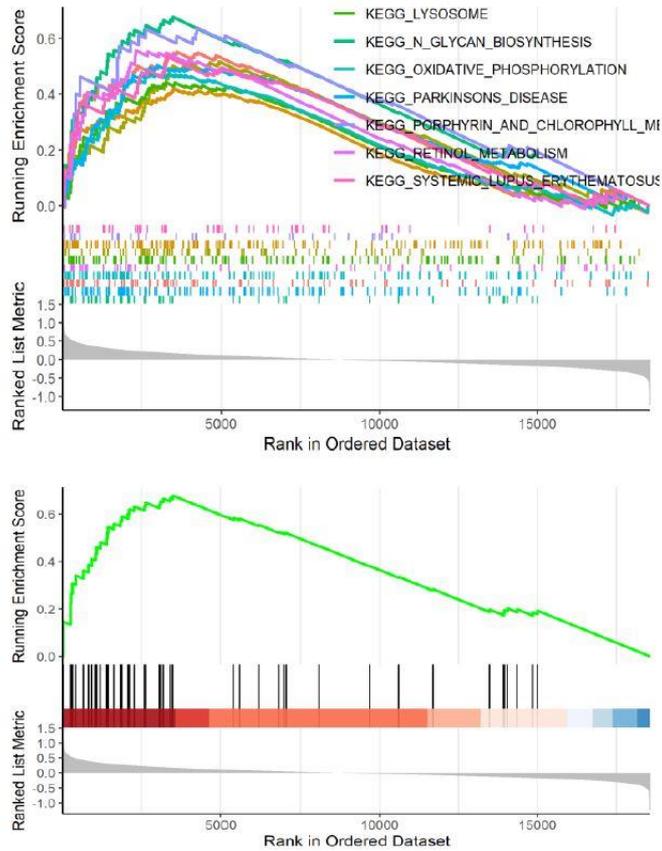
**Figura 46.** Las vías principales de los resultados del análisis de GSEA en función de ADNccc.

### 3.3.3. Enriquecimiento funcional en función de qHBsAg

Los términos GO más enriquecidos en BP fue “respuesta a la vitamina”, que en MF era “unión de actina” y que en CC era “membrana nuclear” (Figura 47). Los resultados de GSEA manifestaron que los ED genes más enriquecimientos estaban estrechamente asociados con lisosoma, biosíntesis de glucanos, fosforilación oxidativa (Figura 48).



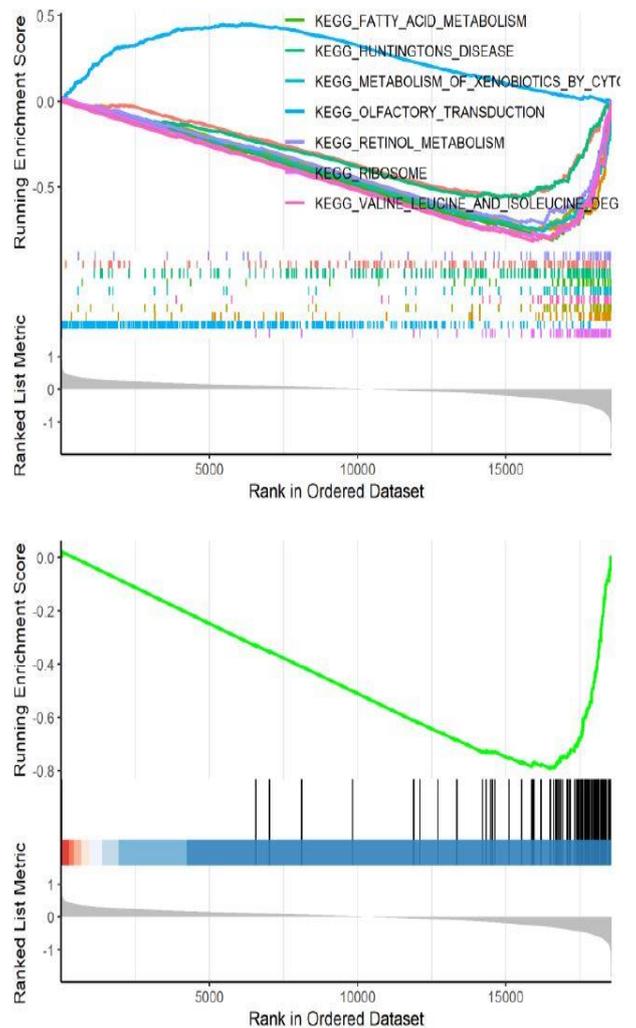
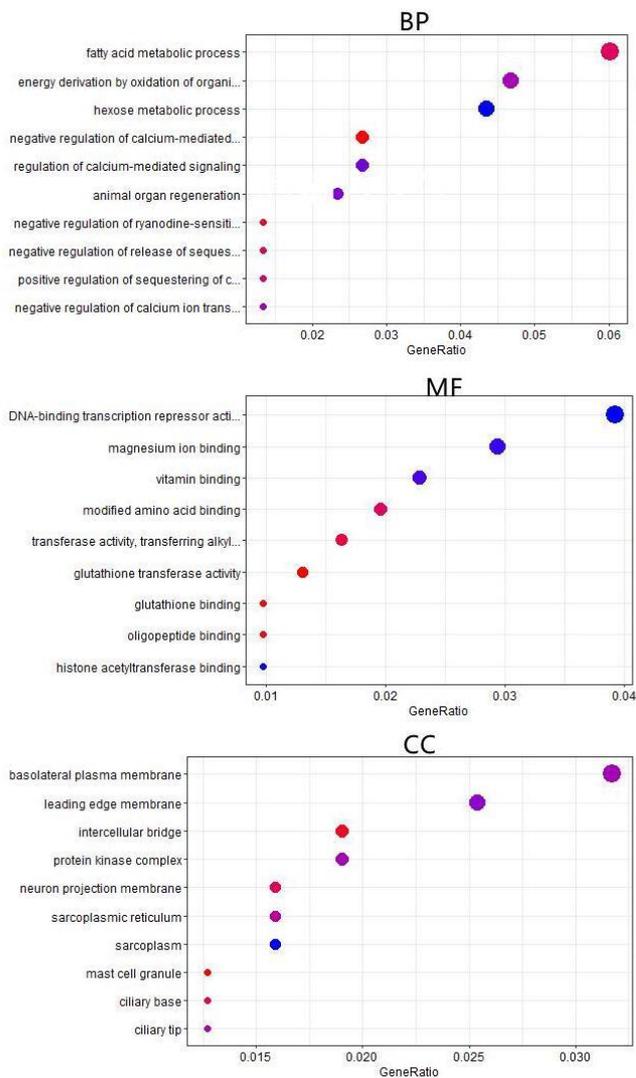
**Figura 47.** Los principales términos GO (BP, MF, CC) en función de qHBsAg.



**Figura 48.** Las vías principales de los resultados del análisis de GSEA en función de qHBsAg.

### 3.3.4. Enriquecimiento funcional en función de tratamiento antiviral

Los términos GO más enriquecidos en BP fue “proceso metabólico de ácidos grasos”, que en MF era “represor de la transcripción de unión al ADN” y que en CC era “membrana plasmática basolateral” (Figura 49). Los resultados de GSEA mostraron que los ED genes más enriquecidos estaban estrechamente asociados con metabolismo de ácidos grasos y enfermedad de Huntington (Figura 50).



**Figura 49.** Los principales términos GO (BP, MF, CC) en función de tratamiento antiviral.

**Figura 50.** Las vías principales de los resultados del análisis de GSEA en función de tratamiento antiviral.

### 3.4. Red de interacción miARN-ARNm en muestra de tejido hepático

#### 3.4.1. Red de miARN-ARNm entre HBC-ZG e individuos sanos

La base de datos *miRTarBase* se utilizó para evaluar la correlación entre los ED de miARNs y los ED de genes diana correspondientes. Como todos sabemos, los genes dianas estaban regulados a la inversa por los miARNs, y cuanto mayor era el coeficiente de correlación, mayor era el efecto de regulación mutua. Basado en esta teoría, calculamos el coeficiente de correlación de Pearson entre 52 ED de miARNs y 1.110 ED de ARNm entre HBC-ZG e individuos sanos. Los pares de interacción que están correlacionados negativamente ( $r < 0$ ) y existen en *miRTarBase* se conservan, y se crea el diagrama de la red de interacción, los cuales se presenta en la Figura 51. Seguidamente, seleccionamos 20 pares de interacción miARN-ARNm con valor de  $p < 0,05$ . Por último, obtuvimos 4 pares de interacción ARN-ARNm (miR-199b-5p - SMARCE1, miR-199b-5p - TXNRD1, miR-23b-3p - FOSB y miR-29c-3p - XPO5) fuertemente correlacionados, con valor de corte  $r < - 0,7$  y  $p < 0,01$  (Figura 52). La correlación de los 4 pares se muestra en la Figura 53.

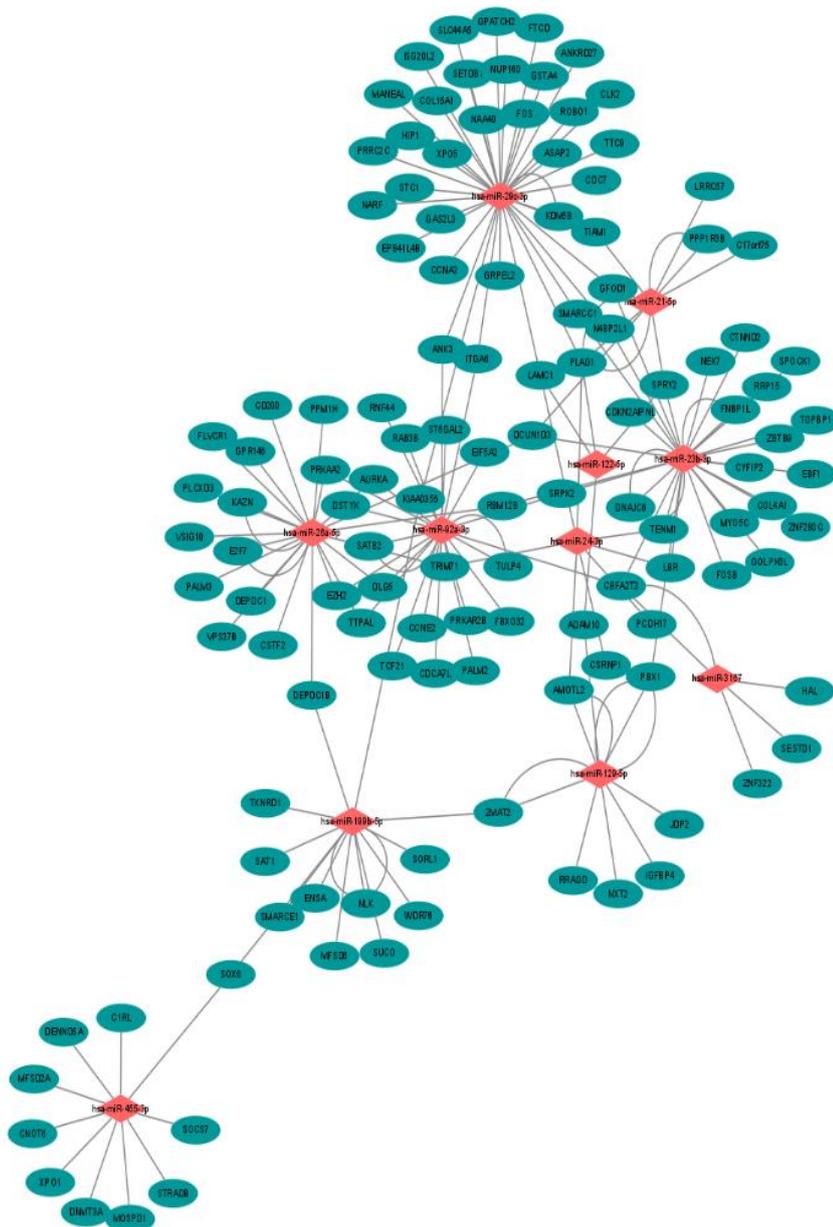
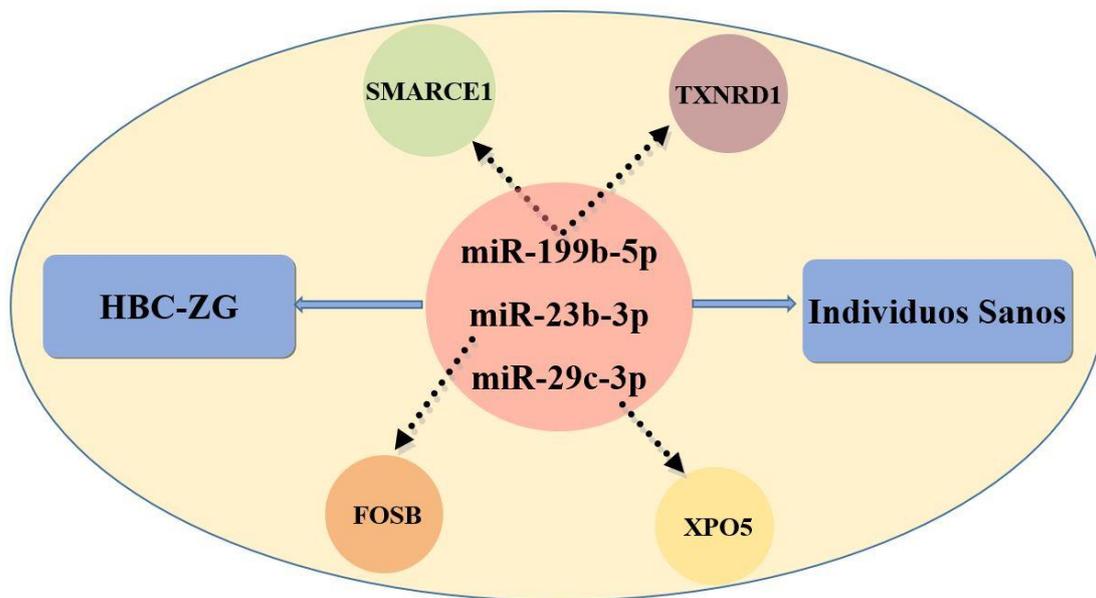
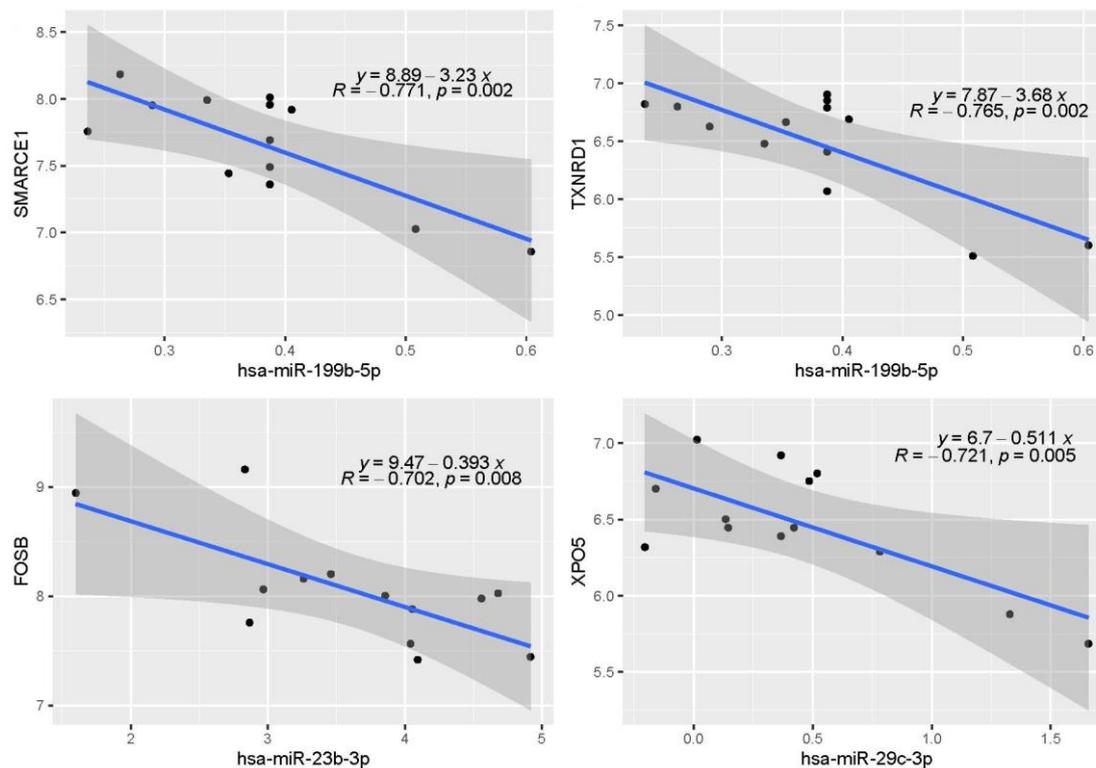


Figura 51. Diagrama de interacción miARN-ARNm entre HBC-ZG e individuos sanos.



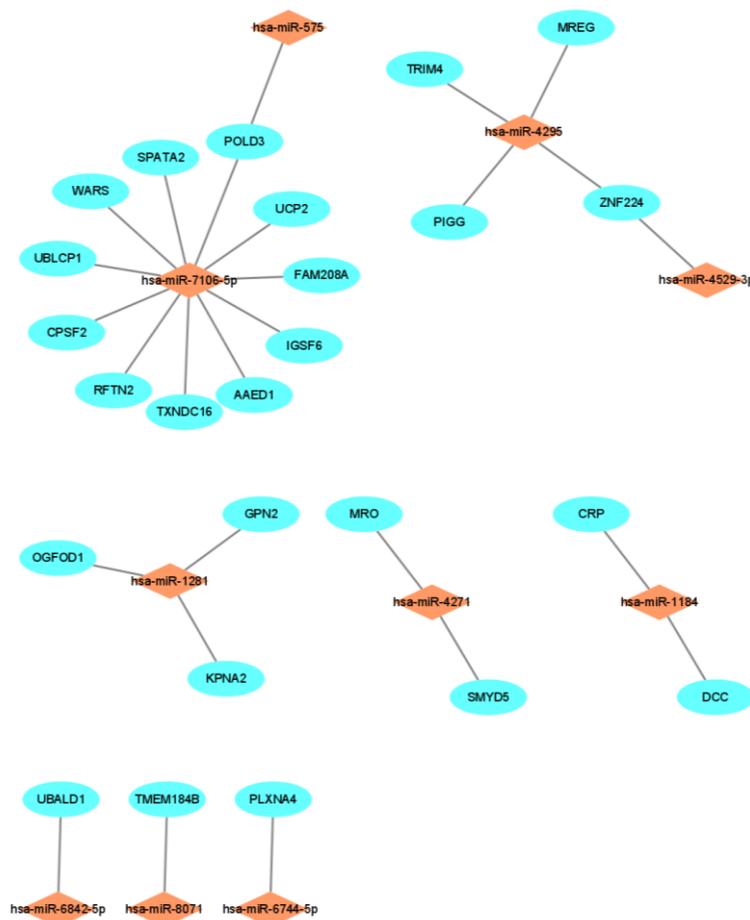
**Figura 52.** Red de miARN-ARNm construidas en HBC-ZG e individuos sanos.



**Figura 53.** Correlación de miARN-ARNm en HBC-ZG e individuos sanos.

### 3.4.2. Red de miARN-ARNm en función de ADNccc

Nuestro objetivo fue calcular el coeficiente de correlación de Pearson entre 19 ED de miARNs y 340 ED de ARNm en el grupo de ADNccc. Los pares de interacción que están correlacionados negativamente ( $r < 0$ ) y que están en *miRTarBase* se presentan en el diagrama de la red de interacción (Figura 54). Seguidamente, seleccionamos 6 pares de interacción miARN-ARNm (miR-4295 - ZNF224, miR-4271 - SMYD5, miR-1281 - KPNA2, miR-1281 - GPN2, miR-8071 - TMEM184B y miR-575 - POLD3) con valor de  $p < 0,05$  (Figura 55). Finalmente, se encontró una fuerte correlación negativa significativa entre el par de interacción miR-4295-ZNF224 con un valor de corte  $r < -0,7$  y  $p < 0,01$ . La correlación de los 6 pares se mostró en la Figura 56.



**Figura 54.** Diagrama de interacción miARN-ARNm en el grupo de ADNccc.

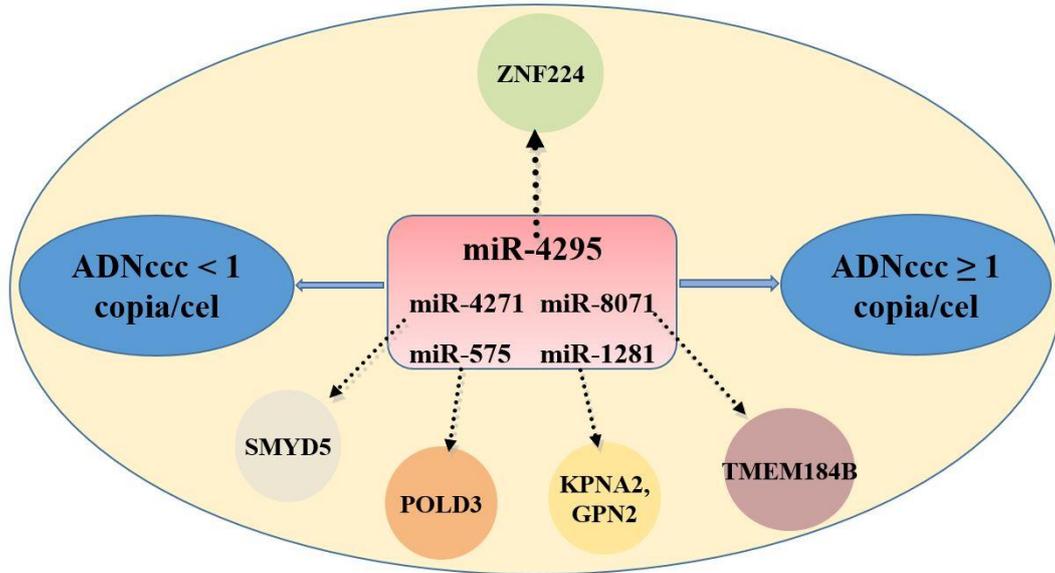


Figura 55. Red de miARN-ARNm construidas en el grupo de ADNccc.

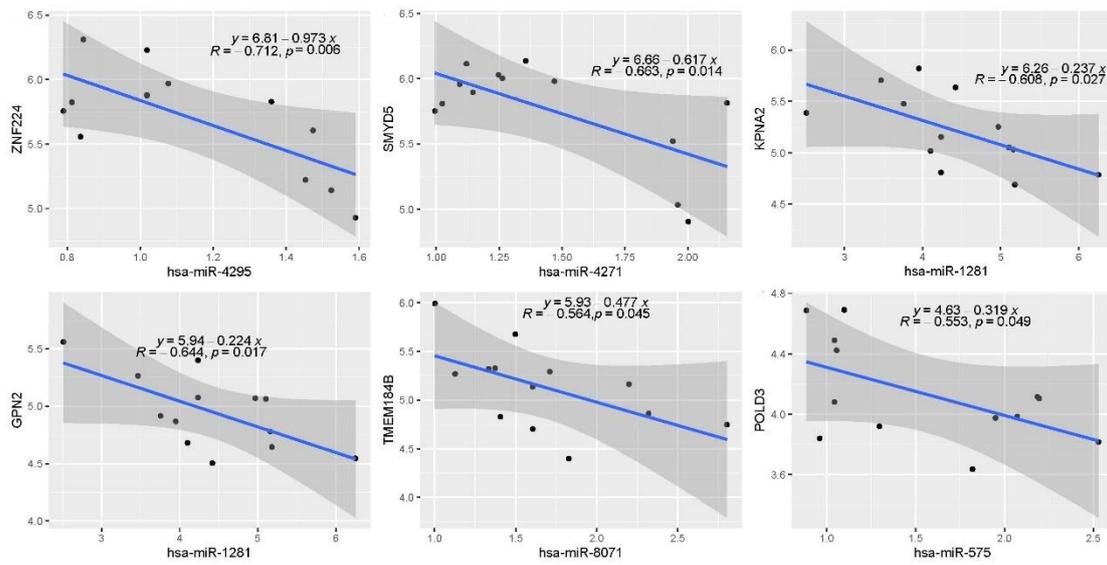
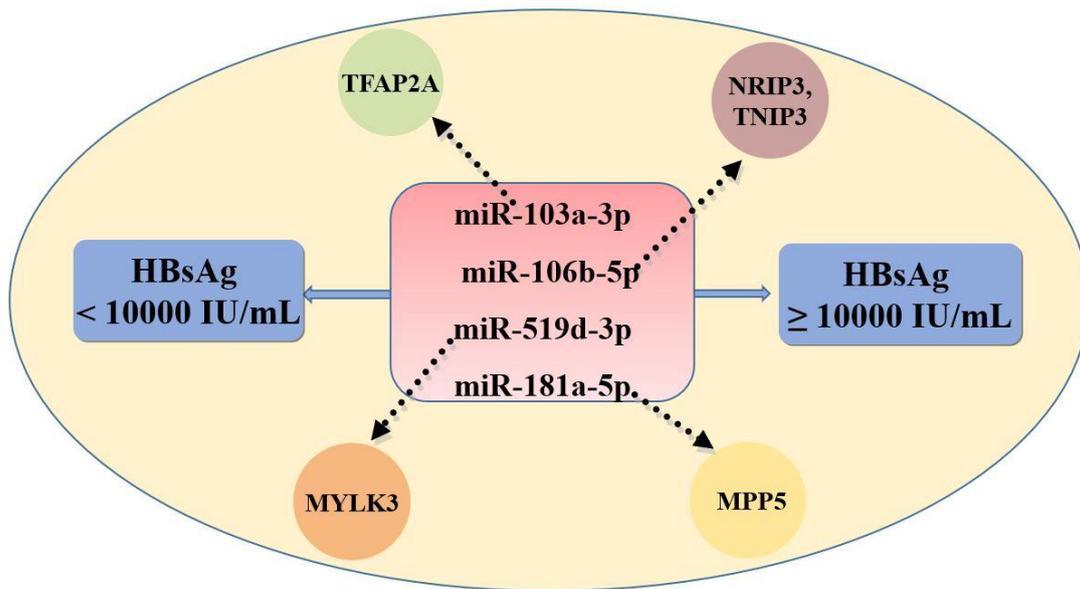
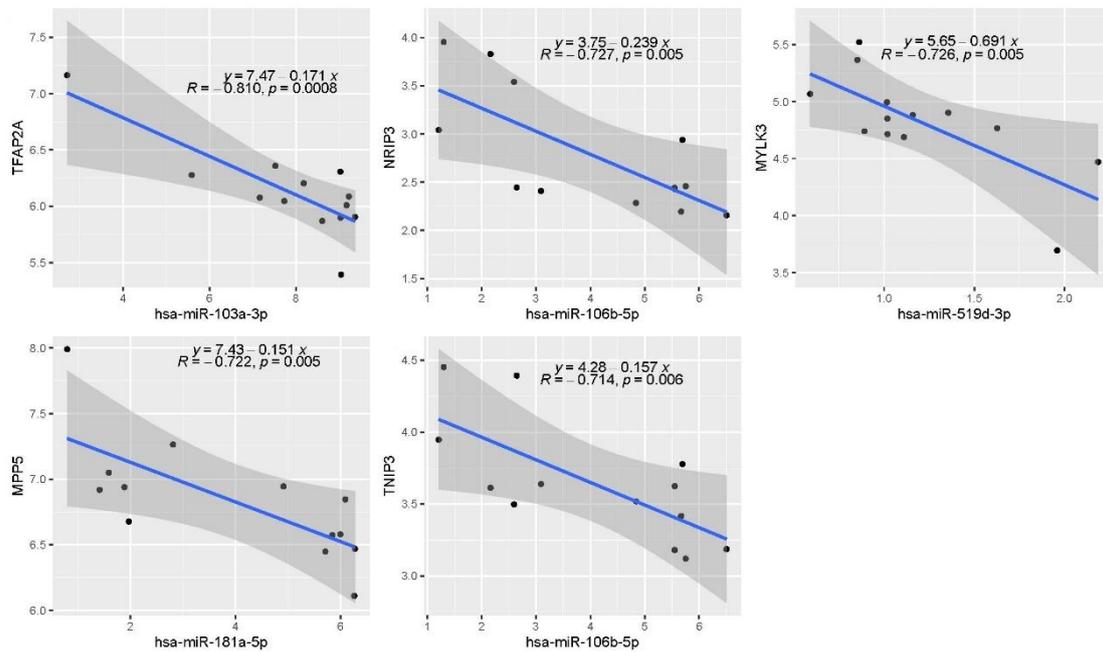


Figura 56. Correlación de miARN-ARNm en el grupo de ADNccc.





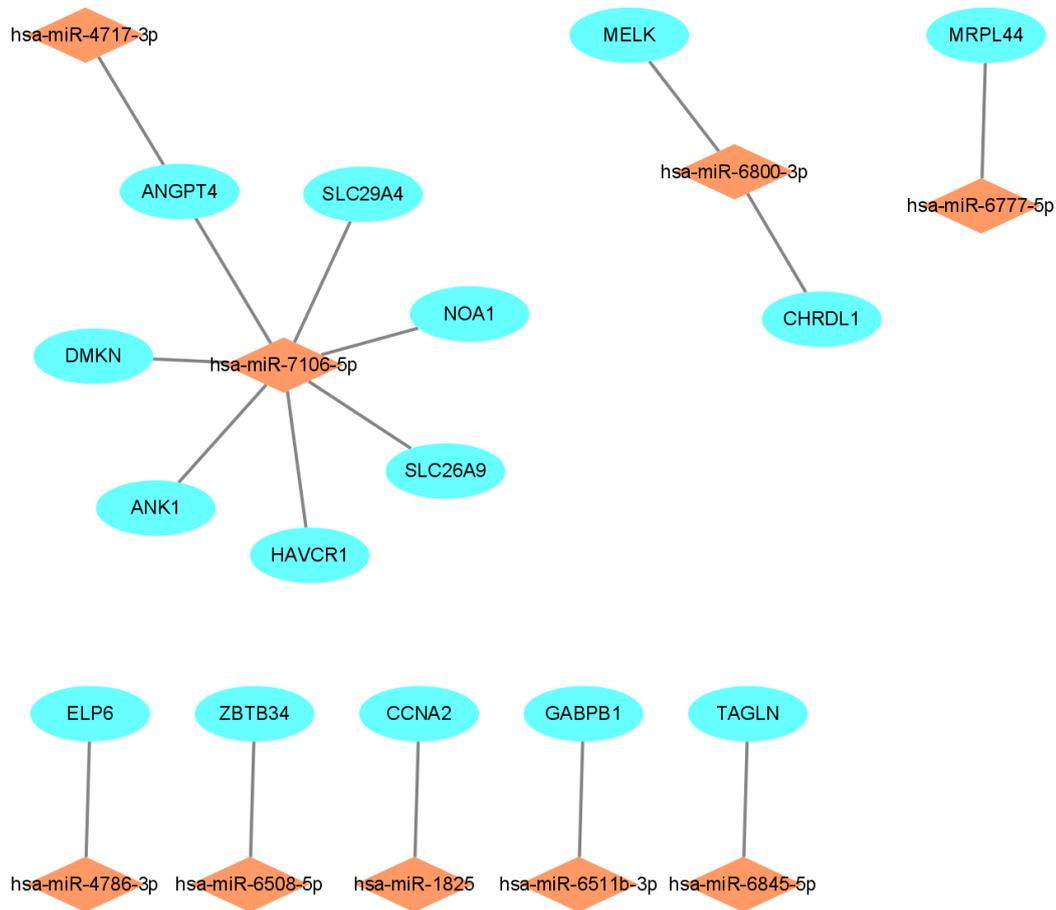
**Figura 58.** Red de miARN-ARNm construidas en el grupo de HBsAg.



**Figura 59.** Correlación de miARN-ARNm en el grupo de HBsAg.

### 3.4.4. Red de miARN-ARNm en función de tratamiento antiviral

Asimismo, calculamos el coeficiente de correlación de Pearson entre 21 ED de miARNs y 353 ED de ARNm en función de tratamiento antiviral. Los pares de interacción que están correlacionados negativamente ( $r < 0$ ) y que existen en *miRTarBase* se presentan en la Figura 60. Sólo hay 3 pares de interacción miARN-ARNm (miR-6845-5p - TAGLN, miR-4786-3p - ELP6 y miR-6800-3p - CHRDL1) con valor de  $p < 0,05$  (Figura 61). Dentro de ellos, el par ARN-ARNm que estaba más fuertemente correlacionados fue miR-6845-5p - TAGLN, con  $r = - 0,605$  y  $p = 0,028$ . La correlación de los 3 pares se puede observar en la Figura 62.



**Figura 60.** Diagrama de interacción miARN-ARNm en función de tratamiento antiviral.

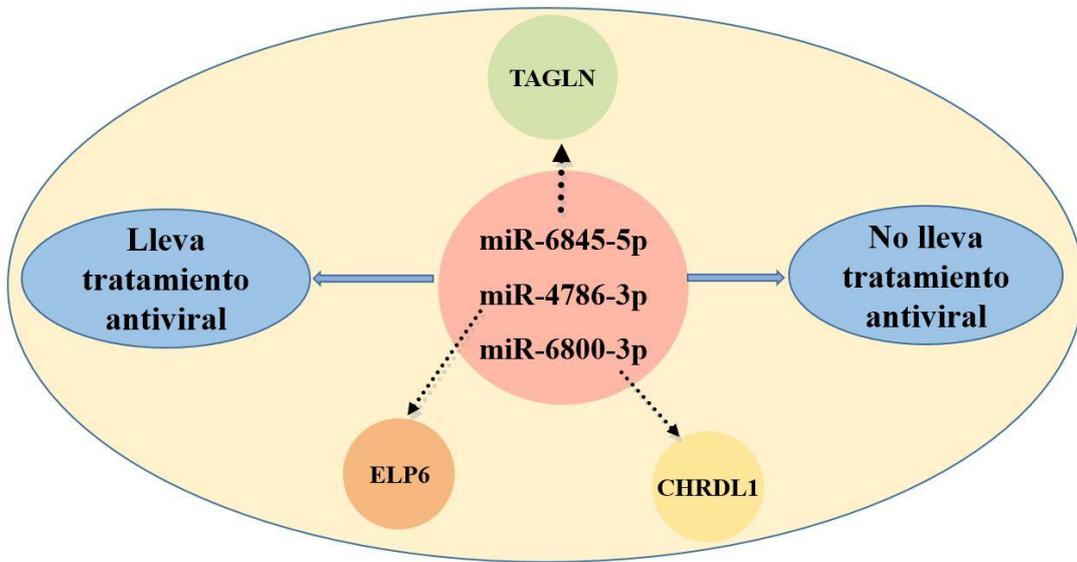


Figura 61. Red de miARN-ARNm construidas en función de tratamiento antiviral.

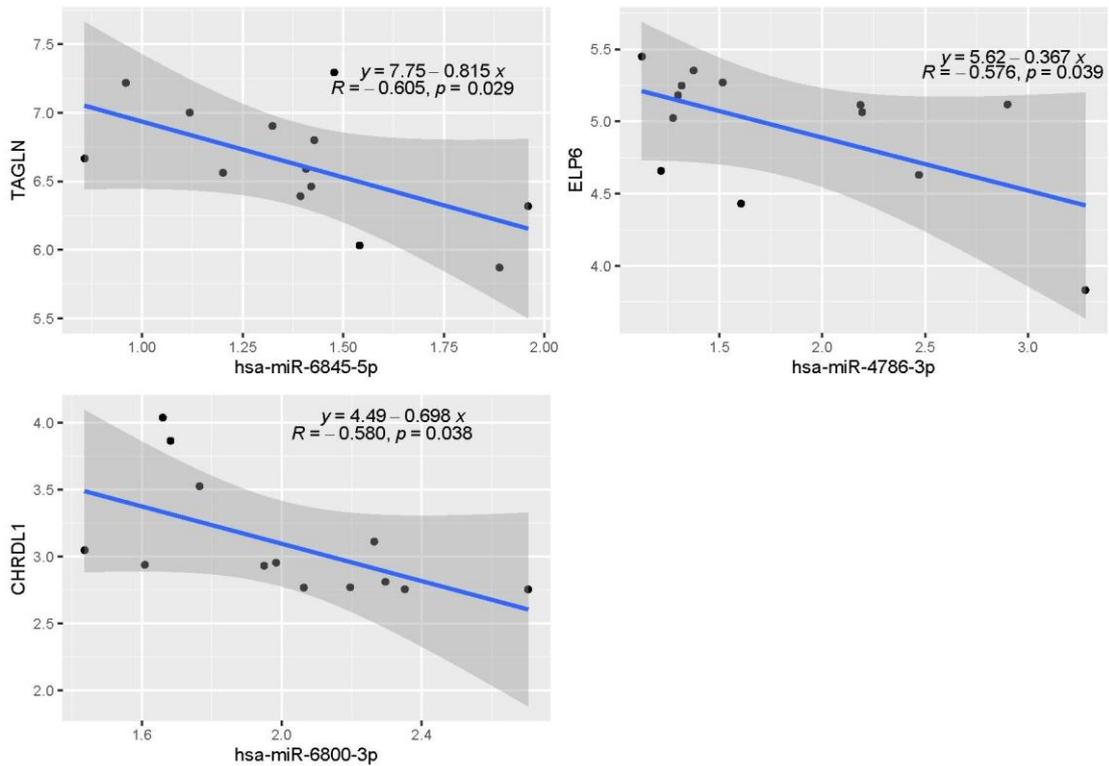


Figura 62. Correlación de miARN-ARNm en función de tratamiento antiviral.

## **CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN**

## 1. METAANÁLISIS DE MICROARN EN CHC-VHB

El carcinoma hepatocelular es uno de los tumores malignos más prevalentes a nivel mundial, la infección crónica por el VHB siendo una de las principales causas de su patogenia. La mayoría de los casos de CHC-VHB en todo el mundo ocurren en la región de Asia-Pacífico. Entre los mecanismos que conducen al CHC-VHB se encuentra un control desregulado de la proliferación celular y la apoptosis, debido en parte a alteraciones en la expresión de ciertos genes<sup>(292)</sup>. Desafortunadamente, el CHC temprano generalmente es asintomático y el tumor a menudo se descubre después de la metástasis y, en ese momento, el tumor no se puede extirpar, por lo que la tasa de mortalidad es muy alta. Aunque los tratamientos curativos que incluyen cirugía y ablación han progresado, la supervivencia general de los pacientes con CHC sigue siendo insatisfactoria debido a la naturaleza agresiva del tumor y la alta tasa de recurrencia<sup>(293)</sup>. El diagnóstico de CHC generalmente se realiza mediante técnicas de imágenes radiológicas (como ultrasonido, TAC y RMN) en combinación con los niveles de AFP y el análisis histológico de biopsias hepáticas<sup>(294)</sup>. El método de imagen tiene la ventaja de ser no invasivo, pero la limitación es que la sensibilidad es baja para detectar nódulos menores de 1cm en CHC<sup>(295)</sup>. La AFP es un biomarcador sérico estándar para el diagnóstico de CHC, y su mayor nivel de expresión está estrechamente relacionado con las características clínico-patológicas de los pacientes con CHC<sup>(296)</sup>. Aunque la AFP se ha utilizado ampliamente en el diagnóstico clínico y la monitorización del pronóstico del CHC, tiene una sensibilidad y especificidad limitadas dado que algunos nódulos hepáticos pueden no liberar AFP y los pacientes con hepatitis crónica activa o cirrosis hepática pueden tener niveles altos de AFP<sup>(297)</sup>. La biopsia hepática es actualmente el estándar de oro para el diagnóstico y la evaluación del estadio del CHC, pero debido a su invasividad y las posibles complicaciones, y la variabilidad insuficiente del muestreo y la interpretación, no se usa ampliamente en la clínica. Por lo tanto, se necesita un biomarcador circulante fiable y potente para compensar los defectos en los medios de diagnóstico existentes.

Los miARNs circulantes han sido ampliamente utilizados en los últimos años en diferentes entornos clínicos para garantizar su estabilidad, como la detección temprana, la predicción, el seguimiento de la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento. Los miARNs también están involucrados en múltiples procesos tumorales que incluyen proliferación, apoptosis, invasión y metástasis a través de remodelación de cromatina, modificaciones epigenéticas y regulación de los genes<sup>(297)</sup>. Además, se ha demostrado que los miARNs desempeñan un papel fundamental en la hepatocarcinogénesis asociada al VHB, ya que pueden actuar como supresores tumorales al regular negativamente la expresión de oncogenes o como promotores tumorales al limitar la expresión de proteínas oncosupresoras, dependiendo de la función celular de los genes diana. Varios estudios han reportado la posibilidad de los miARNs como biomarcadores no invasivos para CHC-VHB, y los resultados son satisfactorios pero inconsistentes. Por lo tanto, realizamos este metaanálisis para evaluar la utilidad de los miARNs circulantes como biomarcador no invasivo en el diagnóstico de CHC-VHB.

Se realizaron búsquedas en múltiples bases de datos y finalmente se incluyeron 32 estudios de 19 artículos con 4.553 pacientes (2.590 CHC-VHB y 1.963 controles) sobre el valor de los miARNs circulantes para el diagnóstico de CHC-VHB. En este metaanálisis, la sensibilidad combinada fue 0,83 (IC 95%: 0,79 - 0,87), la especificidad combinada fue 0,78 (IC 95%: 0,73 - 0,83) y el AUC fue 0,88 (IC 95%: 0,85 - 0,91), lo que significa que el miARN circulante tiene una excelente precisión diagnóstica para CHC-VHB. También calculamos PLR, NLR y DOR para probar aún más la capacidad de discriminación de los miARNs, que pueden proporcionar referencias más significativas para el uso clínico. La PLR, NLR y DOR combinada fueron 3,9 (IC 95%: 3,0 - 4,9), 0,21 (IC 95%: 0,16 - 0,27) y 18 (IC 95%: 12 - 27), respectivamente. Lo que muestra que la probabilidad de un diagnóstico correcto de los pacientes con CHC-VHB es 18 veces mayor que la de un diagnóstico falso negativo de los controles. Sin embargo, la PLR es inferior a 10 y el NLR es superior a 0,1, lo que no cumple los criterios generales para la decisión de adjudicación o exclusión<sup>(298)</sup>.

Además, encontramos que el miR-125b tiene un valor diagnóstico más alto para CHC-VHB que otros miARNs. La sensibilidad combinada fue 0,89 (IC 95%: 0,82 - 0,94), la especificidad fue 0,85 (IC 95%: 0,74 - 0,92), y el AUC fue de 0,94 (IC 95%: 0,91 - 0,96). Un estudio reciente reportó que el miR-125b inhibe los intermediarios del ADN-VHB y la secreción del HBsAg y HBeAg al dirigirse a la expresión de SCNN1A<sup>(142)</sup>. El miR-125b también desempeña un importante papel en la hepatocarcinogénesis relacionada con el VHB y la progresión tumoral<sup>(299)</sup>. MiR-125b puede inhibir la tumorigénesis a través de atacar a Mcl-1 e IL-6R<sup>(300)</sup>. Además, miR-125b suprime la migración e invasión de los hepatocitos al atacar directamente el oncogén LIN28B y el coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ<sup>(301)</sup>. Adicionalmente, miR-125b inhibe la proliferación celular, la migración y la invasión en el carcinoma hepatocelular al dirigirse a tiorredoxina reductasa 1 (TXNRD1)<sup>(302)</sup>. Al monitorear los cambios de miR-125b en la circulación, las personas infectadas con VHB que tienen un mayor riesgo de CHC serían detectadas antes, lo que puede ser un marcador para diagnóstico precoz de los pacientes con CHC-VHB, lo que permitiría un tratamiento temprano y mejora las tasas de supervivencia.

Posteriormente, se realizó un análisis de metarregresión y un análisis de subgrupos según el país, el perfil de miARN, el modo de regulación, tipo de control, tamaño y tipo de muestra para explorar posibles fuentes de heterogeneidad entre estudios. La metarregresión mostró que el país puede explicar la heterogeneidad de la sensibilidad, el perfil de miARN y el tamaño de muestra pueden ser fuentes potenciales para heterogeneidad de la especificidad. Los análisis de subgrupos sugirieron que el ensayo con los *clusters* de miARN mostraron un mejor valor de diagnóstico que cualquier miARN por sí solo. Un miARN simple carece de la especificidad para detectar el cáncer, porque algunos de ellos también pueden estar desregulados en enfermedades infecciosas, inflamaciones inespecíficas y lesiones agudas. En otras palabras, los *clusters* de miARN tienen mecanismos moleculares más complejos, como las redes de ARN endógeno (ceRNA) en competencia que se cruzan durante la tumorigénesis (como la aparición y el desarrollo de tumores graves), esta asociación puede ser valiosa para

la detección temprana de CHC<sup>(303)</sup>. Además, encontramos que la capacidad del miARN para distinguir el CHC-VHB de los CH-VHB es mejor que HBC, aunque todavía se necesitan estudios prospectivos a gran escala para consolidar los resultados. Aparte de eso, los resultados con un tamaño de muestra superior a 100 fueron mejor que los estudios con un tamaño de muestra menos en el diagnóstico de CHC-VHB, esto proporciona apoyo para una muestra más grande de investigación en el futuro. Nuestra investigación también encontró que los miARNs *down*-regulados mostraban un rendimiento diagnóstico mejor que los *up*-regulados. Esto puede deberse a los diferentes métodos estadísticos y plataformas utilizados en la tecnología de microarrays, los tipos de miARNs y los diferentes tamaños de muestra. Estudios previos han encontrado que la concentración de miARN en plasma es más alta que en suero, lo que puede deberse al hecho de que se retienen más proteínas en el plasma para la co-aislamiento de miARN<sup>(303)</sup>. Nuestra investigación encontró que la precisión diagnóstica de suero es ligeramente mejor que la del plasma. La elección del tipo de muestra juega un papel importante en la precisión diagnóstica del miARN circulante como biomarcador de enfermedad, por lo que se necesita más investigaciones para verificar los resultados. Aparte de eso, los miARNs producen una mejor precisión diagnóstica en China que otras poblaciones. Por lo tanto, se necesita investigación multicéntrica para validar los hallazgos.

Este metaanálisis tiene varias ventajas. En comparación con el metaanálisis anterior<sup>(304)</sup>, incluimos los miARNs detectados en los últimos estudios, y se ha evaluado exhaustivamente la eficacia diagnóstica de los miARNs circulantes para CHC-VHB. Este metaanálisis resuelve el debate sobre si los miARNs circulantes pueden usarse como posibles marcadores de diagnóstico para CHC-VHB. Además, los estudios incluidos fueron seleccionados de forma independiente por dos investigadores en función de estrictos criterios de inclusión y exclusión. Aunque hemos hecho todo lo posible para evitar el sesgo durante el proceso de nuestro estudio, todavía había algunas limitaciones. En primer lugar, pueden no haberse incluido algunos estudios valiosos a pesar de la estrategia de búsqueda integral durante nuestra búsqueda de literatura. En

segundo lugar, debido a los datos limitados de las investigaciones y los diferentes criterios, no extrajimos valores de corte, los diferentes valores de corte pueden dar lugar a conclusiones inconsistentes. En tercer lugar, se incluyó un número relativamente pequeño de pacientes en los estudios individuales, lo que limita la fuerza de las conclusiones de nuestro metaanálisis. En cuarto lugar, es importante determinar el valor diagnóstico del miARN en el CHC-VHB según el tamaño y las características del tumor. Por último, la mayoría de los estudios incluidos fueron de Asia y principalmente de China, todavía se desconoce la aplicabilidad de los miARNs circulantes en otros países y regiones. Por lo tanto, se necesita una serie de estudios clínicos a gran escala, prospectivos y multicéntricos internacionales para proporcionar evidencia de alta calidad.

En resumen, los miARNs circulantes (especialmente el miR-125b) podrían servir como un biomarcador no invasivo potencial en el diagnóstico precoz de CHC-VHB. Además, el uso de los *clusters* de miARN junto con un elevado tamaño muestral pueden ser necesarios en estudios futuros para conseguir una buena precisión diagnóstica. En el futuro, aún se necesitan estudios clínicos multicéntricos a gran escala para verificar nuestras conclusiones, a fin de aportar nuevas ideas para el diagnóstico precoz de los pacientes con CHC-VHB.

## 2. CORRELACIÓN ENTRE ADNCCC Y MARCADORES VIROLÓGICOS EN PACIENTES CON HBC-ZG

Aunque los fármacos antivirales actuales de primera línea pueden inhibir eficazmente la replicación del VHB y controlar la progresión de la enfermedad en la mayoría de los pacientes, estos fármacos rara vez conducen a la eliminación completa de la infección crónica por el VHB debido a la persistencia del ADNccc del VHB en los hepatocitos infectados, que representa el intermedio replicativo clave del VHB<sup>(305)</sup>. El papel fundamental del ADNccc intrahepático es servir como molde para la transcripción de todos los ARN virales, incluido el ARNpg, que además produce el ADN del virión descendiente<sup>(39)</sup>. Por tanto, el nivel de ADNccc intrahepático refleja la actividad de replicación del VHB, la monitorización del nivel de ADNccc intrahepático es de gran importancia para evaluar la eficacia de la terapia antiviral y estimar el criterio de valoración del tratamiento<sup>(306)</sup>. Sin embargo, en la práctica clínica real, la monitorización del ADNccc intrahepático no es fácil de generalizar debido a la naturaleza invasiva de la biopsia hepática y las posibles complicaciones. Por lo tanto, no es práctico cuantificar el ADNccc intrahepático como un diagnóstico de rutina, por lo que es necesario encontrar un marcador subrogado circulante que refleje la actividad transcripcional del ADNccc intrahepático. Estudios previos han indicado que los niveles séricos de ADN-VHB, ARNpg-VHB y qHBsAg se correlacionaron positivamente con el ADNccc intrahepático en individuos con infección crónica por VHB<sup>(307)</sup>. Otro estudio reveló que el qHBsAg sérico estaba correlacionado positivamente con el ADNccc intrahepático en pacientes HBeAg positivos, en lugar de pacientes HBeAg negativos<sup>(308)</sup>. Wang *et al.* indicaron que el ARNpg-VHB en suero se ha considerado como un nuevo biomarcador para el ADNccc intrahepático, especialmente en pacientes con supresión viral con VHB-ADN detectable bajo terapia con ANs<sup>(309)</sup>. Otro estudio encontró una correlación general moderada entre el ARNpg en suero y el ADNccc intrahepático ( $r = 0,596$ ,  $p < 0,001$ ) entre todos los pacientes reclutados; sin embargo, al clasificar a los pacientes según la historia natural de HBC

en fase de inmunotolerancia, inmunoactiva con HBeAg positiva, portador inactivo y reactivación con HBeAg negativa, la correlación desapareció en todas las fases<sup>(310)</sup>. Hasta ahora, casi no hay correlación reportada entre el ADNccc intrahepático y los marcadores séricos virales en pacientes con HBC-ZG. Entonces evaluamos la correlación entre ADNccc intrahepático y los otros marcadores de actividad virológico en pacientes con HBC-ZG.

Desde que el equipo del profesor Lu determinó que el ARN-VHB en sangre periférica es ARNpg en el año 2016<sup>(309)</sup>, el ARN-VHB ha recibido una atención cada vez mayor en los últimos años como marcador clínico subrogado de la actividad transcripcional del ADNccc intrahepático<sup>(311)</sup>. Sintetizado a partir del ADNccc del VHB intrahepático, el ARNpg-VHB puede servir como molde para la replicación viral a través de la transcripción inversa utilizando la polimerasa del VHB, así como para la síntesis de proteínas<sup>(312)</sup>. El ARNpg-VHB es valioso en el diagnóstico porque contiene información genética y su evaluación cuantitativa no se ve afectada por los complejos inmunes de anticuerpos y antígenos virales<sup>(313)</sup>. Los datos obtenidos en nuestro estudio muestran que en pacientes con HBC-ZG los niveles séricos de ARNpg-VHB está fuertemente correlacionado positivamente con los indicadores de replicación intrahepático, sobre todo el nivel de ADNccc intrahepático ( $r = 0,790$ ,  $p = 0,001$ ). Además, también encontramos que los niveles séricos de ARNpg-VHB se correlaciona positivamente con el ADN-VHB intrahepático total y ARNpg-VHB intrahepático. Como nuevo marcador viral, el ARNpg-VHB sérico puede usarse como un biomarcador sustituto del ADNccc intrahepático en pacientes con HBC-ZG. Wang *et al.*<sup>(313)</sup> revelaron que además de los marcadores de replicación viral en el hígado, el ARNpg-VHB sérico también se asocia con lesión hepática o histopatología. Más tarde, los datos de Giersch *et al.*<sup>(314)</sup> corroboraron que el ARNpg-VHB sérico puede reflejar la actividad del ADNccc intrahepático. Estudios anteriores han demostrado que la detección de los niveles de ARNpg-VHB sérico en lugar de los niveles de VHB-ADN es más útil para predecir la respuesta a la terapia con ANs, guiar la terminación del tratamiento y monitorear la aparición de mutaciones virales<sup>(313)</sup>. Además, el nivel de ARNpg-VHB

sérico puede ser un marcador subrogado para reflejar el perfil de ADNccc intrahepático en pacientes HBeAg positivos durante el tratamiento con peg-IFN<sup>(315)</sup>. Adicionalmente, Liu *et al.* concluyó que como marcador subrogado de la actividad transcripcional del ADNccc intrahepático, los niveles de ARNpg-VHB sérico pueden predecir la evolución natural de los individuos infectados por el VHB crónico, y muestra superioridad en la diferenciación de la fase de reactivación con HBeAg negativo en individuos infectados crónicos por VHB sin tratamiento previo con HBeAg negativo<sup>(311)</sup>.

El nivel sérico de qHBsAg es la primera herramienta utilizada para identificar las etapas inmunes de la infección crónica por el VHB, y también es una herramienta para reflejar la actividad del ADNccc intrahepático en pacientes con HBC<sup>(316)</sup>. Además, en los últimos años, los métodos de detección cuantitativa de HBsAg se han comercializado y utilizado ampliamente en la predicción de la eficacia antivírica y el manejo de la infección crónica por el VHB sin tratamiento previo<sup>(311)</sup>. Una correlación positiva entre el ADNccc intrahepático y qHBsAg se ha demostrado en algunos estudios, especialmente en pacientes con HBeAg positivos<sup>(317)</sup>. Sin embargo, otro estudio informó que el qHBsAg sérico se puede utilizar para predecir el nivel intrahepático de ADNccc y el ADN del VHB en pacientes con HBC con niveles bajos de HBeAg, especialmente en pacientes con HBeAg negativos. En nuestro estudio, se demostró que en pacientes con HBC-ZG, el nivel sérico de qHBsAg solo se correlacionó positivamente con el ADNccc intrahepático ( $r = 0,730$ ,  $p = 0,004$ ), y no hubo correlación con el ADN-VHB intrahepático total y ARNpg-VHB intrahepático ( $r = 0,410$ ,  $p = 0,163$  y  $r = 0,390$ ,  $p = 0,189$ , respectivamente). Sin embargo, muchos factores pueden ser obstáculos para el uso de qHBsAg sérico como biomarcador sustituto de la actividad de transcripción intrahepática del ADNccc, como la integración del ADN del VHB<sup>(318)</sup>, la retención de HBsAg relacionada con el tratamiento de ANs a largo plazo<sup>(319)</sup>. A diferencia del qHBsAg, el ARNpg-VHB se deriva solo del ADNccc intrahepático, y su cuantificación no se ve afectada por antígenos virales o complejos de anticuerpos<sup>(311)</sup>. Por lo tanto, el ARNpg-VHB sérico puede reflejar con mayor precisión la actividad transcripcional del ADNccc intrahepático.

La medición del ADN-VHB en suero se utiliza ampliamente para evaluar la actividad de la replicación del VHB. Huang *et al.* demostraron que en pacientes con HBeAg positivo sin tratamiento previo, la combinación de ADN-VHB más ARN-VHB en suero eran superiores en reflejar la actividad del ADNccc intrahepático que estos marcadores individuales<sup>(312)</sup>. Nuestro estudio reveló que en pacientes con HBC-ZG hubo correlaciones positivas significativas entre los niveles séricos de ADN-VHB con ADNccc intrahepático, ADN-VHB intrahepático total y ARNpg-VHB intrahepático ( $r = 0,660$ ,  $p = 0,013$ ,  $r = 0,770$ ,  $p = 0,002$  y  $r = 0,690$ ,  $p = 0,010$ , respectivamente). Algunos estudios demostraron que la terapia con los ANs puede reducir el ADN-VHB en suero a un nivel indetectable pero no influye directamente en la producción de HBsAg o ARNpg-VHB en suero desde ADNccc intrahepático<sup>(320)</sup>. En este sentido, qHBsAg y particularmente el ARNpg-VHB en suero parece ser mejores marcadores subrogados para ADNccc intrahepático que el VHB-ADN en suero<sup>(320)</sup>.

En nuestro estudio encontramos que los pacientes con HBC-ZG no hubo correlaciones entre los niveles de ADNccc intrahepático con los cambios histopatológicos (el grado de inflamación portal, el grado de inflamación lobulillar y el grado de fibrosis). La correlación entre el ADNccc intrahepático y el grado histológico de la inflamación hepática genera hoy en día controversia. Algunos investigadores han indicado que independientemente del estado de HBeAg, el nivel de ADNccc intrahepático se correlaciona positivamente con el grado histológico de la inflamación hepática<sup>(321)</sup>. Mientras tanto, otros investigadores no han observado una correlación estadísticamente significativa entre el ADNccc intrahepático y el grado de inflamación hepática en pacientes con HBeAg negativos<sup>(322)</sup>, mientras que otros grupos han encontrado que los pacientes con HBeAg negativos con alto nivel de inflamación hepática que corresponden más altos nivel de ADNccc intrahepático<sup>(323)</sup>. Además, en este estudio, no observamos correlación entre los niveles de AST, ALT y los indicadores de replicación intrahepática. Como uno de los marcadores de activación del sistema inmunológico, los niveles de ALT parecen no estar correlacionados ni con marcadores de replicación virológica ni con niveles de qHBsAg<sup>(322)</sup>. Sin embargo, algunos estudios

transversales demostraron que los niveles de ADNccc intrahepáticos se correlacionan positivamente con los niveles séricos de ALT<sup>(272)</sup>.

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que se ha prestado atención sobre la relación entre el ADNccc intrahepático y los marcadores séricos virales en pacientes con HBC-ZG. Sin embargo, admitimos que nuestra investigación tiene algunas limitaciones que deben abordarse. Primero, el tamaño muestral es relativamente pequeño, lo que puede limitar nuestras conclusiones. En segundo lugar, solo nos centramos en los pacientes con HBC-ZG, y la correlación puede ser diferente según las diferentes etapas de HBC. En tercer lugar, la correlación puede ser diferente según los diferentes métodos de detección de ARNpg-VHB en suero y ADNccc intrahepático. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar un protocolo preciso y estandarizado para la cuantificación de ADNccc intrahepático y ARNpg-VHB. En cuarto lugar, no podemos cuantificar los niveles séricos de HBcrAg, que es un nuevo marcador serológico, y también parece estar relacionado con el ADNccc intrahepático. Finalmente, se debe observar dinámicamente los indicadores que reflejan la replicación del VHB.

En resumen, existe una correlación significativa entre el ARNpg-VHB sérico y el ADNccc intrahepático en pacientes con HBC-ZG, lo que indica que el ARNpg-VHB sérico es un potencial biomarcador subrogado fiable del ADNccc intrahepático. El ARNpg-VHB ha mostrado una importancia clínica preliminar. Por lo tanto, esperamos realizar unas investigaciones exhaustivas para caracterizar aún más la biología molecular del ARNpg-VHB sérico y evaluar su potencial clínico.

### 3. MICROARNS EN PACIENTES CON HBC-ZG

Las interacciones entre el virus y las moléculas de la célula huésped son procesos fundamentales que determinan el estado de la infección por el VHB. Aunque su patogenia involucra diferentes factores, la investigación emergente muestra que los miARNs juegan un papel vital en la patogénesis y el desarrollo de las enfermedades infecciosas por el VHB. Los miARNs se consideran moléculas reguladoras de celulares importantes que modulan profundamente la expresión de los genes del VHB. Sus funciones están mediadas principalmente por la interacción con las transcripciones del VHB, los genes celulares y las vías de señalización que tienen un papel fundamental en la replicación viral y la patogénesis<sup>(324)</sup>. La mayoría de los pacientes con HBC pertenecen a las 5 fases de la historia natural del VHB definidas por la EASL en 2017. Sin embargo, los pacientes con HBC-ZG son una fase indeterminada, y la función de miARN en su patogénesis aún se desconoce en gran medida, aún no existe una red reguladora integral de miARN-ARNm. Entonces el objetivo de primer escenario fue identificar posibles vías reguladoras de miARN-ARNm que contribuyen a la patogénesis de HBC-ZG.

En el primer escenario, se cribaron un total de 52 ED miARNs y 1110 ED ARNm entre pacientes con HBC-ZG e individuos sanos. Mediante una serie de análisis bioinformáticos, se han identificado 4 pares de interacción miARN-ARNm que pueden estar implicados en la patogénesis de HBC-ZG, ellos son miR-199b-5p - SMARCE1, miR-199b-5p - TXNRD1, miR-23b-3p - FOSB y miR-29c-3p - XPO5. SMARCE1 es un miembro de la familia SWI / SNF de complejos remodeladores de cromatina, que desempeña un papel clave en el control transcripcional<sup>(325)</sup>. Pan demostró que la sobreexpresión de SMARCE1 suprimió la expresión y replicación del VHB, mientras que la eliminación de SMARCE1 promovió la expresión y replicación del VHB<sup>(326)</sup>. SMARCE1 reprimió la replicación del VHB mediante la unión al promotor central mutante del VHB en las células HepG2, lo que también reveló que SMARCE1 podría reprimir la replicación del VHB<sup>(326)</sup>. Wu *et al.*<sup>(325)</sup> demostró que miR-29a promovió la

replicación y expresión del VHB mediante la inhibición dirigida de la expresión de SMARCE1. Wang mostró que la sobreexpresión de miR-802 promovió la replicación del ADN del VHB y la expresión de HBsAg y HBeAg mediante la regulación de la expresión de SMARCE1<sup>(327)</sup>. La enzima TXNRD1 es excepcionalmente capaz de utilizar electrones de NADPH para recuperar el estado reducido de TRX1, que es un contribuyente clave a la homeostasis redox intracelular y promueve el metabolismo de la energía y los carbohidratos<sup>(302)</sup>. Además, TXNRD1 está *up*-regulado en muchas neoplasias malignas humanas como CHC y promueve la progresión del cáncer<sup>(328)</sup>, y la atenuación de los niveles de TXNRD1 suprime eficazmente el crecimiento de células tumorales<sup>(329)</sup>. La investigación más reciente mostró que miR-23b-3p actúa como un miARN oncogénico en líneas celulares de CHC, su sobreexpresión en tejido de CHC reseca es un factor pronóstico importante para la supervivencia global<sup>(330)</sup>. Además, Sun *et al.* confirmó que miR-23b-3p sérico puede usarse como un nuevo biomarcador no invasivo para la detección temprana de CHC en pacientes de alto riesgo<sup>(331)</sup>. FOSB conocido como protooncogenes, muchos estudios han informado que el FOSB estuvo involucrado en la proliferación, migración e invasión de algunas neoplasias malignas y también se ha asociado con la muerte celular apoptótica<sup>(332)</sup>. Un reciente estudio se informa que miR-29c-3p inhibe significativamente la expresión del gen S, lo que proporciona una posible diana terapéutica para el tratamiento de los pacientes con la infección por el VHB<sup>(333)</sup>. La XPO5 pertenece a la familia de las carioferinas y es necesaria para el transporte de ARN pequeños y proteínas de unión a ARN bicatenarias desde el núcleo hasta el citoplasma<sup>(334)</sup>. La función alterada de XPO5 podría conducir a la falla del transporte de miARN precursor<sup>(335)</sup>, lo que resultaría en una expresión anormal de miARN y produciría efectos sobre la tumorigénesis. El papel de XPO5 desregulado se ha informado en diferentes cánceres como CHC, cáncer de mama, cáncer colorrectal, adenocarcinoma de pulmón y de próstata<sup>(334)</sup>.

Muchas vías de señalización están relacionadas con la infección por el VHB, por ejemplo, vía de señalización NF- $\kappa$ B, Wnt /  $\beta$  catenina and Akt / mTOR. Un estudio demostró que la activación de la vía NF- $\kappa$ B causa inflamación y daño hepático en

pacientes con infección crónica por el VHB<sup>(336)</sup>. La vía de señalización Wnt /  $\beta$ -catenina juega un papel importante en la patología y fisiología del hígado y se ha identificado como un factor principal en el desarrollo de CHC<sup>(337)</sup>. Xiang *et al.* demostró que la activación de la vía de señalización Akt / mTOR regula negativamente la replicación del VHB<sup>(338)</sup>. Los resultados del análisis de enriquecimiento de las vías de señalización KEGG sugirieron que la patogénesis y el desarrollo de HBC-ZG están asociados con el ciclo celular, metabolismo del retinol, degradación de ácidos grasos, replicación del ADN, metabolismo del triptófano, metabolismo de beta-alanina, metabolismo de alanina, aspartato y glutamato y metabolismo de histidina. La anomalía del ciclo celular evidentemente tiene un papel clave durante el proceso de la infección por el VHB y CHC. Se cree que el VHB es un “metabolovirus” y su transcripción depende en gran medida del metabolismo hepático y factores de transcripción celular<sup>(339)</sup>. Las alteraciones en el metabolismo del retinol juegan un papel fundamental en el proceso de fibrosis hepática, y las enzimas involucradas en el metabolismo del retinol están relacionadas con el CHC<sup>(340)</sup>. Estudios anteriores han demostrado que los cambios en el metabolismo del triptófano son un factor de riesgo para la HBC y la cirrosis hepática. En el análisis de GSEA, los ED genes con la puntuación de enriquecimiento más alta estaban estrechamente asociados con las vías de señalización relacionadas con el complemento y las cascadas de coagulación, la interacción del receptor de citoquinas y citoquinas, el metabolismo de los fármacos citocromo P450 y el metabolismo de los ácidos grasos. Zhang *et al.* mostró que C8B en la vía de señalización de complemento y las cascadas de coagulación sirve como un candidato predictivo para la supervivencia en pacientes con CHC-VHB<sup>(341)</sup>. En un análisis bioinformático sistemático, Tang encontró que la proteína humana La puede desempeñar un papel importante en el desarrollo y progresión del VHB a través de la interacción del receptor de citoquinas y citoquinas<sup>(342)</sup>. Es cierto que estos hallazgos sobre las vías de enriquecimiento han contribuido a un progreso importante en la comprensión de la patogénesis del HBC-ZG.

El ADNccc se mantiene en el núcleo de los hepatocitos infectados como un minicromosoma estable y funciona como molde transcripcional para la producción de

todos los productos génicos virales y, por tanto, es la base molecular de la persistencia del VHB<sup>(343)</sup>. La eliminación, destrucción o inhibición del ADNccc intrahepático juega un papel clave para la erradicación del virus. Actualmente, aunque existen estrategias de tratamiento eficaces basadas en interferón y ANs para suprimir la replicación del VHB, sigue siendo muy difícil de lograr la cura completa de la hepatitis B, es decir, la erradicación de todas las formas de ADN del VHB, incluido el ADNccc<sup>(344)</sup>. Las modificaciones epigenéticas de los minicromosomas del ADNccc, como la metilación del ADN y las modificaciones de las histonas, se han implicado en la regulación de la actividad transcripcional del ADNccc del VHB<sup>(345)</sup>. Además, la tecnología de edición genética que incluye nucleasas con dedos de zinc, TALEN y el sistema CRISPR/Cas están estudiando para apuntar al ADNccc de las células infectadas<sup>(345)</sup>. Aunque la edición genética sigue siendo un área de investigación muy activa, existen varias advertencias y limitaciones, como el riesgo de los efectos fuera del objetivo (*off-target effects*).

La creciente evidencia indica que los miARNs podrían regular la expresión de ADNccc y participar en la historia natural de la enfermedad. Durante la infección por HBC, los productos de la replicación y expresión viral conducen a una expresión anormal de miARNs endógenos y contribuyen a la infección persistente<sup>(149)</sup>. Los miARNs pueden influir en la replicación del VHB directamente, uniéndose a las transcripciones del VHB, o indirectamente, al dirigirse a los factores celulares implicados en la replicación del VHB<sup>(346)</sup>. Por ejemplo, miR-548ah promueve la replicación y expresión del VHB dirigiéndose a la HDAC4<sup>(149)</sup>. En consecuencia, la inhibición de HDAC4 por el miR-548ah podría influir en el estado de desacetilación de las histonas que se unen al ADNccc, mejorando así la replicación del ADNccc<sup>(149)</sup>. MiR-146a regula el nivel de transcripción y expresión de la proteína endonucleasa flap 1 (FEN1: que puede reparar el ADNrc al ADNccc), a través del gen diana quinasa 1 asociada al receptor de interleucina-1 / factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (IRAK1/TRAF6), y promueve la replicación del VHB<sup>(347)</sup>. Zhang demostró que miR-449a se dirige a la proteína 5 de unión al elemento de respuesta al

AMP cíclico (CREB-5), que a su vez induce la expresión de FXR, un factor clave en el metabolismo de los ácidos biliares que también puede regular la actividad del ADNccc en algunos sistemas de replicación del VHB<sup>(177)</sup>. Los miARNs se han investigado no solo para comprender los mecanismos de patogénesis y desarrollo de la enfermedad, sino también para encontrar dianas novedosas y eficaces de la infección y la replicación del VHB para buscar nuevas estrategias terapéuticas de la infección por el VHB. Ha habido varias publicaciones demostrando el efecto de los miARNs sobre el ADNccc en HBC, pero su efecto en los pacientes con HBC-ZG aún se desconoce. Por tanto, explorar el papel regulador de los miARNs en la expresión del ADNccc en los pacientes con HBC-ZG, establecer una red de interacción miARN-ARNm y proporcionar una base teórica para encontrar nuevas dianas terapéuticas del VHB es de vital importancia.

En segundo escenario dividimos a los pacientes con HBC-ZG en dos grupos según el nivel de ADNccc intrahepático. Se cribaron un total de 19 ED miARNs, incluidos 7 ED miARNs *up*-regulados y 12 ED miARNs *down*-regulados, y 340 ED ARNm, incluidos 180 ED ARNm *up*-regulados y 160 ED ARNm *down*-regulados. A través de una serie de análisis bioinformáticos, se estableció una posible red reguladora de miARN-ARNm. Se obtuvieron un total de 6 pares de miARN-ARNm (miR-4295 - ZNF224, miR-4271 - SMYD5, miR-1281 - KPNA2, miR-1281 - GPN2, miR-8071 - TMEM184B y miR-575 - POLD3), entre ellos miR-4295 - ZNF224 mostró una correlación relativamente alta.

Las proteínas de dedos de zinc de caja asociadas a Kruppel (KRAB-ZFP) constituye la familia más grande de los reguladores transcripcionales y supresores epigenéticos encontrados en vertebrados superiores<sup>(348)</sup>. El genoma humano comprende más de 400 genes codificadores de proteínas KRAB-ZFP, la mayoría de ellos se localizan dentro de los 25 *clusters* principales, y el más grande se localiza en el cromosoma 19<sup>(349)</sup>. ZNF224 es un miembro de la familia de KRAB-ZFP, se expresa diferencialmente en células y tejidos humanos y, de acuerdo con el entorno celular distintivo, muestra diferentes funciones esenciales en la regulación génica

transcripcional o postranscripcional<sup>(350)</sup>. Originalmente se identificó como un represor transcripcional involucrado en el silenciamiento específico de genes a través del reclutamiento del correpresor proteína 1 asociada a caja asociadas a Kruppel (KAP1), actividades de modificación de la cromatina y la proteína arginina metiltransferasa 5 (PRMT5) en el promotor de sus genes diana<sup>(350)</sup>. En la carcinogénesis, a ZNF224 se le asignó una función dual de supresor de tumores y oncogén, provocando así la apoptosis o estimulando la proliferación celular<sup>(349)</sup>. Su función como oncogén se descubrió en el cáncer de vejiga<sup>(351)</sup>, en el cáncer de mama<sup>(352)</sup> y en la leucemia linfocítica crónica<sup>(353)</sup>, específicamente en términos de aumento de la quimiorresistencia frente a camptotecina y fludarabina, respectivamente. Sin embargo, el ZNF224 en la leucemia mieloide crónica actúa como un supresor de tumores que puede promover la expresión de genes apoptóticos y reprimir la expresión de genes antiapoptóticos para mejorar la resistencia a los fármacos<sup>(354)</sup>.

MiR-4295 es un miARN recientemente identificado y solo existen unos pocos estudios al respecto. Se ha demostrado que miR-4295 tiene un papel esencial en la carcinogénesis y progresión tumoral. Por ejemplo, miR-4295 participa en la promoción del crecimiento de células de cáncer de vejiga al dirigirse al gen 1 de translocación de células B (BTG1)<sup>(355)</sup>; miR-4295 contribuye a la proliferación celular y la invasión del adenocarcinoma ductal pancreático a través de glypican-5 (GPC5)<sup>(356)</sup>; miR-4295 también promueve la proliferación celular, la migración y la invasión del osteosarcoma mediante la focalización factor regulador de interferón 1 (IRF1)<sup>(357)</sup>.

Aunque actualmente no existe ningún estudio sobre la relación de miR-4295 y ZNF224 con el proceso de infección por el VHB, la función de enriquecimiento de la vía GO y KEGG está relacionada principalmente con el proceso biológico del virus de la hepatitis B. Los términos GO más enriquecidos estaban relacionados con la regulación del ciclo de vida viral, la regulación del proceso viral, la regulación de la replicación del genoma viral y la regulación de la quinasa I-κB / NF-κB. El análisis de enriquecimiento de la vía KEGG sugirió que estos objetivos predichos estaban

relacionados con la hepatitis B e influenza A. Según un análisis, la vacunación anual contra la influenza puede reducir el riesgo de hospitalización y mortalidad en pacientes con infección crónica por el VHB, implica que la terapia diana de la influenza puede tener algún efecto sobre la infección por VHB<sup>(358)</sup>. NF- $\kappa$ B es un importante activador de la expresión de genes antiapoptóticos, que podría ser el componente más importante de la maquinaria promotora de tumores<sup>(359)</sup>. La activación de la señalización de NF- $\kappa$ B es un evento indicativo durante la infección viral, que induce la expresión de numerosos genes relacionados con la inflamación, la defensa antiviral y otros procesos celulares críticos como la apoptosis<sup>(360)</sup>. NF- $\kappa$ B puede ser activado por HBsAg, así como por HBcAg y HBxAg. El HBxAg tiene 154 aminoácidos de longitud, lo que interfiere con la transcripción, la progresión del ciclo celular, la transducción de señales, la degradación de proteínas, la apoptosis y la estabilidad cromosómica en el huésped<sup>(359)</sup>. HBx es un regulador multifuncional de la transducción de señalización celular y un potente activador de NF- $\kappa$ B. La activación de la señalización de NF- $\kappa$ B también puede restringir la transcripción y replicación del VHB. Además, se ha documentado que el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y el MYD88 de la vía de señalización del interferón activan la señalización de NF- $\kappa$ B y reprimen la replicación del VHB<sup>(360)</sup>. Además, NF- $\kappa$ B p65 podría competir con el factor de transcripción Sp1 para unirse a los promotores del VHB<sup>(360)</sup>.

La cuantificación del HBsAg en suero se usa ampliamente para predecir la actividad de la enfermedad. Además, la obtención de qHBsAg puede revelar la presencia de ADNccc y predecir respuestas favorables a la terapia antiviral y el aclaramiento sérico de HBsAg<sup>(361)</sup>. Estudios anteriores han demostrado que los niveles medios de qHBsAg varían a lo largo de las diferentes fases de la infección por VHB<sup>(361)</sup>. Los niveles bajos de qHBsAg pueden identificar a los pacientes que tienen más probabilidades de tener un aclaramiento sérico de HBsAg<sup>(362)</sup>. Por lo tanto, el propósito del tercer escenario es encontrar los miARNs que puedan reflejar el aclaramiento sérico basado en diferentes niveles de qHBsAg, y establecer una red de interacción miARN-ARNm.

Se cribaron un total de 41 ED miARNs, incluidos 21 ED miARNs *up*-regulados y 20 ED miARNs *down*-regulados, y 297 ED ARNm, incluidos 151 ED ARNm *up*-regulados y 146 ED ARNm *down*-regulados. Se estableció una posible red reguladora de miARN-ARNm a través de una serie de análisis bioinformáticos. Se obtuvieron 5 pares de miARN-ARNm que se correlacionan fuertemente (miR-103a-3p - TFAP2A, miR-106b-5p - NRIP3, miR-106b-5p - TNIP3, miR-519d-3p - MYLK3 y miR-181a-5p - MPP5), dentro de ellos, el miR-103a-3p - TFAP2A estaba más fuertemente correlacionados en comparación con otras. El factor de transcripción AP-2 alfa (TFAP2A) es un mediador crítico en el desarrollo embrionario y se ha revelado por su función fundamental en la carcinogénesis<sup>(363)</sup>. Sin embargo, debido a la heterogeneidad del cáncer y la diversidad transcripcional, TFAP2A ha mostrado efectos paradójicos en diferentes tumores<sup>(363)</sup>. Por ejemplo, estudios previos han demostrado que TFAP2A puede contribuir a la expresión de Raf1 inducida por HBx en hepatocitos, lo que proporciona un posible mecanismo para la aparición y el desarrollo de CHC-VHB<sup>(364)</sup>. Además, en cáncer de mama, glioma y cáncer de colon, TFAP2A se comporta más como un supresor de tumores, mientras que en neuroblastoma, cáncer de páncreas y leucemia, muestra potencial oncogénico<sup>(365)</sup>. Liu *et al.* demostró que el MFPP5 está *up*-regulado en el tejido hepático de los pacientes portadores inactivos del VHB en comparación con pacientes inmunotolerantes, que tal vez participar en el control de la replicación del VHB y determinar el estado inactivo de la infección por VHB<sup>(366)</sup>.

Los términos GO más enriquecidos en proceso biológico fue respuesta a la vitamina. Estudios previos han demostrado que las vitaminas pueden estar involucradas en el proceso de infección por el VHB. Por ejemplo, el ácido retinoico, un componente de la vitamina A, puede promover y mejorar la transcripción y replicación del VHB mediante la activación de RXRa; además, la infección por el VHB puede promover proteínas relacionadas con el metabolismo del retinol<sup>(367)</sup>. Otra investigación muestra que la vitamina D también juega un papel importante en la enfermedad hepática metabólica e inflamatoria.

Las indicaciones del tratamiento antiviral de la HBC se basan principalmente en la combinación de tres criterios: niveles séricos de ADN-VHB, valores de ALT y gravedad de la lesión hepática evaluada mediante biopsia hepática o métodos no invasivos. Los pacientes deben ser tratado cuando tienen niveles de ADN-VHB superiores a 2.000 UI/ml, niveles anormales de ALT sérica persistentes o intermitentes y al menos necroinflamación y/o fibrosis moderada. Sin embargo, el tratamiento de HBC-ZG debe ser individualizado, y requiere equilibrar los riesgos y beneficios para los resultados de salud. Aunque los niveles bajos de replicación del VHB y la ausencia de daño hepático significativo son factores de buen pronóstico en la historia natural de la HBC, no se puede descartar que algunos de estos pacientes puedan estar infectados con cepas mutantes asociadas con un alto riesgo de CHC<sup>(368)</sup>. El tratamiento antiviral en HBC-ZG es un tema controvertido. Un estudio de Bonacci y sus colegas mostraron que la mayoría de los pacientes caucásicos con HBC-ZG presentaron una historia natural relativamente benigna. Después de un seguimiento de 8 años, 45% de los pacientes con HBC-ZG pasaron a la fase de infección crónica por VHB con HBeAg negativo (anteriormente denominado fase de portador inactivo); con solo el 6,3% progresaron a hepatitis crónica por VHB con HBeAg negativo que cumplieron los criterios de tratamiento; la fibrosis se mantuvo estable y ningún paciente desarrolló a cirrosis; y solo 1 paciente desarrolló CHC sin cirrosis<sup>(61)</sup>. Este estudio mostró buen resultado en ausencia de tratamiento después de un seguimiento a largo plazo, y que la terapia antiviral se puede evitar o retrasar de manera segura en los pacientes caucásicos con HBC-GZ. Sin embargo, otros estudios han observado que los pacientes con HBC-ZG no tratados tenían un mayor riesgo de eventos clínicos que los pacientes tratados<sup>(369)</sup>.

En el cuarto escenario hicimos un seguimiento de los pacientes con HBC-ZG durante tres años. Al comparar ED de miARNs y ARNm entre los pacientes con HBC-ZG que reciben terapia antiviral y los que no reciben tratamiento, intentamos descubrir la red reguladora de miARN-ARNm capaz de predecir los pacientes HBC-ZG que requerirán terapia antiviral. Se cribaron un total de 21 ED miARNs, incluidos 3 ED miARNs *up*-regulados y 18 ED miARNs *down*-regulados, y 353 ED ARNm, incluidos

177 ED ARNm *up*-regulados y 176 ED ARNm *down*-regulados. A través de una serie de análisis bioinformáticos, se obtuvieron un total de 3 pares de miARN-ARNm significativos (miR-6845-5p - TAGLN, miR-4786-3p - ELP6 y miR-6800-3p - CHRDL1), dentro de ellos, el miR-6845-5p - TAGLN estaba más fuertemente correlacionado en comparación con otras. La transgelina (TAGLN) es una proteína de unión a actina que pertenece a la familia de las calponinas y se localiza en el músculo liso vascular y visceral, y también se expresa en fibroblastos, células endoteliales e inmunes<sup>(370)</sup>. TAGLN está implicado en varios procesos biológicos relacionados con la progresión del cáncer, como la proliferación, diferenciación, migración, invasión y apoptosis<sup>(371)</sup>. También se informa que TAGLN es un supresor de tumores, especialmente en CHC<sup>(371)</sup>. Otros estudios previos han demostrado que TAGLN puede ser un factor positivo del huésped inducido por HBx, está involucrado en la transcripción y replicación del VHB, así como en la fibrosis y tumorigénesis hepática relacionadas con HBx<sup>(372)</sup>. Un estudio reciente demostró que TAGLN podría ser un objetivo importante en JS-K (JS-K, un diolato de diazenio que libera óxido nítrico, es eficaz contra varios tumores) contra CHC-VHB<sup>(373)</sup>.

Los análisis de GO y GSEA sugirieron que las vías están principalmente enriquecidas en el proceso metabólico de los ácidos grasos. El hígado es el órgano principal para la síntesis y circulación de lípidos, juega un papel importante en el metabolismo de los lípidos, como la oxidación y degradación de ácidos grasos y la producción de cuerpos cetónicos. Los cambios metabólicos causados por el VHB están asociados con el hígado graso y la inflamación. Anomalía en la degradación de ácidos grasos podrían inducir un hígado graso por la infección crónica por el VHB<sup>(374)</sup>, se informa que HBx juega un papel importante en este proceso patológico<sup>(375)</sup>.

En resumen, encontramos que los miR-199b-5p - SMARCE1 y miR-199b-5p - TXNRD1, miR-23b-3p - FOSB y miR-29c-3p - XPO5 podrían ser posible red reguladora que contribuya a la patogénesis de HBC-ZG. Establecimos una posible red reguladora de miARN-ARNm relacionada con el nivel de expresión de ADNccc

intrahepático en pacientes con HBC-ZG. La disminución de la expresión de miR-4295 en pacientes con HBC-ZG con niveles bajos de ADNccc está relacionada con el aumento de la expresión de ZNF224, que está involucrado en el proceso biológico de la replicación del VHB y la regulación de su ciclo de vida. Además, especulamos audazmente que el par de interacción miR-103a-3p - TFAP2A puede usarse para predecir el posible aclaramiento sérico de HBsAg en pacientes con HBC-ZG, lo que proporciona una nueva idea para el tratamiento de la hepatitis B. Por último, durante el seguimiento de tres años de los pacientes con HBC-ZG, encontramos que el nivel de miR-6845-5p fue significativamente disminuida en los pacientes que necesitan recibir terapia antiviral y, que están relacionado con la aumentada de TAGLN. Suponemos que la interacción de miR-6854-5p - TAGLN puede servir como biomarcador de la necesidad de terapia antiviral en pacientes con HBC-ZG, que puede estar relacionada con la progresión de la enfermedad hepática. En el futuro, se necesitan más investigaciones para verificar nuestros hallazgos actuales, aclarar los mecanismos por los cuales se altera la expresión de los miARNs del huésped durante la infección y su impacto en la función celular.

Aunque realizamos un análisis exhaustivo de la red reguladora de miARN-ARNm involucrada en pacientes con HBC-ZG, e identificamos con éxito varias vías potenciales de miARN-ARNm, existen algunas limitaciones en este estudio. En primer lugar, el tamaño de la muestra es relativamente pequeño, contiene solo 13 muestras de tejido hepático. En segundo lugar, la red de miARN-ARNm objetivo no se valida mediante experimentos *in vivo* e *in vitro*. En tercer lugar, el tiempo de seguimiento es corto. Por lo tanto, en el futuro, se necesitan muestras clínicas más grandes y los experimentos correspondientes para hacer la verificación de nuestros resultados y, además, se necesita un estudio longitudinal de seguimiento más prolongado para aclarar la progresión de la enfermedad hepática en estos pacientes.

## **CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

- Los miARNs circulantes (especialmente el miR-125b) podrían servir como un biomarcador no invasivo potencial en el diagnóstico precoz de CHC-VHB, además, el uso de los *clusters* de miARN pueden mejorar la precisión diagnóstica.
- Existe una correlación significativa entre el ARNpg-VHB sérico y el ADNccc intrahepático en pacientes con HBC-ZG, lo que indica que el ARNpg-VHB sérico es un potencial biomarcador subrogado fiable del ADNccc intrahepático.
- MiR-199b-5p - SMARCE1, miR-199b-5p - TXNRD1, miR-23b-3p - FOSB y miR-29c-3p - XPO5 son las posibles redes reguladoras puedan estar involucrados a la patogénesis de HBC-ZG.
- La expresión de miR-4295 está reducida en pacientes con HBC-ZG con niveles bajos de ADNccc, lo que está relacionado con el aumento de la expresión de ZNF224, y está involucrado en la replicación del virus, la regulación del ciclo de vida del virus y la regulación replicativa del genoma viral, cuál puede ser en un objetivo terapéutico potencial para HBC.
- El par de interacción miR-103a-3p - TFAP2A puede usarse para predecir el posible aclaramiento sérico de HBsAg en pacientes con HBC-ZG, lo que proporciona una nueva idea para el tratamiento de la hepatitis B.
- La interacción de miR-6854-5P - TAGLN puede servir como biomarcador de la necesidad de terapia antiviral en pacientes con HBC-ZG, que puede estar relacionada con la progresión de la enfermedad hepática.

## **CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA**

## BIOLOGRAFÍA

1. Reuben A. The thin red line. *Hepatology*. 2002;36(3):770-773.
2. Maccallum FO. Homologous Serum Hepatitis. *Proc R Soc Med*. 1946;39(10):655-7.
3. Blumberg BS. Polymorphisms of the serum proteins and the development of iso-precipitins in transfused patients. *Bull N Y Acad Med*. 1964;40(5):377-86.
4. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*. 1970;1(7649):695-8.
5. Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature*. 1979;281(5733):646-50.
6. Gust ID, Burrell CJ, Coulepis AG, Robinson WS, Zuckerman AJ. Taxonomic classification of human hepatitis B virus. *Intervirology*. 1986;25(1):14-29.
7. Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H, Gerlich WH. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol*. 1984;52(2):396-402.
8. Montoya AIT. hepatitis B. *Medicina & Laboratorio*. 2011;17(7):311-29.
9. Huovila AP, Eder AM, Fuller SD. Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *J Cell Biol*. 1992;118(6):1305-20.
10. Lamontagne RJ, Bagga S, Bouchard MJ. Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis. *Hepatoma Res*. 2016;2:163-86.
11. Glebe D, Bremer CM. The molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis*. 2013;33(2):103-12.
12. Miller RH, Kaneko S, Chung CT, Girones R, Purcell RH. Compact organization of the hepatitis B virus genome. *Hepatology*. 1989;9(2):322-7.
13. Kramvis A. The clinical implications of hepatitis B virus genotypes and HBeAg in pediatrics. *Rev Med Virol*. 2016;26(4):285-303.
14. Radziwill G, Tucker W, Schaller H. Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J Virol*. 1990;64(2):613-20.
15. Echevarria-Mayo JM. Etiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Enferm Infecc*

Microbiol Clin. 2006;24(1):45-56.

16. Hu Z, Zhang Z, Doo E, Coux O, Goldberg AL, Liang TJ. Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex. *J Virol.* 1999;73(9):7231-40.

17. Su H, Yee JK. Regulation of hepatitis B virus gene expression by its two enhancers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89(7):2708-12.

18. Zhou DX, Yen TS. Differential regulation of the hepatitis B virus surface gene promoters by a second viral enhancer. *J Biol Chem.* 1990;265(34):20731-4.

19. Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol.* 2014;20(18):5427-34.

20. Rendon JC, Cortes-Mancera F, Duque-Jaramillo A, Ospina MC, Navas MC. Analysis of hepatitis B virus genotypes by restriction fragment length polymorphism. *Biomedica.* 2015;36(0):79-88.

21. Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol.* 2014;20(18):5427-34.

22. Olinger CM, Jutavijittum P, Hübschen JM, Yousukh A, Samounry B, Thammavong T, et al. Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(11):1777-80.

23. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, et al. 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(20):10538-47.

24. Aragri M, Alteri C, Battisti A, Di Carlo D, Minichini C, Sagnelli C, et al. Multiple Hepatitis B Virus (HBV) Quasispecies and Immune-Escape Mutations Are Present in HBV Surface Antigen and Reverse Transcriptase of Patients With Acute Hepatitis B. *J Infect Dis.* 2016;213(12):1897-905.

25. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol.* 1988;69 ( Pt 10):2575-83.

26. Miguel-Hernández ÁS. Variantes o mutaciones del virus de la hepatitis B. *Gac Med Bilbao*. 2018;115(2):96-103.
27. Akahane Y, Yamanaka T, Suzuki H, Sugai Y, Tsuda F, Yotsumoto S, et al. Chronic active hepatitis with hepatitis B virus DNA and antibody against e antigen in the serum. Disturbed synthesis and secretion of e antigen from hepatocytes due to a point mutation in the precore region. *Gastroenterology*. 1990;99(4):1113-9.
28. Parekh S, Zoulim F, Ahn SH, Tsai A, Li J, Kawai S, et al. Genome replication, virion secretion, and e antigen expression of naturally occurring hepatitis B virus core promoter mutants. *J Virol*. 2003;77(12):6601-12.
29. Navarro DEO, Granda S. . Mutantes del virus de la Hepatitis B en el gen S. *SEIMC*. 2006:1-5.
30. Seddigh-Tonekaboni S, Waters JA, Jeffers S, Gehrke R, Ofenloch B, Horsch A, et al. Effect of variation in the common "a" determinant on the antigenicity of hepatitis B surface antigen. *J Med Virol*. 2000;60(2):113-21.
31. Locarnini S. Primary resistance, multidrug resistance, and cross-resistance pathways in HBV as a consequence of treatment failure. *Hepatol Int*. 2008;2(2):147-51.
32. Kew MC. Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26 Suppl 1:144-52.
33. Zhang Z-H, Wu C-C, Chen X-W, Li X, Li J, Lu M-J. Genetic variation of hepatitis B virus and its significance for pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2016;22(1):126-44.
34. Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife*. 2012;1:e00049.
35. Stieger B, Hagenbuch B, Landmann L, Hochli M, Schroeder A, Meier PJ. In situ localization of the hepatocytic Na<sup>+</sup>/Taurocholate cotransporting polypeptide in rat liver. *Gastroenterology*. 1994;107(6):1781-7.
36. Stieger B. The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile

- formation. *Handb Exp Pharmacol*. 2011(201):205-59.
37. Stoeckl L, Funk A, Kopitzki A, Brandenburg B, Oess S, Will H, et al. Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis B viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(17):6730-4.
  38. Yeh CT, Wong SW, Fung YK, Ou JH. Cell cycle regulation of nuclear localization of hepatitis B virus core protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(14):6459-63.
  39. Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut*. 2015;64(12):1972-84.
  40. Nassal M. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus Res*. 2008;134(1-2):235-49.
  41. Qin Y, Tang X, Garcia T, Hussain M, Zhang J, Lok A, et al. Hepatitis B virus genotype C isolates with wild-type core promoter sequence replicate less efficiently than genotype B isolates but possess higher virion secretion capacity. *J Virol*. 2011;85(19):10167-77.
  42. Murakami S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J Gastroenterol*. 2001;36(10):651-60.
  43. Junker-Niepmann M, Bartenschlager R, Schaller H. A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J*. 1990;9(10):3389-96.
  44. Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:65-91.
  45. Bertolotti A, Ferrari C. Adaptive immunity in HBV infection. *J Hepatol*. 2016;64(1 Suppl):S71-s83.
  46. Maini MK, Gehring AJ. The role of innate immunity in the immunopathology and treatment of HBV infection. *J Hepatol*. 2016;64(1 Suppl):S60-s70.
  47. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2017;67(2):370-98.
  48. Ferrari C, Missale G, Boni C, Urbani S. Immunopathogenesis of hepatitis B. *J Hepatol*. 2003;39 Suppl 1:S36-42.

49. Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghrayeb J, Reimann KA, Purcell RH, et al. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol.* 2003;77(1):68-76.
50. Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, Ferencik S, Frilling A, Grosse-Wilde H, et al. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape. *Immunology.* 2003;109(4):487-95.
51. Sprengers D, van der Molen RG, Kusters JG, Hansen B, Niesters HG, Schalm SW, et al. Different composition of intrahepatic lymphocytes in the immune-tolerance and immune-clearance phase of chronic hepatitis B. *J Med Virol.* 2006;78(5):561-8.
52. Visvanathan K, Skinner NA, Thompson AJ, Riordan SM, Sozzi V, Edwards R, et al. Regulation of Toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein. *Hepatology.* 2007;45(1):102-10.
53. Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, Ott JJ. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet.* 2015;386(10003):1546-55.
54. MacLachlan JH, Cowie BC. Hepatitis B virus epidemiology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(5):a021410.
55. Mast EE, Weinbaum CM, Fiore AE, Alter MJ, Bell BP, Finelli L, et al. A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Part II: immunization of adults. *MMWR Recomm Rep.* 2006;55(Rr-16):1-33.
56. Liaw YF, Chen YC, Sheen IS, Chien RN, Yeh CT, Chu CM. Impact of acute hepatitis C virus superinfection in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology.* 2004;126(4):1024-9.
57. WHO. Global Hepatitis Report 2017. Available from: <http://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>.
58. AMSE. Hepatitis B. Epidemiología y situación mundial (2012). Available from:

<https://www.amse.es/informacion-epidemiologica/123-hepatitis-b-epidemiologia-y-situacion-mundial>.

59. Trepo C, Chan HL, Lok A. Hepatitis B virus infection. *Lancet*. 2014;384(9959):2053-63.
60. Mason WS, Gill US, Litwin S, Zhou Y, Peri S, Pop O, et al. HBV DNA Integration and Clonal Hepatocyte Expansion in Chronic Hepatitis B Patients Considered Immune Tolerant. *Gastroenterology*. 2016;151(5):986-98.e4.
61. Bonacci M, Lens S, Mariño Z, Londoño MC, Rodríguez-Tajes S, Mas A, et al. Anti-viral therapy can be delayed or avoided in a significant proportion of HBeAg-negative Caucasian patients in the Grey Zone. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018;47(10):1397-408.
62. Yao K, Liu J, Wang J, Yan X, Xia J, Yang Y, et al. Distribution and clinical characteristics of patients with chronic hepatitis B virus infection in the grey zone. *J Viral Hepat*. 2021; 28(7):1025–1033.
63. Terrault NA, Lok ASF, McMahon BJ, Chang KM, Hwang JP, Jonas MM, et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology*. 2018;67(4):1560-99.
64. Krugman S, Overby LR, Mushahwar IK, Ling CM, Frosner GG, Deinhardt F. Viral hepatitis, type B. Studies on natural history and prevention re-examined. *N Engl J Med*. 1979;300(3):101-6.
65. Cacoub P, Terrier B. Hepatitis B-related autoimmune manifestations. *Rheum Dis Clin North Am*. 2009;35(1):125-37.
66. Han SH. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis B. *Clin Liver Dis*. 2004;8(2):403-18.
67. Bhimma R, Coovadia HM. Hepatitis B virus-associated nephropathy. *Am J Nephrol*. 2004;24(2):198-211.
68. Nishida N, Kudo M. Clinical Features of Vascular Disorders Associated with Chronic Hepatitis Virus Infection. *Dig Dis*. 2014;32(6):786-90.
69. Hsu YS, Chien RN, Yeh CT, Sheen IS, Chiou HY, Chu CM, et al. Long-term

outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2002;35(6):1522-7.

70. Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol*. 2008;48(2):335-52.

71. CDC. Hepatitis B 2011. Available from: <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/>.

72. Guevara L. Diagnóstico de la hepatitis B. *Rev Col Gastroenterol*. 2009;24(1):13-20.

73. BP F. Histología de la biopsia hepática, enfoque para el clínico. *AMC*. 2008;50(Supl 3):19-22.

74. De Vos R, Ray MB, Desmet VJ. Electron microscopy of hepatitis B virus components in chronic active liver disease. *J Clin Pathol*. 1979;32(6):590-600.

75. Brunetto MR, Marcellin P, Cherubini B, Yurdaydin C, Farci P, Hadziyannis SJ, et al. Response to peginterferon alfa-2a (40KD) in HBeAg-negative CHB: on-treatment kinetics of HBsAg serum levels vary by HBV genotype. *J Hepatol*. 2013;59(6):1153-9.

76. Brunetto MR, Oliveri F, Colombatto P, Moriconi F, Ciccorossi P, Coco B, et al. Hepatitis B surface antigen serum levels help to distinguish active from inactive hepatitis B virus genotype D carriers. *Gastroenterology*. 2010;139(2):483-90.

77. Mak L-Y, Seto W-K, Fung J, Yuen M-F. Use of HBsAg quantification in the natural history and treatment of chronic hepatitis B. *Hepatol Int*. 2020;14(1):35-46.

78. Mak LY, Wong DKH, Cheung KS, Seto WK, Lai CL, Yuen MF. Review article: hepatitis B core-related antigen (HBcrAg): an emerging marker for chronic hepatitis B virus infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018;47(1):43-54.

79. Cornberg M, Lok AS, Terrault NA, Zoulim F. Guidance for design and endpoints of clinical trials in chronic hepatitis B - Report from the 2019 EASL-AASLD HBV Treatment Endpoints Conference. *J Hepatol*. 2020;72(3):539-57.

80. Wang J, Yu Y, Li G, Shen C, Meng Z, Zheng J, et al. Relationship between serum HBV-RNA levels and intrahepatic viral as well as histologic activity markers in entecavir-treated patients. *J Hepatol*. 2017:S0168-8278(17)32261-4.

81. Wang J, Shen T, Huang X, Kumar GR, Chen X, Zeng Z, et al. Serum hepatitis B

virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound. *J Hepatol.* 2016;65(4):700-10.

82. Liu S, Zhou B, Valdes JD, Sun J, Guo H. Serum Hepatitis B Virus RNA: A New Potential Biomarker for Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Hepatology.* 2019;69(4):1816-27.

83. Seto WK, Hui AJ, Wong VW, Wong GL, Liu KS, Lai CL, et al. Treatment cessation of entecavir in Asian patients with hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B: a multicentre prospective study. *Gut.* 2015;64(4):667-72.

84. Cooksley WG, Piratvisuth T, Lee SD, Mahachai V, Chao YC, Tanwandee T, et al. Peginterferon alpha-2a (40 kDa): an advance in the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *J Viral Hepat.* 2003;10(4):298-305.

85. Menendez-Arias L, Alvarez M, Pacheco B. Nucleoside/nucleotide analog inhibitors of hepatitis B virus polymerase: mechanism of action and resistance. *Curr Opin Virol.* 2014;8:1-9.

86. Koumbi L. Current and future antiviral drug therapies of hepatitis B chronic infection. *World J Hepatol.* 2015;7(8):1030-40.

87. Buti M. Análogos de nucleósidos y nucleótidos en el tratamiento de la hepatitis crónica por el virus B. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26:32-8.

88. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update of recommendations. *Hepatology.* 2004;39(3):857-61.

89. Volz T, Allweiss L, Ben MM, Warlich M, Lohse AW, Pollok JM, et al. The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus. *J Hepatol.* 2013;58(5):861-7.

90. Nkongolo S, Ni Y, Lempp FA, Kaufman C, Lindner T, Esser-Nobis K, et al. Cyclosporin A inhibits hepatitis B and hepatitis D virus entry by cyclophilin-independent interference with the NTCP receptor. *J Hepatol.* 2014;60(4):723-31.

91. Beerli RR, Barbas CF, 3rd. Engineering polyductyl zinc-finger transcription factors. *Nat Biotechnol.* 2002;20(2):135-41.

92. Cradick TJ, Keck K, Bradshaw S, Jamieson AC, McCaffrey AP. Zinc-finger

nucleases as a novel therapeutic strategy for targeting hepatitis B virus DNAs. *Mol Ther.* 2010;18(5):947-54.

93. Weber ND, Stone D, Sedlak RH, De Silva Felixge HS, Roychoudhury P, Schiffer JT, et al. AAV-mediated delivery of zinc finger nucleases targeting hepatitis B virus inhibits active replication. *PloS One.* 2014;9(5):e97579.

94. Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(1):49-55.

95. Bloom K, Ely A, Mussolino C, Cathomen T, Arbuthnot P. Inactivation of hepatitis B virus replication in cultured cells and in vivo with engineered transcription activator-like effector nucleases. *Mol Ther.* 2013;21(10):1889-97.

96. Kennedy EM, Kornepati AV, Cullen BR. Targeting hepatitis B virus cccDNA using CRISPR/Cas9. *Antiviral Res.* 2015;123:188-92.

97. Lin SR, Yang HC, Kuo YT, Liu CJ, Yang TY, Sung KC, et al. The CRISPR/Cas9 System Facilitates Clearance of the Intrahepatic HBV Templates In Vivo. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2014;3:e186.

98. Li H, Sheng C, Wang S, Yang L, Liang Y, Huang Y, et al. Removal of Integrated Hepatitis B Virus DNA Using CRISPR-Cas9. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:91.

99. Kim JW, Lee SH, Park YS, Hwang JH, Jeong SH, Kim N, et al. Replicative Activity of Hepatitis B Virus Is Negatively Associated with Methylation of Covalently Closed Circular DNA in Advanced Hepatitis B Virus Infection. *Intervirology.* 2011;54(6):316-25.

100. Wei ZQ, Zhang YH, Ke CZ, Chen HX, Ren P, He YL, et al. Curcumin inhibits hepatitis B virus infection by down-regulating cccDNA-bound histone acetylation. *World J Gastroenterol.* 2017;23(34):6252-60.

101. Koumbi L, Pollicino T, Raimondo G, Stampoulis D, Khakoo S, Karayiannis P. Hepatitis B virus basal core promoter mutations show lower replication fitness associated with cccDNA acetylation status. *Virus Res.* 2016;220:150-60.

102. Wooddell CI, Rozema DB, Hossbach M, John M, Hamilton HL, Chu Q, et al. Hepatocyte-targeted RNAi therapeutics for the treatment of chronic hepatitis B virus

- infection. *Mol Ther.* 2013;21(5):973-85.
103. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281-97.
104. Huang JY, Chou SF, Lee JW, Chen HL, Chen CM, Tao MH, et al. MicroRNA-130a can inhibit hepatitis B virus replication via targeting PGC1alpha and PPARgamma. *RNA.* 2015;21(3):385-400.
105. Lam AM, Espiritu C, Vogel R, Ren S, Lau V, Kelly M, et al. Preclinical Characterization of NVR 3-778, a First-in-Class Capsid Assembly Modulator against Hepatitis B Virus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;63(1):e01734-18.
106. Berke JM, Dehertogh P, Vergauwen K, Van Damme E, Mostmans W, Vandyck K, et al. Capsid Assembly Modulators Have a Dual Mechanism of Action in Primary Human Hepatocytes Infected with Hepatitis B Virus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(8):e00560-17.
107. Tang H. Hepatitis B Virus Infection Molecular Virology to Antiviral Drugs 2020.
108. Niu C, Li L, Daffis S, Lucifora J, Bonnin M, Maadadi S, et al. Toll-like receptor 7 agonist GS-9620 induces prolonged inhibition of HBV via a type I interferon-dependent mechanism. *J Hepatol.* 2018;68(5):922-31.
109. Daffis S, Chamberlain J, Zheng J, Santos R, Rowe W, Mish M, et al. Sustained efficacy and surface antigen seroconversion in the woodchuck model of chronic hepatitis B with the selective toll-like receptor 8 agonist GS-9688. *J Hepatol.* 2017;66(1):S692-S3.
110. Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, et al. The RNA sensor RIG-I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus. *Immunity.* 2015;42(1):123-32.
111. Dawood A, Abdul Basit S, Jayaraj M, Gish RG. Drugs in Development for Hepatitis B. *Drugs.* 2017;77(12):1263-80.
112. Peng G, Li S, Wu W, Tan X, Chen Y, Chen Z. PD-1 upregulation is associated with HBV-specific T cell dysfunction in chronic hepatitis B patients. *Mol Immunol.* 2008;45(4):963-70.

113. Gane E, Verdon DJ, Brooks AE, Gaggar A, Nguyen AH, Subramanian GM, et al. Anti-PD-1 blockade with nivolumab with and without therapeutic vaccination for virally suppressed chronic hepatitis B: A pilot study. *J Hepatol.* 2019;71(5):900-7.
114. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-54.
115. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 1993;75(5):855-62.
116. Vella MC, Choi E-Y, Lin S-Y, Reinert K, Slack FJ. The *C. elegans* microRNA *let-7* binds to imperfect *let-7* complementary sites from the *lin-41* 3'UTR. *Genes Dev.* 2004;18(2):132-7.
117. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004;14(10a):1902-10.
118. Brown JR, Sanseau P. A computational view of microRNAs and their targets. *Drug Discov Today.* 2005;10(8):595-601.
119. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13(12):1097-101.
120. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 2003;425(6956):415-9.
121. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 2004;18(24):3016-27.
122. Kim VN. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol.* 2004;14(4):156-9.
123. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature.* 2005;436(7051):740-4.
124. Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN. The role of PACT in the RNA

- silencing pathway. *EMBO J.* 2006;25(3):522-32.
125. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* 2010;11(9):597-610.
126. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009;136(2):215-33.
127. Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massierer K, Holtz J, Eachus R, et al. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell.* 2005;122(4):553-63.
128. Khraiwesh B, Arif MA, Seumel GI, Ossowski S, Weigel D, Reski R, et al. Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell.* 2010;140(1):111-22.
129. Chen Y, Verfaillie CM. MicroRNAs: the fine modulators of liver development and function. *Liver Int.* 2014;34(7):976-90.
130. Gangaraju VK, Lin H. MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(2):116-25.
131. Dorn GW, 2nd. MicroRNAs in cardiac disease. *Transl Res.* 2011;157(4):226-35.
132. Furer V, Greenberg JD, Attur M, Abramson SB, Pillinger MH. The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Clin Immunol.* 2010;136(1):1-15.
133. Zhang GL, Li YX, Zheng SQ, Liu M, Li X, Tang H. Suppression of hepatitis B virus replication by microRNA-199a-3p and microRNA-210. *Antiviral Res.* 2010;88(2):169-75.
134. Potenza N, Papa U, Mosca N, Zerbini F, Nobile V, Russo A. Human microRNA hsa-miR-125a-5p interferes with expression of hepatitis B virus surface antigen. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(12):5157-63.
135. Girard M, Jacquemin E, Munnich A, Lyonnet S, Henrion-Caude A. miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J Hepatol.* 2008;48(4):648-56.
136. Wang S, Qiu L, Yan X, Jin W, Wang Y, Chen L, et al. Loss of microRNA 122 expression in patients with hepatitis B enhances hepatitis B virus replication through cyclin G(1)-modulated P53 activity. *Hepatology.* 2012;55(3):730-41.
137. Qiu L, Fan H, Jin W, Zhao B, Wang Y, Ju Y, et al. miR-122-induced down-

regulation of HO-1 negatively affects miR-122-mediated suppression of HBV. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;398(4):771-7.

138. Fan CG, Wang CM, Tian C, Wang Y, Li L, Sun WS, et al. miR-122 inhibits viral replication and cell proliferation in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma and targets NDRG3. *Oncol Rep.* 2011;26(5):1281-6.

139. Chen Y, Shen A, Rider PJ, Yu Y, Wu K, Mu Y, et al. A liver-specific microRNA binds to a highly conserved RNA sequence of hepatitis B virus and negatively regulates viral gene expression and replication. *FASEB J.* 2011;25(12):4511-21.

140. Kohno T, Tsuge M, Murakami E, Hiraga N, Abe H, Miki D, et al. Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication by targeting core mRNA. *J Viral Hepat.* 2014;21(9):e89-97.

141. Hu W, Wang X, Ding X, Li Y, Zhang X, Xie P, et al. MicroRNA-141 represses HBV replication by targeting PPARA. *PloS One.* 2012;7(3):e34165.

142. Zhang Z, Chen J, He Y, Zhan X, Zhao R, Huang Y, et al. miR-125b inhibits hepatitis B virus expression in vitro through targeting of the SCNN1A gene. *Arch Virol.* 2014;159(12):3335-43.

143. Wang Y, Jiang L, Ji X, Yang B, Zhang Y, Fu XD. Hepatitis B viral RNA directly mediates down-regulation of the tumor suppressor microRNA miR-15a/miR-16-1 in hepatocytes. *J Biol Chem.* 2013;288(25):18484-93.

144. Zhao F, Xu G, Zhou Y, Wang L, Xie J, Ren S, et al. MicroRNA-26b inhibits hepatitis B virus transcription and replication by targeting the host factor CHORDC1 protein. *J Biol Chem.* 2014;289(50):35029-41.

145. Dai X, Zhang W, Zhang H, Sun S, Yu H, Guo Y, et al. Modulation of HBV replication by microRNA-15b through targeting hepatocyte nuclear factor 1 alpha. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(10):6578-90.

146. Guo H, Liu H, Mitchelson K, Rao H, Luo M, Xie L, et al. MicroRNAs-372/373 promote the expression of hepatitis B virus through the targeting of nuclear factor I/B. *Hepatology.* 2011;54(3):808-19.

147. Lin Y, Deng W, Pang J, Kemper T, Hu J, Yin J, et al. The microRNA-99 family

modulates hepatitis B virus replication by promoting IGF-1R/PI3K/Akt/mTOR/ULK1 signaling-induced autophagy. *Cell Microbiol.* 2017;19(5).

148. Zhang X, Zhang E, Ma Z, Pei R, Jiang M, Schlaak JF, et al. Modulation of hepatitis B virus replication and hepatocyte differentiation by MicroRNA-1. *Hepatology.* 2011;53(5):1476-85.

149. Xing T, Zhu J, Xian J, Li A, Wang X, Wang W, et al. miRNA-548ah promotes the replication and expression of hepatitis B virus by targeting histone deacetylase 4. *Life Sci.* 2019;219:199-208.

150. Jin J, Tang S, Xia L, Du R, Xie H, Song J, et al. MicroRNA-501 promotes HBV replication by targeting HBXIP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;430(4):1228-33.

151. Pan Y, Dai J, Liao Y, Yu Q. MicroRNA-137 promotes hepatitis B virus gene expression and replication via targeting the protein inhibitor of activated STAT 2. *Pharmazie.* 2017;72(9):550-4.

152. Yang X, Li H, Sun H, Fan H, Hu Y, Liu M, et al. Hepatitis B Virus-Encoded MicroRNA Controls Viral Replication. *J Virol.* 2017;91(10):e01919-16.

153. Takata A, Otsuka M, Ohno M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Koike K. Mutual antagonism between hepatitis B viral mRNA and host microRNA let-7. *Sci Rep.* 2016;6:23237.

154. Jung YJ, Kim JW, Park SJ, Min BY, Jang ES, Kim NY, et al. c-Myc-mediated overexpression of miR-17-92 suppresses replication of hepatitis B virus in human hepatoma cells. *J Med Virol.* 2013;85(6):969-78.

155. Wu HJ, Zhuo Y, Zhou YC, Wang XW, Wang YP, Si CY, et al. miR-29a promotes hepatitis B virus replication and expression by targeting SMARCE1 in hepatoma carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2017;23(25):4569-78.

156. Wang CM, Wang Y, Fan CG, Xu FF, Sun WS, Liu YG, et al. miR-29c targets TNFAIP3, inhibits cell proliferation and induces apoptosis in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;411(3):586-92.

157. Wang Y, Tian H. miR-101 suppresses HBV replication and expression by targeting

FOXO1 in hepatoma carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;487(1):167-72.

158. Gao D, Zhai A, Qian J, Li A, Li Y, Song W, et al. Down-regulation of suppressor of cytokine signaling 3 by miR-122 enhances interferon-mediated suppression of hepatitis B virus. *Antiviral Res.* 2015;118:20-8.

159. Mosca N, Castiello F, Coppola N, Trotta MC, Sagnelli C, Pisaturo M, et al. Functional interplay between hepatitis B virus X protein and human miR-125a in HBV infection. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;449(1):141-5.

160. Deng W, Zhang X, Ma Z, Lin Y, Lu M. MicroRNA-125b-5p mediates post-transcriptional regulation of hepatitis B virus replication via the LIN28B/let-7 axis. *RNA Biol.* 2017;14(10):1389-98.

161. Shang J, Zheng Y, Guo X, Mo J, Xie X, Xiong Y, et al. Hepatitis B virus replication and sex-determining region Y box 4 production are tightly controlled by a novel positive feedback mechanism. *Sci Rep.* 2015;5:10066.

162. Duan X, Li S, Holmes JA, Tu Z, Li Y, Cai D, et al. MicroRNA 130a Regulates both Hepatitis C Virus and Hepatitis B Virus Replication through a Central Metabolic Pathway. *J Virol.* 2018;92(7):e02009-17.

163. Tang L, Pu Y, Wong DK, Liu T, Tang H, Xiang T, et al. The hepatitis B virus-associated estrogen receptor alpha (ERalpha) was regulated by microRNA-130a in HepG2.2.15 human hepatocellular carcinoma cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2011;43(8):640-6.

164. Guerrieri F, Belloni L, D'Andrea D, Pediconi N, Le Pera L, Testoni B, et al. Genome-wide identification of direct HBx genomic targets. *BMC Genomics.* 2017;18(1):184.

165. Yang Y, Liu Y, Xue J, Yang Z, Shi Y, Shi Y, et al. MicroRNA-141 Targets Sirt1 and Inhibits Autophagy to Reduce HBV Replication. *Cell Physiol Biochem.* 2017;41(1):310-22.

166. Wang Y, Li Y. miR-146 promotes HBV replication and expression by targeting ZEB2. *Biomed Pharmacother.* 2018;99:576-82.

167. Fu L, Fu X, Mo J, Li X, Li R, Peng S. miR-146a-5p enhances hepatitis B virus replication through autophagy to promote aggravation of chronic hepatitis B. *IUBMB life*. 2019;71(9):1336-46.
168. Su C, Hou Z, Zhang C, Tian Z, Zhang J. Ectopic expression of microRNA-155 enhances innate antiviral immunity against HBV infection in human hepatoma cells. *Virol J*. 2011;18(8):354.
169. Xie C, Ren GL, Xu MC, Zhang WY, Zhang SL, Cai QY, et al. The effect of miR-155 on HBV replication and PTEN expression in vivo. *Chinese journal of hepatology*. 2018;26(7):489-94.
170. Sarkar N, Panigrahi R, Pal A, Biswas A, Singh SP, Kar SK, et al. Expression of microRNA-155 correlates positively with the expression of Toll-like receptor 7 and modulates hepatitis B virus via C/EBP-beta in hepatocytes. *J Viral Hepat*. 2015;22(10):817-27.
171. Fan HX, Feng YJ, Zhao XP, He YZ, Tang H. MiR-185-5p suppresses HBV gene expression by targeting ELK1 in hepatoma carcinoma cells. *Life Sci*. 2018;213:9-17.
172. Ko C, Lee S, Windisch MP, Ryu W-S. DDX3 DEAD-box RNA helicase is a host factor that restricts hepatitis B virus replication at the transcriptional level. *J Virol*. 2014;88(23):13689-98.
173. Tian H, He Z. miR-200c targets nuclear factor IA to suppress HBV replication and gene expression via repressing HBV Enhancer I activity. *Biomed Pharmacother*. 2018;99:774-80.
174. Huang JY, Chen HL, Shih C. MicroRNA miR-204 and miR-1236 inhibit hepatitis B virus replication via two different mechanisms. *Sci Rep*. 2016;6:34740.
175. Hamada-Tsutsumi S, Naito Y, Sato S, Takaoka A, Kawashima K, Isogawa M, et al. The antiviral effects of human microRNA miR-302c-3p against hepatitis B virus infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 2019;49(8):1060-70.
176. Fan H, Lv P, Lv J, Zhao X, Liu M, Zhang G, et al. miR-370 suppresses HBV gene expression and replication by targeting nuclear factor IA. *J Med Virol*. 2017;89(5):834-44.

177. Zhang X, Liu H, Xie Z, Deng W, Wu C, Qin B, et al. Epigenetically regulated miR-449a enhances hepatitis B virus replication by targeting cAMP-responsive element binding protein 5 and modulating hepatocytes phenotype. *Sci Rep.* 2016;6:25389.
178. Sun W, Zhang J, Chen J. MicroRNA-520a suppresses HBV replication in HepG2.2.15 cells by inactivating AKT. *J Int Med Res.* 2018;46(11):4693-704.
179. Tian JH, Liu WD, Zhang ZY, Tang LH, Li D, Tian ZJ, et al. Influence of miR-520e-mediated MAPK signalling pathway on HBV replication and regulation of hepatocellular carcinoma cells via targeting EphA2. *J Viral Hepat.* 2019;26(4):496-505.
180. Li Y, Xie J, Xu X, Wang J, Ao F, Wan Y, et al. MicroRNA-548 down-regulates host antiviral response via direct targeting of IFN-lambda1. *Protein Cell.* 2013;4(2):130-41.
181. Wang YQ, Ren YF, Song YJ, Xue YF, Zhang XJ, Cao ST, et al. MicroRNA-581 promotes hepatitis B virus surface antigen expression by targeting Dicer and EDEM1. *Carcinogenesis.* 2014;35(9):2127-33.
182. Wang Y, Cao J, Zhang S, Sun L, Nan Y, Yao H, et al. MicroRNA-802 induces hepatitis B virus replication and replication through regulating SMARCE1 expression in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis.* 2019;10(10):783.
183. Chen C, Wu M, Zhang W, Lu W, Zhang M, Zhang Z, et al. MicroRNA-939 restricts Hepatitis B virus by targeting Jmjd3-mediated and C/EBPalpha-coordinated chromatin remodeling. *Sci Rep.* 2016;6:35974.
184. Ji F, Yang B, Peng X, Ding H, You H, Tien P. Circulating microRNAs in hepatitis B virus-infected patients. *J Viral Hepat.* 2011;18(7):e242-51.
185. Momeni M, Hassanshahi G, Arababadi MK, Kennedy D. Ectopic expression of micro-RNA-1, 21 and 125a in peripheral blood immune cells is associated with chronic HBV infection. *Mol Biol Rep.* 2014;41(7):4833-7.
186. Chen Y, Li L, Zhou Z, Wang N, Zhang CY, Zen K. A pilot study of serum microRNA signatures as a novel biomarker for occult hepatitis B virus infection. *Med Microbiol Immunol.* 2012;201(3):389-95.
187. Brenner DA, Waterboer T, Choi SK, Lindquist JN, Stefanovic B, Burchardt E, et

- al. New aspects of hepatic fibrosis. *J Hepatol.* 2000;32(1 Suppl):32-8.
188. Huang C, Zheng JM, Cheng Q, Yu KK, Ling QX, Chen MQ, et al. Serum microRNA-29 levels correlate with disease progression in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Dig Dis.* 2014;15(11):614-21.
189. Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, et al. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology.* 2011;53(1):209-18.
190. Lakner AM, Steuerwald NM, Walling TL, Ghosh S, Li T, McKillop IH, et al. Inhibitory effects of microRNA 19b in hepatic stellate cell-mediated fibrogenesis. *Hepatology.* 2012;56(1):300-10.
191. Venugopal SK, Jiang J, Kim TH, Li Y, Wang SS, Torok NJ, et al. Liver fibrosis causes downregulation of miRNA-150 and miRNA-194 in hepatic stellate cells, and their overexpression causes decreased stellate cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;298(1):G101-6.
192. Huang CF, Sun CC, Zhao F, Zhang YD, Li DJ. miR-33a levels in hepatic and serum after chronic HBV-induced fibrosis. *J Gastroenterol.* 2015;50(4):480-90.
193. Zhang H, Yan XL, Guo XX, Shi MJ, Lu YY, Zhou QM, et al. MiR-27a as a predictor for the activation of hepatic stellate cells and hepatitis B virus-induced liver cirrhosis. *Oncotarget.* 2018;9(1):1075-90.
194. You K, Li SY, Gong J, Fang JH, Zhang C, Zhang M, et al. MicroRNA-125b Promotes Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrosis by Activating RhoA Signaling. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2018;12:57-66.
195. Kao JH, Chen PJ, Chen DS. Recent advances in the research of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: epidemiologic and molecular biological aspects. *Adv Cancer Res.* 2010;108:21-72.
196. Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, et al. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2009;49(4):1098-112.
197. Li C, Wang Y, Wang S, Wu B, Hao J, Fan H, et al. Hepatitis B virus mRNA-

- mediated miR-122 inhibition upregulates PTTG1-binding protein, which promotes hepatocellular carcinoma tumor growth and cell invasion. *J Virol*. 2013;87(4):2193-205.
198. Neuveut C, Wei Y, Buendia MA. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis. *J Hepatol*. 2010;52(4):594-604.
199. Wei X, Xiang T, Ren G, Tan C, Liu R, Xu X, et al. miR-101 is down-regulated by the hepatitis B virus x protein and induces aberrant DNA methylation by targeting DNA methyltransferase 3A. *Cell Signal*. 2013;25(2):439-46.
200. Huang J, Wang Y, Guo Y, Sun S. Down-regulated microRNA-152 induces aberrant DNA methylation in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by targeting DNA methyltransferase 1. *Hepatology*. 2010;52(1):60-70.
201. Xu X, Fan Z, Kang L, Han J, Jiang C, Zheng X, et al. Hepatitis B virus X protein represses miRNA-148a to enhance tumorigenesis. *J Clin Invest*. 2013;123(2):630-45.
202. Shi C, Xu X. MicroRNA-22 is down-regulated in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Biomed Pharmacother*. 2013;67(5):375-80.
203. Zhang J, Yang Y, Yang T, Liu Y, Li A, Fu S, et al. microRNA-22, downregulated in hepatocellular carcinoma and correlated with prognosis, suppresses cell proliferation and tumorigenicity. *Br J Cancer*. 2010;103(8):1215-20.
204. Jiang R, Deng L, Zhao L, Li X, Zhang F, Xia Y, et al. miR-22 promotes HBV-related hepatocellular carcinoma development in males. *Clin Cancer Res*. 2011;17(17):5593-603.
205. Chen L, Zheng J, Zhang Y, Yang L, Wang J, Ni J, et al. Tumor-specific expression of microRNA-26a suppresses human hepatocellular carcinoma growth via cyclin-dependent and -independent pathways. *Mol Ther*. 2011;19(8):1521-8.
206. Noh JH, Chang YG, Kim MG, Jung KH, Kim JK, Bae HJ, et al. MiR-145 functions as a tumor suppressor by directly targeting histone deacetylase 2 in liver cancer. *Cancer Lett*. 2013;335(2):455-62.
207. Yang XW, Zhang LJ, Huang XH, Chen LZ, Su Q, Zeng WT, et al. miR-145 suppresses cell invasion in hepatocellular carcinoma cells: miR-145 targets ADAM17. *Hepatol Res*. 2014;44(5):551-9.

208. Hou J, Lin L, Zhou W, Wang Z, Ding G, Dong Q, et al. Identification of miRNomes in human liver and hepatocellular carcinoma reveals miR-199a/b-3p as therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Cancer cell*. 2011;19(2):232-43.
209. Fornari F, Milazzo M, Chieco P, Negrini M, Calin GA, Grazi GL, et al. MiR-199a-3p regulates mTOR and c-Met to influence the doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells. *Cancer Res*. 2010;70(12):5184-93.
210. Liu FY, Zhou SJ, Deng YL, Zhang ZY, Zhang EL, Wu ZB, et al. MiR-216b is involved in pathogenesis and progression of hepatocellular carcinoma through HBx-miR-216b-IGF2BP2 signaling pathway. *Cell Death Dis*. 2015;6:e1670.
211. Zhang Z, Han Y, Sun G, Liu X, Jia X, Yu X. MicroRNA-325-3p inhibits cell proliferation and induces apoptosis in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by down-regulation of aquaporin 5. *Cell Mol Biol Lett*. 2019;24:13.
212. Fu X, Tan D, Hou Z, Hu Z, Liu G. miR-338-3p is down-regulated by hepatitis B virus X and inhibits cell proliferation by targeting the 3'-UTR region of CyclinD1. *Int J Mol Sci*. 2012;13(7):8514-39.
213. Li LH, Gao Q, Wang XY, Guo ZJ. miR-378 suppresses HBV-related hepatocellular carcinoma tumor growth by directly targeting the insulin-like growth factor 1 receptor. *Chinese journal of hepatology*. 2013;21(8):609-13.
214. Connolly E, Melegari M, Landgraf P, Tchaikovskaya T, Tennant BC, Slagle BL, et al. Elevated expression of the miR-17-92 polycistron and miR-21 in hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma contributes to the malignant phenotype. *Am J Pathol*. 2008;173(3):856-64.
215. Damania P, Sen B, Dar SB, Kumar S, Kumari A, Gupta E, et al. Hepatitis B virus induces cell proliferation via HBx-induced microRNA-21 in hepatocellular carcinoma by targeting programmed cell death protein4 (PDCD4) and phosphatase and tensin homologue (PTEN). *PloS One*. 2014;9(3):e91745.
216. Zhang X, Liu S, Hu T, Liu S, He Y, Sun S. Up-regulated microRNA-143 transcribed by nuclear factor kappa B enhances hepatocarcinoma metastasis by repressing fibronectin expression. *Hepatology*. 2009;50(2):490-9.

217. Xie Q, Chen X, Lu F, Zhang T, Hao M, Wang Y, et al. Aberrant expression of microRNA 155 may accelerate cell proliferation by targeting sex-determining region Y box 6 in hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2012;118(9):2431-42.
218. Zhang Q, Song G, Yao L, Liu Y, Liu M, Li S, et al. miR-3928v is induced by HBx via NF- $\kappa$ B/EGR1 and contributes to hepatocellular carcinoma malignancy by down-regulating VDAC3. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):14-.
219. Datta J, Kutay H, Nasser MW, Nuovo GJ, Wang B, Majumder S, et al. Methylation mediated silencing of MicroRNA-1 gene and its role in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res*. 2008;68(13):5049-58.
220. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Miyagi T, Hosui A, et al. The let-7 family of microRNAs inhibits Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2010;52(5):698-704.
221. Lan FF, Wang H, Chen YC, Chan CY, Ng SS, Li K, et al. Hsa-let-7g inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells by downregulation of c-Myc and upregulation of p16(INK4A). *Int J Cancer*. 2011;128(2):319-31.
222. Ji J, Zhao L, Budhu A, Forgues M, Jia HL, Qin LX, et al. Let-7g targets collagen type I alpha2 and inhibits cell migration in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2010;52(5):690-7.
223. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005;120(5):635-47.
224. Wang Y, Lu Y, Toh ST, Sung WK, Tan P, Chow P, et al. Lethal-7 is down-regulated by the hepatitis B virus x protein and targets signal transducer and activator of transcription 3. *J Hepatol*. 2010;53(1):57-66.
225. Liu N, Jiao T, Huang Y, Liu W, Li Z, Ye X. Hepatitis B virus regulates apoptosis and tumorigenesis through the microRNA-15a-Smad7-transforming growth factor beta pathway. *J Virol*. 2015;89(5):2739-49.
226. Liu N, Zhang J, Jiao T, Li Z, Peng J, Cui Z, et al. Hepatitis B virus inhibits apoptosis of hepatoma cells by sponging the MicroRNA 15a/16 cluster. *J Virol*. 2013;87(24):13370-8.

227. Wu G, Yu F, Xiao Z, Xu K, Xu J, Tang W, et al. Hepatitis B virus X protein downregulates expression of the miR-16 family in malignant hepatocytes in vitro. *Br J Cancer*. 2011;105(1):146-53.
228. Liu WH, Yeh SH, Lu CC, Yu SL, Chen HY, Lin CY, et al. MicroRNA-18a prevents estrogen receptor-alpha expression, promoting proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Gastroenterology*. 2009;136(2):683-93.
229. Petrini E, Caviglia GP, Abate ML, Fagoonee S, Smedile A, Pellicano R. MicroRNAs in HBV-related hepatocellular carcinoma: functions and potential clinical applications. *Panminerva Med*. 2015;57(4):201-9.
230. Wang Y, Zhang P, Yuan M, Li X. Overexpression of miRNA-21 Promotes the Proliferation and Invasion in Hepatocellular Carcinoma Cells via Suppressing SMAD7. *Technol Cancer Res Treat*. 2019;18:1533033819878686.
231. Salvi A, Sabelli C, Moncini S, Venturin M, Arici B, Riva P, et al. MicroRNA-23b mediates urokinase and c-met downmodulation and a decreased migration of human hepatocellular carcinoma cells. *FEBS J*. 2009;276(11):2966-82.
232. Kong G, Zhang J, Zhang S, Shan C, Ye L, Zhang X. Upregulated microRNA-29a by hepatitis B virus X protein enhances hepatoma cell migration by targeting PTEN in cell culture model. *PloS One*. 2011;6(5):e19518.
233. Yang P, Li QJ, Feng Y, Zhang Y, Markowitz GJ, Ning S, et al. TGF-beta-miR-34a-CCL22 signaling-induced Treg cell recruitment promotes venous metastases of HBV-positive hepatocellular carcinoma. *Cancer cell*. 2012;22(3):291-303.
234. Wang Y, Wang C-M, Jiang Z-Z, Yu X-J, Fan C-G, Xu F-F, et al. MicroRNA-34c targets TGFB-induced factor homeobox 2, represses cell proliferation and induces apoptosis in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*. 2015;10(5):3095-102.
235. Li D, Liu X, Lin L, Hou J, Li N, Wang C, et al. MicroRNA-99a inhibits hepatocellular carcinoma growth and correlates with prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem*. 2011;286(42):36677-85.
236. Sheng Y, Ding S, Chen K, Chen J, Wang S, Zou C, et al. Functional analysis of

miR-101-3p and Rap1b involved in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma pathogenesis. *Biochem Cell Biol.* 2014;92(2):152-62.

237. Li G, Zhang W, Gong L, Huang X. MicroRNA 125a-5p Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma by Downregulation of ErbB3. *Oncol Res.* 2019;27(4):449-58.

238. Xiang LY, Ou HH, Liu XC, Chen ZJ, Li XH, Huang Y, et al. Loss of tumor suppressor miR-126 contributes to the development of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma metastasis through the upregulation of ADAM9. *Tumour Biol.* 2017;39(6):1010428317709128.

239. Chen X, Zhang L, Zhang T, Hao M, Zhang X, Zhang J, et al. Methylation-mediated repression of microRNA 129-2 enhances oncogenic SOX4 expression in HCC. *Liver Int.* 2013;33(3):476-86.

240. Wei X, Tan C, Tang C, Ren G, Xiang T, Qiu Z, et al. Epigenetic repression of miR-132 expression by the hepatitis B virus x protein in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Cell Signal.* 2013;25(5):1037-43.

241. Zhao J, Wang W, Huang Y, Wu J, Chen M, Cui P, et al. HBx elevates oncoprotein AEG-1 expression to promote cell migration by downregulating miR-375 and miR-136 in malignant hepatocytes. *DNA Cell Biol.* 2014;33(10):715-22.

242. Wang W, Zhao LJ, Tan YX, Ren H, Qi ZT. Identification of deregulated miRNAs and their targets in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2012;18(38):5442-53.

243. Zou C, Chen J, Chen K, Wang S, Cao Y, Zhang J, et al. Functional analysis of miR-181a and Fas involved in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma pathogenesis. *Exp Cell Res.* 2015;331(2):352-61.

244. Zou C, Li Y, Cao Y, Zhang J, Jiang J, Sheng Y, et al. Up-regulated MicroRNA-181a induces carcinogenesis in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by targeting E2F5. *BMC cancer.* 2014;14:97.

245. Zhang T, Zhang J, Cui M, Liu F, You X, Du Y, et al. Hepatitis B virus X protein inhibits tumor suppressor miR-205 through inducing hypermethylation of miR-205

- promoter to enhance carcinogenesis. *Neoplasia*. 2013;15(11):1282-91.
246. Chen JJ, Tang YS, Huang SF, Ai JG, Wang HX, Zhang LP. HBx protein-induced upregulation of microRNA-221 promotes aberrant proliferation in HBV-related hepatocellular carcinoma by targeting estrogen receptor- $\alpha$ . *Oncol Rep*. 2015;33(2):792-8.
247. Yu G, Chen X, Chen S, Ye W, Hou K, Liang M. MiR-19a, miR-122 and miR-223 are differentially regulated by hepatitis B virus X protein and involve in cell proliferation in hepatoma cells. *J Transl Med*. 2016;14(1):122.
248. Cao Y, Chen J, Wang D, Peng H, Tan X, Xiong D, et al. Upregulated in Hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma cells, miR-331-3p promotes proliferation of hepatocellular carcinoma cells by targeting ING5. *Oncotarget*. 2015;6(35):38093-106.
249. Song F, Wei M, Wang J, Liu Y, Guo M, Li X, et al. Hepatitis B virus-regulated growth of liver cancer cells occurs through the microRNA-340-5p-activating transcription factor 7-heat shock protein A member 1B axis. *Cancer Sci*. 2019;110(5):1633-43.
250. Bai PS, Hou P, Kong Y. Hepatitis B virus promotes proliferation and metastasis in male Chinese hepatocellular carcinoma patients through the LEF-1/miR-371a-5p/SRCIN1/pleiotrophin/Slug pathway. *Exp Cell Res*. 2018;370(1):174-88.
251. Bai PS, Xia N, Sun H, Kong Y. Pleiotrophin, a target of miR-384, promotes proliferation, metastasis and lipogenesis in HBV-related hepatocellular carcinoma. *J Cell Mol Med*. 2017;21(11):3023-43.
252. Gao H, Liu C. miR-429 represses cell proliferation and induces apoptosis in HBV-related HCC. *Biomed Pharmacother*. 2014;68(8):943-9.
253. Xiang Z, Wang S, Xiang Y. Up-regulated microRNA499a by hepatitis B virus induced hepatocellular carcinogenesis via targeting MAPK6. *PloS One*. 2014;9(10):e111410.
254. Zhao Q, Li T, Qi J, Liu J, Qin C. The miR-545/374a cluster encoded in the Ftx lncRNA is overexpressed in HBV-related hepatocellular carcinoma and promotes

- tumorigenesis and tumor progression. *PloS One*. 2014;9(10):e109782-e.
255. Yang L, Ma Z, Wang D, Zhao W, Chen L, Wang G. MicroRNA-602 regulating tumor suppressive gene RASSF1A is over-expressed in hepatitis B virus-infected liver and hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther*. 2010;9(10):803-8.
256. Chen Y, Zhao Z-X, Huang F, Yuan X-W, Deng L, Tang D. MicroRNA-1271 functions as a potential tumor suppressor in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma through the AMPK signaling pathway by binding to CCNA1. *J Cell Physiol*. 2019;234(4):3555-69.
257. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med*. 2009;6(7):e1000097.
258. Whiting PF, Rutjes AW, Westwood ME, Mallett S, Deeks JJ, Reitsma JB, et al. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Ann Intern Med*. 2011;155(8):529-36.
259. Swets JA. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science*. 1988;240(4857):1285-93.
260. Malmström S, Larsson SB, Hannoun C, Lindh M. Hepatitis B viral DNA decline at loss of HBeAg is mainly explained by reduced cccDNA load--down-regulated transcription of PgRNA has limited impact. *PloS One*. 2012;7(7):e36349.
261. Allweiss L, Volz T, Giersch K, Kah J, Raffa G, Petersen J, et al. Proliferation of primary human hepatocytes and prevention of hepatitis B virus reinfection efficiently deplete nuclear cccDNA in vivo. *Gut*. 2018;67(3):542-52.
262. Burdino E, Ruggiero T, Proietti A, Milia MG, Olivero A, Caviglia GP, et al. Quantification of hepatitis B surface antigen with the novel DiaSorin LIAISON XL Murex HBsAg Quant: correlation with the ARCHITECT quantitative assays. *J Clin Virol*. 2014;60(4):341-6.
263. Verheyen J, Neumann-Fraune M, Berg T, Kaiser R, Obermeier M. The detection of HBsAg mutants expressed in vitro using two different quantitative HBsAg assays. *J Clin Virol*. 2012;54(3):279-81.

264. Cornberg M, Wong VW, Locarnini S, Brunetto M, Janssen HLA, Chan HL. The role of quantitative hepatitis B surface antigen revisited. *J Hepatol.* 2017;66(2):398-411.
265. Ambion, (Life Technologies). mirVana™ miRNA Isolation Kit protocol. 2011.
266. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol.* 1996;14(13):1675-80.
267. Reza A, Cho SK, Choi YJ, Hong K, Kim JH. Microarray profiling of miRNA and mRNA expression in Rag2 knockout and wild-type mouse spleens. *Sci Data.* 2018;5:170199.
268. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics.* 2003;19(2):185-93.
269. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 2004;3(1).
270. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Statist Soc B.* 1995;57(1):289-300.
271. Lucifora J, Protzer U. Attacking hepatitis B virus cccDNA--The holy grail to hepatitis B cure. *J Hepatol.* 2016;64(1 Suppl):S41-S48.
272. Liang LB, Zhu X, Yan LB, Du LY, Liu C, Liao J, et al. Quantitative intrahepatic HBV cccDNA correlates with histological liver inflammation in chronic hepatitis B virus infection. *Int J Infect Dis.* 2016;52:77-82.
273. Qi P, Cheng SQ, Wang H, Li N, Chen YF, Gao CF. Serum microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *PloS One.* 2011;6(12):e28486.
274. Li L, Guo Z, Wang J, Mao Y, Gao Q. Serum miR-18a: a potential marker for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma screening. *Dig Dis Sci.* 2012;57(11):2910-6.
275. Xie Y, Yao Q, Butt AM, Guo J, Tian Z, Bao X, et al. Expression profiling of serum microRNA-101 in HBV-associated chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular

- carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2014;15(9):1248-55.
276. Yu F, Lu Z, Chen B, Dong P, Zheng J. microRNA-150: a promising novel biomarker for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Diagn Pathol.* 2015;28(10):129.
277. Chen Y, Dong X, Yu D, Wang X. Serum miR-96 is a promising biomarker for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(10):18462-8.
278. Ghosh A, Ghosh A, Datta S, Dasgupta D, Das S, Ray S, et al. Hepatic miR-126 is a potential plasma biomarker for detection of hepatitis B virus infected hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 2016;138(11):2732-44.
279. Xiong F, Ma H, Qu YC, Wen F, Bao XL, Han DZ, et al Profiles of serum miR-99a, let-7c and miR-125b in hepatitis B virus (HBV)-associated chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2016;9(7):7087-95.
280. Lin L, Lu B, Yu J, Liu W, Zhou A. Serum miR-224 as a biomarker for detection of hepatocellular carcinoma at early stage. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2016;40(4):397-404.
281. Chen S, Chen H, Gao S, Qiu S, Zhou H, Yu M, et al. Differential expression of plasma microRNA-125b in hepatitis B virus-related liver diseases and diagnostic potential for hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2017;47(4):312-20.
282. Zhao Q, Sun X, Liu C, Li T, Cui J, Qin C. Expression of the microRNA-143/145 cluster is decreased in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma and may serve as a biomarker for tumorigenesis in patients with chronic hepatitis B. *Oncol Lett.* 2018;15(5):6115-22.
283. Xu LJ, Wei B, Hui HX, Liu YQ. Association of serum microRNA-125b and HBV-related hepatocellular carcinoma in Chinese Han patients. *Int J Clin Exp Med* 2018;11(4):3699-703.
284. Moradi N, Paryan M, Khansarinejad B, Sarmadian H, Mondanizadeh M. Plasma Level of miR-5193 as a Novel Biomarker for Diagnosis of HBV-Related

- Hepatocellular Carcinoma. *Hepat Mon.* 2019;19(2):e84455.
285. Gao Y, Gu J, Wang Y, Fu D, Zhang W, Zheng G, et al. Hepatitis B virus X protein boosts hepatocellular carcinoma progression by downregulating microRNA-137. *Pathol Res Pract.* 2020;216(6):152981.
286. Cao X, Yang Q, Yu Q. Increased Expression of miR-487b Is Associated With Poor Prognosis and Tumor Progression of HBV-Related Hepatocellular Carcinoma. *Open Forum Infect Dis.* 2020;7(12):ofaa498.
287. Li X, Guo Y, Wang X, Ge A, Wang H, Fan K, et al. Clinical significance of serum miR-487b in HBV-related hepatocellular carcinoma and its potential mechanism. *Infect Dis (Lond).* 2021;53(7):546-554.
288. Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, Chen X, Liu FY, Zhang JF, et al. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma. *Cancer Res.* 2010;70(23):9798-807.
289. Zhou J, Yu L, Gao X, Hu J, Wang J, Dai Z, et al. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 2011;29(36):4781-8.
290. Tan Y, Ge G, Pan T, Wen D, Chen L, Yu X, et al. A serum microRNA panel as potential biomarkers for hepatocellular carcinoma related with hepatitis B virus. *PloS One.* 2014;9(9):e107986.
291. Zhu HT, Liu RB, Liang YY, Hasan AME, Wang HY, Shao Q, et al. Serum microRNA profiles as diagnostic biomarkers for HBV-positive hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2017;37(6):888-96.
292. Levrero M, Zucman-Rossi J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2016;64(1 Suppl):S84-S101.
293. Kulik L, El-Serag HB. Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology.* 2019;156(2):477-91.e1.
294. Tang A, Cruite I, Mitchell DG, Sirlin CB. Hepatocellular carcinoma imaging systems: why they exist, how they have evolved, and how they differ. *Abdom Radiol (NY).* 2018;43(1):3-12.

295. Tomimaru Y, Eguchi H, Nagano H, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, et al. Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2012;56(1):167-75.
296. Luo P, Wu S, Yu Y, Ming X, Li S, Zuo X, et al. Current Status and Perspective Biomarkers in AFP Negative HCC: Towards Screening for and Diagnosing Hepatocellular Carcinoma at an Earlier Stage. *Pathol Oncol Res.* 2020;26(2):599-603.
297. Pezzuto F, Buonaguro L, Buonaguro FM, Tornesello ML. The Role of Circulating Free DNA and MicroRNA in Non-Invasive Diagnosis of HBV- and HCV-Related Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4):1007.
298. Deeks JJ, Altman DG. Diagnostic tests 4: likelihood ratios. *BMJ.* 2004;329(7458):168-9.
299. Yin H, Sun Y, Wang X, Park J, Zhang Y, Li M, et al. Progress on the relationship between miR-125 family and tumorigenesis. *Exp Cell Res.* 2015;339(2):252-60.
300. Gong J, Zhang JP, Li B, Zeng C, You K, Chen MX, et al. MicroRNA-125b promotes apoptosis by regulating the expression of Mcl-1, Bcl-w and IL-6R. *Oncogene.* 2013;32(25):3071-9.
301. Li J, Fang L, Yu W, Wang Y. MicroRNA-125b suppresses the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells by targeting transcriptional coactivator with PDZ-binding motif. *Oncol Lett.* 2015;9(4):1971-5.
302. Hua S, Quan Y, Zhan M, Liao H, Li Y, Lu L. miR-125b-5p inhibits cell proliferation, migration, and invasion in hepatocellular carcinoma via targeting TXNRD1. *Cancer Cell Int.* 2019;19:203.
303. Gao SS, Wang YJ, Zhang GX, Zhang WT. Potential diagnostic value of miRNAs in peripheral blood for osteosarcoma: A meta-analysis. *J Bone Oncol.* 2020;23:100307.
304. Jin X, Cai C, Qiu Y. Diagnostic Value of Circulating microRNAs in Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Cancer.* 2019;10(20):4754-64.
305. Petersen J, Thompson AJ, Levrero M. Aiming for cure in HBV and HDV infection. *J Hepatol.* 2016;65(4):835-48.

306. Gustot T, Fernandez J, Garcia E, Morando F, Caraceni P, Alessandria C, et al. Clinical Course of acute-on-chronic liver failure syndrome and effects on prognosis. *Hepatology*. 2015;62(1):243-52.
307. Li W, Zhao J, Zou Z, Liu Y, Li B, Sun Y, et al. Analysis of hepatitis B virus intrahepatic covalently closed circular DNA and serum viral markers in treatment-naïve patients with acute and chronic HBV infection. *PloS One*. 2014;9(2):e89046.
308. Thompson AJ, Nguyen T, Iser D, Ayres A, Jackson K, Littlejohn M, et al. Serum hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen titers: disease phase influences correlation with viral load and intrahepatic hepatitis B virus markers. *Hepatology*. 2010;51(6):1933-44.
309. Wang J, Shen T, Huang X, Kumar GR, Chen X, Zeng Z, et al. Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound. *J Hepatol*. 2016;65(4):700-10.
310. Wang J, Yu Y, Li G, Shen C, Li J, Chen S, et al. Natural history of serum HBV-RNA in chronic HBV infection. *J Viral Hepat*. 2018;25(9):1038-47.
311. Liu Y, Jiang M, Xue J, Yan H, Liang X. Serum HBV RNA quantification: useful for monitoring natural history of chronic hepatitis B infection. *BMC gastroenterol*. 2019;19(1):53.
312. Huang H, Wang J, Li W, Chen R, Chen X, Zhang F, et al. Serum HBV DNA plus RNA shows superiority in reflecting the activity of intrahepatic cccDNA in treatment-naïve HBV-infected individuals. *J Clin Virol*. 2018;99-100:71-78.
313. Wang J, Yu Y, Li G, Shen C, Meng Z, Zheng J, et al. Relationship between serum HBV-RNA levels and intrahepatic viral as well as histologic activity markers in entecavir-treated patients. *J Hepatol*. 2017;S0168-8278(17)32261-4.
314. Giersch K, Allweiss L, Volz T, Dandri M, Lütgehetmann M. Serum HBV pgRNA as a clinical marker for cccDNA activity. *J Hepatol*. 2017;66(2):460-2.
315. Wang X, Chi X, Wu R, Xu H, Gao X, Yu L, et al. Serum HBV RNA correlated with intrahepatic cccDNA more strongly than other HBV markers during peg-interferon treatment. *Virol J*. 2021;18(1):4.

316. Li FC, Li YK, Fan YC. Biomarkers for hepatitis B virus replication: an overview and a look to the future. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020;14(12):1131-9.
317. Jaroszewicz J, Calle Serrano B, Wursthorn K, Deterding K, Schlue J, Raupach R, et al. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: a European perspective. *J Hepatol.* 2010;52(4):514-22.
318. Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology.* 2015;479-480:672-86.
319. Warner N, Locarnini S. Can antiviral therapy for chronic hepatitis B enhance the progression to hepatocellular carcinoma?. *Antivir Ther.* 2009;14(2):139-42.
320. Liu S, Zhou B, Valdes JD, Sun J, Guo H. Serum Hepatitis B Virus RNA: A New Potential Biomarker for Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Hepatology.* 2019;69(4):1816-27.
321. Cheng PN, Liu WC, Tsai HW, Wu IC, Chang TT, Young KC. Association of intrahepatic cccDNA reduction with the improvement of liver histology in chronic hepatitis B patients receiving oral antiviral agents. *J Med Virol.* 2011;83(4):602-7.
322. Guner R, Karahocagil M, Buyukberber M, Kandemir O, Ural O, Usluer G, et al. Correlation between intrahepatic hepatitis B virus cccDNA levels and other activity markers in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011;23(12):1185-91.
323. Takkenberg RB, Zaaier HL, Menting S, Weegink CJ, Terpstra V, Cornelissen M, et al. Detection of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in paraffin-embedded and cryo-preserved liver biopsies of chronic hepatitis B patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2010;22(8):952-60.
324. Kitab B, Alj HS, Ezzikouri S, Benjelloun S. MicroRNAs as Important Players in Host-hepatitis B Virus Interactions. *J Clin Transl Hepatol.* 2015;3(2):149-61.
325. Wu HJ, Zhuo Y, Zhou YC, Wang XW, Wang YP, Si CY, et al. miR-29a promotes hepatitis B virus replication and expression by targeting SMARCE1 in hepatoma carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2017;23(25):4569-78.
326. Pan H, Niu DD, Feng H, Ng LF, Ren EC, Chen WN. Cellular transcription

modulator SMARCE1 binds to HBV core promoter containing naturally occurring deletions and represses viral replication. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772(9):1075-84.

327. Wang Y, Cao J, Zhang S, Sun L, Nan Y, Yao H, et al. MicroRNA-802 induces hepatitis B virus replication and replication through regulating SMARCE1 expression in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis*. 2019;10(10):783.

328. Lee D, Xu IM, Chiu DK, Leibold J, Tse AP, Bao MH, et al. Induction of Oxidative Stress Through Inhibition of Thioredoxin Reductase 1 Is an Effective Therapeutic Approach for Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*. 2019;69(4):1768-86.

329. Stafford WC, Peng X, Olofsson MH, Zhang X, Luci DK, Lu L, et al. Irreversible inhibition of cytosolic thioredoxin reductase 1 as a mechanistic basis for anticancer therapy. *Sci Transl Med*. 2018;10(428):eaaf7444.

330. Hayashi M, Yamada S, Kurimoto K, Tanabe H, Hirabayashi S, Sonohara F, et al. miR-23b-3p Plays an Oncogenic Role in Hepatocellular Carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2021;28(6):3416-26.

331. Sun Q, Li J, Jin B, Wang T, Gu J. Evaluation of miR-331-3p and miR-23b-3p as serum biomarkers for hepatitis c virus-related hepatocellular carcinoma at early stage. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2020;44(1):21-8.

332. Liu S, Yao X, Zhang D, Sheng J, Wen X, Wang Q, et al. Analysis of Transcription Factor-Related Regulatory Networks Based on Bioinformatics Analysis and Validation in Hepatocellular Carcinoma. *Biomed Res Int*. 2018;2018:1431396.

333. Huang JH, Han TT, Li LX, Qu T, Zhang XY, Liao X, et al. Host microRNAs regulate expression of hepatitis B virus genes during transmission from patients' sperm to embryo. *Reprod Toxicol*. 2021;100:1-6.

334. Lin D, Fu Z, Yang G, Gao D, Wang T, Liu Z, et al. Exportin-5 SUMOylation promotes hepatocellular carcinoma progression. *Exp Cell Res*. 2020;395(2):112219.

335. Wei YQ. Impaired XPO5 function leads to transportation failure of microRNA precursor. *Sci China Life Sci*. 2017;60(6):677-9.

336. Lin Y, Su C, Niu J, Guo Z, Lu Y. The Association between NFKBIA

Polymorphisms and the Progression of Chronic Hepatitis B Virus Infection among the Chinese Han Population. *Jpn J Infect Dis.* 2018;71(1):21-7.

337. Daud M, Rana MA, Husnain T, Ijaz B. Modulation of Wnt signaling pathway by hepatitis B virus. *Arch Virol.* 2017;162(10):2937-47.

338. Xiang K, Wang B. Role of the PI3K-AKT-mTOR pathway in hepatitis B virus infection and replication. *Mol Med Rep.* 2018;17(3):4713-9.

339. Wang X, Lin Y, Kemper T, Chen J, Yuan Z, Liu S, et al. AMPK and Akt/mTOR signalling pathways participate in glucose-mediated regulation of hepatitis B virus replication and cellular autophagy. *Cell Microbiol.* 2020;22(2):e13131.

340. Pettinelli P, Arendt BM, Teterina A, McGilvray I, Comelli EM, Fung SK, et al. Altered hepatic genes related to retinol metabolism and plasma retinol in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *PloS One.* 2018;13(10):e0205747.

341. Zhang Y, Chen X, Cao Y, Yang Z. C8B in Complement and Coagulation Cascades Signaling Pathway is a predictor for Survival in HBV-Related Hepatocellular Carcinoma Patients. *Cancer Manag Res.* 2021;13:3503-15.

342. Tang J, Zhang ZH, Liu GL. A systematic analysis of the predicted human La protein targets identified a hepatitis B virus infection signature. *J Viral Hepat.* 2013;20(1):12-23.

343. Hu J, Protzer U, Siddiqui A. Revisiting Hepatitis B Virus: Challenges of Curative Therapies. *J Virol.* 2019;93(20):e01032-19.

344. Xia Y, Guo H. Hepatitis B virus cccDNA: Formation, regulation and therapeutic potential. *Antiviral Res.* 2020;180:104824.

345. Mohd-Ismail NK, Lim Z, Gunaratne J, Tan Y-J. Mapping the Interactions of HBV cccDNA with Host Factors. *Int J Mol Sci.* 2019;20(17):4276.

346. Dandri M. Epigenetic modulation in chronic hepatitis B virus infection. *Semin Immunopathol.* 2020;42(2):173-85.

347. Ji M, Mei X, Jing X, Xu X, Chen X, Pan W. The cooperative complex of Argonaute-2 and microRNA-146a regulates hepatitis B virus replication through flap endonuclease 1. *Life Sci.* 2020;257:118089.

348. Ecco G, Imbeault M, Trono D. KRAB zinc finger proteins. *Development*. 2017;144(15):2719-29.
349. Sobocińska J, Molenda S, Machnik M, Oleksiewicz U. KRAB-ZFP Transcriptional Regulators Acting as Oncogenes and Tumor Suppressors: An Overview. *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):2212.
350. Cesaro E, Sodaro G, Montano G, Grosso M, Lupo A, Costanzo P. The Complex Role of the ZNF224 Transcription Factor in Cancer. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2017;107:191-222.
351. Harada Y, Kanehira M, Fujisawa Y, Takata R, Shuin T, Miki T, et al. Cell-permeable peptide DEPDC1-ZNF224 interferes with transcriptional repression and oncogenicity in bladder cancer cells. *Cancer Res*. 2010;70(14):5829-39.
352. Cho JG, Park S, Lim CH, Kim HS, Song SY, Roh TY, et al. ZNF224, Krüppel like zinc finger protein, induces cell growth and apoptosis-resistance by down-regulation of p21 and p53 via miR-663a. *Oncotarget*. 2016;7(21):31177-90.
353. Busiello T, Ciano M, Romano S, Sodaro G, Garofalo O, Bruzzese D, et al. Role of ZNF224 in cell growth and chemoresistance of chronic lymphocytic leukemia. *Hum Mol Genet*. 2017;26(2):344-53.
354. Montano G, Cesaro E, Fattore L, Vidovic K, Palladino C, Crescitelli R, et al. Role of WT1-ZNF224 interaction in the expression of apoptosis-regulating genes. *Hum Mol Genet*. 2013;22(9):1771-82.
355. Nan YH, Wang J, Wang Y, Sun PH, Han YP, Fan L, et al. MiR-4295 promotes cell growth in bladder cancer by targeting BTG1. *Am J Transl Res*. 2016;8(11):4892-901.
356. Yuan Q, Zhang Y, Li J, Cao G, Yang W. High expression of microRNA-4295 contributes to cell proliferation and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma by the down-regulation of Glypican-5. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;497(1):73-9.
357. Cheng JP, Huang B, Duan JH, Yi KJ, Zhuang ZL. miR-4295 promotes cell proliferation, migration and invasion of osteosarcoma through targeting interferon regulatory factor 1. *Oncol Lett*. 2020;20(5):260.

358. Su FH, Huang YL, Sung FC, Su CT, Hsu WH, Chang SN, et al. Annual influenza vaccination reduces total hospitalization in patients with chronic hepatitis B virus infection: A population-based analysis. *Vaccine*. 2016;34(1):120-7.
359. Hesari A, Ghasemi F, Salarinia R, Biglari H, Tabar Molla Hassan A, Abdoli V, et al. Effects of curcumin on NF- $\kappa$ B, AP-1, and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in hepatitis B virus infection. *J Cell Biochem*. 2018;119(10):7898-904.
360. Lin J, Gu C, Shen Z, Liu Y, Wang W, Tao S, et al. Hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$  downregulates HBV gene expression and replication by activating the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *PloS One*. 2017;12(3):e0174017.
361. Ahmed FA, Bajaifar MS, Ahmed MA, Alalwan A, Sanai FA, Albeladi K, et al. Quantitative HBsAg levels do not identify hepatic fibrosis in HBeAg-negative chronic hepatitis B patients. *Saudi J Gastroenterol*. 2019;25(5):286-92.
362. Broquetas T, Garcia-Retortillo M, Hernandez JJ, Puigvehí M, Cañete N, Coll S, et al. Quantification of HBsAg to predict low levels and seroclearance in HBeAg-negative patients receiving nucleos(t)ide analogues. *PloS One*. 2017;12(11):e0188303-e.
363. Kołat D, Kałuzińska Ż, Bednarek AK, Płuciennik E. The biological characteristics of transcription factors AP-2 $\alpha$  and AP-2 $\gamma$  and their importance in various types of cancers. *Biosci Rep*. 2019;39(3):BSR20181928.
364. Qu J, Li J, Chen K, Qin D, Li K, Sheng Y, et al. Hepatitis B virus regulation of Raf1 promoter activity through activation of transcription factor AP-2 $\alpha$ . *Arch Virol*. 2013;158(4):887-94.
365. Xiong Y, Feng Y, Zhao J, Lei J, Qiao T, Zhou Y, et al. TFAP2A potentiates lung adenocarcinoma metastasis by a novel miR-16 family/TFAP2A/PSG9/TGF- $\beta$  signaling pathway. *Cell Death Dis*. 2021;12(4):352.
366. Liu H, Li F, Zhang X, Yu J, Wang J, Jia J, et al. Differentially Expressed Intrahepatic Genes Contribute to Control of Hepatitis B Virus Replication in the Inactive Carrier Phase. *J Infect Dis*. 2018;217(7):1044-54.
367. Shi YX, Huang CJ, Yang ZG. Impact of hepatitis B virus infection on hepatic metabolic signaling pathway. *World J Gastroenterol*. 2016;22(36):8161-7.

368. Gil-García AI, Madejón A, Francisco-Recuero I, López-López A, Villafranca E, Romero M, et al. Prevalence of hepatocarcinoma-related hepatitis B virus mutants in patients in grey zone of treatment. *World J Gastroenterol*. 2019;25(38):5883-96.
369. Choi GH, Kim GA, Choi J, Han S, Lim YS. High risk of clinical events in untreated HBeAg-negative chronic hepatitis B patients with high viral load and no significant ALT elevation. *Aliment Pharmacol Ther*. 2019;50(2):215-26.
370. Zhou H, Li L, Xie W, Wu L, Lin Y, He X. TAGLN and High-mobility Group AT-Hook 2 (HMGA2) Complex Regulates TGF- $\beta$ -induced Colorectal Cancer Metastasis. *Onco Targets Ther*. 2020;13:10489-98.
371. Elsafadi M, Manikandan M, Almalki S, Mahmood A, Shinwari T, Vishnubalaji R, et al. Transgelin is a poor prognostic factor associated with advanced colorectal cancer (CRC) stage promoting tumor growth and migration in a TGF $\beta$ -dependent manner. *Cell Death Dis*. 2020;11(5):341.
372. Yu Y, He Z, Cao Y, Tang H, Huang F. TAGLN2, a novel regulator involved in Hepatitis B virus transcription and replication. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;477(4):1051-8.
373. Liu Z, Xu Y, Zhang W, Gao X, Luo G, Song H, et al. Identification of targets of JS-K against HBV-positive human hepatocellular carcinoma HepG2.2.15 cells with iTRAQ proteomics. *Sci Rep*. 2021;11(1):10381.
374. Li H, Zhu W, Zhang L, Lei H, Wu X, Guo L, et al. The metabolic responses to hepatitis B virus infection shed new light on pathogenesis and targets for treatment. *Sci Rep*. 2015;5:8421.
375. Kim K, Kim KH, Kim HH, Cheong J. Hepatitis B virus X protein induces lipogenic transcription factor SREBP1 and fatty acid synthase through the activation of nuclear receptor LXRalpha. *Biochem J*. 2008;416(2):219-30.

## **CAPÍTULO IX: ANEXOS**

# ANEXO 1: HOJA DE RECOGIDA DE BASE DE DATOS

## VISTA BASAL

Apellido y nombre: \_\_\_\_\_

Centro: \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_

## ESTUDIO SEROLÓGICO

HBsAg  Positivo  Negativo (Fecha: \_\_\_\_\_)

Anti-HBs  Positivo  Negativo (Fecha: \_\_\_\_\_)

Anti-HBc IgG  Positivo  Negativo (Fecha: \_\_\_\_\_)

Anti-HBc IgM  Positivo  Negativo (Fecha: \_\_\_\_\_)

HBeAg  Positivo  Negativo (Fecha: \_\_\_\_\_)

Anti-HBe  Positivo  Negativo (Fecha: \_\_\_\_\_)

## ESTUDIO DE GENOTIPO:

Genotipo A  Genotipo B  Genotipo C

Genotipo D  Genotipo E  No sabe

## ESTUDIO VIROLÓGICO

ADN-VHB (antes de tto): \_\_\_\_\_ IU/mL (Fecha: \_\_\_\_\_)

ADN-VHB (después de tto): \_\_\_\_\_ IU/mL (Fecha: \_\_\_\_\_)

qHBsAg (antes de tto): \_\_\_\_\_ IU/mL (Fecha: \_\_\_\_\_)

qHBsAg (después de tto): \_\_\_\_\_ IU/mL (Fecha: \_\_\_\_\_)

ARNpg-VHB en suero (antes de tto): \_\_\_\_\_ (copies/mL) (Fecha: \_\_\_\_\_)

ARNpg-VHB intrahepático (antes de tto): \_\_\_\_\_ (copies/mL) (Fecha: \_\_\_\_\_)

ADNccc intrahepático (antes de tto): \_\_\_\_\_ (copia/cel) (Fecha: \_\_\_\_\_)

ADN-VHB intrahepático total (antes de tto): \_\_\_\_\_ (Fecha: \_\_\_\_\_)

## ESTUDIO BIOLÓGICO

AST: \_\_\_\_\_ U/L  
ALT: \_\_\_\_\_ U/L  
GTT: \_\_\_\_\_ U/L  
Fosfatasa alcalina: \_\_\_\_\_ U/L  
Proteína total: \_\_\_\_\_ g/dL  
Bilirrubina total: \_\_\_\_\_ mg/dL  
Colinesterasa: \_\_\_\_\_ U/L  
Lactato deshidrogenasa: \_\_\_\_\_ U/L  
Creatinina: \_\_\_\_\_ mg/dL  
Colesterol: \_\_\_\_\_ mg/dL  
Triglicérido: \_\_\_\_\_ mg/dL  
HDL: \_\_\_\_\_ mg/dL  
LDL: \_\_\_\_\_ mg/dL  
Índice de forns: \_\_\_\_\_  
Índice de APRI: \_\_\_\_\_  
Índice de FIB-4: \_\_\_\_\_  
Glucemia: \_\_\_\_\_ mg/dL  
Resistencia a insulina: \_\_\_\_\_  
Hemoglobina: \_\_\_\_\_ g/dL  
Plaquetas: \_\_\_\_\_ K/ $\mu$ L  
INR: \_\_\_\_\_  
Tiempo de protrombina: \_\_\_\_\_ seg  
Actividad de protrombina: \_\_\_\_\_%  
Tiempo de cefalina: \_\_\_\_\_ seg

## ESTUDIO DE ELASTROGRAFÍA HEPÁTICA

Fibroscan: \_\_\_\_\_ Kpa

## ESTUDIO HISTOLÓGICO

Biopsia hepática realizada:  Sí  No

➤ Nivel de infiltración portal:

- 0: Ausente o mínima.
- 1: Inflamación portal sin necrosis.
- 2: Necrosis leve de interfase.
- 3: Necrosis moderada de la interfase.
- 4: Necrosis difusa severa de interfase.

➤ Nivel de infiltración lobulillar:

- 0: Ninguna.
- 1: Inflamación lobulillar sin daño hepatocelular.

- 2: Necrosis o apoptosis focal.
- 3: Necrosis focal severa (necrosis confluyente).
- 4: Daño que incluye necrosis confluyente en puentes.

➤ Nivel de fibrosis:

- 0: Sin fibrosis.
- 1: Fibrosis limitada a los espacios porta.
- 2: Septos fibrosis peri-portal o porta-porta, pero con relación vascular intactas.
- 3: Fibrosis con estructura alterada, pero sin cirrosis obvia.
- 4: Probable o definitiva cirrosis

## TRATAMIENTO

Lleva tratamiento antiviral:  Sí (Fecha: \_\_\_\_\_)  No

Nombre y dosis de tratamiento antiviral: \_\_\_\_\_

## SEGUIMIENTO

Vivo

- Progresión:  No hay progresión
- Cirrosis hepática
  - Encefalopatía hepática
  - Hepatocarcinoma
  - Hemorragia por hipertensión portal
  - Otros: \_\_\_\_\_

Muerto

- Causa:  Hepática: \_\_\_\_\_
- No hepática: \_\_\_\_\_