



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Análisis de los Factores Virales e Inmunológicos en la Patogénesis y Tratamiento de la Hepatitis Crónica B: Estudio Comparativo Intrahepático y Periférico

Mireia García López

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

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

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

**Análisis de los Factores Virales e Inmunológicos en la
Patogénesis y Tratamiento de la Hepatitis Crónica B:
Estudio Comparativo Intrahepático y Periférico**

Memoria de tesis doctoral presentada por

Mireia García López

para optar al grado de doctora por la



Universitat de Barcelona

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

Programa de doctorado de Medicina e Investigación Traslacional

Directora de tesis

Dra. Sofía Pérez del Pulgar Gallart

CIBEREHD, IDIBAPS

Tutor de tesis

Dr. Xavier Forns Bernhardt

Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBEREHD

Realizada en el grupo de *Hepatopatías Tóxicas, Víricas y Metabólicas* del Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)-Hospital Clínic de Barcelona-CEK



Septiembre, 2024

Sobre mi:

Haré todo lo que pueda y un poco más de lo que pueda si es que eso es posible.

Y haré todo lo posible e incluso lo imposible, si también lo imposible es posible.

... Los catalanes hacen cosas.

M. Rajoy, 2018.

Sobre el proyecto:

(HCV) Un virus amb cura i sense vacuna.

(HBV) Un virus amb vacuna, però sense cura.

Xavier Forns, 2021.



International HBV meeting, 2016.

Sobre el futuro:

—Mira, hijo mío, este señor le ha metido esa enfermedad al conejo para estudiarla...

—¡Pobre conejillo! ¡pobre conejillo!

—Para curar a los hombres luego...

—¡Pobre conejillo! ¡Pobre conejillo!

—Pero mira, niño, hay que aprender a curar.

—Y ¿por qué no le curan al conejillo?

Amor y pedagogía - Miguel de Unamuno, 1902.

A mi mamuchi, a mi abu y a ti que la estás leyendo.

AGRADECIMIENTOS

Es de buen nacido ser agradecido... No recuerdo cómo fue aquel 27 de agosto del 1991, pero seguramente le di algo de guerra a mi pobre madre. En fin, espero que agradecer se me dé mejor.

Estáis probablemente ante las páginas más leídas de la tesis y las únicas que no habrán pasado corrección alguna... mucha presión, pero esto se va a escribir solo.

Empezar por quien ha hecho esto posible más que nadie: la doctora (y persona) **Sofía Pérez del Pulgar Gallart**. Por las oportunidades, la paciencia, la fe en mi cuando ni yo misma la tenía, todas las enseñanzas científicas y vitales. Revisiones, diseños experimentales, “menos es más” en las diapositivas, los detalles más técnicos de la metodología, la diplomacia como bandera, XXXXXX. No te lo he puesto nada fácil y seguramente empezareis a hacer entrevistas más exhaustivas perdón por mis malas gestiones y por no haber estado en mi mejor versión muchas veces. Gracias por todos los momentos, tanto los buenos como los aprendizajes. De corazón, gracias.

Gracias también a **Xavi**, por confiar en Sofía y por ende en mí. Gracias por apostar por el aprendizaje (congresos, cursos...) por darnos la libertad de proponer y participar abiertamente en las reuniones y en los proyectos del grupo. Es un alivio ver que hay gente honesta y que quiere hacer buena ciencia. Gracias también por la paciencia y el respeto.

Buenos jefes, mejores personas.

Patri, he de ponerte con ellos porque has sido la jefa moral hahahaha.

Al grupo

A los vecinos

Colaboradores

Estancia

Amigos

Familia

Noe, Alberto, Maelle – Suzanne

Bárbara Testoni, Rocío, Anna pla – Irina – Marta Montero-Laura-Lidia-Vicenzo-Sylvana-Yabetse-María-

Martín Bonacci, Chema, Elenica

HH: Raquel Maeso, Nico, Erica

Giorgos, Laura Díaz

Marcos – Iñi – Nuria

A mis psicólogas (Elena, Elena y Beatriz) y a mi psiquiatra (Diego).

A Marta Salido, la primera persona que creyó que podía ser doctora. Aún recuerdo con cariño esas prácticas de grado aprendiendo a hacer cariotipos y ordenando slides. Gracias por ver en mi un potencial que no creía que tenía y por ser luz en este mundillo a veces algo competitivo y demandante.

Y nada, realmente me podría remontar hasta el inicio de mi existencia, e incluso previamente a ésta dado el hecho indiscutible de que “Todo está conectado” pero si me pongo a ello, las páginas de esta sección serían un coste no despreciable en el cómputo total de la impresión de la tesis y una, es catalana, al fin y al cabo.

Gracias 😊

Si me dejo a alguien no es porque no fuese importante, es que no doy a más.

“Lo siento mucho, me he equivocado y no volverá a ocurrir”

Rey emérito JC, 2012.

FINANCIACIÓN

Proyectos:

PI15/00151

PI16/00111

PI18/00079

PI19/00036



Beca contrato principal:

IF18/00006

Beca movilidad:

MV21/00003

Ayudas de docencia de CIBEREHD:

Curso Flowjo, 2019.

Curso ddPCR, 2020.

Asistencia a la 1ª Reunión de hepatología Traslacional, 2019.

Asistencia congreso AASLD/EASL: HBV Endpoints 2019.

Asistencia congreso HBV meeting 2021.



Beca de grupo:

2017_SGR_1753 (X.F.)



TESIS MONOGRÁFICA

Tesis en formato clásico con 1 artículo anexo.

La tesis consta de 5 objetivos y 1 artículo:

- Viral and immune factors associated with successful treatment withdrawal in HBeAg-negative chronic hepatitis B patients.

Mireia García-López, Sabela Lens, Laura J. Pallett, Barbara Testoni, Sergio Rodríguez-Tajes, Zoe Mariño, Concepción Bartres, Ester García-Pras, Thais Leonel, Elena Perpiñán, Juan José Lozano, Francisco Rodríguez-Frías, George Koutsoudakis, Fabien Zoulim, Mala K. Maini, Xavier Forns, and Sofía Pérez-del-Pulgar.

Journal of Hepatology. 2021 May, 74(5): 1064–1074.

Impact factor (2021): 30.083

5/93 – Q1 (Gastroenterología y hepatología).

ÍNDICE

RESUMEN	19
INTRODUCCIÓN.....	21
EL VIRUS DE LA HEPATITIS B.....	22
1.1. HISTORIA Y EPIDEMIOLOGÍA	22
1.2. ESTRUCTURA VIRAL Y ORGANIZACIÓN GENÓMICA.....	24
1.3. DIVERSIDAD GENÉTICA DEL VHB.....	25
1.4. CICLO VIRAL DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B	26
1.5. BIOMARCADORES EN LA HEPATITIS B	28
HISTORIA NATURAL Y FASES DE LA INFECCIÓN	30
2.1. TRATAMIENTO CONTRA LA HEPATITIS B.....	32
2.1.1. Interferón.....	32
2.1.2. NUCs.....	33
2.2. PARADA DE TRATAMIENTO COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA	34
RESPUESTA INMUNE CONTRA EL VHB.....	35
3.1. RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN HEPATITIS AGUDA Y CRONICIDAD	35
3.2. DISFUNCIÓN DE LA INMUNIDAD ADAPTATIVA EN LA HEPATITIS B CRÓNICA.....	36
3.2.1. La función de las células T en la CHB	37
3.2.2. Agotamiento células T	38
3.3. CARACTERÍSTICAS INMUNOLÓGICAS DEL HÍGADO.	39
3.4. INMUNOTERAPIAS	41
3.4.1. PD1-PD-L1	43
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	48
HIPÓTESIS.....	49
OBJETIVOS.....	50
MATERIAL Y MÉTODOS.....	52
INCLUSIÓN DE PACIENTES	53
CRITERIOS DE REINTRODUCCIÓN DE TRATAMIENTO TRAS LA RETIRADA DE NUCs.....	53
DISEÑO DEL ESTUDIO Y RECOGIDA DE MUESTRAS	54
MARCADORES SEROLÓGICOS DE REPLICACIÓN VIRAL	56
MARCADORES VIROLÓGICOS EN TEJIDO.....	56

ANÁLISIS INMUNOLÓGICO DESPUÉS DE ESTIMULAR <i>IN VITRO</i> CON PÉPTIDOS SOLAPANTES DEL VHB (ESTUDIO 1).....	58
ANÁLISIS <i>EX VIVO</i> DE POBLACIONES INMUNITARIAS EN PERIFERIA E INTRAHEPÁTICAS (ESTUDIO 2).....	60
ANÁLISIS DE DATOS DE SECUENCIACIÓN DE ARN DE CÉLULA ÚNICA.....	62
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	63
<u>RESULTADOS.....</u>	65
ESTUDIO 1:.....	66
CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES ANTES Y DESPUÉS INTERRUMPIR EL TRATAMIENTO CON NUCs	66
CINÉTICA DEL ADN-VHB, ALT Y HBSAG TRAS LA RETIRADA DE NUCs.....	69
LOS NIVELES DE HBSAG BASALES CORRELACIONAN CON EL IHBV-DNA Y EL IHBV-RNA, PERO NO CON EL CCCDNA.....	70
NIVELES BASALES BAJOS DE HBSAG SE ASOCIAN CON LA PÉRDIDA DE HBSAG TRAS LA RETIRADA DE NUCs	71
LAS RESPUESTAS DE CÉLULAS T ESPECÍFICAS CONTRA EL VHB DURANTE EL TRATAMIENTO SE ASOCIAN CON EL CONTROL VIROLÓGICO TRAS SU RETIRADA	73
LAS RESPUESTAS ESPECÍFICAS FRENTE AL VHB NO AUMENTAN TRAS LA INTERRUPCIÓN DEL TRATAMIENTO	77
EL GRADO DE RESPUESTA DE LAS CÉLULAS T VHB ESPECÍFICAS NO SE CORRELACIONA CON LOS MARCADORES VIRALES SEROLÓGICOS O INTRAHEPÁTICOS	79
SEGURIDAD.....	81
ESTUDIO 2:.....	82
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y VIROLÓGICAS DE LA COHORTE DEL ESTUDIO	82
LA EXPRESIÓN DE PD-1 EN CÉLULAS CD8 TRM SE ASOCIA CON LA REPLICACIÓN DEL VHB	83
LA EXPRESIÓN DE PD-1 EN LAS CÉLULAS T INTRAHEPÁTICAS ESTÁ MODULADA POR LA REPLICACIÓN DEL VHB	86
PERFIL TRANSCRIPTÓMICO DE CÉLULA ÚNICA EN CÉLULAS T CD8 TRM	91
<u>DISCUSIÓN.....</u>	96
<u>CONCLUSIONES.....</u>	107
<u>BIBLIOGRAFÍA.....</u>	110
<u>ANEXO.....</u>	123

RESUMEN

El objetivo fue analizar los factores virológicos, clínicos e inmunológicos tanto en la sangre como en el hígado, en el contexto de la hepatitis crónica B y su relación con la patogénesis de la infección por el VHB y la respuesta a los tratamientos. Para ello, se llevaron a cabo dos estudios complementarios.

El primer estudio identificó el efecto de la función del sistema inmunitario adquirido para lograr la cura funcional después de la suspensión del tratamiento antiviral, evaluando la utilidad de la determinación del cccADN intrahepático como factor predictivo de respuesta tras la interrupción del tratamiento antiviral. Los resultados demostraron que la interrupción del tratamiento con análogos de nucleós(t)idos es factible en una proporción elevada de pacientes HBeAg negativos sin cirrosis, y que niveles bajos de HBsAg (≤ 1000 UI/ml) en suero pueden ofrecer un valor predictivo para identificar a aquellos pacientes en los que la interrupción del tratamiento antiviral, con una estrecha vigilancia, sería una estrategia terapéutica válida para lograr la curación funcional. En pacientes con un perfil virológico menos favorable, la funcionalidad de las células T específicas para el VHB podría contribuir a una respuesta favorable después de la suspensión del tratamiento. Estos pacientes podrían beneficiarse de nuevas opciones inmunoterapéuticas finitas después de la interrupción del tratamiento antiviral para aumentar la tasa de pérdida del HBsAg.

El segundo estudio abordó la discrepancia entre las respuestas inmunitarias periféricas e intrahepáticas. Aunque las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se utilizan ampliamente para examinar las respuestas inmunitarias adaptativas contra el VHB y la eficacia de las inmunoterapias, se evidenció que las respuestas inmunitarias intrahepáticas no siempre se reflejan en la periferia. Para profundizar en esta área, se utilizó la punción aspirativa con aguja fina (PAAF) como fuente de células inmunitarias para monitorizar las respuestas intrahepáticas longitudinalmente. Se recogieron y analizaron muestras de sangre, biopsias hepáticas y PAAF apareadas para proporcionar nuevos conocimientos sobre la relación entre los biomarcadores intrahepáticos de la replicación viral y la expresión de PD-1 en las células T CD8 residentes en el hígado. Se demostró una asociación entre la expresión de PD-1 en células T CD8 residentes en el hígado y la replicación del VHB, junto con una reducción mediante la supresión viral a través de la terapia con análogos de nucleós(t)idos. Aún queda por explorar el mecanismo por el cual la carga viral del VHB se asocia con la expresión global de PD-1 en las células T o si los análogos de nucleós(t)idos en sí mismos son capaces de modular dicha expresión.

INTRODUCCIÓN

El virus de la hepatitis B

El virus de la hepatitis B (VHB) es un virus ADN hepatotrópico de la familia Hepadnaviridae y del género Orthohepadnavirus (1) que causa la hepatitis B, enfermedad caracterizada por inflamación en el hígado (2).

1.1. Historia y epidemiología

Aunque varios estudios han encontrado restos de ADN viral en muestras humanas datadas hace más de 50000 años (3,4), el VHB fue descubierto en 1967 por el Dr. Baruch Blumberg (5). En un principio, Blumberg pensó que había descubierto una nueva lipoproteína en sueros de aborígenes australianos al ver que estos reaccionaban ante anticuerpos de un paciente con hemofilia. Lo que en su momento llamó “antígeno de Australia”, hoy es conocido por ser el antígeno de superficie (HBsAg).

En 1970 se relacionó este antígeno con la hepatitis; fue entonces cuando David S. Dane et al. descubrieron partículas virus-like (partículas Dane) mediante microscopio electrónico (6) las cuales resultaron ser viriones infecciosos del VHB. En 1976, Blumberg recibió el Premio nobel de medicina dado que, a partir de su descubrimiento, fueron posibles tanto las vacunas como las pruebas para evitar la propagación del VHB a través de las transfusiones de sangre (7).

Pese a la existencia de vacuna desde 1980 (8), se estiman que 296 millones de personas viven con hepatitis b crónica y se le relacionan unas 820000 muertes anuales por complicaciones via carcinoma hepatocelular y/o fallo hepático (2). La endemicidad de la infección activa por el VHB se refleja en la prevalencia serológica del HBsAg en la población general de un área geográfica definida. Ésta varía del 0.1 hasta 20% dependiendo del nivel socioeconómico del país, vacunación y patrones migratorios (**Figura 1**).

Una prevalencia $\geq 8\%$ define áreas altamente endémicas, de 5%-7% áreas intermedias altas, 2%-4% intermedias bajas y $< 2\%$ bajas (9). Las regiones con prevalencia más alta se encuentran en África sub-Sahariana, China y el sureste de Asia (10). En España, gracias a la introducción de la vacuna en el sistema sanitario y a la recomendación de su uso en adultos de grupos de riesgo (11), la prevalencia es baja. Últimos datos sitúan la seroprevalencia del HBsAg en un 0.6% de la población (12).

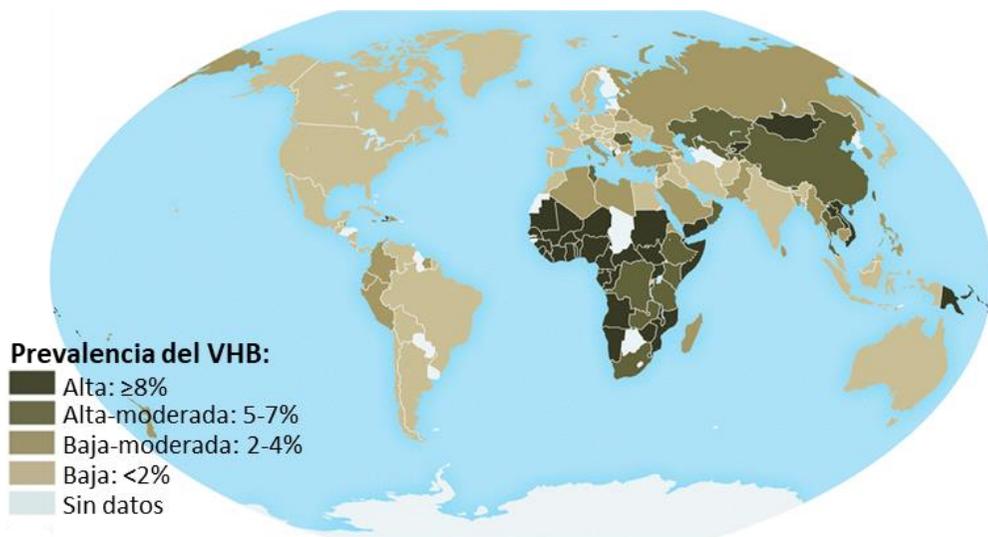


Figura 1. Prevalencia de la infección por el virus de la hepatitis B.
Datos de (10). Figura modificada de (13).

En cuanto a la transmisión del virus, hay dos vías principales: la vertical, que se da de madre a hijo/a y la horizontal, que puede producirse a través de heridas abiertas, transfusiones de sangre, transmisión sexual, inyección de drogas no seguras, uso de instrumentos y otros equipos no esterilizados, etc. El riesgo de cronificar la infección aumenta cuando la transmisión es vertical (el 90% de los casos cronifica) y cuanto más joven sea la persona(2).

1.2. Estructura viral y organización genómica

La estructura del virión del VHB (**Figura 2**) consiste en una envuelta compuesta por una membrana de bicapa lipídica con las tres isoformas del antígeno de superficie: “large” (L), “medium” (M) y “small” (S). Dentro de la envuelta está la cápside formada por la proteína core (HBcAg) que contiene el ADN viral circular parcialmente de doble cadena también llamado ADN circular relajado (rcDNA). Su cadena positiva (+) presenta un hueco de cientos de nucleótidos entre los extremos 3' y 5'. Covalentemente unida al extremo 5' de la cadena negativa (-), encontramos la polimerasa (14).

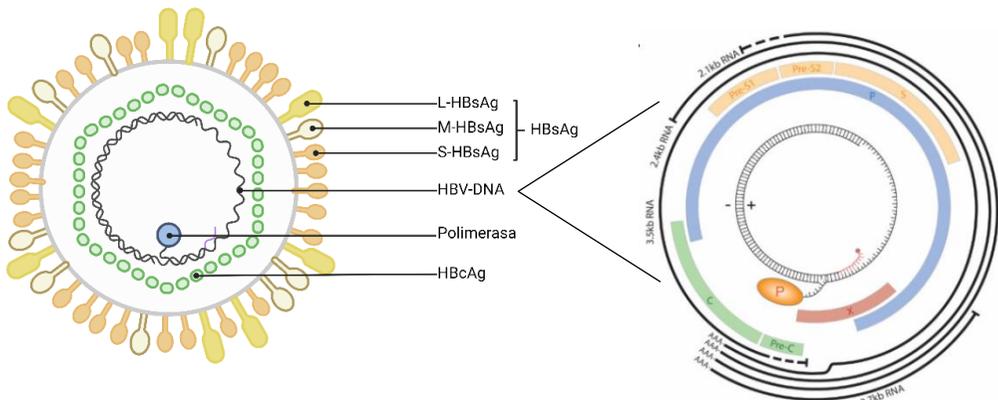


Figura 2. Esquema del virión, organización del genoma y mRNAs del VHB.
Composición mediante biorender.

El genoma tiene aproximadamente 3.200 pb (15,16) y se compone de cuatro marcos de lectura abiertos superpuestos de forma compacta y eficiente donde el 52% de los nucleótidos codifican para más de una proteína. Éstos codifican la transcripción del HBsAg (PreS1, PreS2 y S), el antígeno e (HBeAg) y el HBcAg (PreC y C), la polimerasa (P) con actividad retrotranscriptasa (17) y la proteína x (X)(18).

1.3. Diversidad genética del VHB

Pese a ser un virus de ADN, la falta de capacidad de corrección de la polimerasa y otros factores implicados en el ciclo viral (19) se traducen en una tasa de error relativamente alta ($1.4-3.2 \cdot 10^{-5}$ sustituciones de nucleótidos/sitio/año) durante la replicación viral (20,21).

Como resultado, tenemos una variabilidad genética en el VHB que se clasifica en ocho genotipos A-J (>8% variabilidad genética), en al menos 35 subgenotipos (4-8%) e incluso dentro de cada individuo pueden encontrarse cuasiespecies (22). Esto no sólo se debe a la falta de actividad correctora de la polimerasa, sino que esta variabilidad también es el resultado de una selección a través de la presión ejercida por la presión inmunitaria del huésped y factores exógenos como la terapia antiviral y/o la vacunación(23). Muchos estudios han reportado que los distintos genotipos y subgenotipos muestran una distribución geográfica (**Figura 3**) diferente (24), y que están relacionados con la progresión de la enfermedad, la evolución clínica, la respuesta al tratamiento antiviral y el pronóstico (19).

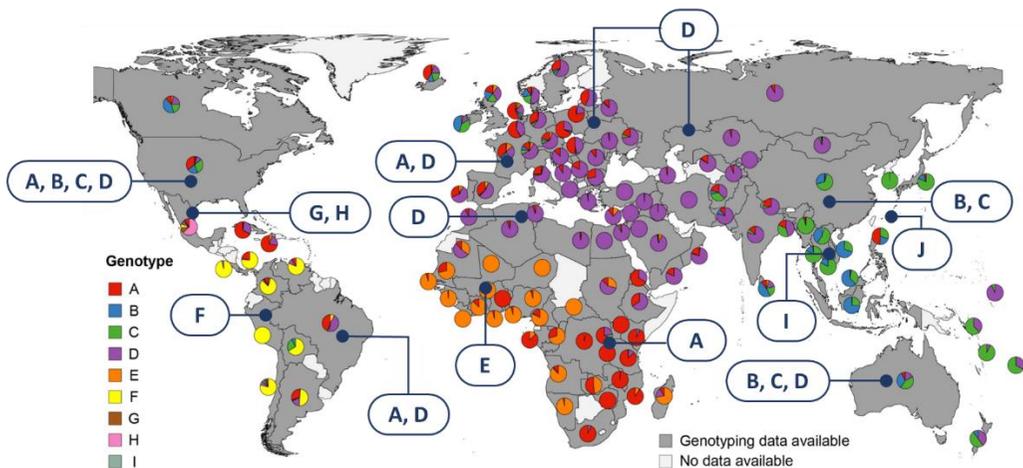


Figura 3. Distribución de los diferentes genotipos del virus de la hepatitis B.
Figura modificada de (25).

1.4. Ciclo viral del virus de la hepatitis B

La infección (**Figura 4**) empieza cuando el virión entra en el hepatocito a través del receptor NTCP (polipéptido cotransportador de sodio-taurocolato) mediante su interacción con el HBsAg (26,27). El virus se internaliza por endocitosis desprendiéndose de la envuelta y liberando la cápside en el citoplasma(28,29). El rcDNA se transporta hasta el núcleo donde se desprende de la cápside (30,31) y se transforma en ADN circular cerrado covalentemente (cccDNA) mediante encimas de reparación del huésped. Esta forma de ADN episomal o “minicromosoma” permanece estable en el núcleo y sirve como plantilla para la transcripción de los ARNs virales (18). Entre ellos tenemos los transcritos de 3.5 kb que son el ARNm pregenómico (pgRNA), que es el molde para la replicación viral y codifica tanto la polimerasa como la proteína del core, y el ARNm precore (preCRNA) que se traduce en el HBeAg y a veces en una proteína truncada relacionada con el core, p22cr(32). Además, tenemos el ARNm de 2.4kb que codifica el L-HBsAg, el ARNm de 2.1kb que se traduce en el M-HBsAg y el S-HBsAg, y uno de 0.7kb que se traduce en la proteína x (HBx)(18). Dentro del citoplasma del hepatocito, el pgRNA se encapsida junto a la polimerasa en una cápside formada por 120 dímeros de proteínas de core(33). Dentro, la polimerasa retrotranscribe el pgRNA en rcDNA. Las cápsides que contienen rcDNA pueden o bien volver al núcleo y amplificar el reservorio de cccDNA o ser envueltas y secretadas como nuevos viriones infecciosos (34). Cabe destacar, que se producen variantes durante la replicación a parte del rcDNA y que son secretadas en formas intermedias; como por ejemplo: cápsides vacías, cápsides que contienen pgRNA, viriones sin envuelta, etc (35,36). Durante mucho tiempo se creía que sólo las nucleocápsides maduras podían ser envueltas y secretadas(37,38). Sin embargo, a lo largo del proceso de replicación, se producen muchos intermediarios replicativos, incluyendo nucleocápsides no envueltas que contienen ADN del VHB y formas envueltas que contienen pgRNA y, en algunos casos, se secretan(35,39,40). También se han observado partículas no envueltas pero encapsuladas que contienen pgRNA dentro de complejos inmunes(36).

Paralelamente, el rcDNA también puede integrarse en el genoma del huésped contribuyendo a la inestabilidad cromosómica y a futuras complicaciones como el cáncer(41). Además, el ADN lineal de doble cadena del VHB (dsDNA), que ocasionalmente se produce tras transcripción inversa del pgRNA como un subproducto aberrante(42), puede ser liberado como un virión defectuoso o también integrarse en el genoma del hepatocito (43,44). Las integraciones normalmente no consiguen transcribir preCRNA o pgRNA por lo que no implica una fuente de producción de viriones. Sin embargo, pueden actuar como plantilla para la expresión de la proteína x y el HBsAg (45) favoreciendo en consecuencia la replicación viral, la tolerancia inmunológica y la persistencia viral.

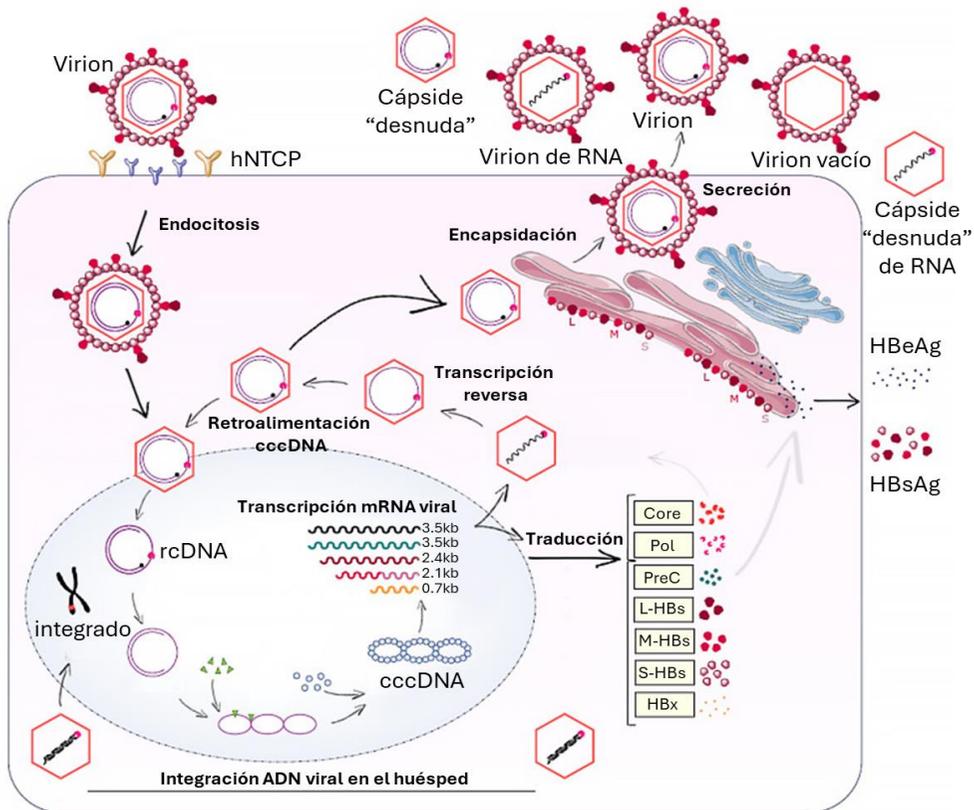


Figura 4. Ciclo viral del virus de la hepatitis B.

Figura modificada de (46).

1.5. Biomarcadores en la hepatitis B

Entender el ciclo viral ayuda a la búsqueda de biomarcadores para evaluar la enfermedad y orientar las posibles decisiones de tratamiento, incluso para desarrollar nuevos. Además, el diagnóstico de la infección por VHB incluye la determinación de marcadores virológicos (**Figura 5**): antígenos víricos, anticuerpos específicos y el estudio del ADN del VHB. Pese a que la infección sucede en el hígado, no siempre se tiene acceso a tejido y cuantificar el ADN del VHB total intrahepático (iHBV-DNA), el ADN del VHB integrado o incluso el cccDNA no es viable. Es por ello que los principales marcadores disponibles hasta la fecha tanto en investigación como en la clínica se miran en sangre (suero).

Entre ellos tenemos el **ADN-VHB**. Es el principal marcador de la replicación viral ya que consiste en la detección de viriones en sangre. A partir de él se puede determinar el genotipo. Otro marcador para la replicación del virus sería el antígeno e (**HBeAg**). Se usa para diferenciar las distintas fases de la enfermedad. Su negatividad sugiere una menor o falta de replicación, pero no siempre es así dado que hay variantes mutantes. También tenemos los anticuerpos para el HBeAg (**anti-HBe**), los cuales no son protectores y pueden aparecer una vez que el virus deja de replicarse de forma activa en el hígado y la proteína del antígeno e puede desaparecer.

Otro de los antígenos de mayor uso es el antígeno de superficie (**HBsAg**). Con él se monitoriza la cura funcional. No correlaciona bien con la replicación viral dado que puede venir tanto del cccDNA como del ADN-VHB integrado. Cuando encontramos anticuerpos para el HBsAg (**anti-HBs**), hablamos de pacientes curados y/o vacunados. Éste es el único anticuerpo neutralizante que confiere inmunidad a largo plazo.

Por otro lado, los anticuerpos para el core (**anti-HBc**) identifican las infecciones agudas (IgM) y las infecciones activas o pasadas (IgG).

Ninguno de estos marcadores representa una gran correlación con la actividad del cccDNA en pacientes con el virus suprimido, es por ello que en los últimos años se

han estudiado otros con más potencial. El antígeno relacionado con el core (**HBcrAg**) es un biomarcador compuesto que detecta core, p22cr y HBeAg. Pese varias demostraciones de su papel como marcador de la actividad transcripcional del cccDNA(47,48), su límite de detección es muy alto y pierde utilidad en pacientes con baja replicación viral(49).

Tenemos también el **ARN-VHB / pgRNA (o cirB-RNA)**. Su directa relación con el cccDNA lo convierte en el biomarcador más sensible y específico en cuanto a la actividad transcripcional del cccDNA(50). Sin embargo hasta la fecha no hay una técnica estandarizada para su uso aunque si empiezan a publicarse algunos estudios donde lo intentan(51,52).

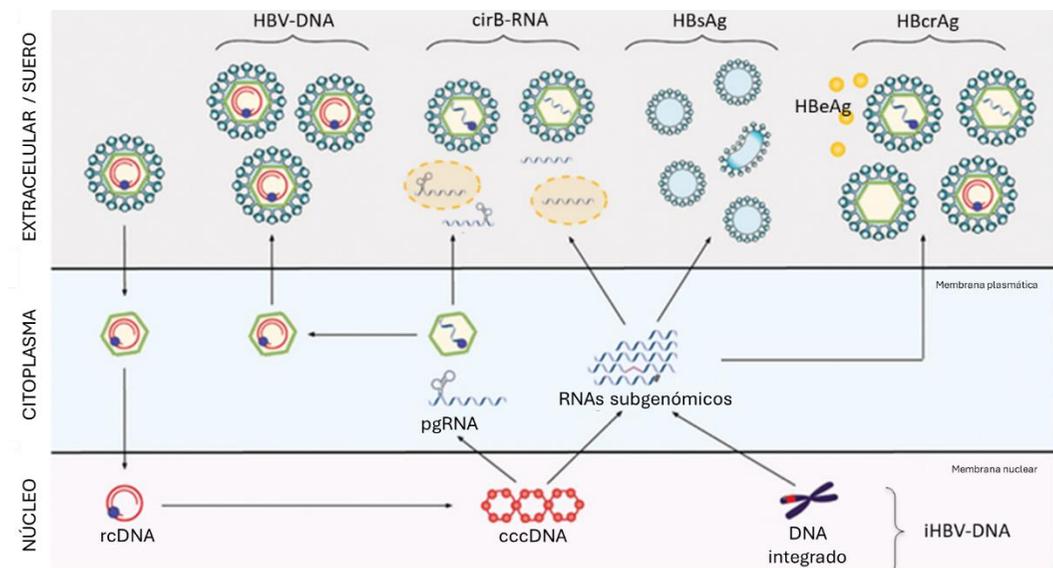


Figura 5. Diferentes biomarcadores serológicos e intrahepáticos en la hepatitis B.
Figura modificada de (53).

Historia natural y fases de la infección

El virus de la hepatitis B puede dar lugar a una infección aguda que puede ir desde una infección asintomática o una enfermedad leve hasta una hepatitis grave o fulminante. Cuando la infección se prolonga durante más de 6 meses con HBsAg positivo, hablamos de una infección crónica(54).

La mayoría de los adultos inmunocompetentes se recuperan espontáneamente con la seroconversión del HBsAg y el desarrollo de anticuerpos (antiHBs), y sólo entre el 1-5% desarrollan una infección crónica. Sin embargo, el riesgo de desarrollar una infección crónica por VHB es del 90% si la infección se adquiere al nacer y del 16-30% si se adquiere en la infancia(55).

La historia natural de la infección crónica por el VHB (**Figura 6**) es dinámica y compleja, y progresa de forma no lineal a través de fases de duración variable dependiendo del equilibrio entre la replicación viral y el control inmunitario. Estas cuatro fases (54) se definen a partir de 3 variables: la presencia de HBeAg, los niveles de ADN-VHB y los niveles de ALT (alanina amino transferasa), enzima hepática utilizada como marcador de necrosis hepatocelular:

- Infección crónica HBeAg(+): Muy común en pacientes con infección adquirida durante la infancia. Los niveles de ADN-VHB son elevados, las ALT normales y la inflamación hepática es mínima.
- Hepatitis crónica HBeAg(+): Descrita por niveles altos-moderados de ADN-VHB y ALT elevadas o fluctuantes. Suele ir acompañada de una progresión de la fibrosis. Los pacientes que permanecen durante años en esta fase presentan más riesgo de desarrollar cirrosis y HCC.
- Infección crónica HBeAg(-): Caracterizada por la ausencia de HBeAg y la presencia de anticuerpos anti-HBe. En esta fase, los niveles de ADN-VHB son bajos o indetectables y las ALT normales; es lo que comúnmente se llamaría “portador inactivo”.

- Hepatitis crónica HBeAg(-): Es muy frecuente en el área mediterránea. Se define por niveles moderados de ADN-VHB y ALT que pueden fluctuar, además de una necroinflamación hepática importante.

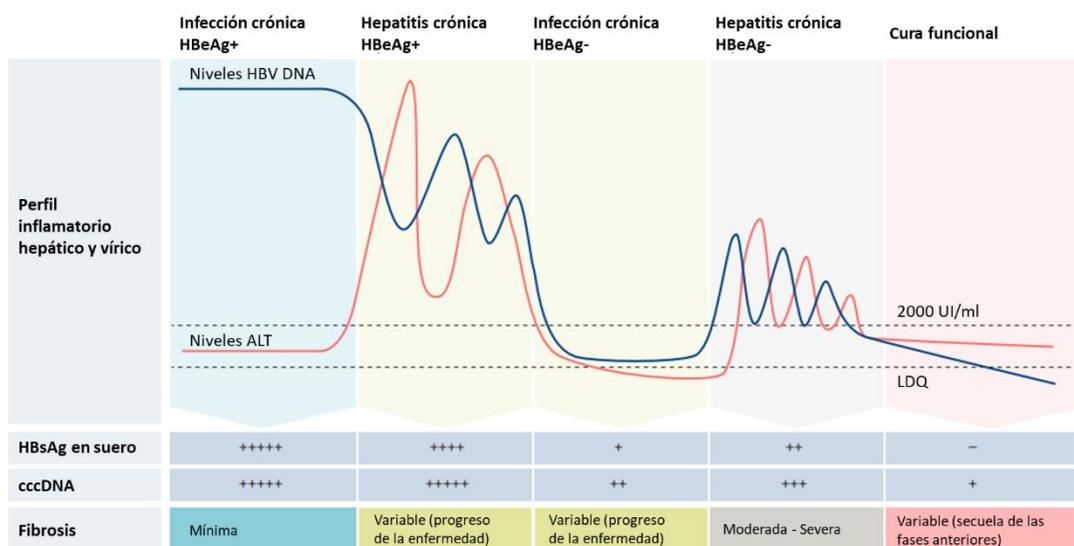


Figura 6. Historia natural de la hepatitis B.

Figura modificada de (53).

Por otro lado, cabe destacar la denominada “cura funcional”. Aunque esta fase rara vez se alcanza, es el objetivo de las terapias actuales contra el VHB, ya que se asocia a una disminución significativa de la mortalidad global y del riesgo de CHC, incluso en aquellos pacientes con cirrosis(56). Se caracteriza por la ausencia de HBsAg con o sin la presencia de anti-HBs, ADN-VHB indetectable y niveles de ALT normales. Sin embargo, dado que aún el cccDNA está presente, puede producirse una reactivación de la replicación del VHB bajo el contexto de inmunosupresión o de forma espontánea(57).

2.1. Tratamiento contra la hepatitis B

Actualmente, no hay tratamiento efectivo que cure la hepatitis B crónica. Sólo un pequeño porcentaje de pacientes tratados alcanzan la cura funcional con las terapias actuales. Sin embargo, éstas tienen como objetivo disminuir la progresión del daño hepático y, en consecuencia, minimizar el riesgo de desarrollar complicaciones hepáticas. Los pacientes considerados para los tratamientos actuales son aquellos que están en fase de hepatitis crónica, ya sea HBeAg positiva o negativa.

Los fármacos aprobados hasta la fecha (**Figura 7**) se dividen en dos tipos: (1) Inmunomoduladores; donde tenemos el interferón alfa (IFN α) y su fórmula mejorada: el interferón pegilado alfa (PEG-IFN). Y (2) Inhibidores de la polimerasa mediante análogos de nucleósidos o nucleótidos (nucleós(t)idos; NUCs); entre los cuales podemos destacar la Lamivudina (LAM), Telbivudina (LdT), Entecavir (ETV), Adefovir dipivoxil (ADV), Tenofovir disoproxil fumarato (TDF) y el Tenofovir alafenamida (TAF).

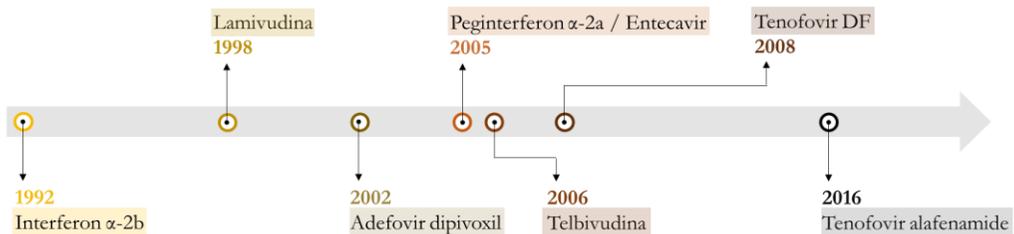


Figura 7. Cronología de los tratamientos actuales para la hepatitis B crónica. Composición mediante powerpoint.

2.1.1. Interferón

El IFN alfa es una citoquina de la inmunidad innata que induce la expresión de los ISGs (interferon stimulated genes)(58). Éstos codifican proteínas intracelulares o secretadas con propiedades antivirales directas o indirectas, y promueven la diferenciación/activación de las células dendríticas y los macrófagos y mediar así en la comunicación cruzada con las células NK y las células T específicas del VHB(59). La terapia mediante interferón es finita (24-48 semanas). Aparte de su efecto inmunomodulador, también inhibe la replicación viral en los hepatocitos(60), incluso

se ha visto que afecta al cccDNA(61). El tratamiento con PEG-IFN da lugar a mayores tasas de cura funcional en comparación con los NUCs; pierden el HBsAg el 2-3% de los pacientes al finalizar el tratamiento y el 3-8% a los 3 años de acabarlo(62). Sin embargo, su perfil de efectos secundarios (fatiga, diarrea, alopecia, síntomas gripales, insomnio, complicaciones psiquiátricas, etc), su administración mediante inyección subcutánea y el seguimiento estrecho al paciente que requiere no compensan las modestas tasas de respuesta y se ha limitado su uso. No obstante, en algunos clinical trials, se utiliza en combinación con nuevas fórmulas terapéuticas para mejorar el efecto(63).

2.1.2. NUCs

Los más utilizados son el tenofovir disoproxil fumarato (TDF), el entecavir (ETV) y el tenofovir alafenamida (TAF) dada su eficacia, buena tolerancia, seguridad y su baja tasa de resistencias (54). Durante la transcripción inversa, estos análogos actúan como terminadores transcripcionales e impiden la síntesis de las cadenas de ADN del VHB inhibiendo así la replicación viral. Esto da lugar a una disminución de la producción de viriones, a un menor reciclaje de las nucleocápsides al núcleo de las células infectadas y, teóricamente, a una disminución del reservorio de cccDNA, aunque esto último sólo puede observarse tras muchos años de tratamiento(64,65). Dado su leve efecto en el cccDNA, su tasa de cura funcional es muy baja y casi siempre el virus recidiva al terminar con el tratamiento. Es por ello que hablamos de un tratamiento de larga duración y en muchos casos, de por vida. Algunos estudios clínicos han demostrado que la estrategia de combinación de Peg-IFN α y NUCs podría dar lugar a mayores tasas de seroconversión del HBeAg en los pacientes HBeAg-positivos junto con mayores descensos y pérdidas de HBsAg(66–69). Sin embargo, esta combinación todavía necesita ser investigada en estudios más amplios para optimizar su uso e identificar las cohortes que pueden salir más beneficiadas(70).

2.2. Parada de tratamiento como estrategia terapéutica

Las guías clínicas europeas actuales recomiendan un tratamiento indefinido con NUCs para los pacientes con cirrosis, excepto si se consigue la pérdida del HBsAg. Para los pacientes HBeAg-positivos sin cirrosis, los NUCs pueden interrumpirse en aquellos que lograron la seroconversión del HBeAg y completaron al menos 12 meses de tratamiento de consolidación(54,71). Para los pacientes con HBeAg negativo sin cirrosis, las directrices de la EASL sugieren que se puede considerar la interrupción del tratamiento con NUCs en los pacientes sin cirrosis que tengan carga viral en suero indetectable durante al menos 3 años.

Sin embargo, la recaída viral es común tras la suspensión del tratamiento, y algunos pacientes pueden experimentar brotes transitorios de hepatitis leve. Por esta razón, es imprescindible un seguimiento riguroso después de la retirada del tratamiento. Con esta estrategia, una proporción de pacientes logrará la pérdida del HBsAg, otros permanecerán en remisión clínica sin necesidad de tratamiento a corto plazo, y algunos experimentarán un brote viral (y de ALT), requiriendo la reintroducción de la terapia. En este último caso, la reintroducción del tratamiento con NUCs se asocia con un buen control de la carga viral y la normalización de los valores de ALT(72).

Respuesta inmune contra el VHB

Uno de los factores principales que contribuyen a la patogénesis durante la infección del VHB es el sistema inmune del huésped. El VHB no es un virus citopático y su capacidad de lesión está condicionada por la respuesta inmunológica, a través de la inmunidad celular, que es capaz de eliminar las células infectadas y bloquear la infección de nuevas células.

3.1. Respuesta inmunológica en hepatitis aguda y cronicidad

En la hepatitis B aguda, el VHB infecta los hepatocitos del huésped y la respuesta inmune adaptativa mediada por células T responde eliminando el DNA viral de manera no citopática. Al contrario que en otras infecciones virales, la respuesta inmune innata no es responsable del control inicial de la infección. Éste consigue mantenerse oculto durante semanas, mientras continúa replicando en el hígado sin ser detectado (73). En estudios con modelos animales, la inmunidad innata se activa débilmente y el control viral y el daño hepático se relacionaron con las células T CD8 (74,75). Esto concuerda con el estudio que miró la cinética de la hepatitis B aguda en sangre periférica donde no se ha logrado encontrar una activación inmunitaria innata significativa durante la fase viral temprana(76).

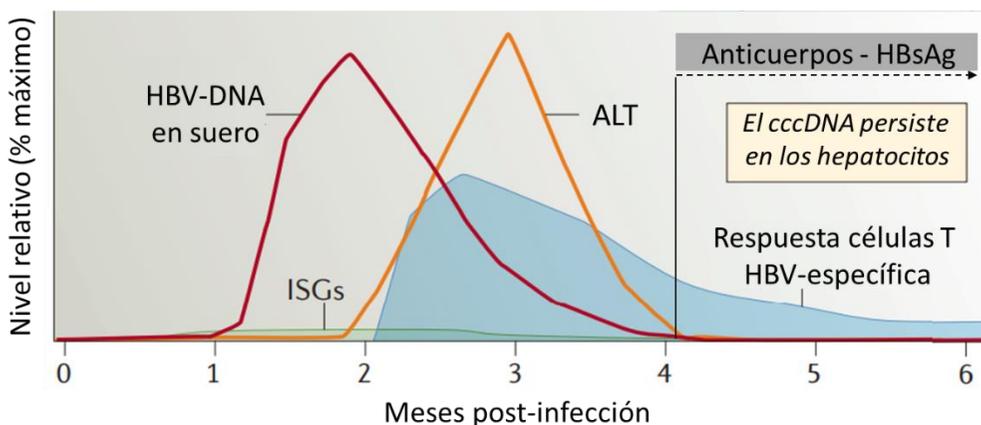


Figura 8. Evolución temporal en la infección aguda por hepatitis B.

Figura modificada de (77).

En la infección aguda (**Figura 8**) se puede observar un aumento del HBV-DNA, seguido del aumento del HBsAg que continúa elevado durante varias semanas más tras el pico de elevación del ADN viral. Durante el descenso del DNA-VHB, aparece la respuesta inmune adaptativa mediada por células T, tanto células VHB-específicas como no específicas (78,79). Paralelamente, se detecta un aumento de ALT y muestras de inflamación en histología.

Al mismo tiempo que se controla la viremia, la inducción de células B produce anticuerpos neutralizantes anti-HBsAg produciendo la pérdida del HBsAg. Cabe destacar que, en los chimpancés, los anticuerpos con potencial neutralizante sólo aparecen después de que el virus ha sido eliminado de la mayoría de los hepatocitos, lo que sugiere que su función principal es prevenir la reaparición del VHB tras la recuperación clínica.

El VHB no es totalmente erradicado a pesar de haberse controlado la infección y, un reservorio de cccDNA permanece en los hepatocitos, aunque se va diluyendo con el tiempo. Sin embargo, esto produce un potencial riesgo de reactivación en caso de inmunosupresión.

Cuando alguna parte de este balance entre el sistema inmune del huésped y el virus falla, nos encontramos con la hepatitis B crónica.

3.2. Disfunción de la inmunidad adaptativa en la hepatitis B crónica

Durante la infección crónica, la inmunidad innata y adaptativa desregulada no consigue eliminar eficazmente el virus, lo que provoca una infección de por vida y un daño hepático persistente que puede desembocar en fibrosis y cirrosis. Cuando la infección se vuelve crónica, existe un deterioro progresivo en la función de los linfocitos T específicos contra el VHB. La infección crónica avanza a través de distintas fases de la enfermedad, muy dependientes de la edad del huésped.

3.2.1. La función de las células T en la CHB

Durante la infección aguda por VHB, se logra un control eficaz del virus gracias a la acción de las células T y B, que limitan la duración del daño hepático causado por el sistema inmunitario y brindan inmunidad a largo plazo contra el virus. La eliminación de las partículas virales intracelulares no se basa únicamente en una actividad citolítica específica, sino también en la supresión de la actividad viral mediante factores solubles como el TNF- α y el interferón- γ liberados por las células T. El desarrollo de la cronicidad depende de una respuesta atenuada frente a los antígenos virales expresados en la superficie celular, una característica observable en los portadores asintomáticos que persiste incluso décadas después de la resolución de la infección por el VHB(74).

Las respuestas inmunitarias adaptativas contra el VHB requieren tanto una respuesta celular (linfocitos T CD4+ y CD8+) como humoral (producción de anticuerpos por los linfocitos B). Los linfocitos T CD8+ desempeñan un papel crucial en la eliminación y curación de los hepatocitos infectados por el VHB, utilizando mecanismos citolíticos y no citolíticos mediados por citocinas y el reconocimiento de antígenos del MHC de clase I y II. Los linfocitos T CD4+ también juegan un papel esencial en la eliminación y curación de los hepatocitos infectados por el VHB(80).

Los linfocitos T CD4+ tienen una función reguladora clave. Los anticuerpos neutralizantes del antígeno de superficie de la hepatitis B (anti-HBsAg) se unen al virus circulante, reduciendo su propagación y proporcionando inmunidad protectora. La alta tasa de reactivación del VHB en pacientes que reciben tratamiento con anti-CD20, que provoca la depleción de células B, sugiere que las células B también desempeñan un papel fundamental en la inmunidad protectora contra el VHB(81).

3.2.2. Agotamiento células T

En la hepatitis B crónica, la persistencia de los antígenos virales lleva a que las células T CD8+ efectoras desarrollen un fenotipo "agotado" (**Figura 9**), caracterizado por una capacidad significativamente reducida para proliferar y producir IFN γ , IL-2, TNF α , granzimas o perforinas. En pacientes con hepatitis B crónica, se observan frecuencias notablemente bajas de linfocitos T CD8+ específicos del VHB en comparación con aquellos que han resuelto la infección aguda(82). Esta baja cantidad de linfocitos T CD8+ puede ser consecuencia de una expansión insuficiente o de una mayor delección clonal. Sin embargo, la frecuencia por sí sola no necesariamente refleja la función y amplitud de la población de células T (83).

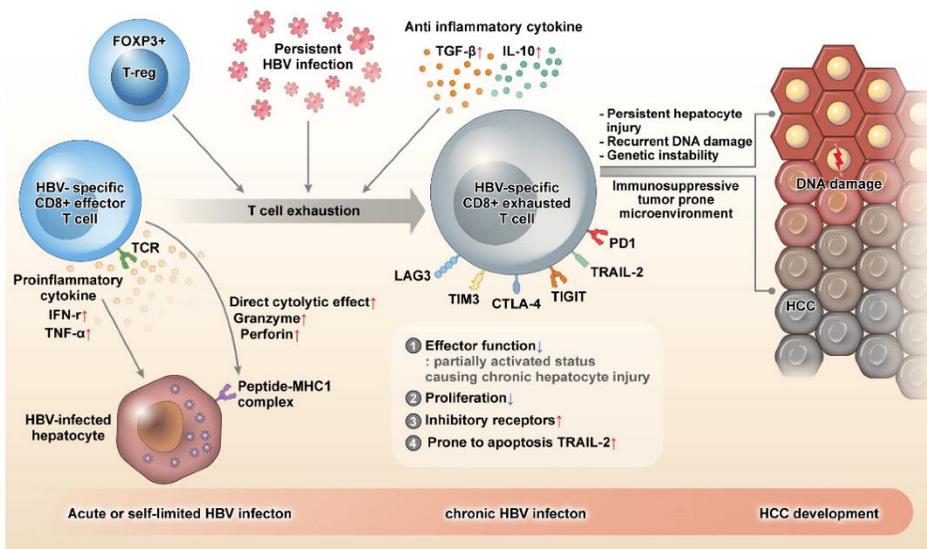


Figura 9. Mecanismos de agotamiento en la células T en la hepatitis B crónica. *Figura modificada de (83).*

Las células T CD8+ agotadas presentan una función efectora disminuida, frecuentemente asociada con la sobreexpresión de receptores coinhibidores como PD-1, CTLA-4, Tim-3, entre otros (36-38). Entre estos receptores, las interacciones entre PD-1 y PD-L1 han sido especialmente destacadas como objetivo para la inmunoterapia del cáncer. La unión de PD-L1 a los receptores PD-1 en las células T

bloquea la señalización del TCR, inhibiendo así su activación inmunitaria. Bally et al. ofrecen un resumen conciso sobre cómo se regula la expresión de PD-1 en general. El papel de la interacción PD-1-PD-L1 en la disfunción de las células T CD8+ específicas del VHB ha sido ampliamente estudiado (43-48). La regulación sostenida de PD-1 se correlaciona con la disfunción de las células T específicas del VHB durante la hepatitis B crónica (2, 83), y se ha observado que la expresión de PD-L1 en sangre periférica está disminuida en pacientes con hepatitis B crónica.

3.3. Características inmunológicas del hígado.

La persistencia del virus de la hepatitis B (VHB) se facilita mediante varios mecanismos aún no completamente comprendidos, incluyendo la formación de cccDNA, la integración viral y el entorno inmunológico. Aunque el muestreo del hígado, mediante aspiración con aguja fina o biopsias de núcleo, es crucial para entender el mecanismo virológico e inmunológico exacto en el sitio de la infección, también se pueden analizar en la circulación ciertos correlatos de la actividad transcripcional y la inmunidad específica contra el VHB.

El hígado tiene una composición inmunológica distinta a la de la sangre y otros órganos linfoides y no linfoides. Su composición celular es notablemente diferente, y los tipos de células circulantes que pasan por el hígado pueden verse influenciados por el entorno local de citoquinas, nutrientes e hipoxia. Estas influencias son probablemente exacerbadas por el flujo sanguíneo lento a través del estrecho lecho vascular de los sinusoides hepáticos. Además de los hepatocitos, donde se replica el VHB, el hígado contiene tipos celulares no parenquimatosos únicos, como las células endoteliales sinusoidales hepáticas y las células de Kupffer (macrófagos específicos del hígado), que pueden influir en los linfocitos vecinos. Aunque las células de Kupffer son la mayor población de macrófagos en humanos, su estudio ha sido complicado por la falta de marcadores adecuados para diferenciarlas de los monocitos que infiltran el hígado. El entorno tolerogénico del hígado, que produce

citoquinas inmunosupresoras como la IL-10 y el TGF- β , también juega un papel importante.

Hemos identificado una nueva población de células T de memoria tisular (TRM) que pueden persistir a largo plazo en el hígado humano infectado por el VHB y no recirculan. Estas células T CD8+ tienen adaptaciones especializadas para mantener la vigilancia antiviral en el entorno tolerogénico del hígado. Encontramos células T CD8+ residentes en el hígado, definidas por la coexpresión de los marcadores de retención CD69 y CD103 y por un perfil específico de factores de transcripción, tanto en hígados sanos como en los infectados por el VHB, pero no en la sangre. Es notable que estas células aumentan selectivamente en pacientes con una infección por VHB bien controlada, contienen células T específicas para epítomos de todas las proteínas principales del VHB y sobreviven en el hígado incluso después de la resolución de la infección.

Todas las células T intrahepáticas expresan más PD-1 que las circulantes, pero los niveles de este receptor coinhibitorio son significativamente mayores en las TRM CD8+. A pesar de ello, las TRM CD8+ son capaces de producir citocinas antivirales rápidamente tras la reestimulación, posiblemente debido a su elevada producción autónoma de IL-2, que supera el agotamiento inducido por PD-1. Sin embargo, las TRM CD8+ hepáticas tienen una expresión de granzima inferior a la de otras células T CD8+ intrahepáticas no residentes, lo que sugiere que están adaptadas para favorecer una función antiviral no citolítica con el fin de preservar la integridad del órgano.

Así, una gran fracción de células T específicas del VHB está compartimentada dentro del hígado, restringida por altos niveles de PD-1 para evitar una proliferación y senescencia excesivas, permitiendo la persistencia a largo plazo y una protección rápida de primera línea. La presencia de una población de células T CD8+ de memoria que persisten en el hígado mucho tiempo después de la resolución de la infección, manteniendo una función efectora específica inmediata, se describió originalmente

para un virus de la gripe neurotrópico hace 20 años. Recientemente, se ha prestado mucha más atención al concepto de células T de memoria residentes en tejidos, con estudios en modelos murinos y humanos que revelan su alta frecuencia entre los linfocitos T de memoria en muchos órganos y su papel clave tanto en la protección contra patógenos como en la patogénesis de enfermedades. Muchas de las características observadas en las TRM hepáticas, como la rápida función efectora a pesar de la presencia de receptores inhibidores y la baja rotación, son compartidas por las TRM humanas de diferentes tejidos, mientras que otras, como la capacidad de patrullar y permanecer dentro de los sinusoides (mediante la expresión del antígeno funcional asociado a linfocitos-1 y CXCR6), son específicas del hígado.

3.4. Inmunoterapias

El fracaso de la inmunidad del huésped frente al VHB en la infección crónica justifica los enfoques inmunoterapéuticos (**Figura 10**). Éstos tienen diferentes objetivos: (1) restaurar las respuestas inmunitarias específicas del VHB disfuncionales (por ejemplo, inhibidores de puntos de control y agonistas de TLRs); (2) sustituir las respuestas de células T CD8+ disfuncionales (por ejemplo, ingeniería de células T); (3) inducir nuevas respuestas inmunitarias específicas del VHB (por ejemplo, vacunación terapéutica y uso de anticuerpos monoclonales).

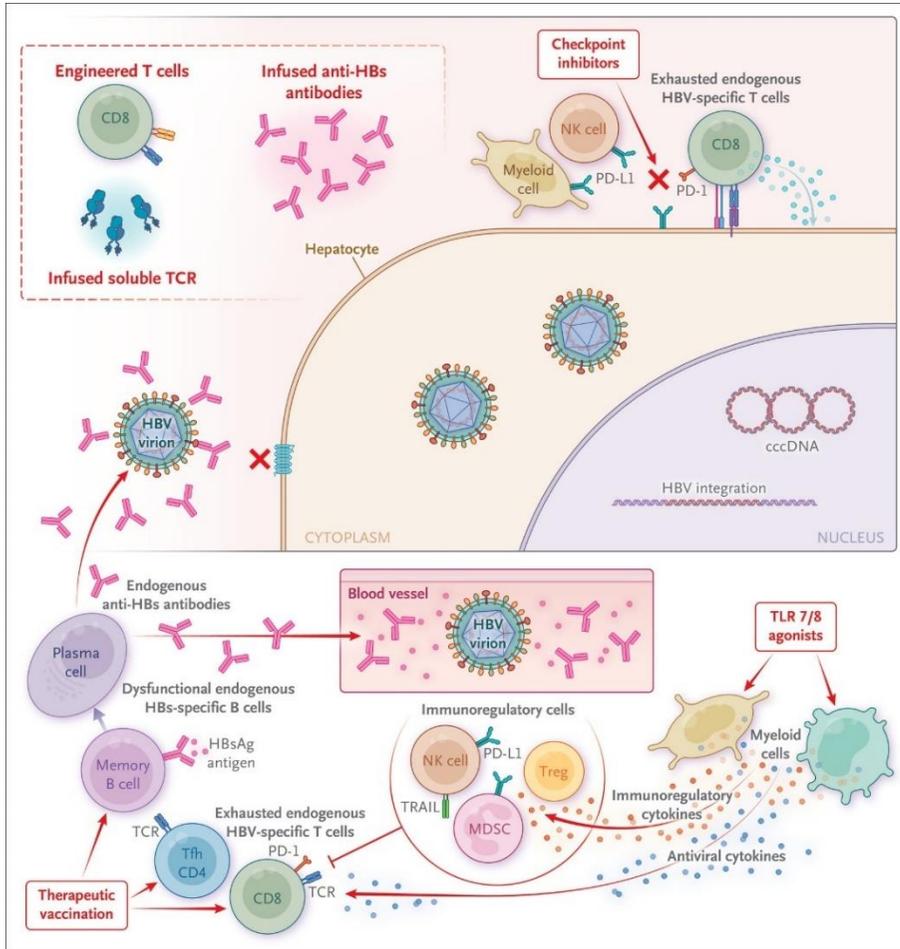


Figura 10. Diferentes estrategias de inmunoterapia en la hepatitis B crónica.
 Figura modificada de (84)

La activación de receptores de reconocimiento de patógenos como TLR7, TLR8 y RIG-1 a través de agonistas puede inducir la secreción de citocinas antivirales por parte de los hepatocitos y las células inmunitarias innatas, tales como macrófagos, células dendríticas y células NK. Esta estimulación de la inmunidad innata puede llevar a que las células T específicas del VHB produzcan citocinas antivirales como IFN- γ y TNF- α . Además, RIG-1 puede ejercer efectos antivirales directos contra el VHB.

En el ámbito de las vacunas terapéuticas, estas codifican antígenos virales para mejorar la presentación cruzada de dichos antígenos y así potenciar la respuesta de las células T específicas del VHB.

Otra estrategia clave involucra los puntos de control inmunitarios. El bloqueo de estos puntos impide que las células T específicas del VHB se unan a sus ligandos en macrófagos, células dendríticas y hepatocitos. Como resultado, se puede restaurar la funcionalidad de las células T específicas del VHB, permitiéndoles producir citocinas antivirales y generar una respuesta potencialmente citotóxica para eliminar los hepatocitos infectados. Hasta la fecha, los ensayos más prometedores han tenido como objetivo el receptor PD-1.(84)

3.4.1. PD1-PD-L1

La superficie de las células T presenta dos tipos de señales correceptoras: una corresponde a receptores coestimuladores que activan positivamente las células T, y la otra a receptores cosupresores que suprimen su actividad. La terapia con inhibidores de puntos de control inmunitarios busca principalmente revertir el agotamiento de las células T CD8+ o las células NK mediante la señalización de los correceptores, disminuyendo la función de los receptores cosupresores.

En el contexto del carcinoma hepatocelular asociado al VHB (CHC-VHB), se han identificado y estudiado numerosos puntos de control inmunitarios. Entre estos se encuentran la proteína de muerte programada 1 (PD-1), la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), y otros puntos de control descubiertos recientemente como el gen de activación de linfocitos 3 (LAG-3), la inmunoglobulina de células T y dominio ITIM (TIGIT), y la inmunoglobulina de células T mucina 3 (TIM-3).

Estos puntos de control inmunitarios, como proteínas de membrana, se expresan inicialmente en el retículo endoplásmico y son transportados a la superficie celular. La glicosilación asegura que solo los puntos de control inmunitario maduros y funcionales lleguen a la superficie celular. Una vez en la superficie, los puntos de control inmunitarios regulan los niveles de proteínas mediante procesos de internalización, circulación y ubiquitinación, mediando así la señalización celular. En el microambiente del CHC, la función de vigilancia inmunitaria de las células inmunitarias suele bloquearse por múltiples mecanismos, siendo la supresión de señales una de las principales causas de la inmunosupresión.

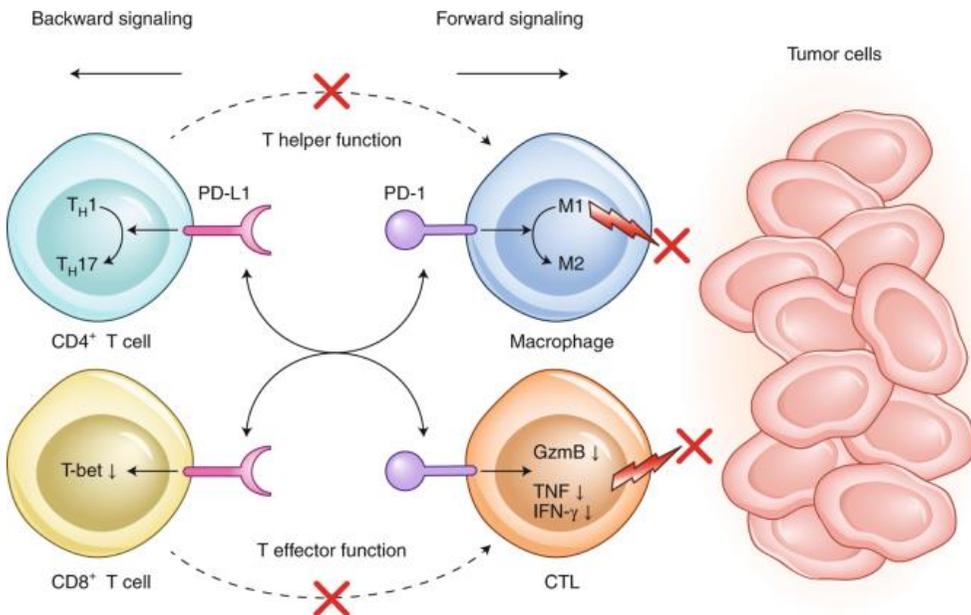


Figura 11. Efectos del eje PD-1/PD-L1.

Figura de (85).

PD-1 es una proteína transmembrana de tipo I que pertenece a la familia de receptores CD28 y cuenta con dos ligandos: PD-L1 y PD-L2, siendo este último tres veces más afín al receptor que PD-L1. PD-1 se encuentra principalmente en células T CD8+ con memoria, células T CD4+ con memoria, células tumorales, células presentadoras de antígenos y células endoteliales. Por su parte, PD-L1 y PD-L2 se expresan mayormente en células B, macrófagos, monocitos y células dendríticas.

El dominio intracelular de PD-1 está compuesto por motivos de conmutación de tirosina de receptor inmune (ITSM) y motivos de inhibición de tirosina de receptor inmune (ITIM). Cuando PD-L1 o PD-L2 se une a PD-1 (**Figura 11**), se fosforilan los ITIM e ITSM, lo que provoca el reclutamiento de numerosas tirosina fosfatasas, principalmente SHP-2, a la cola citoplasmática de PD-1. Posteriormente, SHP-2 regula negativamente las señales coestimuladoras a través de la desfosforilación de componentes clave del TCR, desempeñando un papel inhibitorio en las moléculas de señalización corriente abajo, incluyendo CD28, ZAP70, PLC γ y PI3K, mediando así el fallo de las células T e inhibiendo la inmunidad antitumoral.

Por tanto, la PD-L1 expresada por las células tumorales inhibe la proliferación y activación de las células T al unirse a PD-1, lo que permite a las células tumorales evadir el sistema inmunitario. Además, cuanto mayor es el nivel de expresión de PD-L1 en el tejido del cáncer de hígado, mayor es la malignidad del tumor, su agresividad, la probabilidad de recaída tras la cirugía y menor la supervivencia global de los pacientes.(86).

A pesar de que tanto las TRM CD8 específicas del VHB como las transeúntes presentan niveles elevados de PD-1, investigaciones recientes indican que la producción autónoma de IL-2 por parte de estas células puede mitigar su agotamiento, favoreciendo así sus funciones antivirales. En un modelo experimental que involucra la presentación cruzada por células endoteliales sinusoidales hepáticas, las señales coinhibitorias PD-1/PD-L1 regulaban la liberación temprana de IL-2 por las células T CD8 y controlaban su diferenciación en células T efectoras. La tolerancia mediada por PD-1 se superaba mediante la expresión de IL-2 por las células T CD8, especialmente en condiciones de alta carga antigénica, como sucede durante las infecciones virales.

Además, la producción de IL-10 por las células T CD8 específicas del VHB tras el reconocimiento del antígeno incrementa la capacidad de respuesta a la IL-2, promoviendo así la supervivencia de las células T CD8 efectoras. Por lo tanto, las TRM

CD8 no solo mejoran su propia supervivencia y función, sino que también desempeñan un papel crucial en la regulación inmunitaria a través de la interacción entre IL-2 y PD-1.(87).

Aún queda por investigar el impacto positivo de las vacunas terapéuticas cuando se combinan con la inhibición de PD-1/PD-L1 en pacientes con CHB, así como identificar los factores que predicen la respuesta al tratamiento. La posibilidad de que las respuestas relevantes estén concentradas o diferenciadas en el hígado resalta la importancia de realizar muestreos hepáticos para entender mejor la patogénesis de la CHB y prever cómo afectarán las nuevas opciones terapéuticas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La infección crónica por el VHB se caracteriza por la persistencia del cccDNA en los hepatocitos y la alteración de la respuesta inmune dirigida contra el virus. Entre los aspectos más relevantes de esta alteración destaca la baja funcionalidad de las células T que reconocen antígenos del VHB, una vía clave para conseguir la eliminación del virus. Se trata de linfocitos CD8 muy disfuncionales que expresan niveles elevados de moléculas co-inhedoras (como PD-1, CTLA-4 o Tim-3) y tienen alteraciones importantes en su metabolismo que impiden su correcta estimulación y proliferación. Actualmente, hay un interés creciente en desarrollar tratamientos capaces de obtener una curación funcional de la hepatitis B; entre las posibilidades terapéuticas destacan la parada de tratamiento en pacientes HBeAg negativo tras años con NUCs y aquellas encaminadas a revertir las deficiencias en la función de las células CD8 (inmunoterapia). A pesar de que existen ensayos clínicos en fases muy iniciales con algunas moléculas como anti-PD1, hay todavía grandes vacíos en el conocimiento de los mecanismos que explican el agotamiento de los linfocitos CD8 y gran parte de la literatura está estudiada en sangre cuando ya se ha visto que la inmunidad entre hígado y periferia difiere. Por tanto, creemos que el estudio detallado de la respuesta inmune específica mediada por células CD8 tanto en hígado como en sangre en diferentes situaciones clínicas, y durante eventos virológicos importantes (como en la retirada o introducción de tratamiento con NUCs), puede ser de gran utilidad para el avance en cualquier tratamiento que pretenda la curación funcional de la hepatitis B. De hecho, nuestra hipótesis es que la disfunción de los linfocitos CD8 es más evidente en el hígado que en la periferia y que el éxito en la parada de tratamiento (definido como la pérdida del HBsAg) se ve marcado por el estado de los marcadores virológicos (entre ellos el cccDNA) y un perfil menos agotado en las células T.

Objetivos

Objetivo principal: estudiar los factores virológicos, clínicos e inmunológicos, tanto en suero como en hígado, en el contexto de la hepatitis B crónica analizándola durante eventos virológicos relevantes inducidos por el tratamiento antiviral o su interrupción.

- Analizar el efecto de la función del sistema inmune adquirido sobre la respuesta tras la suspensión del tratamiento antiviral.*
- Evaluar la utilidad de la determinación del cccDNA intrahepático como factor predictivo de respuesta tras la interrupción del tratamiento antiviral.*
- Estudiar la relación entre los factores virológicos e inmunológicos en el contexto de la hepatitis B crónica.*
- Analizar las diferencias entre la inmunidad periférica y hepática en la hepatitis B crónica.
- Evaluar el papel de las células CD8 de memoria residentes hepáticas (TRM).

* Estos corresponden al artículo anexo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Inclusión de pacientes

Estudio 1: Participaron 27 pacientes con hepatitis crónica HBeAg-negativo bajo terapia (entecavir o tenofovir) con respuesta virológica completa (HBV-DNA indetectable y niveles normales de ALT) durante al menos 3 años.

Estudio 2: Se incluyeron 22 pacientes con hepatitis B crónica, 9 de los cuales estaban bajo terapia antiviral prolongada con NUCs y 13 estaban sin tratamiento.

Los criterios de exclusión de ambos estudios fueron la presencia de enfermedad hepática avanzada (F3-F4 según METAVIR en una biopsia hepática o diagnóstico previo de cirrosis), tratamiento concomitante con agentes inmunosupresores, carcinoma hepatocelular y coinfección por VIH, VHC o VHD.

Los proyectos fueron aprobados por el Comité de Ética institucional del Hospital Clínico (estudio 1 - Protocolo HCB/2015/0453; estudio 2 - Protocolo HCB/2018/0370) y se llevaron a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki, las directrices de las Buenas Prácticas Clínicas y los requisitos normativos locales. Todos los pacientes proporcionaron su consentimiento informado por escrito antes de la inclusión.

Criterios de reintroducción de tratamiento tras la retirada de NUCs

Se establecieron los siguientes criterios para la reintroducción del tratamiento antiviral durante el seguimiento:

- Dos valores consecutivos de ALT >10 ULN (límite superior de la normalidad).
- ALT >5-10 ULN y VHB-ADN >2000 UI/ml persistentes durante \geq 28 días (4 semanas).
- ALT >2-5 ULN y ADN-VHB >2000 UI/ml persistentes durante \geq 6 meses.
- Necesidad de tratamiento inmunosupresor.

El criterio de valoración principal de la eficacia fue la proporción de pacientes que perdieron el HBsAg (cura funcional) o controlaron la replicación viral (pacientes que

permanecieron sin tratamiento, aun siendo positivos para el HBsAg) tras la retirada del tratamiento. Los criterios de valoración secundarios incluían el análisis de marcadores virológicos e inmunológicos como posibles predictores de respuesta tras la retirada del tratamiento.

Diseño del estudio y recogida de muestras

Estudio 1: Los pacientes se sometieron a una biopsia hepática percutánea guiada por ecografía antes de la retirada del tratamiento (basal). Esta biopsia se dividió en dos partes, una para el análisis histológico convencional con el fin de descartar la presencia de fibrosis avanzada y la otra parte se almacenó en Allprotect Tissue Reagent (Qiagen, Hilden, Alemania) a -80°C para la realización de los análisis moleculares. Se recogieron muestras de suero al inicio del estudio y longitudinalmente a los 3, 6, 12, 18 y 24 meses durante el seguimiento. También se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*) al inicio del estudio (basal) y a los 3 y 12 meses de la interrupción de los NUCs. Los PBMCs se aislaron por centrifugación en gradiente de densidad utilizando Ficoll Histopaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) y se criopreservaron en nitrógeno líquido. Tras la interrupción del tratamiento se realizaron evaluaciones clínicas, pruebas de laboratorio estándar para la función hepática y se determinaron el HBsAg y la carga viral del VHB (HBV-DNA) mensualmente durante los primeros 6 meses y, posteriormente, cada 3-4 meses hasta completar los 24 meses de seguimiento (**Figura**). En cada visita clínica, se registraron y calificaron todos los acontecimientos adversos.

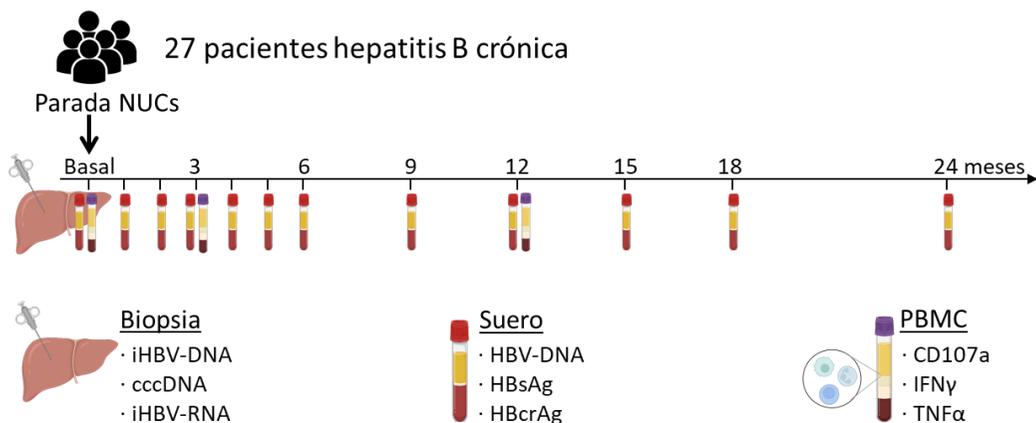


Figura 12. Diseño experimental y recogida de muestras del estudio 1.

Estudio 2: Al inicio del estudio, los pacientes se sometieron a una biopsia hepática y a una punción aspirativa con aguja fina (PAAF, 2 pases). Las biopsias hepáticas se procesaron igual que en el estudio 1. También se obtuvieron PAAFs de seguimiento entre 6 y 18 meses después de interrumpir el tratamiento con NUC (n= 4 pacientes), o después de iniciar el tratamiento antiviral (n= 4 pacientes). Además, se recogieron PBMCs y muestras de suero en cada visita (**Figura 12**).

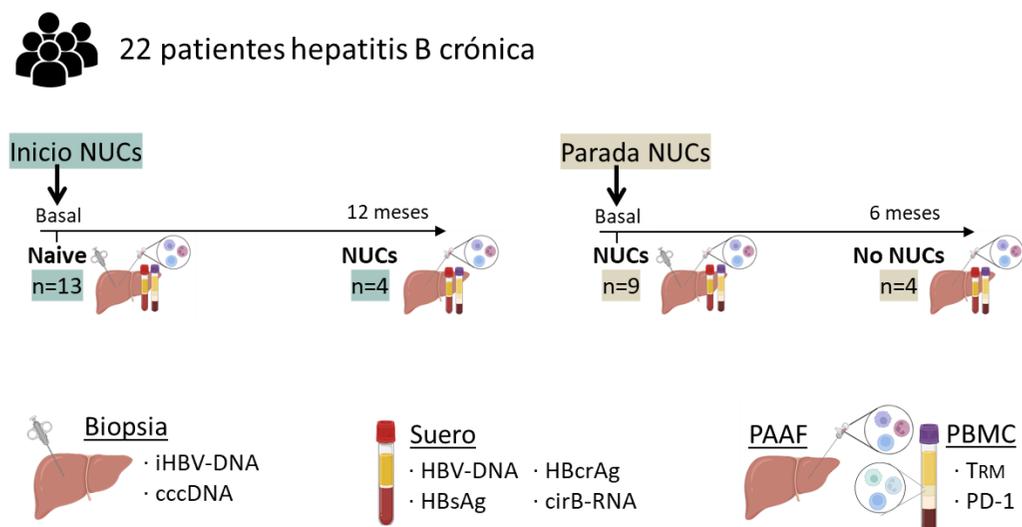


Figura 12. Diseño experimental y recogida de muestras del estudio 2.

Marcadores serológicos de replicación viral

El HBeAg y anti-HBe se determinaron mediante inmunoensayo utilizando el sistema Advia Centaur® (Siemens, Erlangen, Alemania). El ADN-VHB en suero se cuantificó mediante PCR en tiempo real utilizando el sistema cobas® 6800 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania; LLQ <10 UI/ml). El HBsAg se determinó a partir del ensayo ARCHITECT® HBsAg (Abbott Laboratories, Chicago, IL, EEUU; LLQ <0,13 UI/ml). Los niveles de HBcrAg se midieron mediante inmunoensayo enzimático quimioluminiscente utilizando el sistema LUMIPULSE® G1200 (Fujirebio Europe, Gante, Bélgica; LLQ <3 log U/ml).

El ARN del VHB circulante (cirB-RNA) se evaluó por PCR en tiempo real (LLQ 10 copias/ml; intervalo de linealidad 10-10⁹ copias) utilizando el ensayo de Roche en el sistema Cobas® 6800, Roche Diagnostics. El genotipo del VHB se identificó mediante secuenciación directa y análisis filogenético de un fragmento de 1137 pb de la polimerasa viral (nucleótidos 108 a 1244; referencia GenBank NC003977). Se realizaron alineamientos múltiples con *ClustalW* y se construyeron árboles filogenéticos por máxima verosimilitud utilizando el programa MEGA X.

Marcadores virológicos en tejido

Los ácidos nucleicos totales se purificaron a partir de las biopsias hepáticas congeladas utilizando el kit de purificación de ADN y ARN MasterPure™ (Epicentre, Illumina, San Diego, CA, EEUU). Las preparaciones de ácido nucleico se dividieron en dos partes y se trataron con RNasa A o DNasa I para la posterior purificación total de ADN y ARN, respectivamente. Secuanticaron con el espectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.) y el fluorómetro Qubit® 3.0 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). La cuantificación del ADN-VHB intrahepático total (iHBV-DNA) y el cccDNA se realizó según el protocolo descrito por Testoni et al (49), utilizando el sistema de PCR en tiempo real ViiA7 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Para la determinación del cccDNA, el ADN purificado se pretrató con DNasa Plasmid-Safe™ (Epicentre) a 37 °C durante 4 h. La curva estándar se preparó a partir de diluciones seriadas de un plásmido que

contenía un monómero del VHB (pBR322-HBV). El rango de cuantificación fue de 10 a 10⁷ copias para el iHBV-ADN y de 50 a 10⁷ copias por reacción para el cccDNA. El límite de cuantificación fue de 6 copias por reacción para iHBV-DNA y 17 copias por reacción para cccDNA (análisis Probit, 95% de probabilidad). 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, Thermo Fisher).

El ARN-VHB intrahepático de 3.5 kb (iHBV-RNA) se determinó mediante RT-PCR en tiempo real utilizando la TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems). La cuantificación absoluta se realizó utilizando diluciones seriadas de un plásmido transcrito in vitro que contenía 1.8 kb del genoma del VHB (incluida la región diana para la detección del ARN-VHB de 3.5 kb) bajo el control del promotor T7. Se utilizó el análisis Probit para determinar que el límite de cuantificación era de 6 copias por reacción (95% de probabilidad). Los primers y las sondas utilizadas en las reacciones de PCR y RT-PCR están detallados en la **Tabla 1**.

Tabla 1. *Primers y sondas para la detección del cccDNA e iHBV-RNA de 3.5 kb.*

Marcador	Primer/Sonda	Secuencia (5'-3')	Posición del nucleótido[#]
cccDNA	<i>Forward</i>	CCGTGTGCACTTCGCTTCA	1577–1595
	<i>Reverse</i>	GCACAGCTTGGAGGCTTGA	1884–1866
	Sonda	CATGGAGACCACCGTGAACGCC	1609–1631
iHBV-RNA	<i>Forward</i>	GGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCT	2363–2386
	<i>Reverse</i>	CATTGAGATTCCCGAGATTGAGAT	2450–2427
	Sonda	TCTCAATCGCCGCGTCGCAGA	2404–2424

[#]Referenciados a la secuencia de referencia del NCBI: NC_003977.2.

Análisis inmunológico después de estimular *in vitro* con péptidos solapantes del VHB (estudio 1)

Los PBMCs se resuspendieron en RPMI 1640 (Thermo Fisher) suplementado con 10% de suero humano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), 100 U/ml de penicilina, 100ug/ml de estreptomina, aminoácidos no esenciales y esenciales (Thermo Fisher) y 20UI/ml de rhIL-2 (Miltenyi Biotec). Para evaluar la funcionalidad de las células T específicas del VHB, se sembraron PBMC a 10^6 células/ml y se estimularon 7 días con péptidos solapantes (OLP, *overlapping peptides*) pangenotípicos (1µg/ml, genotipos A-D), abarcando las proteínas de la cápside (*core*) o la envuelta (*env*) del VHB (Gilead Sciences, Foster City, CA, EE.UU.) o con OLP de la polimerasa (*pol*) de genotipo D (Peptide Synthesis Core Facility, UPF, Barcelona, España). Los OLP de *core* y *env* consistían en 94 y 166 péptidos 15-mer, respectivamente, solapados 12 aa entre sí; los de *pol* (165 péptidos, 15-mer) solapaban 10 aa. La concentración final de DMSO durante el *in vitro* fue del 0.5%.

Para descartar la posibilidad de infraestimar respuestas de células T específicas de la polimerasa en pacientes no genotipo D, comparamos la presencia o ausencia de respuestas específicas frente a *pol* entre pacientes infectados por genotipo D e infectados por otros genotipos (no-D). Destaca que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los 2 grupos de pacientes: 5 de 6 (83%) genotipo no-D y 15 de 21 (71%) genotipo D mostraron respuestas de células T específicas frente a *pol* (prueba Chi-cuadrado, $p = 0.56$).

Durante la expansión *in vitro*, la mitad del medio se sustituyó por medio fresco cada 3 días. En las últimas 16 h, las células se reestimularon con los OLP correspondientes en presencia de 1 µg/ml de brefeldina A (Sigma), 2 µM de monensina (Biolegend, San Diego, CA, EE.UU.) y anticuerpo anti-CD107a (mAb; Biolegend).

Como controles positivos y para facilitar la identificación de las poblaciones (*gating*), se estimularon células con 2 ng/ml de PMA y 1 µg/ml de ionomicina (ambos de Sigma) o 1 µg/ml de ProMix™ CEF Peptide Pool (*pool* para CMV, EBV e influenza;

Proimmune Ltd., Oxford, Reino Unido). En cada punto temporal se incluyó una muestra no estimulada como control negativo. Tras la reestimulación, se lavaron y marcaron las células con Live/Dead Fixable Cell Stain (Thermo Fisher) antes de incubarlas con los mAbs de superficie (**Tabla 2**) diluidos un 50% en Brilliant Buffer (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.) y un 50% en PBS durante 30 min a 4 °C. Las células se fijaron y permeabilizaron con Cytofix/Cytoperm (BD). A continuación, se incubaron los mAbs intracelulares (**Tabla 2**) en saponina al 0.1% (Sigma) durante 30 min a 4°C. Las muestras se adquirieron en el BD LSR Fortessa 5L y se analizaron con FlowJo v10 (BD). En la **Figura 14** *Error! Reference source not found.*, se muestra la estrategia *gating* para la identificación de las poblaciones linfocitarias.

Tabla 2. Listado de anticuerpos de la citometría de flujo (estudio 1).

Marcador	Fluorocromo	Distribuidor	Clon	N. Catálogo
<i>Fenotipo</i>				
CD3	BUV805	BD	UCHT1	565515
CD4	V500	BD	RPA-T4	560768
CD8	Alexa Fluor 700	ThermoFisher	OKT8	56-0086-42
CD19	FITC	Biolegend	SJ25C1	363008
CD56	BV605	Biolegend	HCD56	318334
Live/Dead	APC-Cy7	ThermoFisher	-	L10119
<i>Función</i>				
CD107a	Pacific Blue	Biolegend	H4A3	328624
IFN γ	PerCP-Cy5.5	Biolegend	4S.B3	502525
TNF α	PE-Dazzle	Biolegend	MAB11	502946

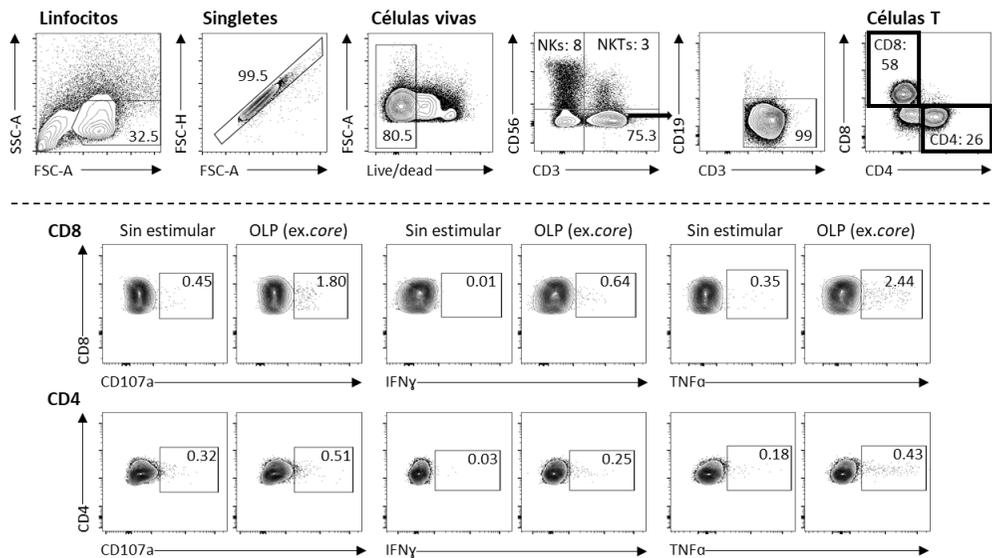


Figura 13. Estrategia de *gating* para el estudio inmunológico (estudio 1).

Análisis *ex vivo* de poblaciones inmunitarias en periferia e intrahepáticas (estudio 2)

Los leucocitos intrahepáticos se obtuvieron a partir de las PAAF, tal como se ha descrito previamente(88). Brevemente, las PAAF se diluyeron en RPMI y se centrifugaron. Tras lisar los eritrocitos (RBC Lysis buffer 10x, Biolegend), se lavaron con PBS y se resuspendieron en el mismo medio que los PBMC. Las células reposaron (16h) en el incubador y fueron analizadas siguiendo el procedimiento del estudio 1, pero con el panel de la **Tabla 3** y el *gating* de la **Error! Reference source not found**.

Tabla 3. Listado de anticuerpos de citometría de flujo (estudio 2).

Marcador	Fluorocromo	Distribuidor	Clon	N. Catálogo
CD3	BUV805	BD	UCHT1	565515
CD20	PE-Dazzle	Biolegend	2H7	302348
CD45	BUV395	BD	HI30	563792
CD8	Alexa Fluor 700	ThermoFisher	OKT8	56-0086-42
CD19	BV786	BD	SJ25C1	563325
CD56	PE-Cy7	BD	NCAM16.2	335826
CD69	BV711	Biolegend	FN50	310944
CD103	BV605	Biolegend	Ber-ACT8	350218
Live/Dead	APC-Cy7	ThermoFisher	-	L10119
PD-1	APC	Biolegend	EH12.2H7	329908

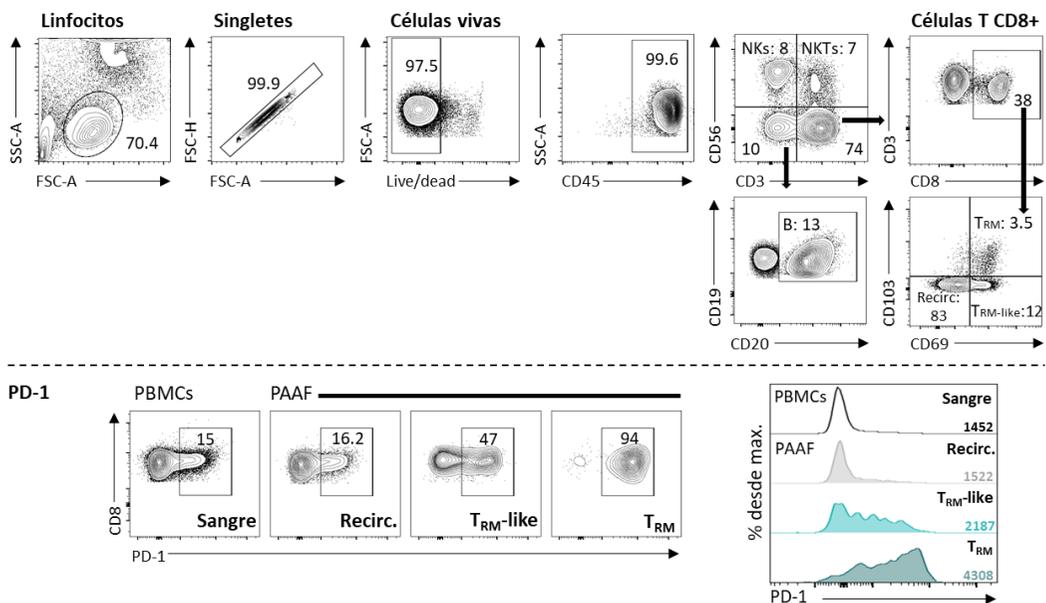


Figura 14. Estrategia de *gating* para el estudio inmunológico (estudio 2).

Análisis de datos de secuenciación de ARN de célula única

Con el fin de caracterizar más profundamente las poblaciones de linfocitos intrahepáticos, realizamos un subanálisis de los datos scRNA-seq de una cohorte independiente de 5 pacientes con hepatitis crónica B, a los que se les efectuó una PAAF al inicio y tras 24 semanas de tratamiento con TAF(89). Estos datos de scRNA-seq están disponibles en la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO) del NCBI (GSE216314).

El análisis de los datos de SCRNA-seq se realizó utilizando Seurat v4.0(90). En primer lugar, se aplicaron las siguientes métricas como control de calidad: 1) número de genes únicos >300, 2) porcentaje de genes mitocondriales <10%, 3) complejidad celular >0.8 (relación entre el número de genes detectados y el número total de transcritos o *counts*; se calcula dividiendo estas variables entre ellas en log10) y 4) número de *counts* <10000. Se calcularon los porcentajes de genes de las subunidades de HBB y de genes plaquetarios para excluir eritrocitos y plaquetas en el análisis, respectivamente. Para corroborar que las muestras no presentaban variabilidad en cuanto al ciclo celular, se determinaron puntuaciones o *scores* con genes relacionados con el ciclo celular y se compararon entre las muestras. Además, respecto a los genes, se eliminaron aquellos que no presentaban interés para el análisis para simplificar y encontrar aquellos más significantes en el análisis de variabilidad; descartamos genes que codifican proteínas estructurales ribosómicas, ARNt no codificantes, y genes expresados en <10 células. Una vez filtradas/limpiadas nuestras muestras, se seleccionaron las células T CD8 filtrándolas teniendo en cuenta los marcadores utilizados en la citometría de flujo (CD3+, CD56 (NCAM1)-, CD19-, CD8+). Tras el filtrado, quedó un total de 7.146 células T CD8 para el análisis posterior. Los datos se normalizaron mediante el comando LogNormalize, fijando en 1000 el recuento total de UMIs (*Unique Molecular Identifier*) por célula. Para modelar la relación media-varianza de los genes para detectar los primeros 2000 genes con mayor varianza se utilizó el método *vst* (FindVariableFeatures). La reducción de la dimensionalidad PCA se realizó sobre los counts totales normalizados

utilizando la función RunPCA. Los primeros 15 componentes principales, basados en la inspección manual del gráfico de codo o *elbow*, se utilizaron para la clusterización (función FindClusters con resolución 0.2) y la visualización UMAP (RunUMAP). A continuación, los *clusters* se clasificaron manualmente basándose en la expresión media de genes marcadores clave en clusters individuales, el patrón de éstos y buscando en la literatura marcadores canónicos de diferentes subpoblaciones. Utilizando la función FindMarkers, se identificaron los genes expresados diferencialmente, y se utilizó el paquete R *heatmaply* para mostrar algunos de los genes principales como un mapa de calor. Para identificar la población PD-1+TRM, se realizó un nuevo subconjunto dentro de las células T CD8 utilizando la función *subset*. Se utilizó el paquete *DESeq2* R para analizar expresión diferencial *pseudobulk* entre las muestras basales y de seguimiento. Se utilizó t-test pareado para comparar los niveles de expresión génica de genes específicos dentro de cada paciente entre los 2 puntos temporales.

Análisis estadístico

Las variables categóricas se expresan como n (%) y las variables cuantitativas como mediana y rango intercuartil (IQR). Las variables categóricas se analizaron mediante la prueba de Chi Cuadrado. En cuanto a las variables cuantitativas, se realizaron comparaciones pareadas utilizando el test de los rangos con signo de Wilcoxon, y no pareadas utilizando la prueba U de Mann-Whitney, prueba t de Welch o test de Krustall Wallis, según correspondía, tal y como se detalla en las leyendas de las figuras. Las correlaciones entre 2 variable se analizaron mediante coeficiente de correlación de Spearman. El análisis para definir la probabilidad de alcanzar la cura funcional (estudio 1), definida como la pérdida de HBsAg, fue mediante Kaplan-Meyer. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando los programas: SPSS v20.0 (IBM, Chicago, IL, EE.UU.), GraphPad Prism v9 (GraphPad Software, Inc., CA, EE.UU.), Origin 2021b (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EE.UU.) y/o R versión 3.4 (R foundation for statistical computing, Viena, Austria).

RESULTADOS

ESTUDIO 1:

Características de los pacientes antes y después interrumpir el tratamiento con NUCs

Las características demográficas y clínicas basales de la cohorte del estudio se muestran en la **Tabla 4** y los datos individuales de cada paciente en la **Tabla 5**. El 93% de los pacientes eran caucásicos y el 78% varones, con una mediana de edad de 56 años (IQR 45-61). La mayoría de los pacientes (74%) estaban infectados por VHB de genotipo D y, en el momento de la inclusión, 20 (74%) pacientes recibían tratamiento con tenofovir y 7 (26%) con entecavir (tiempo mediano de tratamiento 8 años, IQR 8-13). Asimismo, todos los pacientes tenían valores normales de ALT al inicio del estudio (<40 UI/L), y ningún paciente presentaba fibrosis avanzada (F3-4) según la rigidez hepática y la evaluación histológica. Cabe destacar que, antes de la interrupción del tratamiento, los niveles de HBsAg se mantuvieron estables en todos los pacientes (**Figura 16**).

Tabla 4. Características de las diferentes cohortes según la evolución.

Variables	Total (n=27)	Pérdida HBsAg (n=8)	Control viral (n=14)	Re-tratados (n=5)	p- valor
Sexo (hombre)	21 (78%)	7 (87%)	10 (71%)	4 (80%)	0.67
Edad (años)	56 (45-61)	60 (57-63)	51 (43-56)	46 (44-65)	0.17
ALT (UI/L)	23 (17-26)	21 (17-26)	23 (19-28)	16 (15-27)	0.45
Tratamiento con NUCs					
Tenofovir	20 (74%)	8 (100%)	9 (64%)	3 (60%)	0.13
Duración (años)	8 (7-13)	13 (9-15)	8 (7-12)	8 (7-11)	0.18
Fibrosis: F0-1/ F2					
F0-1	25 (93%)	7 (88%)	13 (93%)	5 (100%)	0.7
F2	2 (7%)	1 (12%)	1 (7%)	0	
Genotipo					
A	3 (11%)	0	2 (14%)	1 (20%)	0.31
C	1 (4%)	0	1 (7%)	0	
D	21 (78%)	6 (75%)	11 (78%)	4 (80%)	
F	2 (7%)	2 (25%)	0	0	

Tabla 5. Cuantificaciones individuales de los marcadores séricos e intrahepáticos de los pacientes.

Paciente	Sexo/Edad	Marcadores en suero			Marcadores intrahepáticos		
		qHBsAg	HBcrAg	HBV-RNA	iHBV-DNA	cccDNA	iHBV-RNA
Pérdida HBsAg							
6	H/60	0.07	0	0	0.466	0.851	468
8	H/65	74	0	0	0.023	0.02	0
9	H/77	0.03	0	0	0	0.129	0
11	H/57	567	2.8	0	0.028	0.035	0
15	H/60	329	0	0	0.052	0.49	n.a.
18	H/32	52	5.1	61	0.14	0.042	0
19	M/59	1755	0	0	0.086	0.07	1.7
26	H/60	66	0	0	0.016	0.002	0
Control virológico							
1	H/57	6069	3.1	58	1.282	0.024	n.a.
3	H/43	1260	3	0	1.674	1.302	n.a.
4	H/56	598	0	0	0.208	0.259	n.a.
5	H/41	638	3	0	0.734	0.075	n.a.
14	H/38	1569	0	0	0.35	0.026	n.a.
16	H/43	4145	2.8	96	1.317	1.085	372
17	M/47	3495	3.1	97	1.017	0.243	798
20	H/55	23466	0	0	0.966	0.359	204
21	M/51	2365	3.1	136	0.365	0.069	371
22	H/48	3031	3.3	818	0.198	0.042	202
23	H/51	1675	0	889	0.421	0.085	0
24	H/73	583	0	0	1.108	0.127	4467
25	M/65	1240	2.9	101	0.248	0.368	28
27	M/54	5012	0	0	0.236	0.093	n.a.
Retratados							
2	H/68	2530	3	1002	1.151	0.122	n.a.
7	M/62	3786	3.4	842	0.875	0.459	n.a.
10	H/44	2122	2.8	364	1.51	0.048	96
12	H/46	1310	0	0	0.908	0.039	63
13	H/44	556	0	0	0.191	0.01	29

Tras una mediana de seguimiento de 34 meses (IQR 26-37), 22 pacientes (82%) permanecieron sin tratamiento, y 8 (30%) alcanzaron la cura funcional, definida por la pérdida del HBsAg (**Figura 17**). En estos pacientes, el tiempo transcurrido hasta la desaparición del HBsAg fue de 25 semanas (IQR 22-33), y 5 de ellos desarrollaron anticuerpos anti-HBs. Al final del seguimiento, 14 (52%) pacientes fueron considerados como “controladores virológicos” dado que permanecieron sin tratamiento aun siendo positivos para el HBsAg. Cinco de ellos cumplían los criterios de infección crónica HBeAg-negativa con valores normales de ALT y ADN-VHB inferior a 2000 UI/ml.

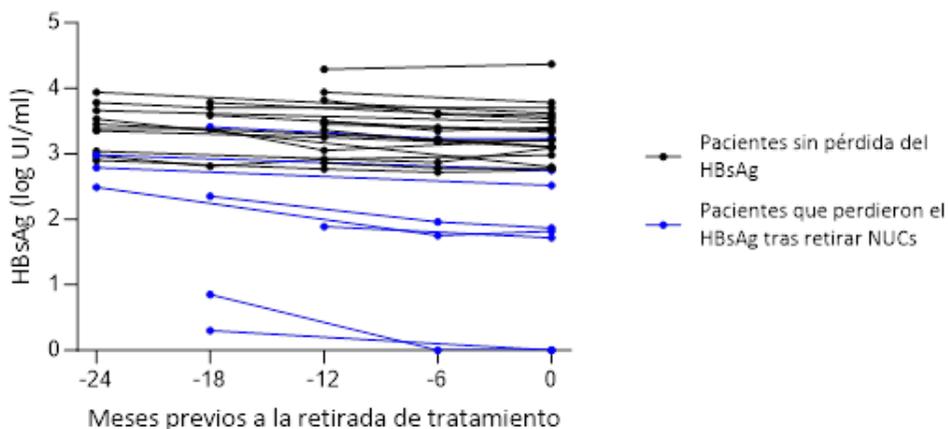


Figura 16. Cinética del HBsAg meses antes de parar el tratamiento con NUCs.

Los pacientes restantes se encontraban en una "zona gris". 7 tenían niveles de ADN-VHB >2000 UI/ml con valores de ALT normales, y los otros 2 presentaban niveles elevados de ALT <2 ULN. De los 27 pacientes incluidos en el estudio, sólo 5 (18%) precisaron reintroducción del tratamiento.

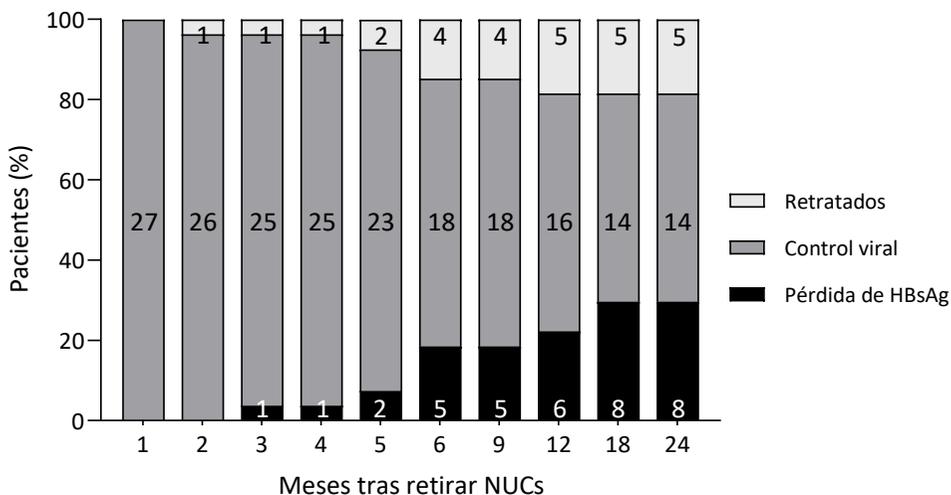


Figura 17. Evolución de los pacientes tras la interrupción del tratamiento con NUCs. Las barras representan el porcentaje de pacientes con pérdida del HBsAg, control virológico o reintegro. El número de pacientes se muestra dentro de las barras.

Los motivos de la reintroducción del tratamiento fueron: pico de ADN-VHB y niveles persistentes de ALT >10 ULN (n=1), viremia elevada con niveles persistentes de ALT 2-5 ULN durante al menos 4 semanas (n=3), y necesidad de tratamiento con dosis

altas de corticosteroides durante más de 7 días (n=1, que también presentaba ALT >2 ULN y ADN-VHB >20000 UI/ml). No se observaron diferencias en cuanto a la evolución de los pacientes tras la interrupción de los NUCs al considerar características como el sexo, la edad, el fármaco y la duración del tratamiento antiviral o el genotipo del VHB (**Tabla 4**).

Cinética del ADN-VHB, ALT y HBsAg tras la retirada de NUCs

La carga viral alcanzó su elevación máxima entre el primer y tercer mes tras interrumpir el tratamiento con NUCs (**Figura 18**).

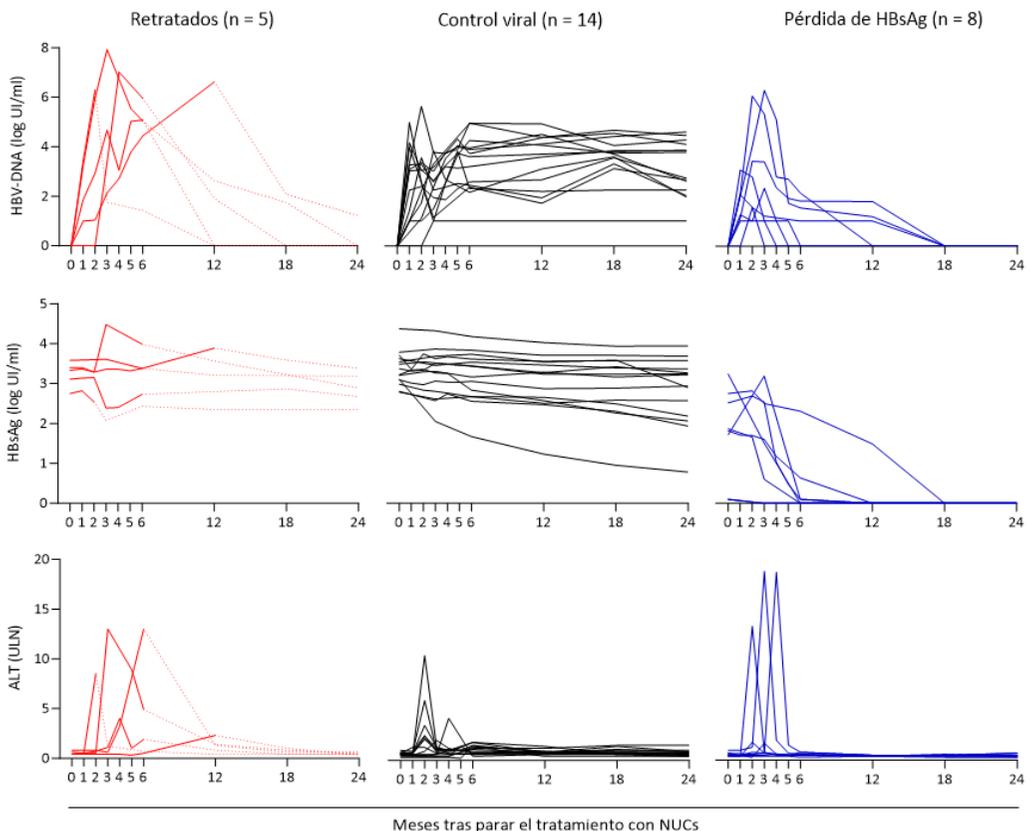


Figura 18. Cinética de HBV-DNA, HBsAg y ALT tras la retirada del tratamiento antiviral. En rojo, retratados (las líneas punteadas son una vez los pacientes volvieron a medicarse); en negro, los pacientes que presentaron un control del virus; el azul, los pacientes que perdieron el HBsAg, es decir, consiguieron la cura funcional.

La mayoría de los pacientes experimentaron una “recaída virológica” definida por un aumento del ADN-VHB por encima de 2000 UI/mL (78%) o 20000 UI/mL (44%). Tras la retirada del tratamiento, se observaron picos de ALT en algunos pacientes, aunque en la mayoría de los casos fueron leves. Seis pacientes sufrieron picos de ALT >10 ULN: 2 necesitaron la reintroducción del tratamiento, mientras que los otros 4 permanecieron sin terapia (3 de estos lograron la pérdida de HBsAg). Ni el ADN-VHB ni la cinética de ALT predijeron la evolución clínica durante el seguimiento. La reducción global de los niveles de HBsAg tras la retirada de los NUCs fue de -0.22 log UI/ml, sin que se observaran diferencias entre los pacientes con control virológico y los que reiniciaron la terapia.

Los niveles de HBsAg basales correlacionan con el iHBV-DNA y el iHBV-RNA, pero no con el cccDNA

Se analizaron los marcadores virales serológicos e intrahepáticos antes de la interrupción del tratamiento (**Tabla 5**). La mediana de la concentración de HBsAg basal en nuestra cohorte fue de 1310 UI/ml, con 11 (41%) pacientes ≤ 1000 UI/ml y 5 (18%) ≤ 100 UI/ml. A pesar del tratamiento prolongado con NUCs, todos los pacientes tenían iHBV-DNA y cccDNA detectables al inicio del estudio y el iHBV-RNA se detectó en el 67% de las muestras de tejido hepático analizadas (n=18). Por el contrario, sólo 11 (41%) y 13 (48%) pacientes tenían niveles serológicos detectables de HBV-RNA y HBcrAg, respectivamente. Cabe destacar que el HBV-RNA en suero fue indetectable en todos aquellos pacientes con iHBV-RNA indetectable (n=6), tampoco pudimos detectar HBV-RNA en sus muestras de suero emparejadas.

Al analizar las correlaciones entre los marcadores virales serológicos e intrahepáticos basales (**Tabla 6**), observamos que el HBsAg correlacionaba tanto con el iHBV-DNA ($\rho=0.65$, $p=0.0003$), como con el iHBV-RNA ($\rho=0.48$, $p=0.04$), pero no con el cccDNA. Además, el HBV-RNA en suero correlacionó con el iHBV-DNA y el iHBV-RNA ($\rho=0.50$, $p=0.008$ y $\rho=0.56$, $p=0.01$, respectivamente). No se observó ninguna

correlación entre la duración del tratamiento previo con NUCs y la expresión de ninguno de los marcadores virológicos analizados (datos sin mostrar).

Tabla 6. Correlaciones entre marcadores virales en suero e hígado.

	iHBV-DNA	cccDNA	iHBV-RNA[#]	iHBV-RNA/cccDNA[#]
<i>HBsAg</i>	rho= 0.65 p= 0.0003	rho= 0.33 p= 0.09	rho= 0.48 p= 0.04	rho= 0.45 p= 0.06
<i>HBV-RNA</i>	rho= 0.50 p= 0.008	rho= 0.22 p= 0.3	rho= 0.56 p= 0.01	rho= 0.56 p= 0.01
<i>HBcrAg</i>	rho= 0.36 p= 0.06	rho= 0.18 p= 0.4	rho= 0.34 p= 0.2	rho= 0.24 p= 0.3

Niveles basales bajos de HBsAg se asocian con la pérdida de HBsAg tras la retirada de NUCs

Aunque los niveles de cccDNA eran similares, los pacientes que perdieron el HBsAg tenían títulos de HBsAg e iHBV-DNA más bajos al inicio del estudio, en comparación con los individuos que mantuvieron el control virológico y los que necesitaron un nuevo tratamiento (**Figura 19**).

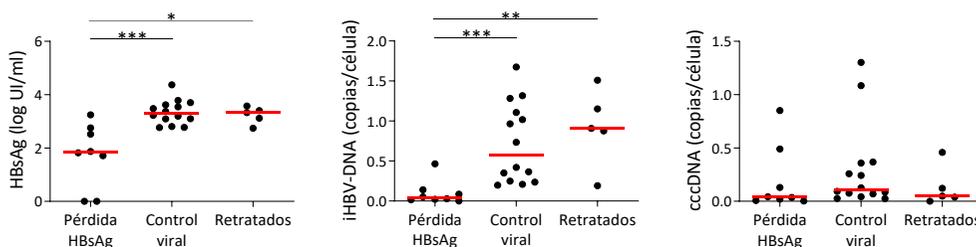


Figura 19. Comparación de los niveles de HBsAg, iHBV-DNA y cccDNA entre grupos.

Es importante destacar que 5 de los 7 (71%) pacientes que lograron la pérdida de HBsAg tenían un iHBV-RNA indetectable al inicio del estudio ($p < 0,01$), mientras que el 91% de los pacientes que siguieron siendo positivos para el HBsAg tenían iHBV-RNA indetectable (**Figura 20**). Además, los niveles basales de HBcrAg y HBV-RNA en suero fueron indetectables en la mayoría de pacientes que lograron la pérdida de HBsAg (75% y 88%, respectivamente).

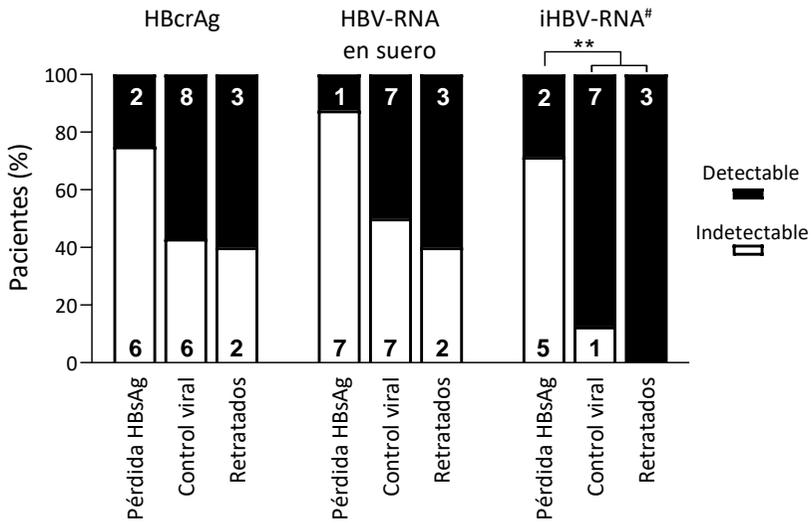


Figura 20. Marcadores de actividad transcripcional en pacientes.

Como se muestra en la **Figura 21a**, la probabilidad de pérdida de HBsAg fue mayor entre los pacientes con niveles bajos de HBsAg ≤ 1000 UI/ml (log rank 9.9; $p=0.002$).

La combinación de niveles de HBsAg ≤ 1000 UI/ml y HBV-RNA indetectable en suero no mejoró el valor predictivo de la pérdida de HBsAg (log rank 6.7; $p=0.009$; **Figura 21b**). Aunque los parámetros virológicos predijeron la pérdida de HBsAg, no observamos diferencias entre los grupos de control virológico y de recaída.

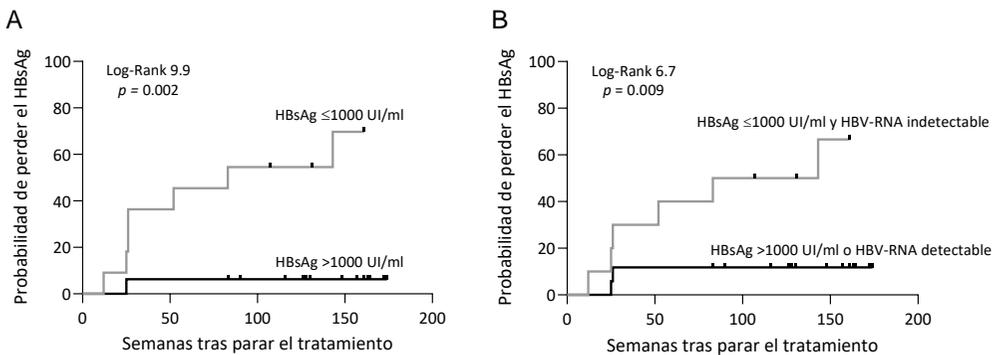


Figura 21. Probabilidad de perder el HBsAg si se tiene en cuenta A) un *cut off* de HBsAg B) tener o no HBV-RNA y los niveles de HBsAg.

Las respuestas de células T específicas contra el VHB durante el tratamiento se asocian con el control virológico tras su retirada

Para evaluar el impacto de la respuesta de las células T específicas frente al VHB en la evolución de los pacientes tras la interrupción de los NUCs, investigamos la capacidad efectora de las células T CD4+ y CD8+ específicas contra el VHB tras la estimulación in vitro con péptidos solapantes (OLP, *overlapping peptides*) que abarcan las proteínas de la cápside, la envoltura o la polimerasa.

Como se puede observar en la **Figura 22**, en el momento basal (en el momento de la parada del tratamiento), el porcentaje de pacientes que permanecieron sin terapia cuyas células T CD8+ específicas respondieron contra OLP de más de una proteína del VHB fue mayor que los que requirieron la reintroducción de NA (68% frente a 20% $p=0,048$ para la producción de IFN γ y 77% frente a 40% $p=0,099$ para la expresión de CD107a, respectivamente. Asimismo, las células T CD8+ y CD4+ que respondían frente a todos los antígenos virales se detectaban con más frecuencia en los pacientes que permanecieron sin tratamiento que en el grupo de retratamiento.

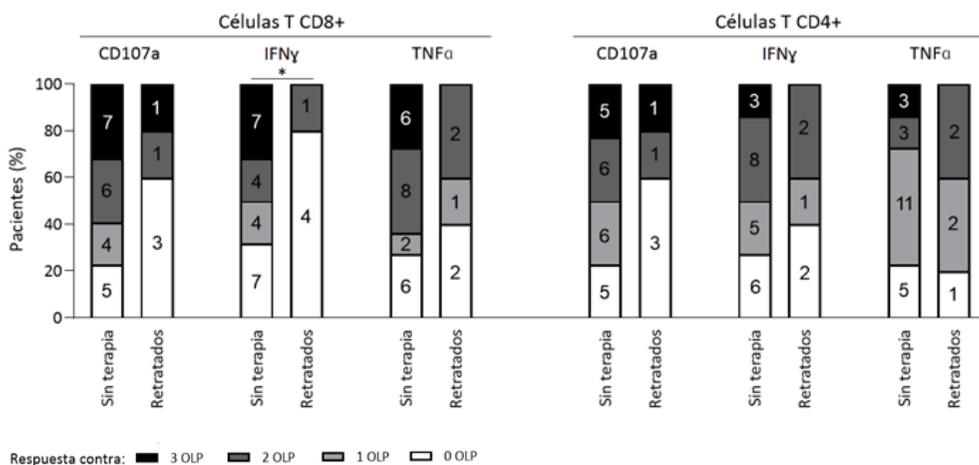


Figura 22. Porcentaje de pacientes con respuestas de células T específicas contra el VHB antes de parar tratamiento según los diferentes pools de péptidos superpuestos (OLP). Definimos una respuesta de células T específica del VHB como $>0,1\%$ tras sustracción del control no estimulado.

De hecho, en este grupo de pacientes no se detectaron linfocitos T CD4+ y CD8+ capaces de producir IFN γ o TNF α en respuesta a OLP de las 3 proteínas virales. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la respuesta frente a los distintos péptidos dentro de cada uno de los grupos (pérdida de HBsAg, sin tratamiento y retratamiento), probablemente debido al número reducido de pacientes incluidos en el grupo de retratamiento.

Como medida de actividad citotóxica, determinamos la capacidad de degranulación de las células T CD8+ mediante la expresión de CD107 en la membrana celular después de la expansión in vitro con OLPs del VHB (core, envuelta y polimerasa). El porcentaje de células T CD8+ CD107a+ específicas frente a la proteína core fue mayor en los pacientes que permanecieron sin terapia, tanto en el momento basal como después de 12 semanas de parar los NUCs ($p=0.039$ y 0.0093 , respectivamente; **Figura 23**). Sin embargo, no encontramos diferencias en la expresión de CD107a al estimular con OLPs correspondientes a las proteínas de envoltura y polimerasa.

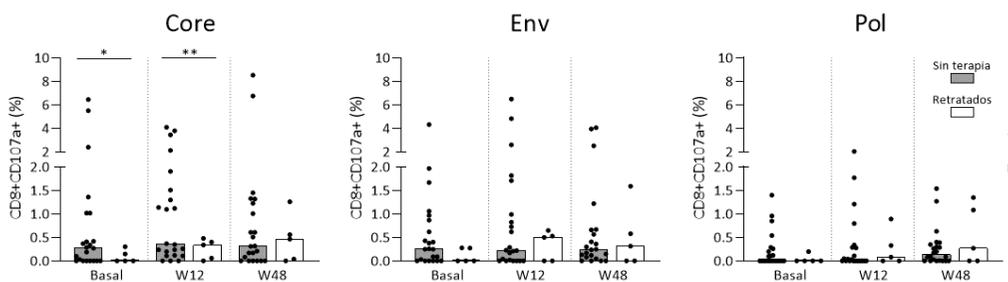


Figura 23. Células T CD8+ que expresan CD107a al inicio y 48 semanas después de la suspensión del tratamiento. Las barras representan la mediana y las líneas punteadas el umbral del 0.1% para respuestas positivas restando el control no estimulado. Se utilizó la prueba t de Welch para comparar los grupos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Cuando investigamos la presencia de linfocitos T CD8+ y CD4+ polifuncionales (células que coexpresan IFN γ y TNF α , **Figura 24**), observamos que el porcentaje de linfocitos T CD8+ core-específicos que producían IFN γ /TNF α era mayor en los pacientes que permanecieron sin tratamiento en comparación con los pacientes que

necesitaron la reintroducción del tratamiento, tanto antes como después de 1 año de seguimiento. Se observó una tendencia similar cuando se analizaron las células T CD4+ efectoras coproductoras de IFN γ /TNF α ; sin embargo, las diferencias entre los 2 grupos de pacientes no fueron estadísticamente significativas. Del mismo modo, los porcentajes de células T (CD4+ y CD8+) polifuncionales específicas contra las proteínas de la envoltura y la polimerasa fueron similares entre los pacientes que permanecieron sin terapia y los que fueron retratados.

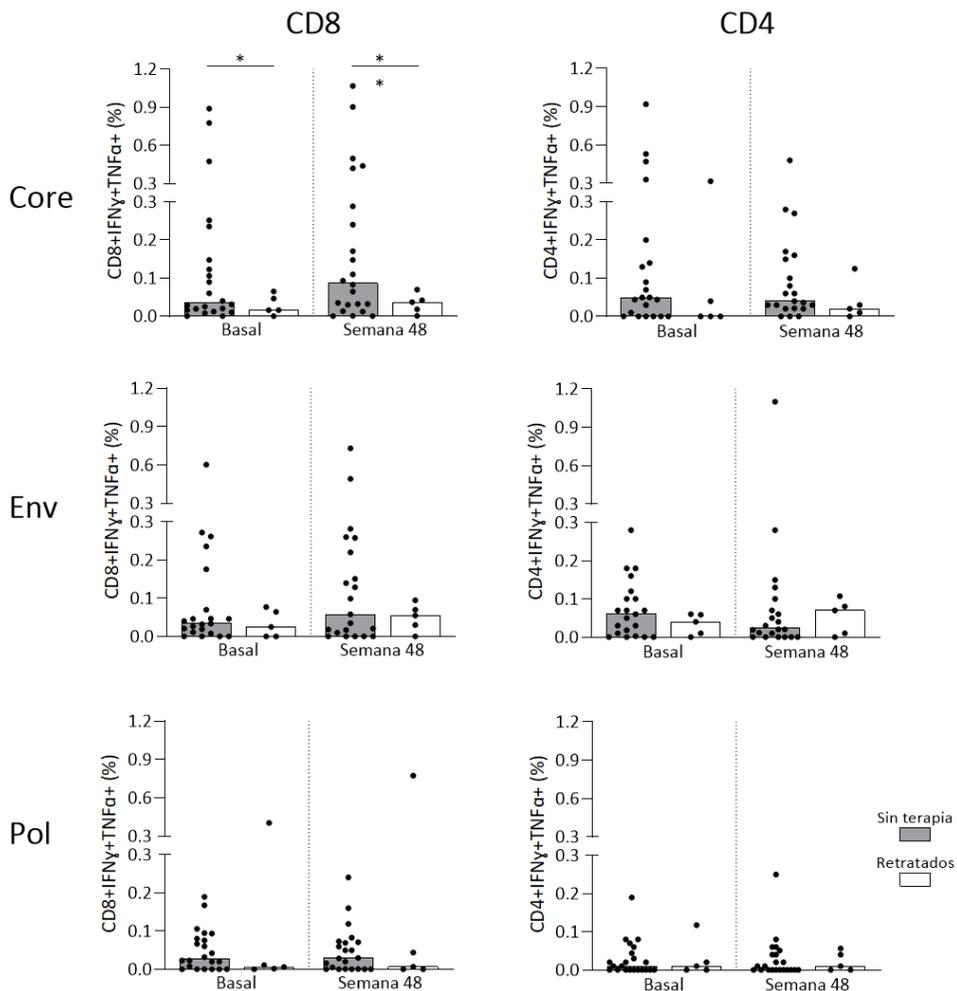


Figura 24. Células T polifuncionales al inicio y 48 semanas después de la suspensión del tratamiento. Las barras representan la mediana. Se utilizó la prueba t de Welch para comparar los grupos. *p < 0.05, **p < 0.01.

También evaluamos si existía alguna asociación entre las respuestas de células T y el desarrollo de brotes de ALT clínicamente relevantes durante el seguimiento. Como se muestra en la **Figura 25**, observamos que las respuestas de las células T CD8+ y CD4+ específicas del VHB al inicio del estudio (antes de retirar el tratamiento) fueron similares entre los pacientes, independientemente de si desarrollaron pico de ALT (utilizando un umbral de ≥ 2 ULN).

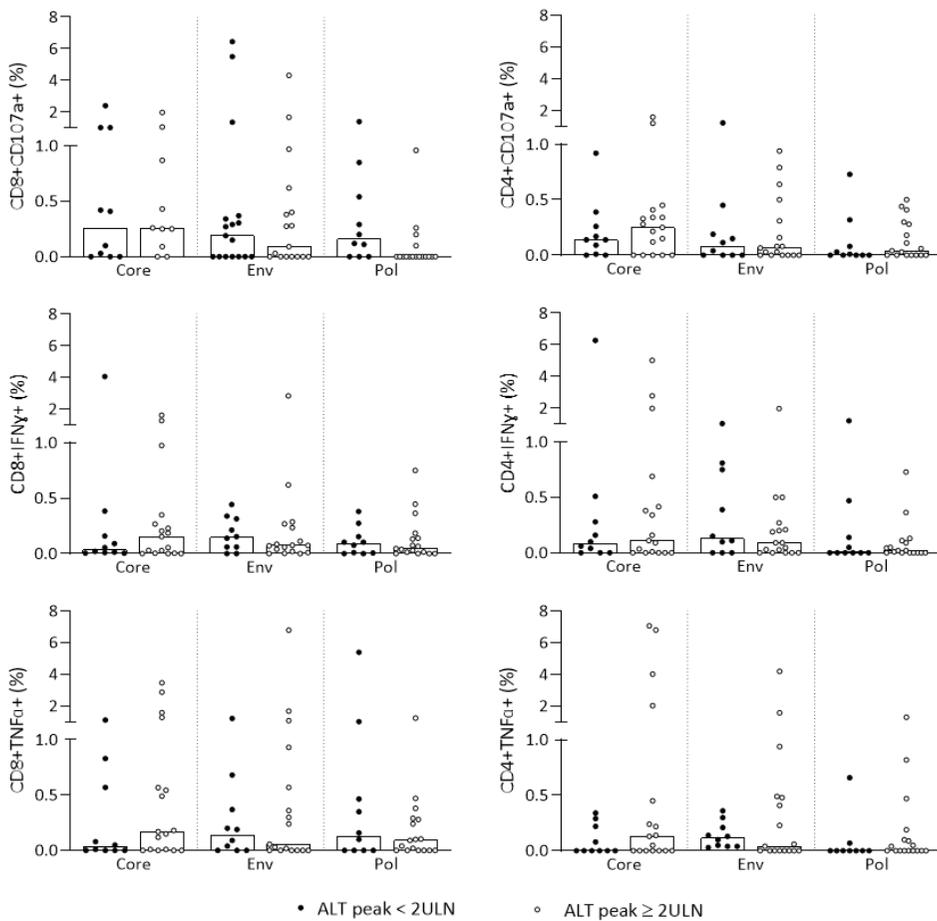


Figura 25. Respuesta específica de VHB de células T basal categorizando los pacientes según si presentaron un pico de ALT durante el seguimiento.

Las respuestas específicas frente al VHB no aumentan tras la interrupción del tratamiento

Para investigar el impacto de la retirada del tratamiento antiviral en la respuesta inmune celular, realizamos un análisis longitudinal de las respuestas de las células T frente a OLP del VHB a las 12 y 48 semanas tras la interrupción de los NUCs. Como se muestra en la **Figura 26**, la frecuencia de células T CD8+ o CD4+ específicas contra el VHB (CD107a+, IFN γ + y/o TNF α +) no cambió significativamente durante el seguimiento.

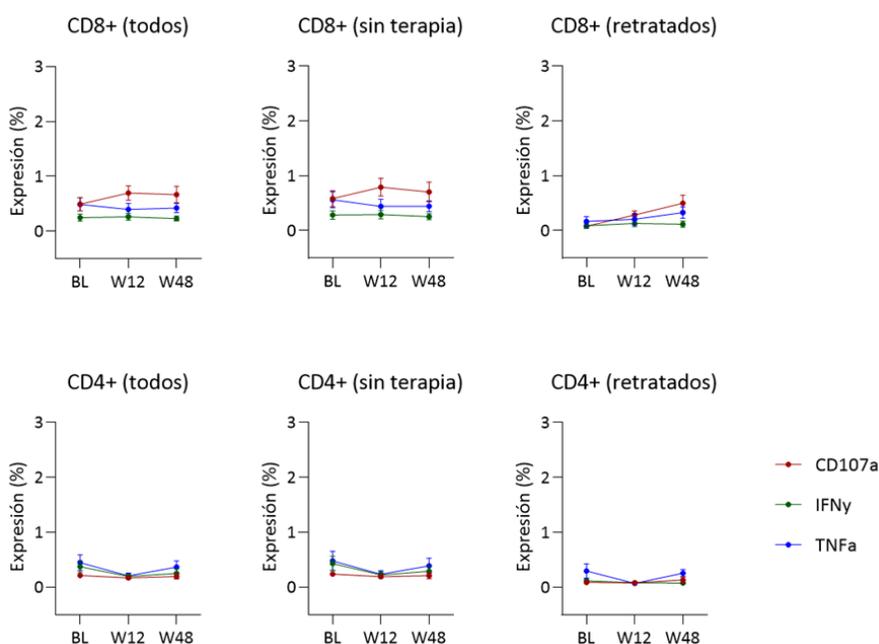


Figura 26. Análisis longitudinal de las respuestas de células T VHB-específicas tras la parada de tratamiento. Los datos se expresan como media \pm SEM.

Asimismo, tampoco se detectaron cambios significativos en ninguna de las funciones efectoras para ninguno de los grupos de péptidos en la semana 12 o 48 en comparación con el valor basal (**Figura 27**). Dado que la pérdida de HBsAg con o sin producción de anti-HBs representa el mejor predictor de éxito tras la interrupción de la terapia con NUCs, analizamos las respuestas de células T CD8+ y CD4+ específicas del VHB en este subgrupo de 8 pacientes que alcanzaron la cura funcional.

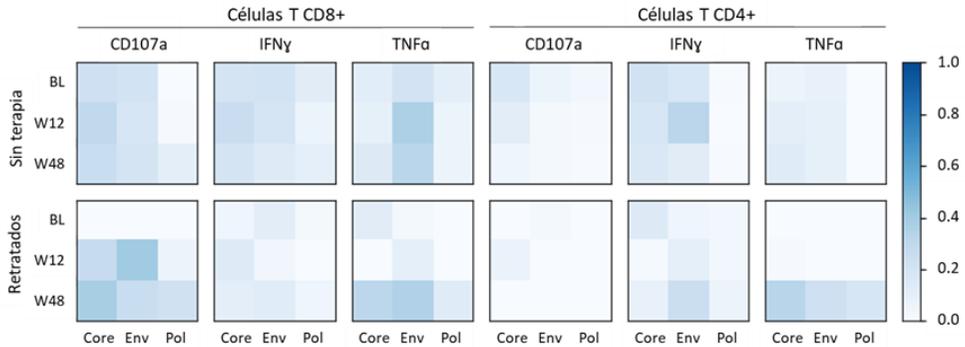


Figura 27. Heatmap de las respuestas de células T VHB-específicas contra cada OLP al inicio (BL) y durante el seguimiento. La normalización se realizó escalando los valores máximos y mínimos por marcador entre 0 y 1.

Curiosamente, la respuesta de las células T CD8+ efectoras fue heterogénea: algunos pacientes presentaron respuestas vigorosas y persistentes mientras que otros las respuestas fueron muy débiles o inexistentes para todos los mediadores CD107a, IFN γ o TNF α (**Figura 28**).

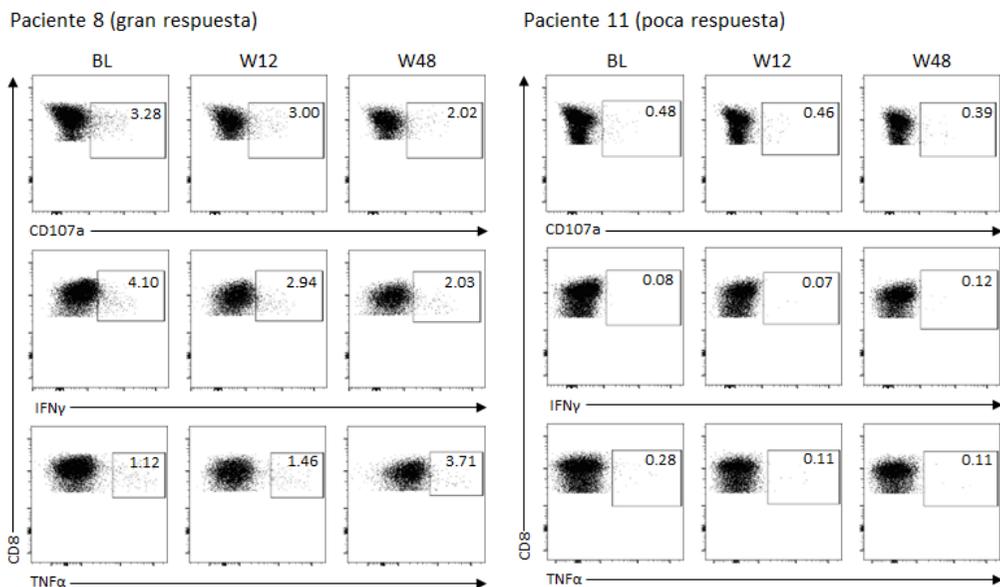


Figura 28. Ejemplos representativos de las respuestas T de dos pacientes que perdieron el HBsAg tras la interrupción de NUCs.

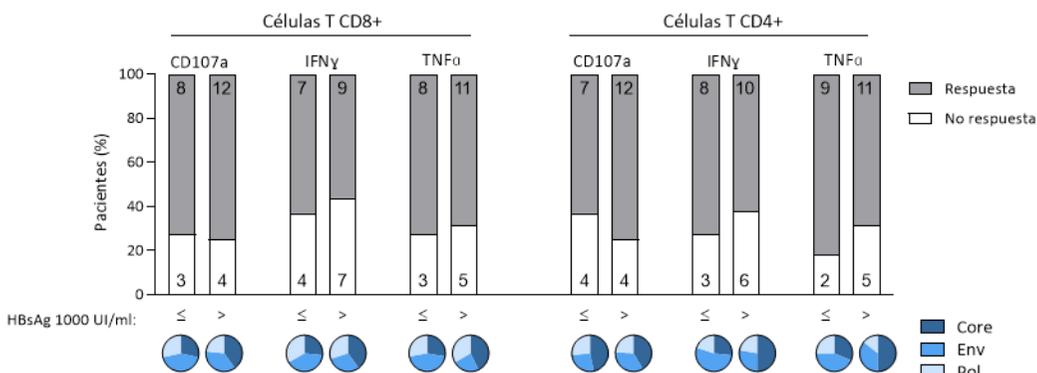


Figura 30. Porcentaje de pacientes con respuestas VHB-específicas de células T CD8+ o CD4+ específicas del VHB en muestra basal. Los gráficos de sectores debajo de las barras representan la fracción de pacientes con respuestas de células T contra los diferentes grupos de OLP del VHB: Core (azul oscuro), Env (azul medio) y Pol (azul claro). Las barras representan la mediana.

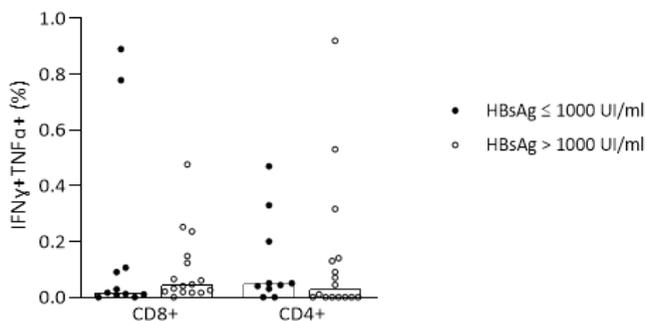


Figura 31. Células T CD8+ y CD4+ core-específicas multifuncionales basales y 48 semanas después de la interrupción del tratamiento con NUCs. Los pacientes fueron clasificados según los niveles de HBsAg en ≤1000 UI/ml o >1000 UI/ml. El número de pacientes se muestra dentro de las barras.

Seguridad

En cuanto a la seguridad de la retirada del tratamiento con NUCs, cabe destacar que ningún paciente desarrolló descompensación hepática, carcinoma hepatocelular o falleció durante el seguimiento. No se detectaron niveles de bilirrubina superiores a 2 mg/dl ni prolongación del tiempo de protrombina en ningún punto temporal, ni siquiera entre los individuos que precisaron reintroducción del tratamiento. Tampoco se detectaron otros acontecimientos adversos durante el periodo de seguimiento. Todos los pacientes que requirieron la reintroducción de NA tuvieron una buena respuesta posterior con entecavir o tenofovir, logrando la remisión virológica (carga viral indetectable) y la normalización de ALT en un plazo de 6 meses. Además, en 19 (70%) pacientes, no observamos ningún cambio en la rigidez hepática a los 24 meses de seguimiento en comparación con la evaluación inicial correspondiente o al comparar los grupos de resultados del tratamiento (Tabla 1).

ESTUDIO 2:

Características clínicas y virológicas de la cohorte del estudio

Las características clínicas y virológicas basales de los pacientes incluidos en el estudio se muestran en la **Tabla 7** (pacientes agrupados). La mayoría de los pacientes eran varones (73%) con una mediana de edad de 46 años y presentaban fibrosis leve (86% <F2). Los genotipos del VHB más prevalentes (A a F) estaban presentes entre los pacientes, sin diferencias significativas entre los grupos tratados con NUCs y los no tratados.

Tabla 7. Características basales de las dos cohortes de pacientes.

	Sin tratamiento (n=13)	Tratados (n=9)	p valor
Sexo (hombre)	10 (77%)	6 (67%)	n.s.
Edad (años)	44 (34 - 58)	47 (42 - 58)	n.s.
ALT (U/L)	41 (32 - 87)	25 (22 - 41)	n.s.
Estado fibrosis F0-1	10 (77%)	9 (100%)	n.s.
F2/F3	1/2 (8%/15%)		
Tratamiento TDF/ETV	n.a.	7/2 (78%/22%)	n.a.
Duración (años)		7 (5 - 10)	
HBeAg (+/-)	5/8 (38%/62%)	0/9 (0%/100%)	0.03
Marcadores serológicos			
HBV-DNA (Log UI/ml)	5.2 (3.4 - 8.4)	n.a.	n.a.
HBsAg (Log UI/ml)	4.1 (3.1 - 4.4)	3.3 (2.5 - 4.1)	n.s.
HBcrAg_cat (positivo)	8 (62%)	5 (56%)	n.s.
HBcrAg (Log U/ml)*	6.6 (4.8 - 7.0)	3.1 (3.1 - 4.5)	0.01
cirB-RNA_cat (positivo)	9 (69%)	1 (11%)	0.007
cirB-RNA (Log copias/ml)*	4.6 (2.6 - 6.0)	n.a.	n.a.
Marcadores intrahepáticos			
iHBV-DNA (copias/célula)	4.39 (1.10 - 426)	0.28 (0.10 - 0.78)	0.0026
cccDNA (copias/célula)	0.61 (0.30 - 3.00)	0.02 (0.008 - 0.17)	0.0011

Los pacientes que recibían tratamiento con NUCs eran HBeAg negativos y tenían una carga viral indetectable. La mediana de duración del tratamiento fue de 7 años (IQR 5-10) y la mayoría de ellos (78%) fueron tratados con tenofovir. Los pacientes sin tratamiento tenían una carga viral media de 5,2 Log UI/ml (IQR 3.4-8.4) y 5 de 13 (38%) eran HBeAg positivos. Los títulos de HBsAg fueron similares entre ambos grupos de pacientes. Aunque la proporción de pacientes con HBcrAg detectable fue similar entre los pacientes tratados y los no tratados (56% vs 62%, respectivamente),

los pacientes sin tratamiento mostraron niveles de HBcrAg más elevados en comparación con los pacientes sometidos a terapia NUCs. Sólo se detectó CirB-RNA en 1 (11%) paciente tratado en comparación con 9 (69%) pacientes sin tratamiento. En cuanto a los biomarcadores virales intrahepáticos, tanto el iHBV-DNA como el cccDNA fueron más elevados en el grupo sin tratamiento y ambos parámetros se correlacionaron significativamente con el ADN-VHB, el cirB-RNA, el HBsAg y el HBcrAg séricos (Figura suplementaria S1). Por el contrario, de acuerdo con informes previos, no se observó correlación entre el HBsAg y el HBcrAg y los marcadores intrahepáticos en pacientes sometidos a tratamiento con NUC.

La expresión de PD-1 en células CD8 TRM se asocia con la replicación del VHB
En primer lugar, analizamos los perfiles inmunitarios de las PAAFs y los comparamos con la sangre periférica del mismo individuo. Las células T CD8 de memoria residentes en tejido hepático humano (TRM) se distinguieron de las células T infiltradas, pero no residentes, en función de la expresión de dos moléculas de retención tisular: CD69 (antagonista de S1PR1, que impide la salida del tejido) y CD103 (integrina αE que se une a E-cadherina). Así pues, clasificamos las células T CD8 en: i) TRM (CD69+CD103+), ii) recirculantes (infiltradas en tejido) no residentes (CD69-CD103-) y iii) TRM-like (fenotipo intermedio: CD69+CD103-).

Tal y como se muestra en la **Figura 32** y de acuerdo con datos previos(88), no se encontraron células T CD8 TRM en la periferia, pero se detectaron en todas las PAAFs, lo que confirma un muestreo fiable y representativo del compartimento intrahepático: 4% TRM ((IQR 2-7) y 20% TRM-like (IQR 13-28). Además, las células T CD8 totales y las células NK también se enriquecieron en el compartimento hepático, mientras que la frecuencia de células B fue menor en las PAAF en comparación con la sangre.

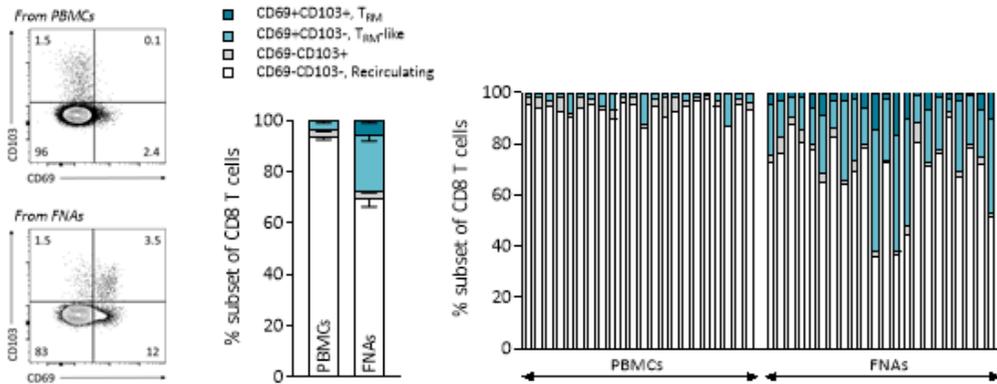


Figura 32. Perfil global de linfocitos en muestras emparejadas de sangre (PBMCs) y FNAs de hígado. Identificación de células T residentes en el hígado (TRM, CD69+CD103+), TRM-like (CD69+CD103-) y no residentes "recirculantes" que se infiltran en el tejido (CD69-CD103-). Los gráficos de barras apiladas muestran la frecuencia de cada subgrupo como resumen de los datos (gráfico izquierdo) y datos individuales donde cada barra representa a un paciente (gráfico derecho).

En cuanto a la expresión del receptor coinhibitorio PD-1, tanto el porcentaje de células T CD8 PD-1+ como la MFI fueron notablemente mayores en las células T CD8 intrahepáticas que en las periféricas, particularmente en la fracción residente en el tejido formada por las poblaciones TRM CD8 y las poblaciones TRM-like CD69+CD103- (**Figura 33**). De hecho, la MFI de PD-1 en las células T CD8 TRM fue 2 veces superior a la de la subpoblación no residente (CD69-CD103-, $p < 0,0001$).

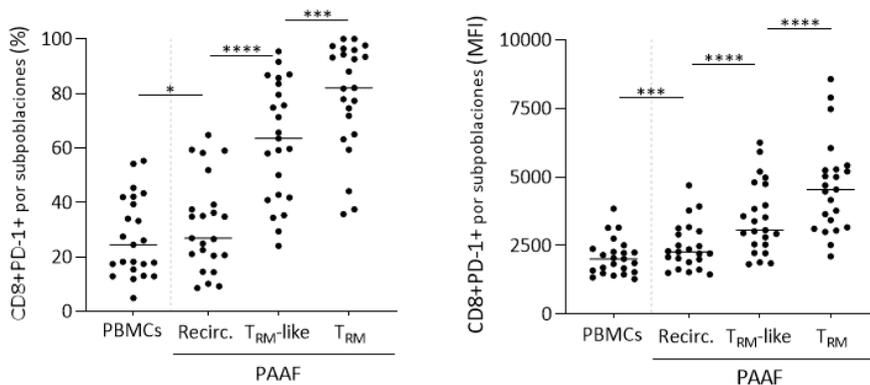


Figura 33. Porcentaje e intensidad de PD-1 en las diferentes subpoblaciones de células T CD8+.

A continuación, nos propusimos explorar si existía una asociación entre la actividad viral y la expresión de PD-1 en células T CD8 periféricas e intrahepáticas. Ni la carga viral ni los niveles de HBAg se correlacionaron con la expresión de PD-1 en células T CD8 TRM. No obstante, encontramos que la expresión de PD-1 en células T CD8 TRM (MFI) se correlacionaba con los niveles de iHBV-DNA ($r=0,67$ $p=0,001$) y cccDNA ($r=0,80$ $p<0,0001$). Estas correlaciones se mantuvieron cuando analizamos por separado los pacientes tratados con NUC y los no tratados. Además, estos dos marcadores también se correlacionaron con la expresión de PD-1 en otras subpoblaciones de células T procedentes de las PAAFs, pero no en células T CD8 periféricas. Asimismo, también encontramos una correlación estadísticamente significativa entre los marcadores serológicos de la actividad transcripcional del cccDNA, cirB-RNA y HBcrAg, y la expresión de PD-1 en TRM CD8 (**Figura 34a, Figura 34b**). La expresión de PD-1 en TRM CD8 también fue mayor en pacientes con cirB-RNA detectable (90% no tratados) en comparación con aquellos pacientes con ARN-cirB indetectable (67% sometidos a terapia NUC, $p=0,011$), mientras que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en función de la detección o no de HBcrAg (**Figura 34c**). En conjunto, estos datos sugieren una asociación entre ambos marcadores hepáticos de replicación del VHB (iHBV-DNA y cccDNA) y marcadores sustitutos de la actividad del cccDNA en suero y la expresión de PD-1 en TRM CD8.

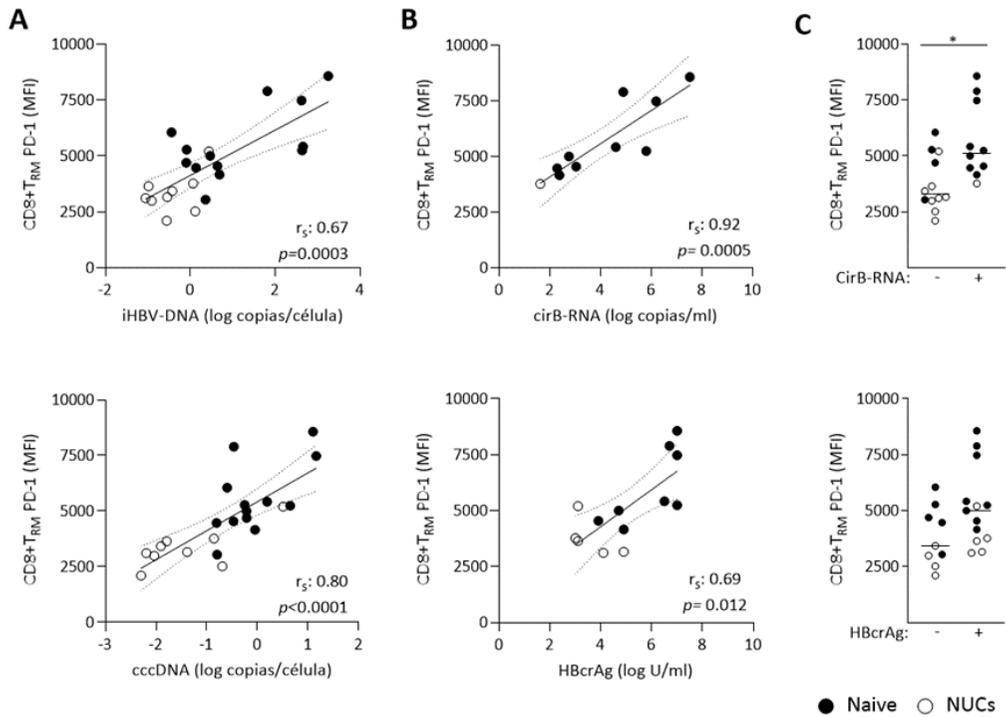


Figura 34. Asociación de la expresión de PD-1 y diferentes marcadores virales. A) Intrahepáticos, B) En suero y C) de manera categórica.

La expresión de PD-1 en las células T intrahepáticas está modulada por la replicación del VHB

Para investigar el impacto del tratamiento con NUCs en el compartimento inmunitario intrahepático, clasificamos a los pacientes en función de si recibían o no tratamiento con NUC (**Figura 35a**, **Figura 35b**). La expresión de PD-1 (porcentaje e MFI) en las células T CD8 infiltrantes del hígado (CD69-CD103-) o en las que circulaban en sangre periférica fue similar entre ambos grupos de pacientes. Por el contrario, observamos que la expresión de PD-1 en células T CD8 TRM y TRM-like era menor en los pacientes en tratamiento prolongado con NUCs que en los pacientes naive/no tratados ($p=0.0008$ y $p=0.003$; respectivamente). Aunque los niveles de ALT fueron similares entre ambos grupos de pacientes tratados y naive, la MFI de PD-1

en las células T CD8 TRM era mayor en los pacientes con niveles de ALT más elevados (Figura 35c).

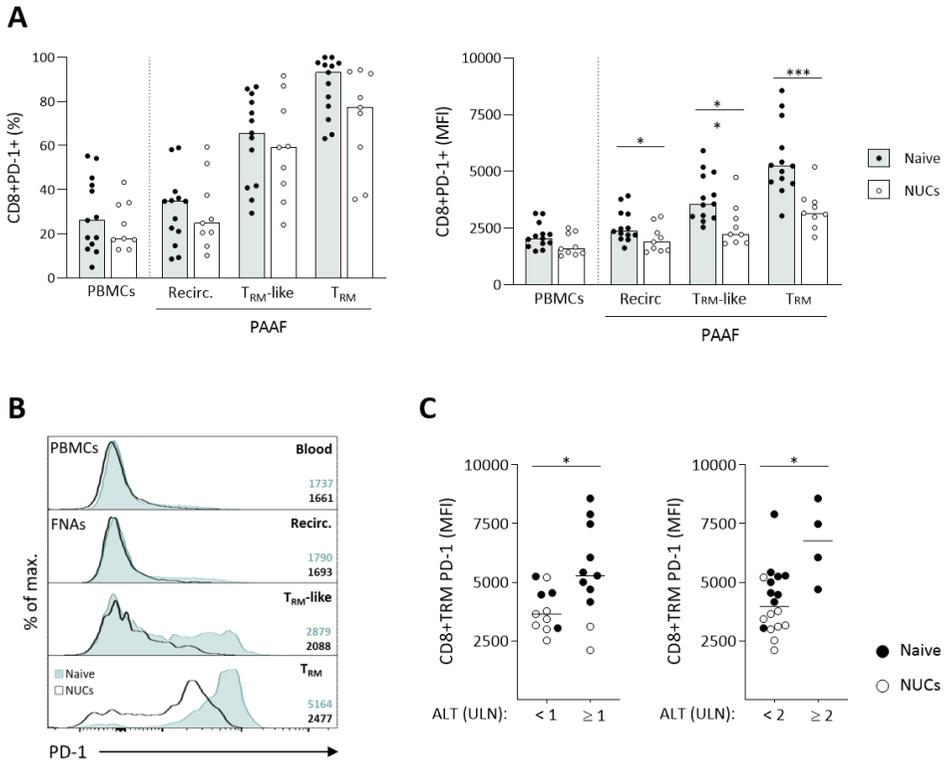


Figura 35. PD-1 en pacientes bajo NUCs y sin terapia en las diferentes poblaciones de células CD8+ T. A) Porcentaje e intensidad, B) Ejemplo ilustrativo y C) de manera categórica según el nivel de ALT.

En el análisis transversal, las diferencias de expresión de PD-1 entre los grupos tratados con NUC y naive podrían deberse a factores distintos del efecto del tratamiento en la evolución clínica de los pacientes. Por lo tanto, para investigar más a fondo si la expresión intrahepática de PD-1 puede ser modulada por la replicación del VHB, llevamos a cabo comparaciones longitudinales intrapacientes antes y después de la interrupción o introducción del tratamiento con NUCs. Para realizar este análisis, en primer lugar, comprobamos que las poblaciones globales de linfocitos en sangre periférica y en el hígado se mantenían estables y no cambiaban

de forma significativa durante el periodo de estudio: tiempo transcurrido entre la PAAF basal en el inicio o retirada de tratamiento y la PAAF de seguimiento obtenida entre 6 y 18 meses de la intervención (**Figura 36**).

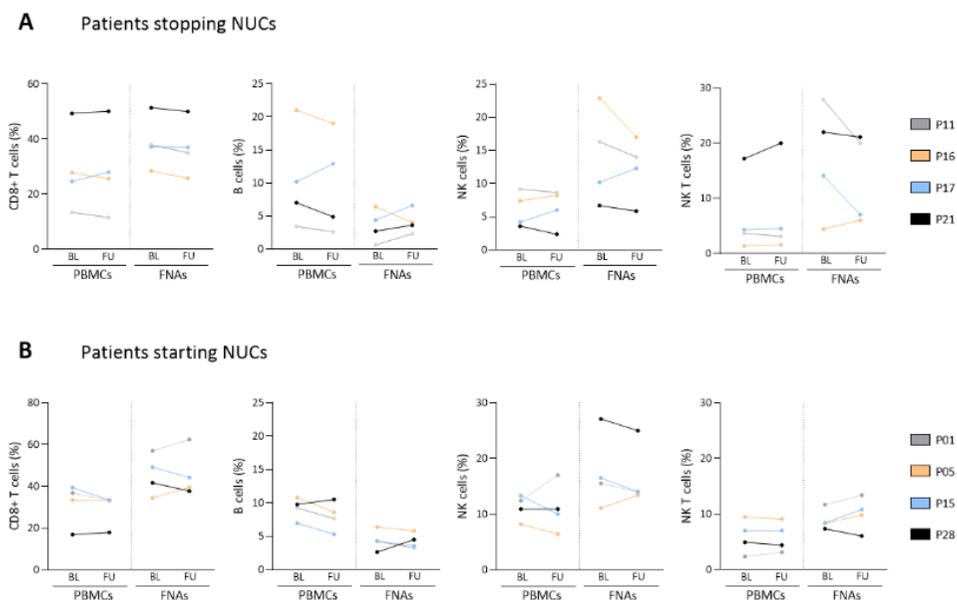


Figura 36. Perfil global de linfocitos en las diferentes muestras (PBMCs y FNAs).

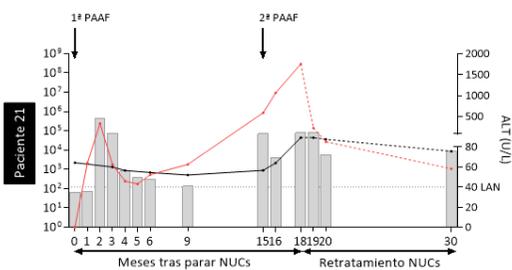
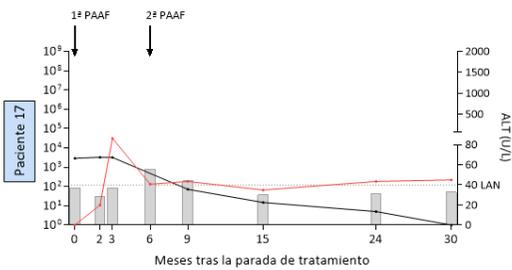
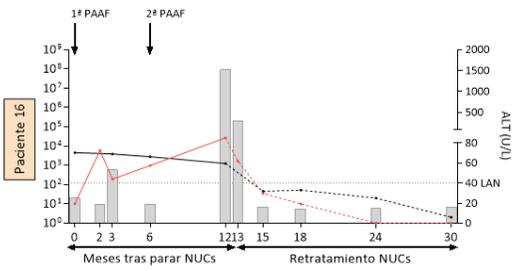
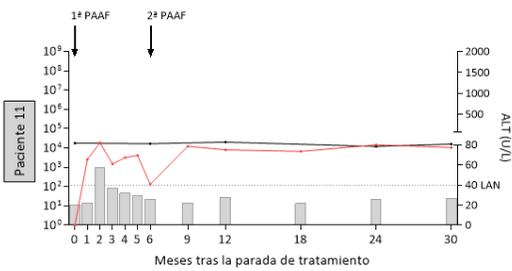
En segundo lugar, siguiendo las guías clínicas de la EASL (54), se paró el tratamiento a 4 de los pacientes con hepatitis crónica B HBeAg negativo incluidos en nuestro estudio- y se realizó una PAAF de seguimiento en ausencia de tratamiento antiviral en estos pacientes (**Figura 37a**). Tras 30 meses de seguimiento, 2 pacientes requirieron la reintroducción del tratamiento según los criterios previamente definidos, mientras que los otros 2 pacientes alcanzaron el control viral con una carga viral baja y ALT normal. La evolución del HBsAg (durante el período sin tratamiento) fue heterogénea, ya que permaneció estable en los pacientes 11 y 16, aumentó >1 log en el paciente 21 y disminuyó 3 log en el paciente 17. Todos los pacientes presentaron una recaída virológica (ADN-VHB >2000 UI/ml) así como elevaciones moderadas de ALT > 1UNL durante los 6 primeros meses tras la

interrupción de los NUCs. En cuanto a los cambios en la expresión de PD-1 tras la retirada del tratamiento (**Figura 38a**), observamos un aumento de la MFI n de PD-1 en las células T CD8 TRM en comparación con las células T CD8 circulantes (sangre periférica e infiltrantes).

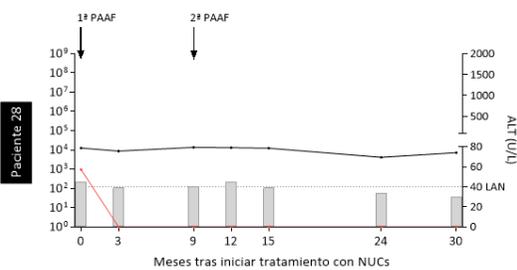
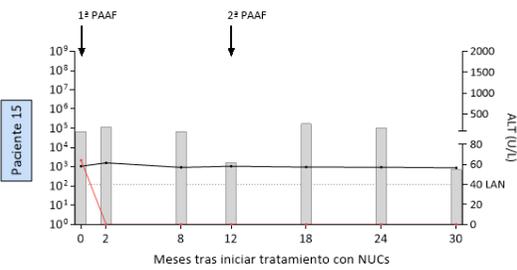
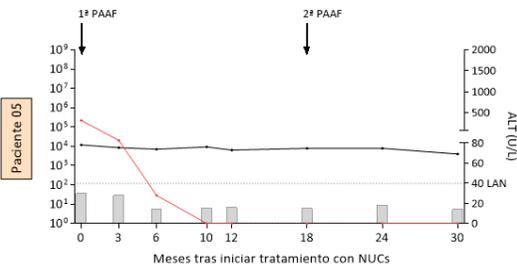
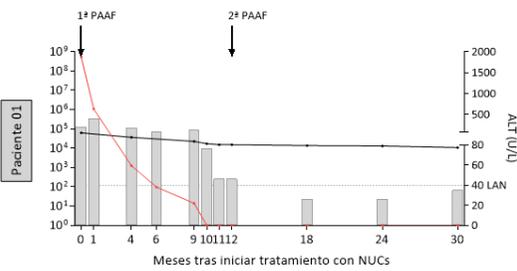
En tercer lugar, analizamos la situación inversa: se empezó el tratamiento con NUCs en 4 pacientes naive y se realizó una PAAF de seguimiento entre 9 y 18 meses después de iniciar la terapia (**Figura 37b**).

En el momento de la segunda PAAF, los niveles de ADN-VHB eran <10 UI/ml y la ALT <2 UNL en los 4 pacientes. Por el contrario, los niveles de HBsAg permanecieron estables en 3 pacientes y disminuyeron sólo 0,6 log en el paciente 1. Tras la supresión viral, la expresión de PD-1 disminuyó de manera significativa en las células T CD8 TRM (**Figura 38b**), mientras que no se observaron cambios significativos en las demás subpoblaciones de linfocitos T CD8 intrahepáticos ni en la periferia. En conjunto, estos resultados respaldan las observaciones previas derivadas de la comparación transversal entre pacientes con VHB tratados y no tratados en cuanto a la asociación de la replicación del VHB con la expresión de PD-1 en linfocitos intrahepáticos.

A Pacientes que paran NUCs



B Pacientes que inician NUCs



—●— HBV-DNA (UI/mL) —●— HBsAg (UI/mL) ■ ALT (U/L)

Figura 37. Cinética de ALT, carga viral y HBsAg en A) Pacientes que paran NUCs y B) Pacientes que empiezan.

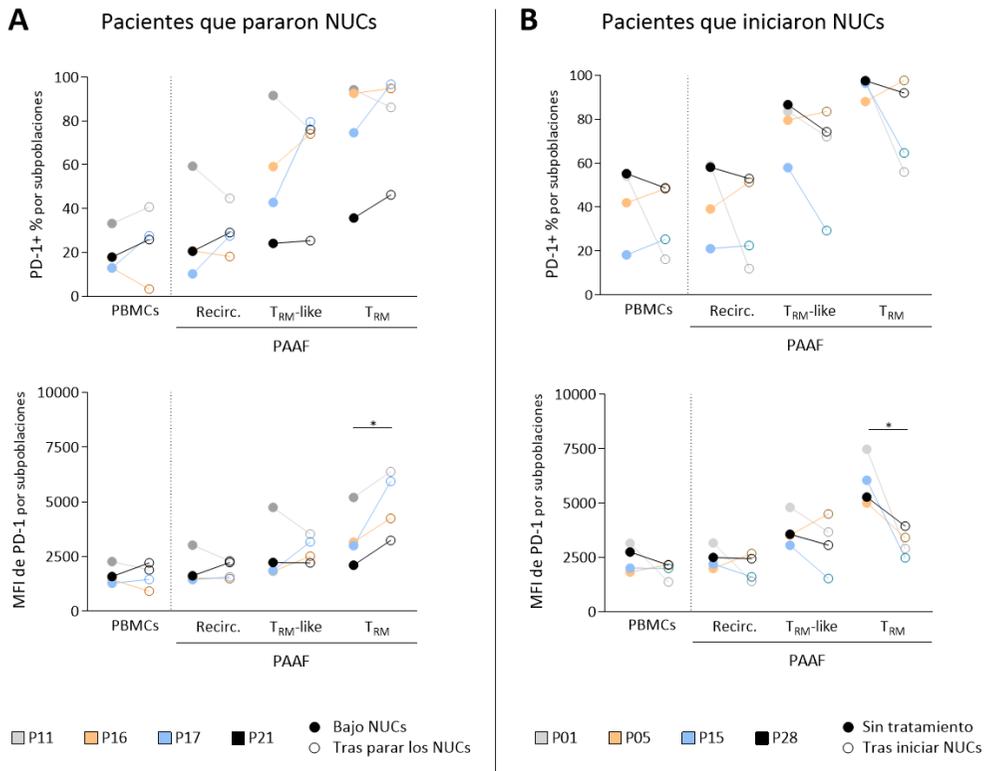


Figura 38. Cambios inmunológicos durante el seguimiento después de suspender o iniciar el tratamiento con AN. Comparación de la expresión de PD-1 (porcentaje e IMF) en células T CD8 en PBMCs y FNAs entre las muestras iniciales y de seguimiento de (A) pacientes bajo terapia y 6 meses después de la interrupción del tratamiento, y (B) pacientes no tratados previamente y 1 año después de iniciar la terapia antiviral. Las células T CD8 de FNAs se estratifican según la expresión de marcadores de residencia. Prueba t de Welch. * $p < 0.05$.

Perfil transcriptómico de célula única en células T CD8 TRM

Para ahondar en la modulación de la expresión de PD-1 en células T CD8 TRM por la replicación viral y su supresión inducida por los NUCs, analizamos los datos disponibles de scRNA-seq de PAAFs de una cohorte independiente de 5 pacientes con hepatitis B crónica antes y después de 24 semanas de terapia con NUCs(89). Identificamos 6 subpoblaciones distintas de células T CD8 que se agruparon de acuerdo con la expresión de una serie de genes “marcadores” seleccionados y

expresados diferencialmente para cada subpoblación (**Figura 39a y 39b**). Asimismo, se identificó una población que representaba el 34% del total de células T CD8 muestreadas en las PAAF y se caracterizaba por la expresión del receptor de quimioquinas CXCR6 (**Figura 39c**). Tal y como se ha descrito recientemente(91), esta población CXCR6+ también expresaba otros marcadores de residencia en tejido como CD69 y CD103 y se caracterizaba por una alta expresión de marcadores tanto de activación (TNFRSF9 [CD137/4-1BB], HLA-DR, IL2RG) como de agotamiento (PDCD1 [PD-1], LAG3, TIGIT, HAVCR2 [TIM3], TOX) (**Figura 39b**). Utilizando el perfil de expresión CD69+CD103+PD-1+, identificamos las células T CD8 TRM y analizamos su distribución en los distintos clústeres de células T CD8. Observamos que el 78% de esta población se solapaba con el clúster CXCR6 en el gráfico UMAP (**Figura 39c y 39d**).

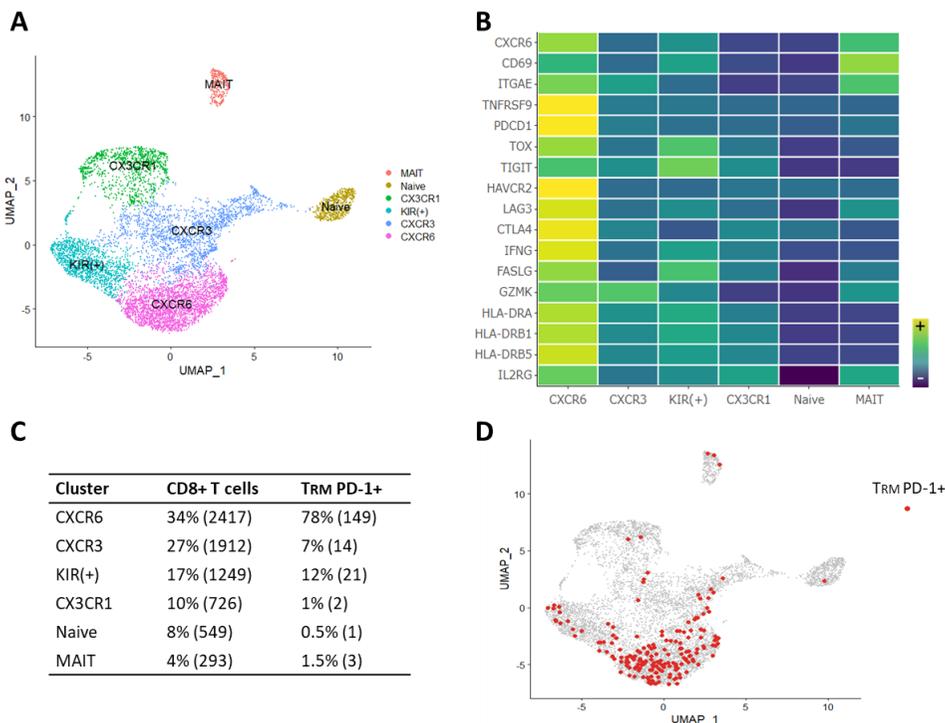


Figura 39. Perfil transcriptómico de células TRM CD8 a nivel de célula única. (A) Representación del diagrama UMAP de los grupos de células T CD8 nombrados según genes marcadores seleccionados. Células T CD8 de los 5 pacientes sometidos a la terapia TAF NUC inicial (3 momentos: inicio, semana 12 y semana 24). (B) Mapa de

calor del nivel de expresión normalizado de los genes específicos de cada tipo de célula en los seis grupos. El color representa el nivel de expresión normalizado para cada gen. (C) Porcentaje (y número) de células T CD8 y TRM CD8 PD-1+ en cada grupo. (D) Diagrama UMAP que muestra las células TRM CD8 PD-1+ destacadas (CD8+CD69+CD103+PD-1+) en puntos rojos.

Finalmente, analizamos el impacto de la supresión viral inducida por los NUCs sobre el fenotipo de las células T CD8 TRM a nivel de célula única. Para ello, visualizamos las células T CD8 TRM en gráficos UMAP que representan la expresión de genes clave relacionados con su función efectora, antes y después de 24 semanas de tratamiento. La supresión viral y la subsiguiente normalización de ALT se asociaron con una disminución del ARN de PD-1 en las células T CD8 TRM a nivel de célula única. Este resultado coincidía con la disminución de la expresión de PD-1 en esta subpoblación a nivel proteico mediante citometría de flujo. El efecto del tratamiento con NUC sobre otros marcadores de agotamiento fue variable: LAG3 y TOX disminuyeron en la mayoría de los pacientes (4 y 3 de 5, respectivamente), mientras que CTLA-4 permaneció prácticamente inalterado (**Figura 40a**). Paralelamente a la mejora general del perfil de agotamiento, también disminuyó la expresión de genes MHC y moléculas efectoras en las células T CD8 TRM (HLA-DR, IFNG, IL2RG y FASL) en la mayoría de los pacientes durante el seguimiento (**Figura 40b**). En resumen, estos datos sugieren que las células T CD8 TRM presentan un perfil agotado a la vez que mantienen algunas funciones efectoras, y que este fenotipo puede ser modulado por los antivirales del VHB.

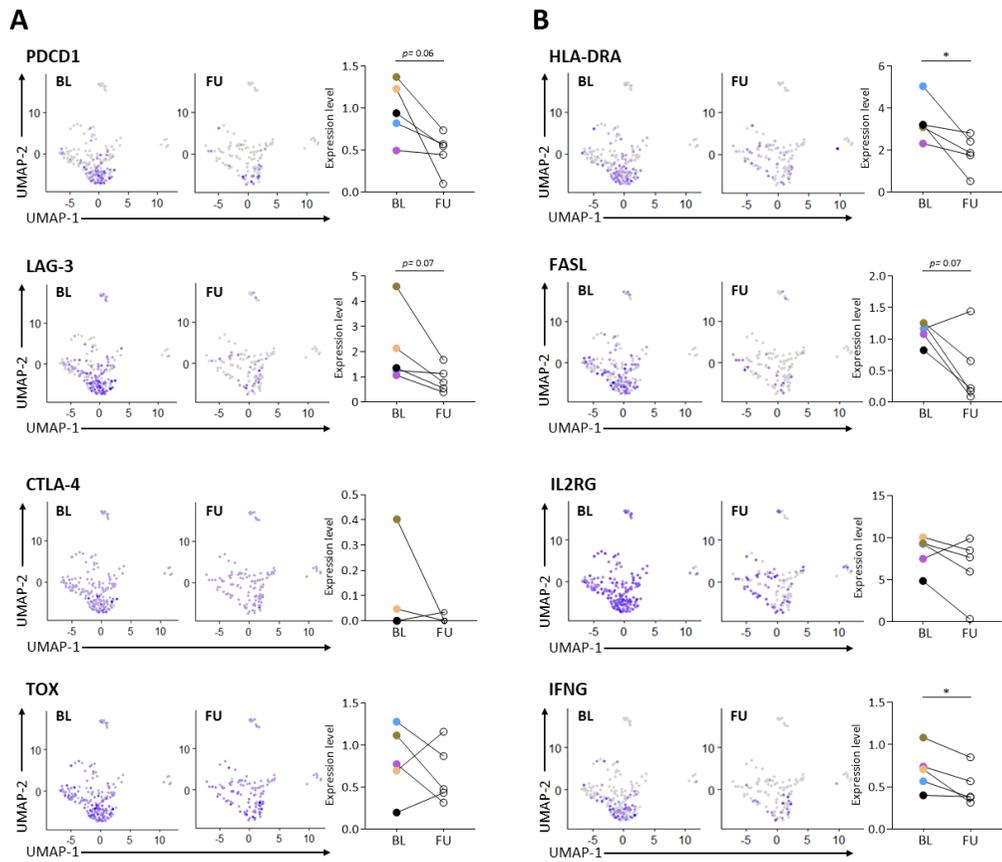


Figura 40. Diagramas UMAP de características y expresión génica de célula única para marcadores de (A) agotamiento y (B) activación antes (inicio, BL, puntos completos) y después de 24 semanas de terapia TAF (seguimiento, FU, puntos abiertos) para cada paciente.

DISCUSIÓN

Este trabajo tiene como objetivo analizar los factores virológicos, clínicos e inmunológicos tanto en la sangre como en el hígado, en el contexto de la hepatitis crónica B y su relación con la patogénesis de la infección por el VHB y la respuesta a los tratamientos. Para ello, se llevaron a cabo dos estudios complementarios cuyo hilo conductor es avanzar en el conocimiento de la patogénesis de la infección por el VHB y la búsqueda de estrategias terapéuticas para alcanzar la curación funcional de la CHB.

Actualmente, no existe un tratamiento curativo contra la CHB. El tratamiento con NA consigue suprimir la replicación viral, pero no eliminar el cccDNA, siendo la tasa de pérdida del HBsAg muy baja. Por este motivo, el objetivo del tratamiento es disminuir la progresión del daño hepático y minimizar el riesgo de desarrollar complicaciones hepáticas.(54,92) Varios nuevos antivirales de acción directa y compuestos inmunomoduladores se encuentran en fase de evaluación clínica con el objetivo de lograr la curación funcional de la CHB con una duración de tratamiento finita.(93) Alternativamente, se ha propuesto que la interrupción de la NA es una estrategia terapéutica prometedora para promover la pérdida de HBsAg o al menos el control viral sostenido fuera de tratamiento en una proporción sustancial de pacientes.(54,94–97)

Para investigar las correlaciones de los resultados tras el cese de NA, analizamos los marcadores hepáticos y séricos de la replicación del VHB en paralelo con la evaluación de la inmunidad de las células T específicas del VHB en una cohorte bien caracterizada de pacientes con HBC HBeAg negativo sometidos a interrupción de NA.

En nuestro estudio, después de una mediana de seguimiento de 2,8 años desde la interrupción del tratamiento, el 81% de los pacientes permanecen sin tratamiento y 8 (30% de la cohorte total) lograron la pérdida de HBsAg. Se observaron recaídas virológicas en la mayoría (78%) de los pacientes, aunque no siempre se asociaron con recaídas bioquímicas. De hecho, la mayoría de los brotes de ALT fueron leves y temporales, lo que condujo a una remisión virológica y bioquímica a largo plazo sin que ningún paciente desarrollara disfunción hepática.

Nuestros resultados concuerdan con los reportados por Berg et al.(96), el único ensayo aleatorizado que comparó la estrategia de mantenimiento de la terapia con NA y retirada de la terapia que incluyó una población comparable en términos de características genotípicas y clínicas.

Aunque los criterios de reintroducción del tratamiento difieren entre los estudios publicados actualmente, nosotros y otros hemos demostrado que los títulos más bajos de HBsAg en el momento de la retirada de NA se asocian con una mayor probabilidad de pérdida de HBsAg.(94,96,98–101) En nuestro estudio, el uso de un valor umbral para el HBsAg de ≤ 1000 UI/ml predijo la pérdida de HBsAg (VPN 94%). Asimismo, los pacientes que alcanzaron la pérdida de HBsAg tenían niveles más bajos de iHBV-DNA al inicio del estudio, que incluían cccDNA, DNA circular relajado y HBV-DNA integrado. De hecho, la integración del ADN-VHB en el genoma del huésped y su contribución a la formación de partículas de HBsAg(102) puede explicar la buena correlación entre el iHBV-ADN y el HBsAg en nuestra cohorte de pacientes HBeAg-negativos suprimidos crónicamente con terapia NA.

No encontramos una asociación entre los niveles basales de cccDNA y el resultado virológico al retirar la NA. Sin embargo, la mayoría de los pacientes que perdieron el HBsAg tenían un ARN iHBV indetectable (83%) y, por tanto, una actividad transcripcional del cccDNA reducida, definida por la relación iHBV-RNA/cccDNA. Esto explicaría, al menos en parte, un resultado más favorable en estos pacientes. De hecho, 10 de 11 (91%) de los pacientes que no lograron la pérdida de HBsAg presentaban un iHBV-RNA detectable, lo que sugiere una actividad transcripcional del cccDNA y un mayor riesgo de rebote viral.

También estudiamos el valor pronóstico de otros marcadores séricos sustitutivos de la actividad transcripcional del cccDNA, como el HBcrAg y el ARN-VHB sérico, que se asociaron a buenos resultados en estudios previos.(103–105) La proporción de pacientes con ARN-VHB o HBcrAg séricos indetectables al inicio del tratamiento en

nuestra cohorte fue mayor entre los pacientes que lograron la pérdida de HBsAg (7/8 y 6/8 pacientes, respectivamente), aunque estos marcadores no mejoraron la capacidad de los niveles de HBsAg para predecir la curación funcional. En este contexto, es posible que el ARN-VHB y el HBcrAg en suero se hayan vuelto indetectables en pacientes HBeAg-negativos sometidos a tratamiento con NA a largo plazo, lo que limita su poder predictivo.(103,104)

Dado que las respuestas inmunitarias adaptativas son importantes para el control de la infección por VHB,(106–108) analizamos la funcionalidad efectora de las células T CD4+ y CD8+ específicas del VHB en el momento de la retirada del tratamiento (situación basal) y a lo largo de la interrupción de la NA. En el momento basal, la proporción de pacientes con células T CD8+ específicas del VHB que expresaban CD107a e IFN γ tras la estimulación in vitro con OLP fue mayor entre los pacientes que posteriormente permanecieron sin tratamiento en comparación con los que necesitaron la reintroducción del tratamiento.

La presencia de células T polifuncionales se ha asociado a un mejor control de la replicación viral.(107,109) En consecuencia, observamos que la frecuencia de células T específicas del VHB coproductoras de IFN γ /TNF α era mayor tanto al inicio como un año después de interrumpir el tratamiento entre los pacientes que permanecieron sin terapia. Sin embargo, en contraste con hallazgos recientes,(110) la retirada del tratamiento no indujo ningún cambio significativo en las respuestas de células T CD8+ y CD4+ específicas del VHB tras 12 o 48 semanas de seguimiento.

Curiosamente, los pacientes que lograron la pérdida de HBsAg presentaron una respuesta de células T efectoras específicas del VHB heterogénea tanto al inicio como durante el seguimiento, sin que existiera un patrón claro que diferenciara a los pacientes que lograron la pérdida de HBsAg tras una reagudización de ALT o no. En consonancia con el concepto de que las células T CD8+ específicas del VHB pueden ejercer un control vírico sin daño hepático,(108) un estudio reciente demostró que las células T específicas del VHB eran en realidad más funcionales en aquellos pacientes sin una reagudización de la ALT tras la interrupción del tratamiento.(111)

No encontramos ningún aumento de las células T específicas del VHB en aquellos pacientes con reagudizaciones hepáticas (ALT >2 o >5 ULN), lo que plantea la posibilidad de que existan mecanismos inmunitarios alternativos que impulsen estos resultados.

En resumen, la interrupción del tratamiento con NA es factible en una elevada proporción de pacientes HBeAg negativos sin cirrosis. Una menor actividad transcripcional del cccDNA tras un tratamiento antiviral prolongado se asocia a un resultado satisfactorio tras la retirada de la NA. Del mismo modo, los niveles séricos bajos de HBsAg (≤ 1000 UI/ml) pueden ofrecer un valor predictivo para evaluar a aquellos pacientes en los que ninguna intervención específica, aparte de la interrupción del tratamiento antiviral y una estrecha vigilancia, sería una estrategia terapéutica válida para lograr la curación funcional. En el caso de los pacientes con un perfil virológico menos favorable, la intensidad de las respuestas de las células T específicas del VHB al inicio del estudio contribuye al resultado de la interrupción del tratamiento. Este último grupo puede responder mejor a las nuevas opciones inmunoterapéuticas finitas tras la interrupción de la NA para aumentar la tasa de pérdida de HBsAg.

Esta mayor funcionalidad de las células T CD8 en los pacientes que se mantienen sin necesidad de retratamiento sugiere que un menor perfil de agotamiento podría contribuir al control de la infección por el virus de la hepatitis B (VHB).

Tras estos resultados, fue de interés profundizar en los factores inmunológicos en esta cohorte para definir bien este perfil de agotamiento de las células T y analizar las diferencias entre los pacientes tratados y los que permanecen sin tratamiento.

Aquí es donde entra el estudio 2. El análisis de PBMC se utiliza ampliamente para examinar las respuestas inmunitarias adaptativas contra el VHB y la eficacia de las inmunoterapias. Sin embargo, cada vez hay más pruebas que sugieren que las respuestas inmunitarias intrahepáticas no siempre se reflejan en la periferia.(112–114) En este contexto, las PAAF son una rica fuente de células inmunitarias y, por lo

tanto, una herramienta útil para monitorizar las respuestas inmunitarias intrahepáticas longitudinalmente.(115–118) Hemos recogido y analizado sangre, biopsias hepáticas y PAAF emparejadas para proporcionar nuevos conocimientos sobre la relación entre los biomarcadores intrahepáticos de la replicación viral y la expresión de células T residentes en el hígado de la diana inmunoterapéutica clave PD-1.

El hígado humano alberga células T CD8 residentes en el tejido (T_{RM}), que pueden separarse de las células T infiltrantes pero no residentes. Las células TRM CD8 hepáticas tienen un fenotipo distinto al de las células T de la sangre periférica o de otros tejidos, que puede estar inducido por el microambiente único del hígado y desempeñar un papel clave en la inmunidad antiviral. En concordancia con informes recientes, observamos que la expresión de PD-1 era sorprendentemente mayor en las células T CD8 intrahepáticas que en las circulantes, en particular en la fracción residente en el tejido (T_{RM} , CD69+ CD103+, and T_{RM} -like, CD69+ CD103).(114,119)

Curiosamente, la expresión de PD-1 en las TRM CD8 se correlacionaba tanto con los niveles intrahepáticos de HBV-DNA y cccDNA, como con los de cirB-RNA. Nuestros datos demuestran que la replicación activa del VHB afecta al microambiente hepático, lo que conduce a una regulación al alza de PD-1 en las células T_{RM} . Dado que muchos de estos pacientes tenían valores de ALT casi normales, la correlación de PD-1 con la actividad de replicación del VHB puede ser una respuesta de retroalimentación para proteger las células T CD8 o indicar una inflamación hepática subclínica. En apoyo de la función de la replicación del VHB en la expresión de PD-1 en el lugar de la infección, observamos una expresión de PD-1 significativamente mayor en las células CD8 T_{RM} (CD69+CD103+) y T_{RM} -like (CD69+CD103-) en pacientes naive en comparación con los pacientes tratados con NUC durante un periodo prolongado.

Aunque hubo una correlación entre el análisis de PBMC y el intrahepático en términos de células T CD8 PD-1+, las diferencias entre pacientes tratados e ingenuos observadas en el compartimento intrahepático no se reflejaron en el análisis de

células T CD8 periféricas. Esto último sugiere que el muestreo sanguíneo no puede representar plenamente el impacto de la supresión viral a largo plazo mediante NUCs sobre esta diana inmunitaria en el compartimento hepático.

Estudios previos han demostrado que la expresión de PD-1 disminuyó en las células T CD8 totales y específicas del VHB de la sangre de pacientes tratados con telbivudina o lamivudina durante 1 año.(120,121) En nuestro estudio, el porcentaje de células T CD8 circulantes PD-1-positivas disminuyó en 3 de 4 pacientes después de iniciar los NUC. Sin embargo, esta disminución fue mayor en las TRM CD8 que en las células T CD8 periféricas. Estos resultados sugieren que la supresión de la replicación viral por NUCs puede contribuir a disminuir la expresión de PD-1 en las células T CD8 que residen en el hígado. Reforzando estos resultados, al analizar a los pacientes sometidos a la interrupción de los NUC (y al rebote del VHB-ADN), se observó un aumento de la expresión de PD-1 tanto en las células T CD8 circulantes como en las intrahepáticas, que fue más pronunciado en las TRM CD8 hepáticas que en sangre.

Para obtener una visión más profunda del papel de los TRM CD8 que expresan PD-1, analizamos los datos longitudinales de scRNA-seq intrahepáticos de 5 pacientes con CHB que iniciaban tratamiento con NUC en una cohorte separada.(122) Nuestra población PD-1+ CD8 T_{RM} caracterizada por citometría de flujo se agrupó junto con una población de células T CD8+ policlonales CXCR6+ residentes en el hígado mediante scRNAseq. Esta última incluía una población residente en el tejido caracterizada por una firma activada a pesar de la presencia de marcadores de agotamiento como PDCD1, LAG3, TIM3, TIGIT y TOX.

Tras 24 semanas de tratamiento con TAF, la expresión de moléculas efectoras (IFNG y FASLG) y marcadores de activación (HLA-DR, IL2RG) en TRM CD8 disminuyó de forma concomitante con los niveles de expresión de PD-1 y LAG3. En este contexto, esta población puede representar una población de células T CD8+ espectadora implicada en la patogénesis de la CHB, sólo presente cuando hay daño hepático (niveles elevados de ALT).

Este fenotipo paradójico de marcadores de activación y niveles elevados de inhibidores de puntos de control inmunitarios favorece el papel dual de PD-1 en las células T CD8 intrahepáticas. Por un lado, un nivel elevado de PD-1^{high} puede ser un marcador de células T específicas del VHB disfuncionales,(86,123) mientras que, por otro lado, puede no impedir la funcionalidad de las células T CD8+ e incluso ser un marcador de activación. De hecho, la función de la PD-1 puede ser diferente en las células T específicas del VHB y en las células T CD8 transeúntes, como propuso Kefalakes H para la hepatitis crónica delta.(124)

Además, las células que expresan PD-1 pueden ser moduladas por células que expresan PD-L1 dentro del hígado. Esto se vería respaldado por un informe reciente que sugiere que la expresión de PD-L1 de las células NK residentes en el hígado puede atenuar la lesión hepática inducida por el hígado.(87) Se ha descrito que una población de células residentes en el hígado hepatotóxicas similares con alta expresión de PD-1 desempeña un papel en otras enfermedades hepáticas.(125)

PD-1 es una de las principales dianas de investigación de las inmunoterapias actuales en la CHB, ya que el bloqueo de la vía del receptor inhibitor de PD-1 revigora el agotamiento de las células T CD8+(126) y mejora el control inmunitario de las infecciones crónicas y el cáncer.(127)

Además, estudios in vitro sugieren que el bloqueo de PD-1 en combinación con CD40L puede ser capaz de recuperar parcialmente las células B disfuncionales específicas del virus en pacientes con CHB.(113,128) Sin embargo, un estudio previo informó de que una alta frecuencia de células T CD8 específicas del VHB funcionalmente agotadas se asociaba tanto con la falta de reactividad ex vivo como con la falta de respuesta al bloqueo de PD-L1.(129) Las células T agotadas expresan múltiples capas de receptores coinhibitorios que pueden limitar las células T cuando se bloquea PD-1, y los defectos epigenéticos y metabólicos subyacentes pueden limitar la capacidad de rescatar estas respuestas. La variabilidad en la expresión de PD-1 en las células T en el lugar de la infección puede determinar la respuesta variable al bloqueo de PD-1 observada en un ensayo clínico temprano.(130)

En conclusión, nuestros datos muestran una asociación entre la expresión de PD-1 en células T residentes en el hígado y la replicación del VHB, junto con una reducción mediante la supresión viral a través de la terapia NUC. Queda por explorar el mecanismo por el cual la carga de VHB se asocia con la expresión global (y no sólo específica de VHB) de PD-1 en células T o si los NUC pudiesen ser capaces de modular la expresión de PD-1. El hecho de que la disponibilidad de PD-1 pueda ser importante para la respuesta a la inmunoterapia anti-PD-1 sugiere que devolver PD-1 a los niveles basales en las células T hepáticas globales (por ejemplo, deteniendo los NUCs) al atacar este eje sería una estrategia interesante para lograr la curación funcional del VHB. Nuestros resultados abordan algunas cuestiones no resueltas relativas a la funcionalidad de subconjuntos heterogéneos de TRM en el hígado de pacientes con CHB para allanar el camino al desarrollo de vacunas e inmunoterapias novedosas.

Caben a destacar algunas limitaciones en estos estudios; en el estudio 1, aunque el umbral de HBsAg no fue un criterio de inclusión, nuestra cohorte se caracteriza por una proporción de pacientes con niveles bajos de HBsAg al inicio, lo que podría haber influido en la mejora de las tasas de éxito en este estudio. No obstante, al excluir a los dos pacientes con qHBsAg más bajo (<1 UI/ml), el análisis estadístico relativo a las diferencias basales y los factores predictivos siguió siendo el mismo. En segundo lugar, debido a la cantidad limitada de tejido hepático, no pudimos evaluar la integración VHB-ADN ni estudiar las respuestas inmunitarias innatas dentro del hígado(131) o la contribución de las células T residentes en el hígado al control viral.(132,133) Por último, no podemos descartar una futura transición a una fase de infección por VHB diferente en pacientes con control virológico, por lo que estos pacientes permanecen bajo seguimiento clínico.

En cuanto al estudio 2; debido al pequeño número de linfocitos aislados de las PAAF (dos pasajes), nos centramos en la respuesta global para evitar sesgos relacionados con un número insuficiente de células T específicas del VHB. Sin embargo, dado el tamaño de esta población y su perfil activado antes del tratamiento, es poco

probable que estas células representen la población específica del VHB. Curiosamente, la expresión de PD-1 se ha asociado con la persistencia de células T específicas del VHB y el control viral tras la interrupción del NUC.(111) Los estudios futuros deberán examinar otros marcadores fenotípicos y transcripcionales de activación y agotamiento.(129,134)

Así pues tenemos que el primer estudio aborda el primer objetivo observando que la funcionalidad de las células T CD8+ y CD4+ específicas del VHB, evaluada por la producción de CD107a e IFN γ , es mayor en pacientes que lograron mantenerse sin tratamiento antiviral. Éste destaca que una mayor presencia de células T polifuncionales se asocia con un mejor control de la replicación viral, lo que subraya la importancia del sistema inmune adquirido en la respuesta tras la suspensión del tratamiento antiviral. En cuanto al segundo objetivo (evaluar la utilidad de la determinación del cccDNA intrahepático como factor predictivo de respuesta tras la interrupción del tratamiento antiviral), el primer estudio también aborda este objetivo mediante el análisis del cccDNA intrahepático en pacientes que interrumpieron el tratamiento con NA. Los resultados muestran que una menor actividad transcripcional del cccDNA, medida por la relación iHBV-RNA/cccDNA, se asocia con un mejor resultado tras la interrupción del tratamiento. Este hallazgo sugiere que aunque la cuantificación del cccDNA intrahepático no mostró ser un factor predictivo, el ratio con el iHBV-RNA podría ser útil para evaluar la probabilidad de éxito tras la suspensión del tratamiento antiviral. En el tercer objetivo (estudiar la relación entre los factores virológicos e inmunológicos en el contexto de la hepatitis B crónica), ambos estudios contribuyen. El primero correlaciona la pérdida de HBsAg y la actividad del cccDNA con la funcionalidad de las células T específicas del VHB, destacando cómo los factores virológicos e inmunológicos están interrelacionados. El segundo, añade a este entendimiento al mostrar cómo la replicación activa del VHB y los niveles de cccDNA intrahepático se correlacionan con la expresión de PD-1 en las células T CD8 hepáticas, proporcionando una visión más detallada de cómo estos factores interactúan en el microambiente hepático.

Los dos últimos objetivos se ven abordados por el estudio 2, donde se compara la expresión de PD-1 en células T CD8 circulantes y intrahepáticas observando que la expresión de PD-1 es significativamente mayor en las células T CD8 residentes en el hígado (TRM) que en las circulantes. Este estudio demuestra que las respuestas inmunitarias intrahepáticas pueden no estar reflejadas en la periferia, subrayando la importancia de analizar ambos compartimentos para una comprensión completa de la inmunidad en la hepatitis B crónica. Además, profundiza en el papel de las células CD8 TRM en el hígado. Observa que estas células tienen una mayor expresión de PD-1 y están implicadas en la respuesta inmunitaria local contra la replicación del VHB. Además, el estudio muestra que la supresión viral mediante NUCs puede reducir la expresión de PD-1 en las células CD8 TRM, sugiriendo que estas células juegan un papel crucial en la inmunidad antiviral y pueden ser un objetivo importante para futuras terapias.

En resumen, ambos estudios contribuyen significativamente a los objetivos de la investigación, proporcionando una comprensión más profunda de la interacción entre factores virológicos e inmunológicos, la importancia del cccDNA intrahepático, las diferencias entre la inmunidad periférica y hepática, y el papel crítico de las células CD8 TRM en la hepatitis B crónica.

CONCLUSIONES

1. La retirada del tratamiento con análogos de nucleós(t)idos es factible en una proporción elevada de pacientes con hepatitis B crónica B HBeAg negativo.
2. Los títulos bajos de HBsAg en el momento de la interrupción del tratamiento identifican a los pacientes que lograrán la cura funcional. Asimismo, estos pacientes presentan una menor actividad transcripcional del cccDNA.
3. La funcionalidad de las células T específicas frente al VHB puede contribuir a un mejor control virológico tras la retirada de los análogos de nucleós(t)idos.
4. La expresión de PD-1 en las células CD8 TRM está asociada con marcadores intrahepáticos de replicación del VHB (iHBV-ADN y cccDNA) y marcadores séricos de la actividad transcripcional del cccDNA (cirB-RNA y HBcrAg).
5. La expresión de PD-1 en las células CD8 TRM es menor en pacientes con supresión viral a largo plazo que en pacientes no tratados, mientras que la retirada del tratamiento tiene el potencial de impulsar la reexpresión de PD-1 en estas células.
6. El análisis de la expresión de PD-1 en PBMC no refleja completamente el impacto del tratamiento antiviral en pacientes con elevaciones leves de ALT, especialmente en aquellos con hepatitis B crónica HBeAg-negativo.
7. Los datos scRNA-seq corroboran el impacto de la supresión viral inducida por el tratamiento en la expresión de PD-1 en poblaciones de células CD8 TRM definidas transcripcionalmente a partir de una cohorte independiente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Magnius L, Mason WS, Taylor J, Kann M, Glebe D, Dény P, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepadnaviridae. *J Gen Virol.* 2020;101(6):571–2.
2. World Health Organization. Hepatitis B. WHO Fact sheets. 2024.
3. Mühlemann B, Jones TC, De Barros Damgaard P, Allentoft ME, Shevnina I, Logvin A, et al. Ancient hepatitis B viruses from the Bronze Age to the Medieval period. *Nature.* 2018;557(7705):418–23.
4. Kocher A, Papac L, Barquera R, Key FM, Spyrou MA, Hübler R, et al. Ten millennia of hepatitis B virus evolution. *Science (80-).* 2021;374(6564).
5. Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med.* 1967;66(5):924–31.
6. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. VIRUS-LIKE PARTICLES IN SERUM OF PATIENTS WITH AUSTRALIA-ANTIGEN-ASSOCIATED HEPATITIS. *Lancet.* 1970;295(7649):695–8.
7. NobelPrize.org. Baruch S. Blumberg – Facts. 2023.
8. Szmunes W, Stevens CE, Harley EJ, Zang EA, Oleszko WR, William DC, et al. Hepatitis B vaccine: demonstration of efficacy in a controlled clinical trial in a high-risk population in the United States. *N Engl J Med.* 1980;303(15):833–41.
9. World Health Organisation. Guideline For The Prevention, Care And Treatment Of Persons With Chronic Hepatitis B Infection. 2015.
10. 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.
11. Cuadrado A, Perelló C, Cabezas J, Llerena S, Llop E, Escudero MD, et al. Update on epidemiology of hepatitis B in a low-endemic European country: There is still much to do. *J Viral Hepat.* 2020;27(11):1261–5.
12. Salleras L, Domínguez A, Bruguera M, Plans P, Costa J, Cardeñosa N, et al. Declining prevalence of hepatitis B virus infection in Catalonia (Spain) 12 years after the introduction of universal vaccination. *Vaccine.* 2007;25(52):8726–31.
13. Prevention C for DC and. Hepatitis B - Chapter 4 - 2020 Yellow Book, Travelers' Health, CDC. CDC Yellow Book. 2020.
14. Gerlich WH, Robinson WS. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell.* 1980;21(3):801–9.

15. Summers J, O'Connell A, Millman I. Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci.* 1975;72(11):4597–601.
16. Robinson WS. The genome of hepatitis B virus. Vol. 31, *Annual review of microbiology.* Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA; 1977. p. 357–77.
17. Mack, DH, Bloch W, Nath N, Sninsky JJ. Hepatitis B virus particles contain a polypeptide encoded by the largest open reading frame: a putative reverse transcriptase. *J Virol.* 1988;62(12):4786–90.
18. Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut.* 2015;64(12):1972–84.
19. Revill PA, Tu T, Netter HJ, Yuen LKW, Locarnini SA, Littlejohn M. The evolution and clinical impact of hepatitis B virus genome diversity. Vol. 17, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology.* Nature Publishing Group; 2020. p. 618–34.
20. Mizokami M, Orito E. Molecular Evolution of Hepatitis Viruses. *Intervirology.* 1999;42(2–3):159–65.
21. Fares MA, Holmes EC. A revised evolutionary history of hepatitis B virus (HBV). *J Mol Evol.* 2002;54(6):807–14.
22. Kramvis A. Genotypes and Genetic Variability of Hepatitis B Virus. *Intervirology.* 2014;57(3–4):141–50.
23. Araujo NM, Teles SA, Spitz N. Comprehensive Analysis of Clinically Significant Hepatitis B Virus Mutations in Relation to Genotype, Subgenotype and Geographic Region. *Front Microbiol.* 2020;11:616023.
24. Liu Z, Zhang Y, Xu M, Li X, Zhang Z. Distribution of hepatitis B virus genotypes and subgenotypes. *Med (United States).* 2021;100(50):E27941.
25. Velkov S, Ott JJ, Protzer U, Michler T. The Global Hepatitis B Virus Genotype Distribution Approximated from Available Genotyping Data. *Genes (Basel).* 2018;9(10).
26. 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;2012(1).
27. Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, Nkongolo S, Kaufman C, Fälth M, et al. Hepatitis B and D Viruses Exploit Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide for Species-Specific Entry into Hepatocytes. *Gastroenterology.* 2014;146(4):1070-1083.e6.
28. Huang H-C, Chen C-C, Chang W-C, Tao M-H, Huang C. Entry of Hepatitis B Virus

- into Immortalized Human Primary Hepatocytes by Clathrin-Dependent Endocytosis. *J Virol.* 2012;86(17):9443–53.
29. Macovei A, Petrareanu C, Lazar C, Florian P, Branza-Nichita N. Regulation of Hepatitis B Virus Infection by Rab5, Rab7, and the Endolysosomal Compartment. *J Virol.* 2013;87(11):6415–27.
 30. Guidotti LG, Martinez V, Lor Y-T, Rogler CE, Chisari' F V. Hepatitis B virus nucleocapsid particles do not cross the hepatocyte nuclear membrane in transgenic mice. *J Virol.* 1994;68(9):5469–75.
 31. Li HC, Huang EY, Su PY, Wu SY, Yang CC, Lin YS, et al. Nuclear Export and Import of Human Hepatitis B Virus Capsid Protein and Particles. *PLOS Pathog.* 2010;6(10):e1001162.
 32. Kimura T, Ohno N, Terada N, Rokuhara A, Matsumoto A, Yagi S, et al. Hepatitis B virus DNA-negative dane particles lack core protein but contain a 22-kDa precore protein without C-terminal arginine-rich domain. *J Biol Chem.* 2005;280(23):21713–9.
 33. Bartenschlager R, Schaller H. Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *EMBO J.* 1992;11(9):3413–20.
 34. Tuttleman JS, Pourcel C, Summers J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell.* 1986;47(3):451–60.
 35. Hu J, Liu K. Complete and incomplete hepatitis B virus particles: Formation, function, and application. Vol. 9, *Viruses*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2017. p. 56.
 36. Bai L, Zhang X, Kozlowski M, Li W, Wu M, Liu J, et al. Extracellular Hepatitis B Virus RNAs Are Heterogeneous in Length and Circulate as Capsid-Antibody Complexes in Addition to Virions in Chronic Hepatitis B Patients. *J Virol.* 2018;92(24).
 37. Gerelsaikhan T, Tavis JE, Bruss V. Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *J Virol.* 1996;70(7):4269–74.
 38. Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res.* 2004;106(2):199–209.
 39. Ning X, Nguyen D, Mentzer L, Adams C, Lee H, Ashley R, et al. Secretion of Genome-Free Hepatitis B Virus – Single Strand Blocking Model for Virion Morphogenesis of Para-retrovirus. *PLOS Pathog.* 2011;7(9):e1002255.
 40. Wang J, Shen T, Huang X, Renuka Kumar G, 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.
41. Tu T, Budzinska MA, Shackel NA, Urban S. HBV DNA integration: Molecular mechanisms and clinical implications. Vol. 9, *Viruses*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2017. p. 75.
 42. Staprans S, Loeb DD, Ganeml D. Mutations affecting hepadnavirus plus-strand DNA synthesis dissociate primer cleavage from translocation and reveal the origin of linear viral DNA. *J Virol.* 1991;65(3):1255–62.
 43. Yang W, Summers J. Infection of Ducklings with Virus Particles Containing Linear Double-Stranded Duck Hepatitis B Virus DNA: Illegitimate Replication and Reversion. *J Virol.* 1998;72(11):8710–7.
 44. Bill CA, Summers J. Genomic DNA double-strand breaks are targets for hepadnaviral DNA integration. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101(30):11135–40.
 45. Wooddell CI, Yuen MF, Chan HLY, Gish RG, Locarnini SA, Chavez D, et al. Rnai-based treatment of chronically infected patients and chimpanzees reveals that integrated hepatitis b virus DNA is a source of hbsag. *Sci Transl Med.* 2017;9(409).
 46. Prifti GM, Moianos D, Zoidis G, Giannakopoulou E, Pardali V, Tavis JE. Recent advances in hepatitis b treatment. Vol. 14, *Pharmaceuticals*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2021. p. 417.
 47. Wong DKH, Tanaka Y, Lai CL, Mizokami M, Fung J, Yuen MF. Hepatitis B virus core-related antigens as markers for monitoring chronic hepatitis B infection. *J Clin Microbiol.* 2007;45(12):3942–7.
 48. Suzuki F, Miyakoshi H, Kobayashi M, Kumada H. Correlation between serum hepatitis B virus core-related antigen and intrahepatic covalently closed circular DNA in chronic hepatitis B patients. *J Med Virol.* 2009;81(1):27–33.
 49. Testoni B, Lebossé F, Scholtes C, Berby F, Miaglia C, Subic M, et al. Serum hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) correlates with covalently closed circular DNA transcriptional activity in chronic hepatitis B patients. *J Hepatol.* 2019;70(4):615–25.
 50. 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.
 51. Cortese MF, Riveiro-Barciela M, Tabernero D, Rodriguez-Algarra F, Palom A, Sopena S, et al. Standardized Hepatitis B Virus RNA Quantification in Untreated and Treated Chronic Patients: a Promising Marker of Infection Follow-Up. *Microbiol Spectr.* 2022;10(2).
 52. Yu G, Chen R, Zheng S, Liu Y, Zou J, Gu Z, et al. A standardized assay for the

- quantitative detection of serum HBV RNA in chronic hepatitis B patients. *Emerg Microbes Infect.* 2022;11(1):775.
53. Fanning GC, Zoulim F, Hou J, Bertoletti A. Therapeutic strategies for hepatitis B virus infection: towards a cure. *Nat Rev Drug Discov* 2019 1811. 2019;18(11):827–44.
 54. European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2017;67(2):370–98.
 55. Chen CJ, Yang HI. Natural history of chronic hepatitis B REVEALed. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26(4):628–38.
 56. Kim GA, Lim YS, An J, Lee D, Shim JH, Kim KM, et al. HBsAg seroclearance after nucleoside analogue therapy in patients with chronic hepatitis B: clinical outcomes and durability. *Gut.* 2014;63(8):1325–32.
 57. Cornberg M, Lok ASF, Terrault NA, Zoulim F, Berg T, Brunetto MR, et al. 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.
 58. Der SD, Zhou A, Williams BRG, Silverman RH. Identification of genes differentially regulated by interferon α , β , or γ using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(26):15623–8.
 59. Sadler AJ, Williams BRG. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* 2008 87. 2008;8(7):559–68.
 60. Tian Y, Chen W ling, James Ou J hsiung. Effects of Interferon- α/β on HBV Replication Determined by Viral Load. *PLOS Pathog.* 2011;7(7):e1002159.
 61. Yuan Y, Yuan H, Yang G, Yun H, Zhao M, Liu Z, et al. IFN- α confers epigenetic regulation of HBV cccDNA minichromosome by modulating GCN5-mediated succinylation of histone H3K79 to clear HBV cccDNA. *Clin Epigenetics.* 2020;12(1):1–16.
 62. Ren H, Huang Y. Effects of pegylated interferon- α based therapies on functional cure and the risk of hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat.* 2019;26(S1):5–31.
 63. Lok ASF. Toward a Functional Cure for Hepatitis B. *Gut Liver.* 2024;18(2).
 64. Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, Wursthorn K, Petersen J, Lau G, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology.* 2004;126(7):1750–8.
 65. Lai CL, Wong D, Ip P, Kopaniszen M, Seto WK, Fung J, et al. Reduction of

- covalently closed circular DNA with long-term nucleos(t)ide analogue treatment in chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 2017;66(2):275–81.
66. Wursthorn K, Lutgehetmann M, Dandri M, Volz T, Buggisch P, Zollner B, et al. Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2006;44(3):675–84.
 67. Lutgehetmann M, Volz T, Quaas A, Zankel M, Fischer C, Dandri M, et al. Sequential Combination Therapy Leads to Biochemical and Histological Improvement Despite Low Ongoing Intrahepatic Hepatitis B virus Replication. <https://doi.org/101177/135965350801300106>. 2008;13(1):57–66.
 68. Ning Q, Han M, Sun Y, Jiang J, Tan D, Hou J, et al. Switching from entecavir to PegIFN alfa-2a in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B: A randomized open-label trial (OSST trial). *J Hepatol.* 2014;61(4):777–84.
 69. Marcellin P, Ahn SH, Ma X, Caruntu FA, Tak WY, Elkashab M, et al. Combination of Tenofovir Disoproxil Fumarate and Peginterferon α -2a Increases Loss of Hepatitis B Surface Antigen in Patients with Chronic Hepatitis B. *Gastroenterology.* 2016;150(1):134-144.e10.
 70. Gill US, Kennedy PTF. The impact of currently licensed therapies on viral and immune responses in chronic hepatitis B: Considerations for future novel therapeutics. Vol. 26, *Journal of Viral Hepatitis*. John Wiley & Sons, Ltd; 2019. p. 4–15.
 71. 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.
 72. Wong GLH, Gane E, Lok ASF. How to achieve functional cure of HBV: Stopping NUCs, adding interferon or new drug development? *J Hepatol.* 2022;76(6):1249–62.
 73. Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari F V. Viral Clearance Without Destruction of Infected Cells During Acute HBV Infection. *Science (80-).* 1999;284(5415):825–9.
 74. Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb 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.
 75. Suresh M, Czerwinski S, Murreddu MG, Kallakury B V., Ramesh A, Gudima SO, et al. Innate and adaptive immunity associated with resolution of acute woodchuck hepatitis virus infection in adult woodchucks. *PLoS Pathog.* 2019;15(12).
 76. Dunn C, Peppia D, Khanna P, Nebbia G, Jones M, Brendish N, et al. Temporal

- analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*. 2009;137(4):1289–300.
77. Shin EC, Sung PS, Park SH. Immune responses and immunopathology in acute and chronic viral hepatitis. *Nat Rev Immunol* 2016 168. 2016;16(8):509–23.
 78. Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs M V., Matzke B, Schreiber R, Chisari F V. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*. 1996;4(1):25–36.
 79. Webster GJM, Reignat S, Maini MK, Whalley SA, Ogg GS, King A, et al. Incubation phase of acute hepatitis B in man: Dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology*. 2000;32(5):1117–24.
 80. Almeida JR, Price DA, Papagno L, Arkoub ZA, Sauce D, Bornstein E, et al. Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J Exp Med*. 2007;204(10):2473–85.
 81. Giadans CG, Ríos DA, Ameigeiras B, Pietrantonio AM, Lucatelli NL, Haddad L, et al. Chronic hepatitis B: The interplay between intrahepatic lymphocyte population and viral antigens in relation to liver damage. *J Viral Hepat*. 2019;26(6):727–37.
 82. Lazarevic I, Banko A, Miljanovic D, Cupic M. Immune-escape hepatitis B virus mutations associated with viral reactivation upon immunosuppression. *Viruses*. 2019;11(9).
 83. Cho H-J, Cheong J-Y, Cho H-J, Cheong J-Y. Role of Immune Cells in Patients with Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci* 2021, Vol 22, Page 8011. 2021;22(15):8011.
 84. Dusheiko G, Agarwal K, Maini MK. New Approaches to Chronic Hepatitis B. *N Engl J Med*. 2023;388(1):55–69.
 85. Johnson RMG, Wen T, Dong H. Bidirectional signals of PD-L1 in T cells that fraternize with cancer cells. *Nat Immunol* 2020 214. 2020;21(4):365–6.
 86. 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.
 87. Zhou J, Peng H, Li K, Qu K, Wang B, Wu Y, et al. Liver-Resident NK Cells Control Antiviral Activity of Hepatic T Cells via the PD-1-PD-L1 Axis. *Immunity*. 2019;50(2):403–417.e4.
 88. Gill US, Pallett LJ, Thomas N, Burton AR, Patel AA, Yona S, et al. Fine needle aspirates comprehensively sample intrahepatic immunity. *Gut*. 2019;68(8):1493–503.

89. Wooddell CI, Yuen MF, Chan HLY, Gish RG, Locarnini SA, Chavez D, et al. Rnai-based treatment of chronically infected patients and chimpanzees reveals that integrated hepatitis b virus DNA is a source of hbsag. *Sci Transl Med.* 2017;9(409).
90. Hao Y, Hao S, Andersen-Nissen E, Mauck WM, Zheng S, Butler A, et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell.* 2021;184(13):3573-3587.e29.
91. Dudek M, Pfister D, Donakonda S, Filpe P, Schneider A, Laschinger M, et al. Auto-aggressive CXCR6+ CD8 T cells cause liver immune pathology in NASH. *Nature.* 2021;592(7854):444–9.
92. Marcellin P, Wong DK, Sievert W, Buggisch P, Petersen J, Flisiak R, et al. Ten-year efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate treatment for chronic hepatitis B virus infection. *Liver Int.* 2019;39(10):1868–75.
93. Cornberg M, Lok ASF, Terrault NA, Zoulim F, Berg T, Brunetto MR, et al. 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.
94. Hadziyannis SJ, Sevastianos V, Rapti I, Vassilopoulos D, Hadziyannis E. Sustained responses and loss of HBsAg in HBeAg-negative patients with chronic hepatitis B who stop long-term treatment with adefovir. *Gastroenterology.* 2012;143(3):629-636.e1.
95. Papatheodoridis G V., Manolakopoulos S, Su TH, Siakavellas S, Liu CJ, Kourikou A, et al. Significance of definitions of relapse after discontinuation of oral antivirals in HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2018;68(2):415–24.
96. Berg T, Simon KG, Mauss S, Schott E, Heyne R, Klass DM, et al. Long-term response after stopping tenofovir disoproxil fumarate in non-cirrhotic HBeAg-negative patients - FINITE study. *J Hepatol.* 2017;67(5):918–24.
97. Lampertico P, Berg T. Less can be more: A finite treatment approach for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2018;68(2):397–400.
98. Cao J, Chi H, Yu T, Li Z, Hansen BE, Zhang X, et al. Off-treatment hepatitis B virus (HBV) DNA levels and the prediction of relapse after discontinuation of nucleos(t)ide analogue therapy in patients with chronic hepatitis B: A prospective stop study. *J Infect Dis.* 2017;215(4):581–9.
99. Papatheodoridis G, Rigopoulou E, Papatheodoridi M, Zachou K, Xourafas V, Gatselis N, et al. DARING-B: discontinuation of effective entecavir or tenofovir therapy in non-cirrhotic HBeAg-negative chronic hepatitis B patients: a prospective Greek study. *J Hepatol.* 2017;66(1):S26.

100. Jeng WJ, Chen YC, Chien RN, Sheen IS, Liaw YF. Incidence and predictors of hepatitis B surface antigen seroclearance after cessation of nucleos(t)ide analogue therapy in hepatitis B e antigen–negative chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2018;68(2):425–34.
101. Chen CH, Lu SN, Hung CH, Wang J-HH, Hu T-HH, Changchien CS, et al. The role of hepatitis B surface antigen quantification in predicting HBsAg loss and HBV relapse after discontinuation of lamivudine treatment. *J Hepatol*. 2014;61(3):515–22.
102. Wooddell CI, Yuen MF, Chan HLY, Gish RG, Locarnini SA, Chavez D, et al. Rnai-based treatment of chronically infected patients and chimpanzees reveals that integrated hepatitis b virus DNA is a source of hbsag. *Sci Transl Med*. 2017;9(409):1–12.
103. Papatheodoridi M, Hadziyannis E, Berby F, Zachou K, Testoni B, Rigopoulou E, et al. Predictors of hepatitis B surface antigen loss, relapse and retreatment after discontinuation of effective oral antiviral therapy in noncirrhotic HBeAg-negative chronic hepatitis B. *J Viral Hepat*. 2019;27(2):118–26.
104. Carey I, Gersch J, Wang B, Moigboi C, Kuhns M, Cloherty G, et al. Pre-genomic HBV RNA and HBcrAg predict outcomes in HBeAg negative chronic hepatitis B patients suppressed on nucleos(t)ide analogue therapy. *Hepatology*. 2019;0–1.
105. Wang J, Shen T, Huang X, Renuka Kumar G, 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.
106. Maini MK, Pallett LJ. Defective T-cell immunity in hepatitis B virus infection: why therapeutic vaccination needs a helping hand. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2018;3(3):192–202.
107. Boni C, Laccabue D, Lampertico P, Giuberti T, Vigan M, Schivazappa S, et al. Restored function of HBV-specific T cells after long-term effective therapy with nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology*. 2012;143(4):963-973.e9.
108. Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, et al. The role of virus-specific CD8+ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med*. 2000;191(8):1269–80.
109. Almeida JR, Price DA, Papagno L, Arkoub ZA, Sauce D, Bornstein E, et al. Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J Exp Med*. 2007;204(10):2473–85.
110. Rinker F, Zimmer CL, Siederdisen CHZ, Manns MP, Kraft ARM, Wedemeyer

- H, et al. Hepatitis B virus-specific T cell responses after stopping nucleos(t)ide analogue therapy in HBeAg negative chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 2018;69(3):584–93.
111. Rivino L, Bert N Le, Gill US, Kunasegaran K, Cheng Y, Tan DZMM, et al. Hepatitis B virus – specific T cells associate with viral control upon nucleos (t) ide-analogue therapy discontinuation. *J Clin Invest.* 2018;128(4):1–14.
 112. Gill US, Pallett LJ, Kennedy PTF, Maini MK. Liver sampling: a vital window into HBV pathogenesis on the path to functional cure. *Gut.* 2018;67:gutjnl-2017-314873.
 113. Burton AR, Pallett LJ, McCoy LE, Suveizdyte K, Amin OE, Swadling L, et al. Circulating and intrahepatic antiviral B cells are defective in hepatitis B. *J Clin Invest.* 2018;128(10):4588–603.
 114. Pallett LJ, Davies J, Colbeck EJ, Robertson F, Hansi N, Easom NJW, et al. IL-2(high) tissue-resident T cells in the human liver: Sentinels for hepatotropic infection. *J Exp Med.* 2017;214(6):1567–80.
 115. Gill US, Pallett LJ, Thomas N, Burton AR, Patel AA, Yona S, et al. Fine needle aspirates comprehensively sample intrahepatic immunity. *Gut.* 2019;68(8):1493–503.
 116. Pembroke T, Gallimore A, Godkin A. Tracking the kinetics of intrahepatic immune responses by repeated fine needle aspiration of the liver. *J Immunol Methods.* 2015;424:131–5.
 117. Sprengers D, Van Der Molen RG, Kusters JG, Kwekkeboom J, Van Der Laan LJW, Niesters HGM, et al. Flow cytometry of fine-needle-aspiration biopsies: a new method to monitor the intrahepatic immunological environment in chronic viral hepatitis. *J Viral Hepat.* 2005;12(5):507–12.
 118. Genshaft AS, Subudhi S, Keo A, Vasquez JDS, Conceição-Neto N, Mahamed D, et al. Clinical implementation of single-cell RNA sequencing using liver fine needle aspirate tissue sampling and centralized processing captures compartment specific immuno-diversity. *bioRxiv.* 2021;2021.11.30.470634.
 119. Fisicaro P, Valdatta C, Massari M, Loggi E, Biasini E, Sacchelli L, et al. Antiviral Intrahepatic T-Cell Responses Can Be Restored by Blocking Programmed Death-1 Pathway in Chronic Hepatitis B. *Gastroenterology.* 2010;138(2):682-693.e4.
 120. Hou F-Q, Wu X-J, Wang Y, Chen J, Liu Y-Z, Ren Y-Y, et al. Rapid downregulation of programmed death-1 and interferon- γ -inducible protein-10 expression is associated with favourable outcome during antiviral treatment of chronic hepatitis B. *J Viral Hepat.* 2013;20 Suppl 1(SUPPL.1):18–26.
 121. Evans A, Riva A, Cooksley H, Phillips S, Puranik S, Nathwani A, et al.

- Programmed death 1 expression during antiviral treatment of chronic hepatitis B: Impact of hepatitis B e-antigen seroconversion. *Hepatology*. 2008;48(3):759–69.
122. Nkongolo S, Mahamed D, Kuiper A, Sanchez Vasquez JD, Kim SC, Mehrotra A, et al. Longitudinal liver sampling in patients with chronic hepatitis B starting antiviral therapy reveals hepatotoxic CD8+ T cells. *J Clin Invest*. 2023;133(1).
 123. Boni C, Fiscaro P, Valdatta C, Amadei B, Di Vincenzo P, Giuberti T, et al. Characterization of Hepatitis B Virus (HBV)-Specific T-Cell Dysfunction in Chronic HBV Infection. *J Virol*. 2007;81(8):4215–25.
 124. Kefalakes H, Horgan XJ, Jung MK, Amanakis G, Kapuria D, Bolte FJ, et al. Liver-Resident Bystander CD8+ T Cells Contribute to Liver Disease Pathogenesis in Chronic Hepatitis D Virus Infection. *Gastroenterology*. 2021;161(5):1567-1583.e9.
 125. Dudek M, Pfister D, Donakonda S, Filpe P, Schneider A, Laschinger M, et al. Auto-aggressive CXCR6+ CD8 T cells cause liver immune pathology in NASH. *Nat* 2021 5927854. 2021;592(7854):444–9.
 126. Boni C, Fiscaro P, Valdatta C, Amadei B, Di Vincenzo P, Giuberti T, et al. Characterization of Hepatitis B Virus (HBV)-Specific T-Cell Dysfunction in Chronic HBV Infection. *J Virol*. 2007;81(8):4215–25.
 127. McLane LM, Abdel-Hakeem MS, Wherry EJ. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. Vol. 37, *Annual Review of Immunology*. Annual Reviews; 2019. p. 457–95.
 128. Salimzadeh L, Le Bert N, Dutertre CA, Gill US, Newell EW, Frey C, et al. PD-1 blockade partially recovers dysfunctional virus-specific B cells in chronic hepatitis B infection. *J Clin Invest*. 2018;128(10):4573–87.
 129. Ferrando-Martinez S, Snell Bennett A, Lino E, Gehring AJ, Feld J, Janssen HLA, et al. Functional Exhaustion of HBV-Specific CD8 T Cells Impedes PD-L1 Blockade Efficacy in Chronic HBV Infection. *Front Immunol*. 2021;12.
 130. 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.
 131. Lebossé F, Testoni B, Fresquet J, Facchetti F, Galmozzi E, Fournier M, et al. Intrahepatic innate immune response pathways are downregulated in untreated chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 2017;66(5):897–909.
 132. Gill US, Pallett LJ, Kennedy PTF, Maini MK. Liver sampling: a vital window into HBV pathogenesis on the path to functional cure. *Gut*. 2018;67:767–775.

133. Kim JH, Han JW, Choi YJ, Rha MS, Koh JY, Kim KH, et al. Functions of human liver CD69+CD103-CD8+ T cells depend on HIF-2 α activity in healthy and pathologic livers. *J Hepatol.* 2020;72(6):1170–81.
134. Heim K, Binder B, Sagar, Wieland D, Hensel N, Llewellyn-Lacey S, et al. TOX defines the degree of CD8+ T cell dysfunction in distinct phases of chronic HBV infection. *Gut.* 2021;70(8):1550–60.

ANEXO



Viral and immune factors associated with successful treatment withdrawal in HBeAg-negative chronic hepatitis B patients

Mireia García-López^{1,†}, Sabela Lens^{1,†}, Laura J. Pallett², Barbara Testoni³, Sergio Rodríguez-Tajes¹, Zoe Mariño¹, Concepción Bartres¹, Ester García-Pras¹, Thais Leonel¹, Elena Perpiñán¹, Juan José Lozano⁴, Francisco Rodríguez-Frías⁵, George Koutsoudakis¹, Fabien Zoulim³, Mala K. Maini², Xavier Forns^{1,*}, Sofía Pérez-del-Pulgar^{1,*}

¹Liver Unit, Hospital Clínic, University of Barcelona, IDIBAPS, CIBERehd, Barcelona, Spain; ²Division of Infection and Immunity, Institute of Immunity and Transplantation, University College London, London, UK; ³INSERM U1052-Cancer Research Center of Lyon (CRCL), University of Lyon, UMR_S1052, CRCL, Lyon, France; ⁴Bioinformatics Platform, CIBERehd, Barcelona, Spain; ⁵Liver Pathology Unit, Department of Biochemistry and Microbiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, CIBERehd, Barcelona, Spain

Background & Aims: Factors associated with a successful outcome upon nucleos(t)ide analogue (NA) treatment withdrawal in HBeAg-negative chronic hepatitis B (CHB) patients have yet to be clarified. The objective of this study was to analyse the HBV-specific T cell response, in parallel with peripheral and intrahepatic viral parameters, in patients undergoing NA discontinuation.

Methods: Twenty-seven patients without cirrhosis with HBeAg-negative CHB with complete viral suppression (>3 years) were studied prospectively. Intrahepatic HBV-DNA (iHBV-DNA), intrahepatic HBV-RNA (iHBV-RNA), and covalently closed circular DNA (cccDNA) were quantified at baseline. Additionally, serum markers (HBV-DNA, HBsAg, HBV core-related antigen [HBcrAg] and HBV-RNA) and HBV-specific T cell responses were analysed at baseline and longitudinally throughout follow-up.

Results: After a median follow-up of 34 months, 22/27 patients (82%) remained off-therapy, of whom 8 patients (30% of the total cohort) lost HBsAg. Baseline HBsAg significantly correlated with iHBV-DNA and iHBV-RNA, and these parameters were lower in patients who lost HBsAg. All patients had similar levels of detectable cccDNA regardless of their clinical outcome. Patients achieving functional cure had baseline HBsAg levels $\leq 1,000$ IU/ml. Similarly, an increased frequency of functional HBV-specific CD8⁺ T cells at baseline was associated with sustained viral control off treatment. These HBV-specific T cell responses persisted, but did not increase, after treatment withdrawal. A similar, but not statistically significant trend, was observed for HBV-specific CD4⁺ T cell responses.

Conclusions: Decreased cccDNA transcription and low HBsAg levels are associated with HBsAg loss upon NA discontinuation in

patients with HBeAg-negative CHB. The presence of functional HBV-specific T cells at baseline are associated with a successful outcome after treatment withdrawal.

Lay summary: Nucleos(t)ide analogue therapy can be discontinued in a high proportion of chronic hepatitis B patients without cirrhosis. The strength of HBV-specific immune T cell responses may contribute to successful viral control after antiviral treatment interruption. Our comprehensive study provides in-depth data on virological and immunological factors than can help guide individualised therapy in patients with chronic hepatitis B.

© 2020 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introduction

Functional cure, defined as the loss of HBsAg, with or without the development of anti-HBs antibodies, is regarded as the optimal treatment endpoint in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B (CHB). However, despite more than 10 years on nucleos(t)ide analogue (NA) therapy, this endpoint is only achieved in 1–5% of patients.^{1,2} The latest EASL guidelines propose NA discontinuation in selected HBeAg-negative patients without cirrhosis who have achieved long-term (>3 years) virological suppression on treatment, if close clinical monitoring can be guaranteed after NA discontinuation.² These recommendations are based on data from studies evaluating treatment withdrawal in Caucasian HBeAg-negative patients with complete viral suppression on NA therapy^{3,4} where the rate of HBsAg loss after NA discontinuation reached 20%. Importantly, a high proportion of these patients achieved sustained virological remission (low HBV-DNA levels and normal alanine aminotransferase [ALT] levels). Despite this recommendation, some clinicians may be reluctant to offer NA withdrawal to their patients owing to the high probability of viral rebound after stopping antiviral therapy (serum HBV-DNA >2,000 IU/ml in about 55–70%).⁵ However, viral relapses are not always associated with ALT flares and, when transitory, may lead to long-term virological remission. In addition, an accurate definition of relapse and criteria for NA re-introduction are needed to prevent premature re-treatment that may impair the possibility of remission or functional cure.⁶

Keywords: Hepatitis B virus; Chronic hepatitis B; Nucleos(t)ide analogue; Antiviral therapy discontinuation; HBsAg; HBcrAg; Covalently closed circular DNA; HBV-RNA; Immune response; HBV-Specific T cells.

Received 7 May 2020; received in revised form 28 October 2020; accepted 16 November 2020; available online 2 December 2020

* Corresponding authors. Address: Liver Unit, Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona, Spain. Tel.: +34-2275400, ext. 2093; Fax: +34-933129405. (X. Forns) (S. Pérez-del-Pulgar).

E-mail addresses: xforns@clinic.cat (X. Forns), sofiapp@clinic.cat (S. Pérez-del-Pulgar).

[†] These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.11.043>



Table 1. Characteristics of the entire cohort at baseline and during follow-up according to clinical outcome.

Variables	ALL patients (n = 27)	HBsAg loss (n = 8)	Virological control (n = 14)	Treatment re-introduction (n = 5)	p value
Sex (male)	21 (78%)	7 (87%)	10 (71%)	4 (80%)	0.67
Age (years)	56 (45–61)	60 (57–63)	51 (43–56)	46 (44–65)	0.17
Duration of NA therapy (years)	8 (7–13)	13 (9–15)	8 (7–12)	8 (7–11)	0.18
NA therapy					
Tenofovir	20 (74%)	8 (100%)	9 (64%)	3 (60%)	0.13
Entecavir	7 (26%)	0	5 (36%)	2 (40%)	
Baseline elastography (kPa)	4.8 (4.0–5.5)	4.3 (3.3–5.1)	4.8 (3.9–5.3)	4.8 (3.9–5.3)	0.28
Last elastography (kPa; n = 19)	5.3 (4.3–6.1)	4.4 (3.7–5.4)	5.7 (4.2–6.7)	5.3 (4.9–5.7)	0.19
Fibrosis stage					
F0–1	25 (93%)	7 (88%)	13 (93%)	5 (100%)	0.70
F2	2 (7%)	1 (12%)	1 (7%)	0	
HBV genotype					
A	3 (11%)	0	2 (14%)	1 (20%)	0.31
C	1 (4%)	0	1 (7%)	0	
D	21 (78%)	6 (75%)	11 (78%)	4 (80%)	
F	2 (7%)	2 (25%)	0	0	
Baseline ALT (IU/L)	23 (17–26)	21 (17–26)	23 (19–28)	16 (15–27)	0.45
ALT peak ≥ 2 ULN	17 (63%)	3 (36%)	9 (64%)	5 (100%)	0.07
ALT peak ≥ 5 ULN	8 (29%)	3 (36%)	2 (14%)	3 (60%)	0.13
ALT peak ≥ 10 ULN	6 (22%)	3 (36%)	1 (7%)	2 (40%)	0.15
Last ALT (IU/L)	22 (16–30)	17 (16–20)	28 (23–33)	27 (22–36)	0.004
HBV-DNA peak 2,000 IU/ml	21 (78%)	3 (37%)	13 (93%)	5 (100%)	0.005
HBV-DNA peak ≥ 20,000 IU/ml	12 (44%)	2 (25%)	5 (36%)	5 (100%)	0.019
Serum virological markers					
Baseline qHBsAg (IU/ml)	1,310 (556–3,031)	70 (13–507)	2,020 (1,089–4,361)	2,122 (933–3,158)	0.002
≤ 2,000 IU/ml	17 (63%)	8 (100%)	7 (50%)	2 (40%)	0.03
≤ 1,000 IU/ml	11 (41%)	7 (87%)	3 (21%)	1 (20%)	0.006
≤ 100 IU/ml	5 (18%)	5 (63%)	0	0	0.001
Last qHBsAg (IU/ml)	372 (0–1,689)	0	1,368 (175–2,749)	661 (350–1,953)	0.82
≤ 2,000 IU/ml	21 (28%)	n.a.	9 (64%)	4 (80%)	0.48
≤ 1,000 IU/ml	17 (63%)	n.a.	6 (43%)	3 (60%)	0.62
≤ 100 IU/ml	10 (37%)	n.a.	2 (14%)	0	0.53
Delta qHBsAg (Log IU/ml)	-0.22 (-0.58–0.16)	n.a.	-0.22 (-0.66–0.14)	-0.39 (-0.51–0.17)	0.92
Baseline HBcrAg (positive)	13 (48%)	2 (25%)	8 (57%)	3 (60%)	0.29
Baseline HBcrAg (log U/ml)*	3.2 (2.8–5.1)	3.9 (2.8–5.1)	3.0 (2.8–3.3)	3.0 (2.8–3.4)	0.97
Last HBcrAg (positive)	8 (29%)	1 (12%)	5 (36%)	2 (40%)	0.53
Baseline HBV-RNA (positive)	11 (41%)	1 (12%)	7 (50%)	3 (60%)	0.14
Baseline HBV-RNA (copies/ml)*	136 (96–842)	n.a.	101 (96–477)	840 (603–922)	0.07
Last HBV-RNA (positive)	10 (37%)	0	7 (50%)	3 (60%)	0.53
Liver virological markers at baseline					
iHBV-DNA (copies/cell)	0.36 (0.14–1.02)	0.04 (0.02–0.13)	0.58 (0.25–1.15)	0.91 (0.53–1.33)	0.001
cccDNA (copies/cell)	0.09 (0.035–0.36)	0.04 (0.01–0.40)	0.11 (0.06–0.36)	0.05 (0.02–0.29)	0.32
iHBV-RNA (positive) [†]	12/18 (67%)	2/7 (14%)	7/8 (87%)	3/3 (100%)	0.009
iHBV-RNA (copies/25 ng total RNA)* [†]	203 (37–4,417)	n.a.	655 (28–4,417)	123 (29–184)	0.15
iHBV-RNA/cccDNA* [†]	3,834 (76–34,780)	n.a.	5,642 (76–34,780)	3,835 (3,174–28,996)	0.72

Categorical and quantitative data are expressed as n (%) and median (IQR), respectively. Groups were compared using the Chi-square test for categorical variables and the ANOVA test for continuous variables.

ALT, alanine aminotransferase; cccDNA, covalently closed circular DNA; iHBV-DNA, intrahepatic HBV-DNA; iHBV-RNA, intrahepatic HBV-RNA; n.a., not applicable; ULN, upper limit of normal.

*Analysis of median (IQR) values for HBcrAg, HBV-RNA, iHBV-RNA, and iHBV-RNA/cccDNA was performed only considering patients with positive results.

[†]Data available for 18 patients. One patient in the HBsAg loss group had detectable iHBV-RNA <LLQ.

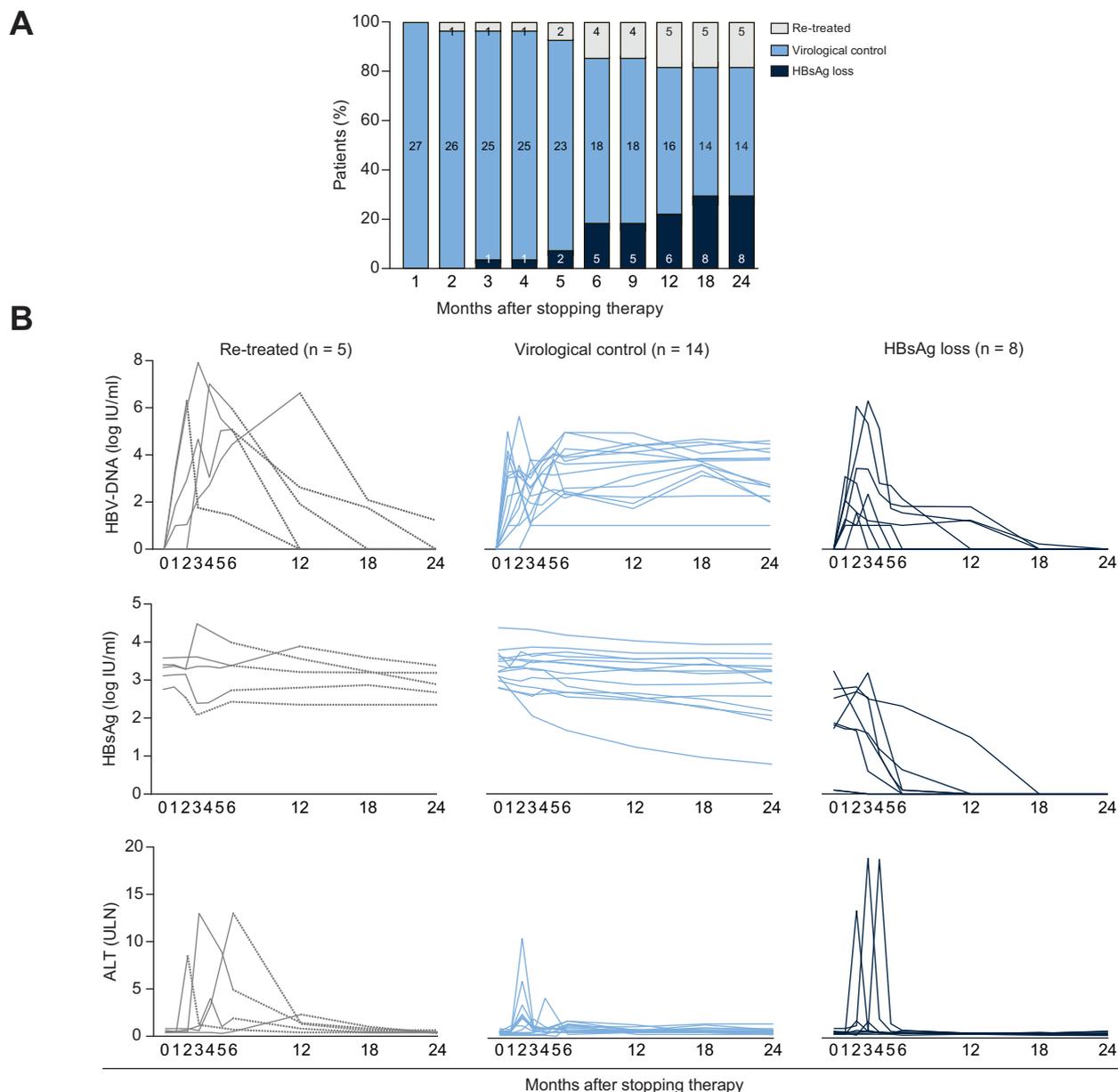


Fig. 1. Patient outcome and viral kinetics after NA discontinuation. (A) Patient outcome after NA discontinuation. Bars represent the percentage of patients with HBsAg loss, virological control, or re-treatment. The number of patients is shown within the bars. (B) HBV-DNA, HBsAg, and ALT kinetics. For re-treated patients, the dotted line represents the evolution after treatment re-introduction. ALT, alanine aminotransferase; NA, nucleos(t)ide analogue.

Several studies have suggested that patients with lower circulating HBsAg at the time of NA withdrawal have an increased probability of remaining off-therapy or achieving HBsAg loss^{4,7} although other studies have failed to find an association.^{8,9} The evaluation of the prognostic value of other serum markers of HBV replication such as HBV core-related (HBcrAg) and HBV-RNA may be of interest, but data are scarce.^{7,10,11} To date, no study has evaluated the significance of HBV replication markers within the liver, such as total intrahepatic HBV-DNA (iHBV-DNA), covalently-closed circular DNA (cccDNA) or intrahepatic HBV-RNA (iHBV-RNA) in relation to NA therapy discontinuation.

As in naturally-resolving HBV infection,¹² the HBV-specific immune response plays an important role in determining the

outcome of viral control after NA discontinuation. A recent study has shown that patients with a higher frequency of HBV-specific T cell responses are less likely to develop ALT flares when stopping NAs.¹³ One study has also shown a tendency for HBV-specific T cell responses to increase after NA cessation, that can be further enhanced by PD-1 blockade.¹⁴ To our knowledge, this is the first study to evaluate a number of viral and immunological parameters simultaneously. Therefore, our objective was to assess the proportion of patients with HBeAg-negative CHB achieving HBsAg loss or virological control after NA interruption, and to identify potential biomarkers associated with predicting outcome. For this purpose, we longitudinally analysed HBV-specific T cell responses in parallel with peripheral and

intrahepatic virological markers after NA discontinuation in a well-characterised cohort of HBeAg-negative CHB patients.

Materials and methods

Patients

This is a prospective single-centre study involving 27 patients with HBeAg-negative CHB with complete virological control (undetectable HBV-DNA and normal ALT levels) for at least 3 years under NA therapy (entecavir or tenofovir). Exclusion criteria included advanced liver disease (F3–F4 according to METAVIR by liver biopsy or previous diagnosis of cirrhosis), immunosuppressive therapy, hepatocellular carcinoma, or coinfection with HIV, HCV, or HDV.

The study was approved by the Hospital Clinic institutional Ethics Committee and was conducted in compliance with the principles of the Declaration of Helsinki, Good Clinical Practice guidelines, and local regulatory requirements. All patients provided written informed consent before screening.

Study design

All patients underwent a liver biopsy before treatment withdrawal (baseline). Serum samples were collected at baseline and at 3, 6, 12, 18, and 24 months during a follow-up period. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were also obtained at baseline, 3, and 12 months after NA discontinuation. Assessments after treatment interruption included clinical evaluation, standard laboratory testing for liver function, HBsAg, and HBV-DNA monthly during the first 6 months and then every 3–4 months until the 24-month follow-up.

Re-introduction criteria and study endpoints

Criteria for re-introduction of antiviral treatment during follow-up were as follows:

- Two consecutive ALT measurements >10 upper limit of normal (ULN) regardless of the HBV-DNA level.
- ALT >5–10 ULN and HBV-DNA >2,000 IU/ml persisting for ≥28 days (4 weeks).
- ALT >2–5 ULN and HBV-DNA >2,000 IU/ml persisting for ≥6 months.
- Need for immunosuppressive treatment.

The primary efficacy endpoint was the proportion of patients achieving HBsAg loss (functional cure) or virological control (patients who remained off-therapy being HBsAg positive) after treatment withdrawal. Secondary endpoints included the

analysis of virological and immunological markers as potential predictors of response.

Full materials and methods regarding the assessment of virological parameters, immune responses and statistical analysis are available in the [Supplementary data](#). Further details regarding the materials used can be found in the CTAT table.

Results

Patient characteristics and outcome after NA therapy discontinuation

The overall demographic and baseline clinical characteristics of the study cohort are shown in [Table 1](#), with the individual patient data in [Table S1](#). Within the cohort studied, 93% were Caucasian and 78% of patients were male with a median age of 56 years (IQR 45–61). In line with the geographical location of this study, the majority of patients (78%) were infected with HBV genotype D. All patients had previously been treated with NA therapy for a median period of 8 years; with 20 (74%) patients receiving tenofovir and 7 (26%) entecavir. Of note, HBsAg levels remained stable before NA treatment discontinuation in all patients ([Supplementary Fig. S1](#)). All patients had normal ALT values at baseline (<40 IU/L), with no patient presenting with advanced fibrosis (F3–F4) according to liver stiffness and histological assessment.

After a median follow-up of 34 (26–37) months, 22 patients (82% of the total cohort) remained off-therapy, with 8 individuals (representing 30% of the total cohort) achieving functional cure, as defined by the loss of HBsAg ([Fig. 1A](#) and [Table 1](#)). Notably, the median time to HBsAg clearance in these patients was 25 (22–33) weeks, with 5 of these 8 patients developing detectable anti-HBs antibody. At the end of the follow-up period, among those patients who remained off-therapy but were positive for HBsAg (n = 14, 52%), considered ‘virological controllers’, 5 met the criteria for HBeAg-negative chronic infection with normal ALT values and HBV-DNA <2,000 IU/ml. The remaining patients were in a ‘grey zone’; 7 had HBV-DNA levels >2,000 IU/ml with normal ALT values, with a further 2 patients presenting with elevated ALT levels that remained <2 ULN. Of the 27 CHB patients, only 5 patients (18%) required NA re-introduction after stopping NAs ([Fig. 1A](#)). The reasons for treatment re-introduction were: early flare in HBV-DNA and persistent ALT levels >10 ULN (n = 1), high viraemia with persistent 2–5 ULN ALT levels for at least 4 weeks (n = 3), and the need for high dose corticosteroid therapy for more than 7 days (n = 1, who also had an ALT >2 ULN and HBV-DNA >20,000 IU/ml >8 weeks). We did not find any

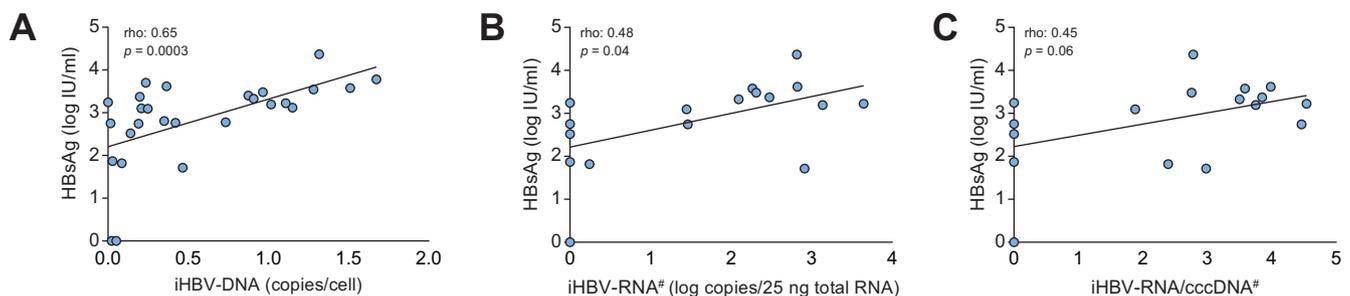


Fig. 2. Correlations between HBsAg and intrahepatic replication markers before NA discontinuation. Correlation between HBsAg and (A) iHBV-DNA, (B) iHBV-RNA, and (C) iHBV-RNA/cccDNA ratio as a measure of cccDNA transcriptional activity. Rho, Spearman's correlation coefficient. *Data available for 18 patients. cccDNA, covalently closed circular DNA; iHBV-DNA, intrahepatic HBV-DNA; iHBV-RNA, intrahepatic HBV-RNA; NA, nucleos(t)ide analogue.

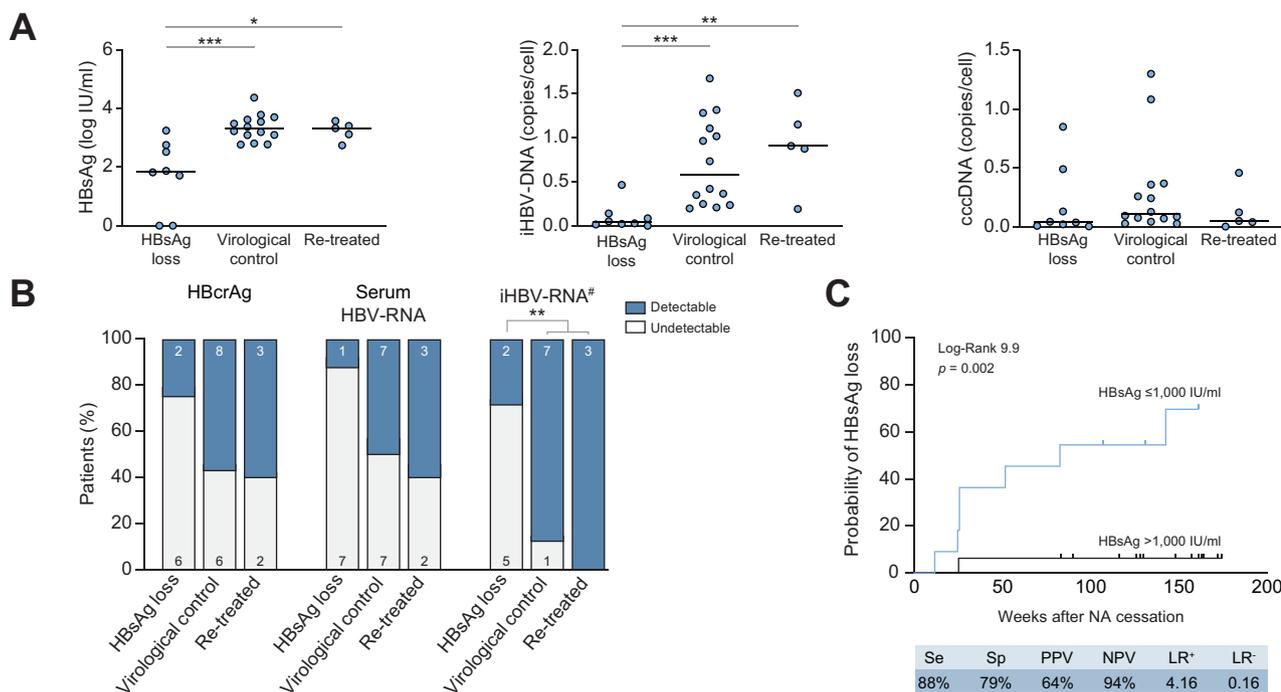


Fig. 3. Association between baseline virological markers and outcome after NA discontinuation. (A) Baseline HBsAg, iHBV-DNA, and cccDNA levels according to patient outcome. The red lines indicate median values. (B) Proportion of patients with detectable HBcrAg, serum HBV-RNA, and iHBV-RNA according to outcome. Mann-Whitney (A) and Chi-squared tests (B) were used for comparison, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001. (C) Kaplan-Meier curves for HBsAg loss after NA interruption according to HBsAg levels at baseline. [#]Data available for 18 patients. cccDNA, covalently closed circular DNA; iHBV-DNA, intrahepatic HBV-DNA; iHBV-RNA, intrahepatic HBV-RNA; LR, likelihood ratio; NA, nucleos(t)ide analogue; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value; Se, sensitivity; Sp, specificity.

difference according to outcome after NA discontinuation when considering patient characteristics including sex, age, type, and duration of antiviral therapy or HBV genotype (Table 1 and Supplementary Table S1).

HBV-DNA, ALT, and HBsAg kinetics after NA withdrawal

In this cohort, HBV-DNA viraemia peaked within 1–3 months of stopping NA therapy (Fig. 1B). Most patients had a virological relapse defined as either an increase in HBV-DNA above 2,000 IU/mL (78%) or 20,000 IU/mL (44%).

ALT flares were observed in some patients during the ‘off-therapy’ period, although these were mostly mild (Table 1). Patients with ALT flare >10 ULN presented with diverse clinical outcomes with only 2 out of 6 patients needing treatment re-introduction, whereas 4 out of 6 remained off-therapy, including 3 who achieved HBsAg loss (Table 1 and Fig. 1B). Neither HBV-DNA nor ALT kinetics predicted the clinical evolution during follow-up. The overall reduction in HBsAg levels was -0.22 (-0.58–0.16) log IU/ml during follow-up with no differences noted between virological controllers and patients re-starting therapy (Fig. 1B). The evolution of the remaining markers (HBcrAg and serum HBV-RNA) is shown in Table 1 and Supplementary Table S1.

Baseline HBsAg significantly correlates with iHBV-DNA and iHBV-RNA, but not cccDNA

Serum and liver parameters of HBV replication were analysed before treatment interruption (Table 1 and Supplementary Table S1). The median baseline HBsAg titre in our cohort was

1,310 (556–3031) IU/ml, with 11 patients (41%) ≤1,000 IU/ml and 5 (18%) ≤100 IU/ml. Despite long-term NA therapy, all patients had detectable iHBV-DNA and cccDNA at baseline. In contrast, only 11 (41%) and 13 (48%) patients had detectable serum levels of HBV-RNA and HBcrAg, respectively. Intrahepatic HBV-RNA was detected in 67% of liver samples at baseline. Notably in all patients with undetectable iHBV-RNA (n = 6), we were also unable to detect HBV-RNA in their matched serum samples. In 8 patients we detected both iHBV-RNA and serum HBV-RNA, whereas in 4 patients only iHBV-RNA was detectable. In addition, 5 out of 7 patients with virological control and 2 out of 3 patients needing re-treatment had detectable iHBV-RNA and positive serum HBV-RNA levels.

We analysed the correlations between baseline serum and intrahepatic viral markers (Fig. 2 and Supplementary Table S2). HBsAg correlated with both iHBV-DNA (rho = 0.65, *p* = 0.0003) and iHBV-RNA (rho = 0.48, *p* = 0.04), but not with cccDNA. Furthermore, serum HBV-RNA correlated with iHBV-DNA and iHBV-RNA (rho = 0.50, *p* = 0.008 and rho = 0.56, *p* = 0.01, respectively). We did not observe any correlation between the duration of prior NA therapy and the expression of any virological parameter tested (data not shown).

Low baseline HBsAg levels are associated with HBsAg loss upon NA withdrawal

Patients achieving HBsAg loss had lower HBsAg and iHBV-DNA but similar cccDNA levels at baseline, compared with the individuals sustaining virological control and those requiring re-treatment (Table 1 and Fig. 3A). Importantly, 5 out of 7 (71%)

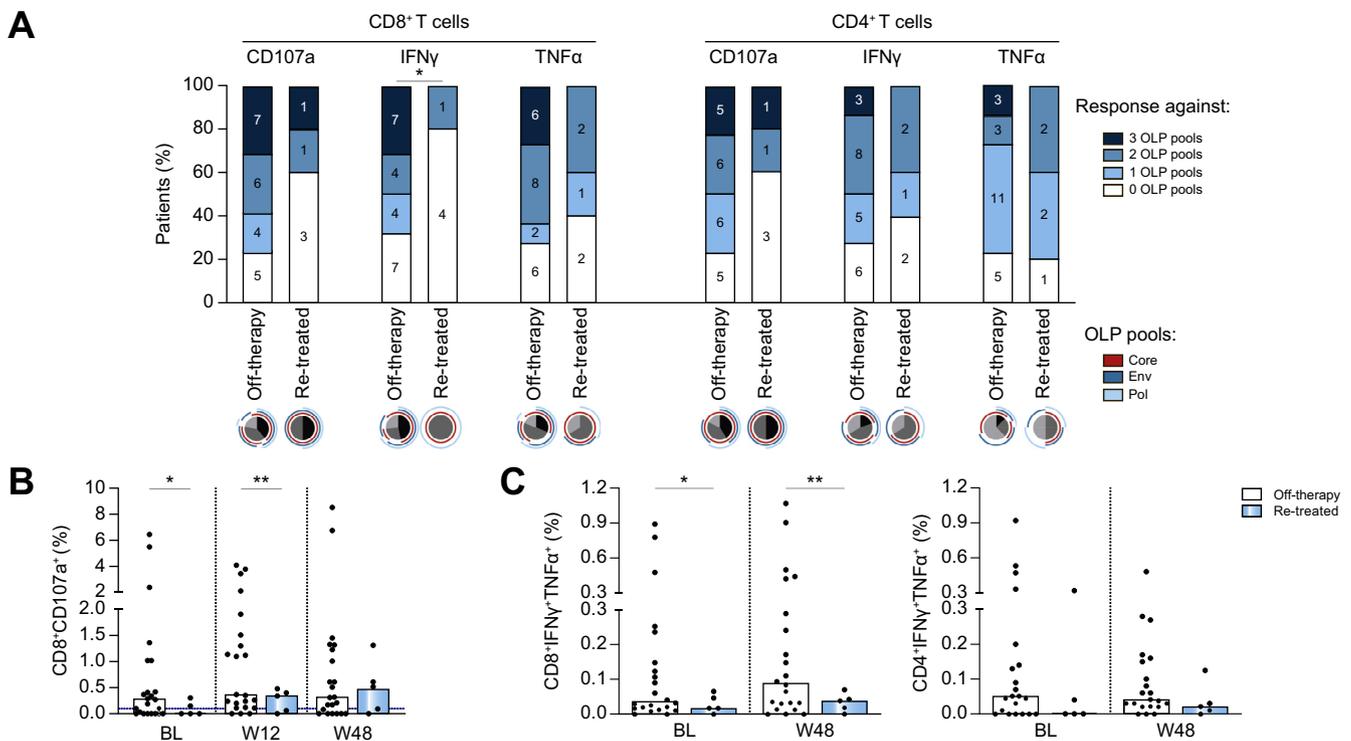


Fig. 4. HBV-specific T cell responses at baseline and during follow-up. (A) Percentage of patients with baseline HBV-specific T cell responses ($\geq 0.1\%$ positive cells after subtracting the unstimulated control) and hierarchy of the T cell responses according to the different overlapping peptide (OLP) pools. (B) Degranulating CD8+ T cells after *in vitro* expansion with core OLP. (C) Polyfunctional T cells co-expressing IFN γ and TNF α after core OLP stimulation at baseline and 48 weeks after treatment withdrawal. Bars represent the median and dotted lines the 0.1% cut-off for positive T cell responses minus the unstimulated control (B and C). Chi-square test (A) and Welch's *t* test (B, C) were used to compare groups, **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

patients who achieved HBsAg loss had undetectable iHBV-RNA at baseline (*p* < 0.01), whereas 91% of patients who remained HBsAg-positive had detectable levels of iHBV-RNA (Table 1 and Fig. 3B). In addition, baseline HBcrAg and serum HBV-RNA were more frequently undetectable in patients who achieved HBsAg loss than in patients who did not (HBcrAg: 75% vs. 42%; *p* = 0.12 and HBV-RNA: 88% vs. 47%; *p* = 0.053), although the differences did not reach statistical significance. As shown in Fig. 3C, the probability of HBsAg loss was higher among patients with low HBsAg $\leq 1,000$ IU/ml (log rank 9.9, *p* = 0.002). Combining HBsAg levels $\leq 1,000$ IU/ml and undetectable serum HBV-RNA did not improve the predictive value for HBsAg loss (log rank 6.7, *p* = 0.009; Supplementary Fig. S2). Although virological parameters predicted HBsAg loss, we did not see differences between the virological control and relapse groups.

HBV-specific T cell responses at baseline are associated with virological control off-treatment

To evaluate the impact of the HBV-specific T cell response on the clinical outcome after NA discontinuation, we investigated the effector capacity of HBV-specific CD4+ and CD8+ T cells after *in vitro* stimulation with overlapping peptides (OLP) spanning the core, envelope, or polymerase proteins. A representative gating strategy and example flow cytometric plots are shown in Supplementary Fig. S3 and individual data showing CD8+ and CD4+ T cell responses at all time points are shown in

Supplementary Fig. S4. Interestingly, an increased proportion of patients that remained off-therapy had functional HBV-specific CD8+ T cell responses against epitopes from more than one HBV protein before NA withdrawal compared to those requiring NA re-introduction (68% vs. 20% *p* = 0.048 for IFN γ production and 77% vs. 40% *p* = 0.099 for CD107a expression, respectively). Of note, we defined an HBV-specific T cell response as $\geq 0.1\%$ after subtraction of the unstimulated control; Fig. 4A). Interestingly, for both CD8+ and CD4+ T cells, responding cells to all viral antigens were more likely to be detectable at baseline in patients who remained off-therapy than in the re-treatment group. Indeed, CD4+ and CD8+ T cells producing IFN γ and TNF α in response to any peptide pool were absent in all patients that had NA re-introduction. However, no statistically significant differences were observed within groups likely attributable to the number of patients falling in the re-treatment group.

The percentage of degranulating CD8+ T cells (CD107a) in response to stimulation with HBV-core OLP was significantly higher at baseline and after 12 weeks of stopping NA treatment in patients remaining off-therapy than in those requiring NA re-introduction (*p* = 0.039 and 0.0093, respectively; Fig. 4B). However, these differences in CD107a responses between patient groups were not maintained when focusing on OLP encompassing the envelope and polymerase proteins (Supplementary Fig. S5).

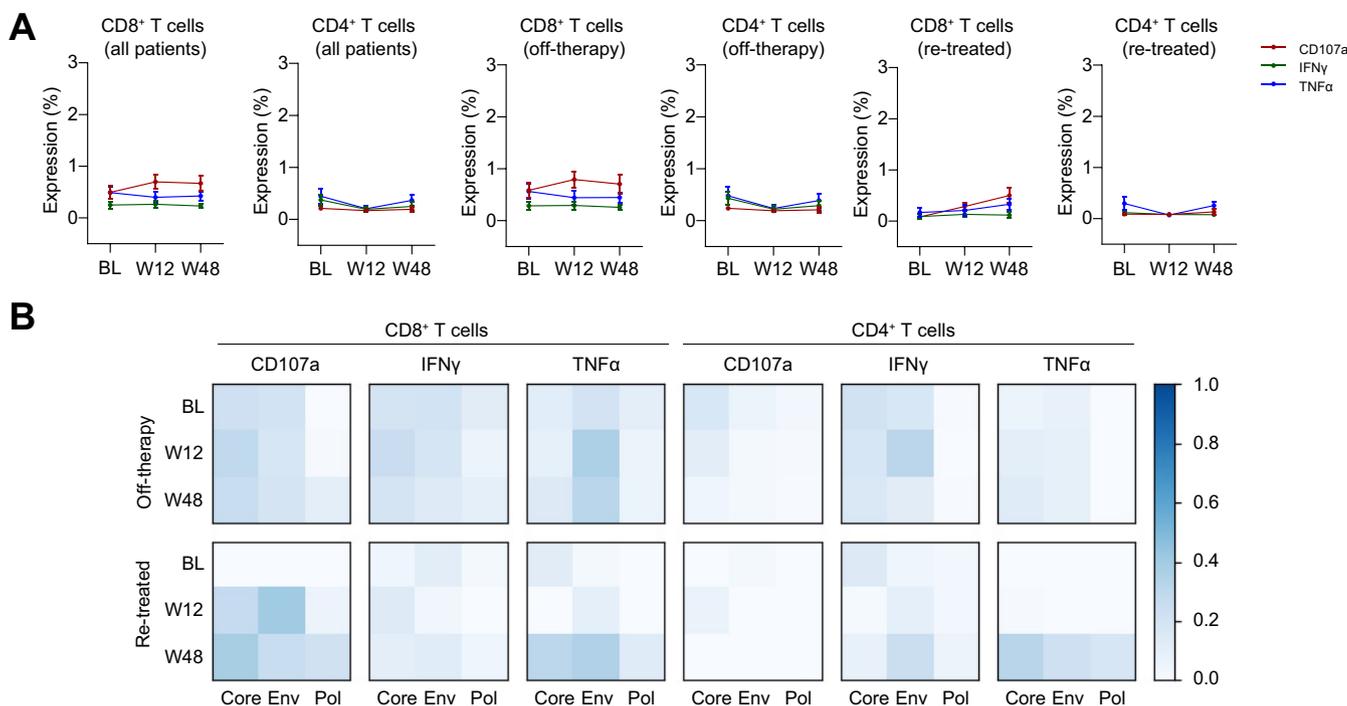


Fig. 5. HBV-specific T cell responses do not increase after NA withdrawal. (A) Longitudinal analysis of HBV-specific T cell responses after stopping therapy (entire cohort and broken down by clinical outcome: off-therapy and re-treated). Data are expressed as mean \pm SEM. (B) Heat map showing normalised median frequencies of HBV-specific T cell responses against each OLP at baseline (BL), week 12 (W12) and week 48 (W48) after treatment discontinuation. Normalisation was performed by scaling maximum and minimum values per marker between 0 and 1. Absence of * indicates no differences compared to baseline in each group (Wilcoxon Signed-Rank test). Env, envelope; NA, nucleos(t)ide analogue; Pol, polymerase.

When we investigated the presence of polyfunctional CD8⁺ and CD4⁺ T cells (cells co-expressing IFN γ and TNF α), we observed that the percentage of core-specific CD8⁺ T cells producing IFN γ /TNF α at baseline was increased among patients who remained off-therapy compared with those patients needing treatment re-introduction ($p = 0.031$; Fig. 4C). Importantly, this increase persisted for more than a year of follow-up whilst off-therapy ($p = 0.01$). A similar trend was observed when probing effector CD4⁺ T cells co-producing IFN γ /TNF α , however, the differences between outcome groups did not reach statistical significance (Fig. 4C). Likewise, no differences were observed between groups of patients (off-therapy and treatment re-introduction) regarding the presence of polyfunctional T cell responses against envelope and polymerase proteins (Supplementary Fig. S6).

We also evaluated if there was any association between T cell responses and the development of clinically relevant ALT flares during follow-up. As shown in Supplementary Fig. S7, we observed that HBV-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cell responses at baseline were similar between patients regardless of whether they developed an ALT flare (using a threshold of ≥ 2 ULN).

HBV-specific responses do not increase following treatment withdrawal

To investigate the impact of NA discontinuation on functional HBV-specific T cells, we performed a longitudinal analysis of the T cell responses against HBV OLP at 12 and 48 weeks after NA withdrawal. We found that the frequency of either HBV-specific CD8⁺ or CD4⁺ T cells detectable by intracellular cytokine staining for the antiviral mediators CD107a, IFN γ , and/or TNF α did not

significantly change during follow-up compared to baseline (Fig. 5A and Supplementary Fig. S4). Similarly, when classifying patients according to whether they remained off-therapy or required treatment re-introduction, no significant changes in any effector functions to any of the peptide pools were detected at week 12 or 48 compared with baseline (Fig. 5B).

As HBsAg loss with or without the production of anti-HBs represents the best predictor of success upon discontinuation of NA therapy, we analysed HBV-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cell responses within this small group of individuals. Notably, the effector CD8⁺ T cell response to antigenic stimulation in these patients was heterogeneous, with a significantly greater magnitude of response to HBV OLP stimulation in some patients, and with absent or very weak responses for all mediators (CD107a, IFN γ or TNF α) in others (Fig. 6A). The longitudinal analysis after NA cessation did not show significant changes in the response rates in this subgroup of patients (Fig. 6B). Similar results were obtained for HBV-specific CD4⁺ T cell responses (data not shown).

The strength of HBV-specific T cell responses does not correlate with serum or intrahepatic virological markers

We next explored whether differences in the HBV-specific T cell response were associated with serum or intrahepatic virological parameters. As we noted, baseline HBsAg levels $\leq 1,000$ IU/ml were predictive of HBsAg clearance in our cohort, we classified patients accordingly and analysed their HBV-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cell responses at baseline. The proportion of patients with HBV-specific effector T cells as well as the frequency of polyfunctional T cells co-producing IFN γ /TNF α were similar regardless of HBsAg

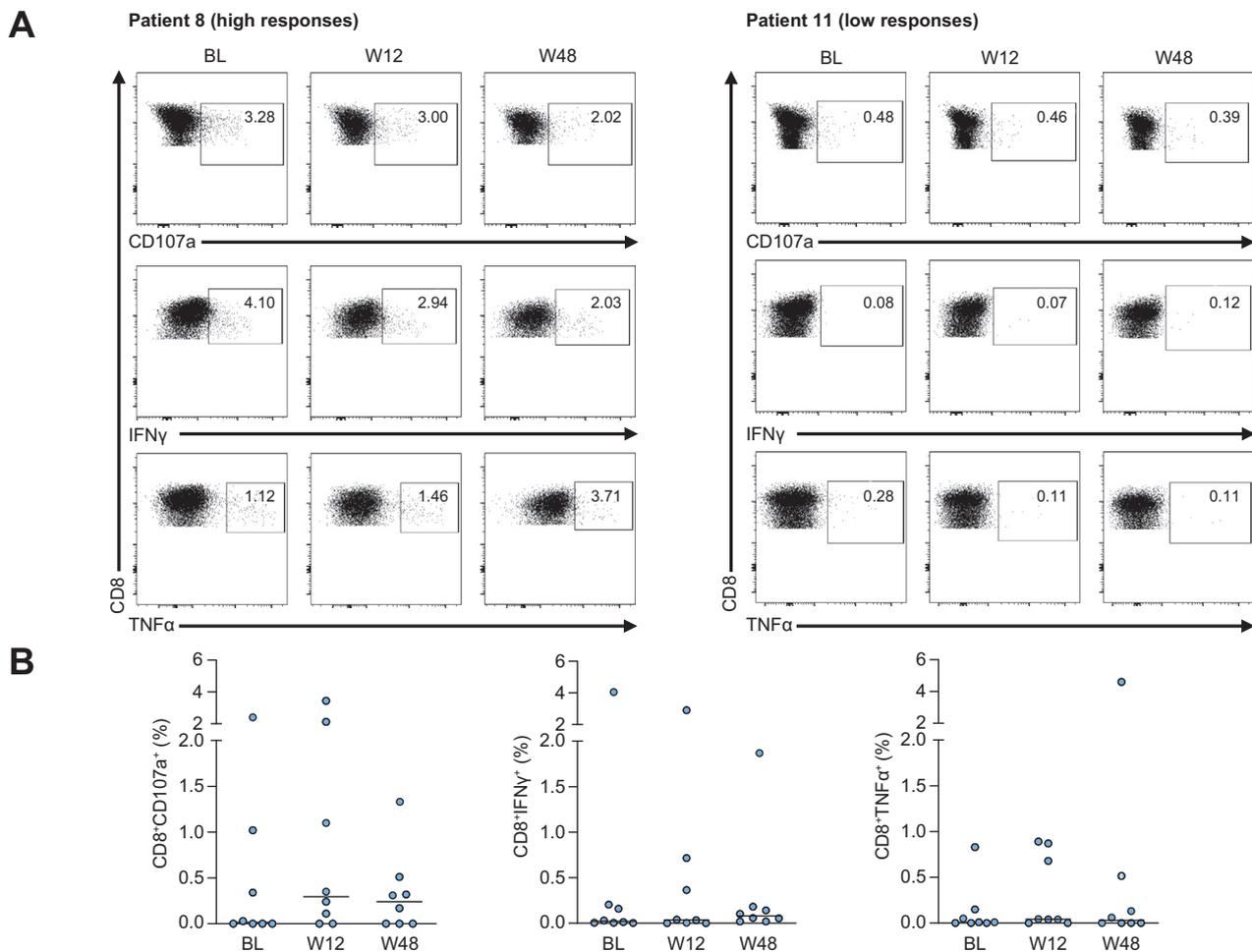


Fig. 6. HBV core-specific CD8⁺ T cell responses in patients who achieved HBsAg loss after treatment withdrawal. (A) Representative dot plots of HBV-specific effector CD8⁺ T cells from 2 patients who lost HBsAg. (B) Longitudinal HBV-specific T cell responses against core OLP in patients that achieved HBsAg loss after stopping therapy. No differences were observed at weeks 12 and 48 when comparing to baseline (Wilcoxon Signed-Rank test).

titres (Supplementary Fig. S8). We did not find any significant correlation between peripheral HBV-specific T cell responses and other serum (e.g. HBcrAg) or liver replication markers (iHBV-DNA, cccDNA, iHBV-RNA, or iHBV-RNA/cccDNA ratio).

Safety

Importantly, no patient developed hepatic decompensation, hepatocellular carcinoma, or died during follow-up. Bilirubin levels greater than 2 mg/dl or prolongation of prothrombin time were not detected at any time point, even amongst those individuals requiring treatment re-introduction. No other adverse events were detected during the follow-up period. All patients requiring NA re-introduction had a subsequent good response with entecavir or tenofovir, returning to undetectable serum HBV-DNA and a normal ALT within 6 months. Furthermore, we observed no change in liver stiffness assessment at the 24-month follow-up in 19 of our 27 patients compared with their matched baseline assessment or when comparing treatment outcome groups (Table 1).

Discussion

Despite lifelong treatment with NA being safe and effective in patients with HBeAg-negative CHB, the overall rate of HBsAg loss

remains low.^{1,2} Several new direct-acting antivirals and immunomodulatory compounds are in clinical evaluation with the aim of achieving functional cure of CHB with finite treatment duration.¹⁵ Alternatively, NA discontinuation has been proposed as a promising therapeutic strategy to promote HBsAg loss or at least sustained off-treatment viral control in a considerable proportion of patients.^{2-5,16} However, the reported rates of HBsAg loss in NA withdrawal studies have been enormously variable, in part owing to the heterogeneity of patient cohorts, and the absence of standardised treatment re-introduction criteria. To investigate the correlates of outcomes upon NA cessation, we analysed liver and serum markers of HBV replication in parallel with assessment of HBV-specific T cell immunity in a well-characterised cohort of patients with HBeAg-negative CHB undergoing NA discontinuation.

In our study, after a median follow-up of 2.8 years from treatment interruption, 82% of patients remain off-therapy and 8 (30% of the total cohort) continued to remain HBsAg negative. Virological relapses were observed in the majority (78%) of patients although these were not always associated with biochemical relapses. Indeed, most of the ALT flares were mild and temporary, leading to long-term virological and biochemical remission with no patients developing liver dysfunction. Our

results agree with those reported by Berg *et al.*,³ the only randomised trial comparing the strategy of NA-therapy maintenance and therapy withdrawal, which included a comparable population in terms of genotypic and clinical characteristics.

Although treatment re-introduction criteria differ among the current published studies, we and others have shown that lower HBsAg titres at the time of NA withdrawal are associated with an increased probability of HBsAg loss.^{3,4,6,17–19} In our study, a threshold value for HBsAg of $\leq 1,000$ IU/ml was a good predictor whether a patient went on to lose HBsAg. Likewise, patients who achieved HBsAg loss had lower iHBV-DNA levels at baseline; this marker includes cccDNA, relaxed circular DNA, and integrated HBV-DNA. Indeed, integration of HBV-DNA into the host genome and its contribution to the formation of HBsAg particles²⁰ may explain the good correlation between iHBV-DNA and HBsAg in our cohort of HBeAg-negative patients chronically suppressed by NA therapy.

We did not find an association between baseline cccDNA levels and virological outcome. However, most patients achieving HBsAg loss had undetectable iHBV-RNA (71%) and, hence, reduced cccDNA transcriptional activity (iHBV-RNA/cccDNA ratio). This would explain, at least in part, a more favourable outcome in these patients. Indeed, 10 out of 11 patients not achieving HBsAg loss had detectable iHBV-RNA suggesting transcriptionally active cccDNA and a higher risk of viral rebound. We also studied the prognostic value of other surrogate serum markers of cccDNA transcriptional activity such as HBcrAg and serum HBV-RNA.^{7,21,22} The proportion of patients with undetectable serum HBV-RNA or HBcrAg at baseline in our cohort was higher among patients achieving HBsAg loss (7/8 and 6/8 patients, respectively), however, these markers did not improve the ability of HBsAg levels to predict functional cure. Importantly, serum HBV-RNA and HBcrAg may have become undetectable in HBeAg-negative patients under long-term NA therapy thus limiting their predictive power.^{7,21}

As adaptive immune responses are important for the control of HBV infection,^{12,23,24} we analysed the effector functionality of HBV-specific CD4+ and CD8+ T cells at the time of treatment withdrawal (baseline) and throughout NA discontinuation. At baseline, the proportion of patients with HBV-specific CD8+ T cells expressing CD107a and IFN γ after *in vitro* peptide stimulation was higher amongst patients who subsequently remained off-therapy compared with those that needed treatment re-introduction. The presence of polyfunctional T cells has been associated with an improved control of viral replication.^{23,25} Accordingly, we found that the frequency of HBV-specific T cell co-producing IFN γ /TNF α were higher both at baseline and 1 year after stopping therapy in patients who remained off-therapy. However, in contrast to recent findings,¹⁴ treatment withdrawal did not induce any significant change in the HBV-specific CD8+ and CD4+ T cell response after 12 or 48 weeks of follow-up.

Interestingly, patients achieving HBsAg loss presented a heterogeneous HBV-specific effector T cell response both at baseline and during follow-up, with no clear pattern differentiating those patients achieving HBsAg loss after an ALT flare or not. In line with the concept that HBV-specific CD8+ T cells can exert viral control without liver damage,²⁴ a recent study showed higher baseline frequencies of core and polymerase-specific CD8+ T cells were predictive of viral control in the absence of a flare after treatment interruption.¹³ Our findings similarly show that higher baseline HBV-specific CD8+ T cells were predictive of virological

control off-treatment. In both studies, ALT flares were not associated with significant increases in HBV-specific CD8+ T cell frequency (in the Rivino *et al.*¹³ study they were lower in the flaring group), raising the possibility of alternative immune mechanisms driving liver damage.

Finally, our study also has some limitations. First, although an HBsAg threshold was not an inclusion criterion, our cohort is characterised by a proportion of patients with low HBsAg levels at baseline which might have influenced the improved success rates in this study. Nonetheless, when excluding the 2 patients with lower qHBsAg (< 1 IU/ml), the statistical analysis regarding baseline differences and predictive factors remained the same. Second, because of the limited amount of liver tissue, we were not able to assess HBV-DNA integration or to study innate immune responses within the liver,²⁶ or the contribution of liver-resident T cells to viral control.^{27–29} Lastly, we cannot rule out future transition to a different HBV infection phase in patients with virological control, thus these patients remain under clinical monitoring.

In summary, stopping NA therapy is feasible in a high proportion of HBeAg-negative patients without cirrhosis. Although lower cccDNA transcriptional activity after long-term antiviral therapy is associated with successful outcome after NA withdrawal, intrahepatic viral parameters do not seem to improve the predictive capacity of readily available serum markers such as HBsAg. Indeed, low HBsAg levels ($\leq 1,000$ IU/ml) may offer predictive value in assessing those patients in whom no specific intervention other than stopping antiviral therapy and close monitoring would be a valid therapeutic strategy for achieving functional cure. For those patients with a less favourable virological profile, the strength of HBV-specific T cell responses at baseline may contribute to the outcome of treatment interruption. The latter group may be more responsive to novel finite immunotherapeutic options after NA discontinuation to increase the rate of HBsAg loss.

Abbreviations

ALT, alanine aminotransferase; BL, baseline; cccDNA, covalently closed circular DNA; CHB, chronic hepatitis B; Env, envelope; HBcrAg, HBV core-related antigen; iHBV-DNA, intrahepatic HBV-DNA; iHBV-RNA, intrahepatic HBV-RNA; LR, likelihood ratio; NPV, negative predictive value; NA, nucleos(t)ide analogue; OLP, overlapping peptides; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; Pol, polymerase; PPV, positive predictive value; rho, Spearman's correlation coefficient; Se, sensibility; Sp, specificity; ULN, upper limit of normal; W12, week 12; W48, week 48.

Financial support

This study was sponsored by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) through the Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013–2016, grants PI16/00111 (SPP), PI15/00151 and PI18/00079 (XF), and PI18/01436 (FRF), co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF), by the Gilead Fellowship Programme, grant GLD15/00274 (XF) and by Plan Estratégico Nacional contra la hepatitis C (Spanish Health Ministry). XF has received support from Secretaria d'Universitats i Recerca del Departament d'Economia i Coneixement (grant 2017_SGR_1753) and CERCA Programme/Generalitat de Catalunya. SL has received grants from Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH) and Societat Catalana de Digestologia (SCD). GK is supported by Fundació IBEROSTAR.

MGL is supported by the i-PFIS program (fellowship IFI18/00006) and SRT by the Rio Hortega program (fellowship CM17/00015) of the ISCIII, both co-funded by the European Social Fund (ESF). SRT is supported by an initiation research grant from SCD and the Emili Letang end-of-residency prize from Hospital Clínic de Barcelona. MKM and LJP are supported by Wellcome Trust Investigator award 214191/Z/18/Z and CRUK Immunology grant 26603. This work was performed within the framework of the RHU CirB-RNA (ANR-17-RHUS-0003) that is part of the second programme 'Investissements d'Avenir' operated by the French National Research Agency (ANR) (FZ and BT).

Conflicts of interest

SL has received lecture and advisory fees from Gilead, Abbvie, and MSD. XF has acted as advisor for Gilead and Abbvie. SRT has received lecture fees from Gilead and Abbvie. ZM has received fees for lectures and consulting from Gilead and Abbvie, and a research grant from Gilead. The Maini lab has received research funding from Gilead, Hoffmann La Roche and Immunocore. MKM has sat on advisory boards/provided consultancy for Gilead, Hoffmann La Roche, Immunocore, VIR, Galapagos NV, GSK, Abbvie, and Freeline. LJP has received fees from Gilead for consultancy work. FZ received research grants and consultancy honoraria from Hoffmann-La-Roche, Gilead Sciences, Janssen, Assembly Biosciences, Arbutus, Contravir, Sanofi, and Transgene. All other authors have declared no conflicts of interest.

Please refer to the accompanying ICMJE disclosure forms for further details.

Authors' contributions

Contributed to the study concept and design: XF, SL, SPP. Patient selection/inclusion: SL, SRT, ZM, XF. Acquired data: MGL, SL, SRT, EGP, EP, TL, GK, CB, FRF, ZM, XF, SPP. Contributed to analysis and interpretation of data: MGL, SL, XF, SPP, JLL, FZ, BT, LJP, MKM. Drafted the manuscript: SL, MGL, SPP. Contributed to critical revisions and approved the final manuscript: all authors.

Data availability

Data regarding patients included in the study are confidential. Additional information relevant to readers is provided as [Supplementary data](#).

Acknowledgements

We are indebted to the Cytometry and Cell Sorting facility of the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDI-BAPS) and the Peptide Synthesis Core Facility of the Pompeu Fabra University (UPF), Barcelona, Spain for the technical help.

Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.11.043>.

References

Author names in bold designate shared co-first authorship

- [1] Marcellin P, Wong DK, Sievert W, Buggisch P, Petersen J, Flisiak R, et al. Ten-year efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate treatment for chronic hepatitis B virus infection. *Liver Int* 2019;39:1868–1875.
- [2] European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2017;67:370–398.
- [3] Berg T, Simon KG, Mauss S, Schott E, Heyne R, Klass DM, et al. Long-term response after stopping tenofovir disoproxil fumarate in non-cirrhotic HBeAg-negative patients – FINITE study. *J Hepatol* 2017;67:918–924.
- [4] Hadziyannis SJ, Sevastianos V, Rapti I, Vassilopoulos D, Hadziyannis E. Sustained responses and loss of HBsAg in HBeAg-negative patients with chronic hepatitis B who stop long-term treatment with adefovir. *Gastroenterology* 2012;143. 629–636.e1.
- [5] Papatheodoridis GV, Manolakopoulos S, Su TH, Siakavellas S, Liu CJ, Kourikou A, et al. Significance of definitions of relapse after discontinuation of oral antivirals in HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2018;68:415–424.
- [6] Jeng WJ, Chen YC, Chien RN, Sheen IS, Liaw YF. Incidence and predictors of hepatitis B surface antigen seroclearance after cessation of nucleos(t)ide analogue therapy in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2018;68:425–434.
- [7] Papatheodoridi M, Hadziyannis E, Berby F, Zachou K, Testoni B, Rigopoulou E, et al. Predictors of hepatitis B surface antigen loss, relapse and retreatment after discontinuation of effective oral antiviral therapy in noncirrhotic HBeAg-negative chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2019;27:118–126.
- [8] Ha M, Zhang G, Diao S, Lin M, Sun L, She H, et al. A prospective clinical study in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients with stringent cessation criteria for adefovir. *Arch Virol* 2012;157:285–290.
- [9] Chi H, Hansen BE, Yim C, Arends P, Abu-Amara M, Van Der Eijk AA, et al. Reduced risk of relapse after long-term nucleos(t)ide analogue consolidation therapy for chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther* 2015;41:867–876.
- [10] Jung KS, Park JY, Chon YE, Kim HS, Kang W, Kim BK, et al. Clinical outcomes and predictors for relapse after cessation of oral antiviral treatment in chronic hepatitis B patients. *J Gastroenterol* 2016;51:830–839.
- [11] van Bömmel F, Bartens A, Mysickova A, Hofmann J, Krüger DH, Berg T, et al. Serum hepatitis B virus RNA levels as an early predictor of hepatitis B envelope antigen seroconversion during treatment with polymerase inhibitors. *Hepatology* 2015;61:66–76.
- [12] Maini MK, Pallett LJ. Defective T-cell immunity in hepatitis B virus infection: why therapeutic vaccination needs a helping hand. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2018;3:192–202.
- [13] Rivino L, Bert N Le, Gill US, Kunasegaran K, Cheng Y, Tan DZMM, et al. Hepatitis B virus-specific T cells associate with viral control upon nucleos(t)ide-analogue therapy discontinuation. *J Clin Invest* 2018;128:1–14.
- [14] Rinker F, Zimmer CL, Siederdisen CHZ, Manns MP, Kraft ARM, Wedemeyer H, et al. Hepatitis B virus-specific T cell responses after stopping nucleos(t)ide analogue therapy in HBeAg negative chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2018;69:584–593.
- [15] Cornberg M, Lok ASF, Terrault NA, Zoulim F, Berg T, Brunetto MR, et al. 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;72:539–557.
- [16] Lampertico P, Berg T. Less can be more: a finite treatment approach for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2018;68:397–400.
- [17] Cao J, Chi H, Yu T, Li Z, Hansen BE, Zhang X, et al. Off-treatment hepatitis B virus (HBV) DNA levels and the prediction of relapse after discontinuation of nucleos(t)ide analogue therapy in patients with chronic hepatitis B: a prospective stop study. *J Infect Dis* 2017;215:581–589.
- [18] Papatheodoridis G, Rigopoulou E, Papatheodoridi M, Zachou K, Xourafas V, Gatselis N, et al. DARING-B: discontinuation of effective entecavir or tenofovir therapy in non-cirrhotic HBeAg-negative chronic hepatitis B patients: a prospective Greek study. *J Hepatol* 2017;66:S26.
- [19] Chen CH, Lu SN, Hung CH, Wang J-HH, Hu T-HH, Changchien CS, et al. The role of hepatitis B surface antigen quantification in predicting HBsAg loss and HBV relapse after discontinuation of lamivudine treatment. *J Hepatol* 2014;61:515–522.
- [20] Wooddell CI, Yuen MF, Chan HLY, Gish RG, Locarnini SA, Chavez D, et al. Rnai-based treatment of chronically infected patients and chimpanzees reveals that integrated hepatitis B virus DNA is a source of HBsAg. *Sci Transl Med* 2017;9:1–12.
- [21] Carey I, Gersch J, Wang B, Moigboi C, Kuhns M, Cloherty G, et al. Pre-genomic HBV RNA and HBcrAg predict outcomes in HBeAg negative chronic hepatitis B patients suppressed on nucleos(t)ide analogue therapy. *Hepatology* 2019;0–1.
- [22] Wang J, Shen T, Huang X, Renuka Kumar G, 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;65:700–710.
- [23] Boni C, Laccabue D, Lampertico P, Giuberti T, Viganò M, Schivazappa S, et al. Restored function of HBV-specific T cells after long-term effective therapy with nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 2012;143:963–73.e9.
- [24] Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, et al. The role of virus-specific CD8+ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000;191:1269–1280.
- [25] Almeida JR, Price DA, Papagno L, Arkoub ZA, Sauce D, Bornstein E, et al. Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J Exp Med* 2007;204:2473–2485.
- [26] **Lebossé F, Testoni B**, Fresquet J, Facchetti F, Galmozzi E, Fournier M, et al. Intrahepatic innate immune response pathways are downregulated in untreated chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2017;66:897–909.
- [27] Pallett LJ, Davies J, Colbeck EJ, Robertson F, Hansi N, Easom NJW, et al. IL-2(high) tissue-resident T cells in the human liver: sentinels for hepatotropic infection. *J Exp Med* 2017;214:1567–1580.
- [28] **Gill US, Pallett LJ**, Thomas N, Burton AR, Patel AA, Yona S, et al. Fine needle aspirates comprehensively sample intrahepatic immunity. *Gut* 2019;68:1493–1503.
- [29] **Kim JH, Han JW**, Choi YJ, Rha MS, Koh JY, Kim KH, et al. Functions of human liver CD69+ CD103- CD8+ T cells depend on HIF-2 α activity in healthy and pathologic livers. *J Hepatol* 2020;72:1170–1181.