

**VARIANTES DE LA REGIÓN DEL PROMOTOR BÁSICO  
DEL GEN PRECORE-CORE DEL VIRUS DE LA  
HEPATITIS B. RELACIÓN CON LA REGIÓN PRECORE  
Y LOS GENOTIPOS VIRALES.**

**JOSÉ JAVIER COSTA ALCALDE**

**OCTUBRE 2002**

**VARIANTES DE LA REGIÓN DEL PROMOTOR BÁSICO  
DEL GEN PRECORE-CORE DEL VIRUS DE LA  
HEPATITIS B. RELACIÓN CON LA REGIÓN PRECORE  
Y LOS GENOTIPOS VIRALES.**

Tesis doctoral presentada por **José Javier Costa Alcalde**, realizada en la unidad de Proteínas y Hepatitis del Servicio de Bioquímica del Hospital General Vall d'Hebron de Barcelona, bajo la dirección del **Dr. Rosendo Jardí Margalef** y la **Dra. María Buti Ferret**. La tutora de esta tesis ha sido la **Dra. Margarida Sentís i Vilalta**.

Barcelona, junio de 2002.

**Rosendo JARDÍ MARGALEF**, Doctor en Medicina i **Maria BUTI FERRET**, Professora Titular de Medicina Interna del Departament de Medicina Interna de la Universitat Autònoma de Barcelona.

**FAN CONSTAR:**

Que el treball titulat **VARIANTES DE LA REGIÓN DEL PROMOTOR BÁSICO DEL GEN PRECORE-CORE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B. RELACIÓN CON LA REGIÓN PRECORE Y LOS GENOTIPOS VIRALES**, ha estat realitzat, sota la seva direcció, per José Javier COSTA ALCALDE, llicenciat en Farmàcia, i es troba en condicions de ser presentat i defensat davant del corresponent tribunal per optar al grau de Doctor.

I perquè així consti, signen la present a Barcelona, el 11 d'abril de 2002..

Dr. Rosendo Jardí Margalef

Prof. Dra. Maria Buti Ferret

**Margarida SENTÍS i VILALTA**, professora titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

**FA CONSTAR:**

Que la memòria per optar al grau de Doctor, titulada **VARIANTES DE LA REGIÓN DEL PROMOTOR BÁSICO DEL GEN PRECORE-CORE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B. RELACIÓN CON LA REGIÓN PRECORE Y LOS GENOTIPOS VIRALES**, presentada per José Javier COSTA ALCALDE, dirigida pel Dr. **Rosendo JARDÍ MARGALEF** i per la Dra. **Maria BUTI FERRET**, i tutoritzada per mi, reuneix els mèrits suficients per a ser presentada i defensada davant del corresponent.

I perquè així consti, signo la present a Barcelona, el 11 d'abril de 2002..

Dra. Margarida Sentís i Vilalta

*Adicado ós meus pais co desexo dunha contribución á súa loita.*

# AGRADECIMIENTOS

En la realización de este trabajo han colaborado muchas personas, tanto de una forma directa como indirecta. A todas ellas deseo agradecerles todo lo que me han ayudado.

Al Dr. Rosendo Jardí y a la Dra. María Buti, quienes me dieron la oportunidad de realizar este trabajo, su dirección y su confianza en mí son motivos por los que siento un gran agradecimiento.

Al Dr. Francisco Rodríguez-Frías, que siempre ha estado ahí, hombro con hombro, luchando para que todo esto salga adelante y siempre me ha levantado en momentos difíciles. Agradecer en unas pocas palabras sus horas y horas de generosa y desinteresada disposición, así como todo lo que hay en este trabajo de sus conocimientos, es poco menos que imposible.

A la Dra. Margarida Sentís por aceptar la tutoría de este trabajo y por el interés mostrado.

Al Dr. Román Galimany, Jefe de Servicio del Laboratorio de Bioquímica Clínica del Hospital General Vall d'Hebron, por poner de su parte los medios a su alcance para que este trabajo llegase a buen fin.

Al profesor Jaume Guardia Masso, Catedrático de Patología y Clínica Médica de la Facultad de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, y al profesor Rafael Esteban Mur, Catedrático de Hepatología de la misma Facultad, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis.

A Montserrat Cotrina, muy especialmente.

A Montserrat Gimferrer, a quien le debo un montón de cafés y con la esperanza de que nos toque la quiniela algún día.

A la Dra. María Martell por su colaboración imprescindible en los procesos de secuenciación..

Al Dr. Josep Quer que es como un faro en medio de la tormenta.

A Lupe, Isabel, Edu y Conchi al lado de quienes trabajar ha sido un gusto.

A todos los compañeros del laboratorio que me han ayudado en todo cuanto ha estado en su mano.

.

Este trabajo se ha realizado en parte gracias a la concesión de una beca del Fondo de Investigación Sanitaria (expediente: 00/0799).

# **INTRODUCCIÓN**



# 1. INTRODUCCIÓN.

## 1.1. EL VIRUS DE LA HEPATITIS B.

El virus de la hepatitis B (VHB) está formado por una partícula esférica de 42-47 nm de diámetro, rodeada de una envuelta proteolipídica de 7 nm de espesor que contiene el antígeno de superficie (HBsAg) contra el que está dirigido el anticuerpo neutralizante anti-HBs. (Dane y col., 1970; Mason y col., 1980). En el interior de las partículas se observa un núcleo esférico, electrodensito, de 22-25 nm de diámetro que contiene el antígeno HBcAg o antígeno core, el ADN viral, una proteína con actividad ADN polimerasa (Robinson y col., 1974) y una proteína con actividad quinasa que fosforila el HBcAg (Feitelson y col., 1982). Existe otro antígeno viral, denominado antígeno “e” (HBeAg), que no forma parte de la estructura del VHB, pero que se sintetiza a partir del gen que codifica la proteína del core. El HBeAg es secretado en forma soluble y se detecta en suero.

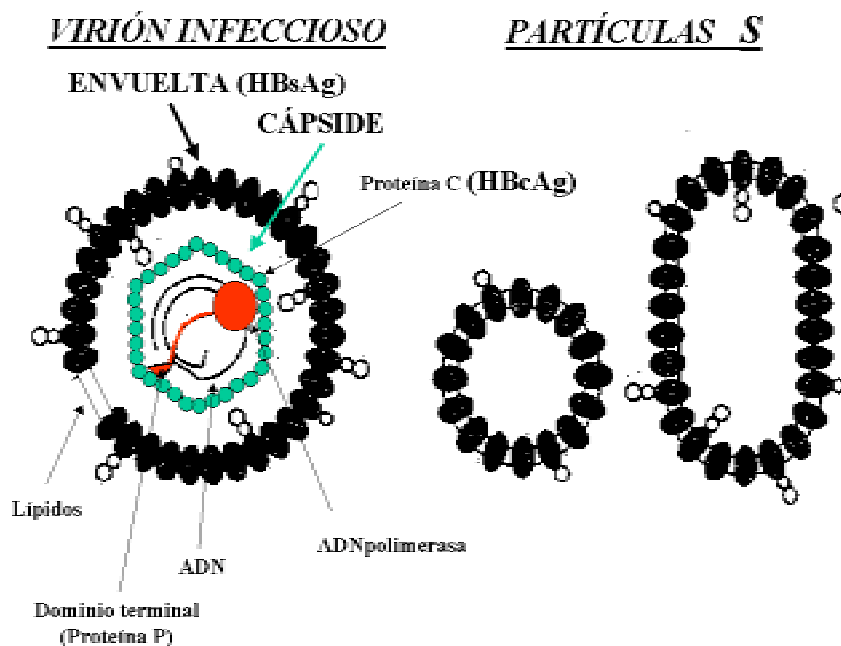


Figura 1. Estructura del VHB y de las partículas virales no infecciosas.

La concentración de partículas virales en el suero de pacientes infectados por VHB puede exceder las  $10^9$  partículas/ mL. Además de las partículas virales se encuentran en el suero otras formas particuladas, llamadas partículas S, compuestas sólo por el HBsAg, en número incluso superior al de las partículas infecciosas ( $10^{13}$  o más

partículas/ mL). Se trata de pequeñas partículas esféricas de 16 a 25 nm de diámetro, y de formas filamentosas de 22 nm de espesor y longitud variable, constituidas por lípidos, carbohidratos y proteínas pero no por componentes del núcleo del virus, por lo que se las considera formas incompletas de la envuelta proteolipídica (Dane y col., 1970; Summers y col., 1978; Marion y col., 1980). En la Figura 1 está representada la estructura del VHB y de las partículas virales no infecciosas.

### *1.1.1. ESTRUCTURA DEL GENOMA VIRAL.*

El genoma del VHB está constituido por una molécula de pequeño tamaño de ADN circular, parcialmente de doble cadena, que consta de una cadena larga de unas 3.200 bases (la cadena negativa o complementaria al ARN mensajero viral), con ligeras diferencias entre los aislados secuenciados, y una cadena corta, o positiva, de longitud variable, de 1.700 a 2.800 (Sattler y col., 1979; Okamoto y col., 1988). Las posiciones de las diferentes características de este genoma se indican utilizando el sistema de numeración de Ono y col. (1983), que se inicia en la posición correspondiente al enzima de restricción *Eco RI* cuando la diana para este enzima está presente o en el lugar homólogo cuando este sitio está ausente.

La cadena negativa no es un círculo cerrado y presenta una muesca única situada en la posición 1819, a 225 bases del extremo 5' de la cadena positiva. Los extremos 5' de ambas cadenas del ADN no pueden ser fosforilados, hecho que condujo al descubrimiento de un polipéptido unido covalentemente al extremo 5' de la cadena larga (Gerlich y col., 1980) que actúa como cebador en la síntesis de esta cadena de ADN (Ganem y col., 1982; Molnar-Kimber y col., 1983).

Una vez que el virus se encuentra en el núcleo del hepatocito, el ADN viral se hace circular y cerrado covalentemente (ADNccc) por acción de la polimerasa viral. El ADNccc sirve como molde para todos los procesos de transcripción del VHB, proceso que se realiza por acción de la ARNpolimerasa II del huésped (Nassal y col., 1996).

El genoma del VHB contiene 4 marcos de lectura abierta (ORF) parcialmente solapados (C, P, S y X) que se transcriben en 5 ARN mensajeros (ARNprecore, ARNcore, ARNpreS1, ARNpreS2/S y ARNX) para formar las siete proteínas del VHB (proteína “e”, C, P, preS1, preS2, S y proteína X). La síntesis de cada uno de los ARNm está dirigida por su correspondiente región promotora (Ganem y col., 1987) y la actividad de estos promotores está regulada por dos elementos potenciadores o “enhancers”:

“enhancer I” y “enhancer II” (Su y col., 1992; Guo y col., 1991; Wang y col., 1990). Los dos “enhancers” presentan especificidad hepática debido a que requieren factores de transcripción hepáticos para su actividad. La traducción del ARN<sub>precore</sub> da lugar a la proteína “e”, precursora del HBeAg. El ARN<sub>core</sub> expresa las proteínas C y P; además tiene una función como ARN<sub>pregenómico</sub> en la que sirve de molde para el ADN viral en el proceso de retrotranscripción del genoma del VHB. Los demás ARNm expresan la proteína que su propio nombre indica. Los distintos ARNm difieren en su extremo 5’ pero el extremo 3’ es una señal poliadenilada (TATAAA) común, localizada en la región 1916-1921 del genoma del VHB. Tanto el ARN<sub>core</sub> como el ARN<sub>precore</sub> presentan una redundancia terminal de manera que en su extremo 3’ presentan una repetición del fragmento que va desde el lugar de inicio de la transcripción (5’) hasta la señal de poliadenilación, es decir, que la señal de poliadenilación sólo es reconocida como tal (señal para la terminación de la transcripción) sólo en una “segunda” lectura de transcripción (Figura 3). En el fragmento que se halla repetido en los extremos 5’ y 3’ se encuentra una estructura llamada señal de encapsulación que, como se comentará más adelante, juega un importante papel en la reproducción del virus. En la Figura 2 está representada la estructura del genoma del VHB y en la Figura 3 se representan los diferentes ARNm del VHB.

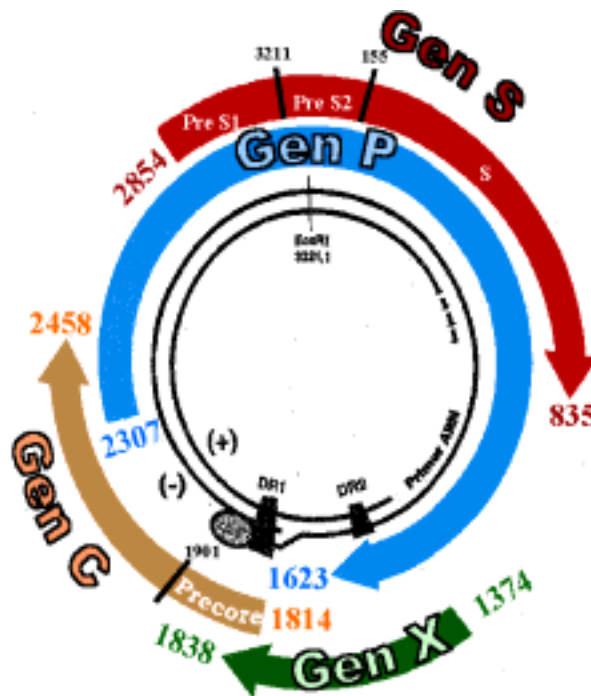


Figura 2. Esquema del genoma del VHB.

### **1.1.1.1. Características de los genes del VHB.**

Los 4 ORFs (C,P,S y X) del genoma del VHB están solapados de forma que toda la secuencia del genoma es codificante, y que los elementos reguladores están incluidos en secuencias codificantes. Este hecho confiere al genoma del VHB una gran capacidad codificante, 1.5 veces superior a la que tendría de no existir el solapamiento de genes (Miller y col., 1989). La organización del genoma del VHB se muestra en las Figuras 2 y 3.

#### ***1.1.1.1.1. El gen C o precore-core del VHB.***

Está situado entre las posiciones 1814-2458, y presenta dos códones de iniciación (ATG) en fase (en las posiciones 1814 y 1901) codificando dos proteínas, el HBcAg, componente de la cápsida viral, de 21.000 daltons, y un péptido de 16.000 daltons, el HBeAg. La secuencia corta situada entre los dos códones de iniciación se denomina pre C o precore.

#### ***1.1.1.1.2. El gen S del VHB.***

Está situado entre las posiciones 2854 y 835, donde la presencia de tres códones de iniciación en fase en el interior de la ORF (posiciones 2854, 3211 y 155) define tres regiones denominadas pre S1, pre S2 y S. Esta región codifica los péptidos de la envuelta del virión completo o partícula Dane y de las partículas no infectivas, esferas y filamentos. Estas proteínas están compuestas por las formas glicosiladas y no glicosiladas de 3 polipéptidos diferentes de 24.000, 33.000 y 39.000 daltons que son codificados respectivamente por la región S, la unión pre S2-S y la unión de las tres regiones pre S1-pre S2-S, o sea la ORF completa. Estos péptidos son: P-24/GP-27 (denominado S) (de la región S sola), GP-33/GP36 (denominado M) ambos glicosilados aunque en diferente proporción (de las regiones preS2+S), y P39/GP42 (denominado L) (de la ORF completa preS1+preS2+S). El gen S presenta una zona con una gran variabilidad de secuencia, situado aproximadamente entre las posiciones 2950 y 3125. La variabilidad antigénica de sus productos proteicos se ha utilizado para clasificar los diferentes aislados víricos dando lugar a los denominados subtipos del virus.

#### ***1.1.1.1.3. El gen P del VHB.***

Está situado entre las posiciones 2307 y 1623, cubriendo las tres cuartas partes del genoma, y solapa la porción carboxi-terminal del gen C, el gen S completo y la porción amino terminal del gen X. Codifica un polipéptido básico de unos 90.000 daltons que tiene asociadas las actividades de ADN polimerasa, transcriptasa inversa (dominio RT) y RNAasa (extremo carboxi terminal) (Miller y col., 1986; Radziwill y col., 1990). También codifica el cebador proteico para la síntesis de la cadena de ADN negativa, que permanece unido covalentemente a la cadena de ADN por su dominio amino-terminal (Bartenschlager y col., 1988; Bosch y col., 1988). Entre las regiones correspondientes a la proteína terminal y la polimerasa viral existe una zona de unas 300 bases no esencial, llamada región espaciadora.

#### ***1.1.1.1.4. El gen X del VHB.***

Está situado entre las posiciones 1374-1838 y codifica un polipéptido de 145-154 aminoácidos. Es una proteína reguladora que actúa como transactivador transcripcional (Murakami y col., 1999). Una proteína derivada del gen X ha sido detectada en el hígado de pacientes con hepatocarcinoma (Moriarty y col., 1985). Se ha documentado su conocida capacidad de inducción de carcinoma hepatocelular al ser transfectado este gen en ratones transgénicos y se ha sugerido un papel en la replicación viral (Haruna y col., 1991; Kim y col., 1991).

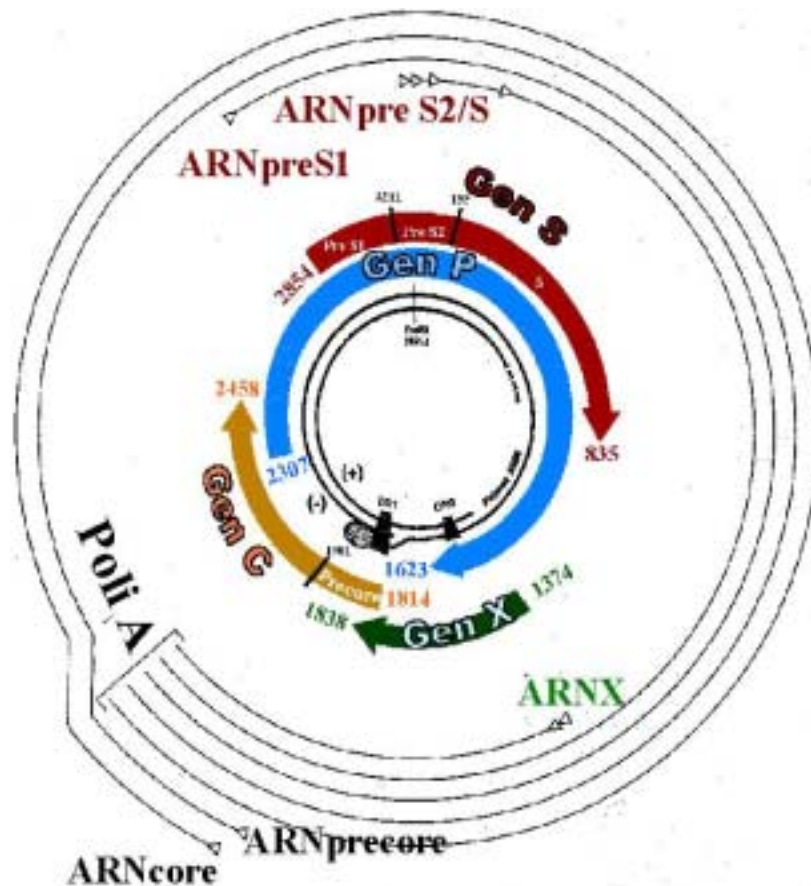


Figura 3. Esquema del genoma del VHB indicando los diferentes transcritos de ARN producidos en el ciclo viral.

### 1.1.1.2. Otros elementos del genoma del VHB.

Además de las regiones codificadoras de proteínas se han identificado otros elementos funcionales en el genoma de los hepadnavirus:

#### 1.1.1.2.1. Repeticiones directas cortas o DR.

Son pequeñas secuencias, de 11 pares de bases llamadas DR1 (entre las posiciones 1824 y 1834) y DR2 (entre las posiciones 1590 y 1600), separadas por 225 bases, que intervienen en la replicación viral (Miller y col., 1989) El extremo 5' de la cadena negativa se halla dentro del DR1 y el de la positiva en el extremo 3' del DR2 (Seeger y col., 1986). Estas secuencias se hallan fuertemente conservadas entre los diferentes aislados del VHB e incluso entre otros hepadnavirus (Figuras 2 y 3).

### ***1.1.1.2.2. Promotores de la síntesis de ARNm.***

Como se ha dicho anteriormente, la síntesis de cada uno de los ARNm está dirigida por su propio promotor. Un promotor forma parte integral de un gen y con frecuencia sólo tiene sentido en el contexto de su propio gen. La función de un promotor es mediar y controlar el inicio de la transcripción del gen que se localiza inmediatamente después del promotor (extremo 3'). Así pues, el promotor, por definición, marca el principio del primer exón de un gen. Frecuentemente el proceso de regulación implica otros elementos distintos del promotor (“enhancers”, “locus control region” y/o “scaffold/matrix attachment regions”). Cuando alguno de estos elementos se encuentra adyacente al promotor es difícil precisar hasta dónde llega el promotor. Es por ello que se considera al promotor como la región que es necesaria para lograr el inicio de la transcripción, aunque esta región puede no ser suficiente para determinar la regulación completa del gen (Werner, 1999). Los promotores para la ARN polimerasa II consisten en una caja TATA que se encuentra a unos 30 nucleótidos en dirección 5' respecto al lugar de inicio de la transcripción y de la región de inicio del ARNm, elemento mínimo del promotor que se solapa con el sitio de inicio de la transcripción (Kraus y col., 1996). En el VHB se han identificado 4 regiones promotoras que son: el promotor preS1, preS2, precore-core y X. En este trabajo sólo se estudiarán las variantes del promotor del gen precore-core.

#### ***1.1.1.2.2.1. El promotor del gen precore-core.***

El promotor del gen precore-core incluye al menos 232 nucleótidos, entre las posiciones 1591 a la 1822. En él se pueden distinguir dos regiones: el promotor básico del core y la “upper regulatory region” (región reguladora en 5' respecto del promotor básico del gen precore-core). El promotor básico del core es suficiente para un inicio preciso de la transcripción del ARNprecore y del ARNpregenómico. La “upper regulatory region”, situada en dirección 5' respecto al promotor básico del core, contiene secuencias reguladoras (Kramvis y col., 1999).

##### ***1.1.1.2.2.1.1. El promotor básico del core.***

El promotor básico del core (PBC) es un fragmento del genoma del VHB situado entre los nucleótidos 1742-1849, suficiente para el inicio de la transcripción del ARNcore y

el ARNprecore. Experimentos *in vivo* e *in vitro* demuestran que el PBC contiene elementos “cis-acting” que, de manera independiente, dirigen la transcripción de ambos ARN. Estos elementos se solapan parcialmente aunque son genéticamente distintos (Yu y col., 1996). El extremo 5' del ARNprecore se localiza en los nucleótidos 1785-1786 (Yaginuma y col., 1987; Günter y col., 1996) pero también en los nucleótidos 1791-1797 (Yaginuma y col., 1987; Honigwachs y col., 1989; Hiraga y col. 1994; Chen y col., 1995). El extremo 5' del ARNcore se localiza en la región  $1815 \pm 5$  (Yaginuma y col., 1987; Honigwachs y col., 1989; Hiraga y col. 1994; Chen y col., 1995; Günter y col., 1996).

La razón para esta multiplicidad de lugares de inicio del ARNprecore se cree que es debida a la falta de una única caja TATA en sentido estricto (TATAAA) dentro del PBC (Hiraga y col., 1994). En lugar de ello, el PBC presenta 3 cajas “TATA-like” (regiones ricas en AT) que controlan la transcripción del ARNprecore y una cuarta caja “TATA-like” que controla la transcripción del ARNpregenómico. Esta configuración recuerda a los promotores para la ARN polimerasa II (Buratowski y col., 1994) que tienen una caja TATA situada a unos 30 pb en dirección 5' con respecto al sitio de inicio de la transcripción y de la región de inicio del ARNm, elemento mínimo del promotor que se solapa con el sitio de inicio de la transcripción (Kraus y col., 1996).

Las tres regiones ricas en AT que controlan la transcripción del ARNprecore se localizan a 20-35 pb en dirección 5' con respecto a los sitios de inicio del ARNprecore: TA1. 5'-AGATTA-3' (nts 1750-1755), TA2. 5'-TTAAA-3' (nts 1758-1762) y TA3. 5'-TATTA-3' (nts 1771-1775); las tres pueden unir “TATA-binding protein” (proteína de unión a la caja TATA) (Chen y col., 1995; Yu y col., 1996). Se requieren las tres regiones para lograr una transcripción óptima del ARNprecore (Yu y col., 1996).

La cuarta de estas regiones, TA4. 5'-CATAAATT-3' (nts 1788-1795), tiene una doble función: contiene el elemento “TATA-like” para el ARNpregenómico (presenta un lugar de unión a la “TATA-binding-protein” para iniciar la transcripción 25-30 pb en dirección 5' en el sitio de inicio del ARNpregenómico) y también funciona como región de inicio para algunos de los ARNprecore (Chen y col., 1995; Yu y col., 1996). El extremo 5' de la caja “TATA-like” es el nt 1788 (Yu y col., 1996) mientras que la región de inicio del ARNprecore comprende los nts 1788-1791 (5'-CATA-3') (Chen y col., 1995; Yu y col., 1996), solapa el sitio de inicio del ARNprecore y recuerda la secuencia óptima de una región de inicio (5'-CA(T/G)T-3') (Kraus y col., 1996).



La secuencia 5'-CAAC-3' (nts 1817-1821), región de inicio del ARNpregenómico, solapa el sitio de inicio del ARNpregenómico y dos de sus bases coinciden con dos de las bases más importantes de la secuencia óptima de una región de inicio (Kraus y col., 1996). El PBC es suficiente para dirigir el inicio del ARNprecore y el ARNpregenómico. La transcripción de ambos ARN se regula de manera coordinada aunque, no obstante, se puede desacoplar (Buckwold y col., 1997; Yu y col., 1997). En la figura 4 se muestran los distintos elementos del PBC.

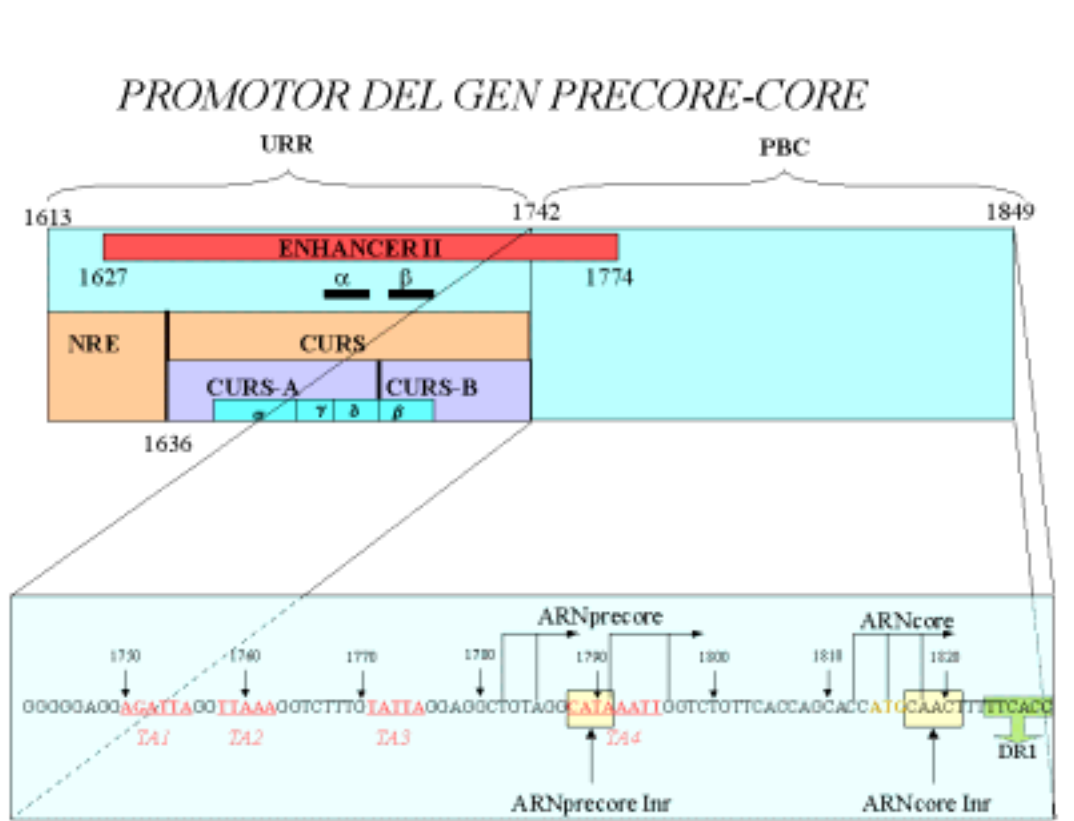


Figura 4. Distintas regiones identificadas en el promotor del gen precore-core.

URR: “upper regulatory region; PBC: promotor básico del core; CURS: “core upstream regulatory sequence”; NRE: Elemento regulador negativo; ARNprecore Inr: región de inicio del ARNprecore; ARNcore Inr: Región de inicio del ARNcore; DR1: Repetición directa corta 1.

#### 1.1.1.2.2.1.2. La “upper regulatory region”.

La “upper regulatory region” o región reguladora en 5’ respecto del PBC, es un fragmento situado entre los nts 1613-1742, que contiene elementos “cis-acting” (activadores próximos) positivos y negativos. La totalidad de la región estimula la transcripción del ARNprecore y del ARNpregenómico en células de hepatoma (Yu y col., 1996). Secuencias localizadas directamente en dirección 5’ respecto al PBC pueden regular positivamente este promotor con especificidad hepática mediante

elementos “cis-acting” situados en región conocida como “core upstream regulatory sequence” (secuencia reguladora del core en dirección 5’) (nts 1636-1742), secuencia que se solapa con el “enhancer II” (Guo y col., 1993, Baumert y col., 1996) y se encuentra en la “upper regulatory region”. También incluidas en la “upper regulatory region”, se encuentran secuencias localizadas todavía más alejadas en dirección 5’, que, mediante un elemento regulador negativo (nts 1613-1636), pueden regular negativamente la expresión del gen precore-core (Guo y col, 1993; Baumert y col, 1996; Gerlach y col, 1992). Secuencias dentro del “enhancer I” (nts 1074-1234) también pueden activar el PBC (Zhang y col., 1993; Zhang y col., 1994). De hecho, el promotor del gen precore-core (que contiene el “enhancer II”) es un promotor muy débil por sí mismo y requiere del “enhancer I” para incrementar su actividad (Lopez Cabrera y col., 1991).

#### ***1.1.1.2.2.1.2.1. “Core upstream regulatory sequence”.***

La “core upstream regulatory sequence” o secuencia reguladora del core en dirección 5’ (nts 1636-1742) actúa como región reguladora pero no como promotor. La “core upstream regulatory sequence” se puede dividir en dos dominios: “core upstream regulatory sequence A” (nts 1636-1703) y “core upstream regulatory sequence B” (nts 1704-1743). El primero de ellos puede, por sí solo, realizar un efecto regulador positivo en el PBC, aunque de menor intensidad que el “core upstream regulatory sequence” entero. Por otro lado la “core upstream regulatory sequence” puede subdividirse en motivos de secuencia unitaria: alfa ( $\alpha$ ) (nts 1646-1668), gamma ( $\gamma$ ) (nts 1671-1686), delta ( $\delta$ ) (nts 1687-1703) y beta ( $\beta$ ) (nts 1704-1714). Los motivos de secuencia alfa, gamma y delta regulan positivamente la actividad del PBC mientras que beta lo hace negativamente. El motivo de secuencia alfa se une a factores de transcripción (Lopez Cabrera y col., 1990; Wang y col., 1990; Yuh y col., 1991; Guo y col., 1993; Yuh y col., 1992, 1993). El “core upstream regulatory sequence” no media su actividad vía enhancer II el cual activa los promotores S y X independientemente de la orientación y la posición, sin embargo el “core upstream regulatory sequence” depende tanto de la orientación como de la posición para activar el PBC.

#### ***1.1.1.2.2.1.2.2. “Enhancer II”.***

Un “enhancer” es un fragmento de secuencia que presenta la capacidad de potenciar la transcripción independientemente de la orientación y de la posición. El “enhancer II” se compone de dos motivos de secuencia cuya interacción se requiere para su función: una caja alfa de 23 pb (nts 1646-1668) y una caja beta de 12 pb (nts 1704-1725) (Yuh y col., 1991). Estas dos cajas presentan una especificidad hepática bien diferenciada (Yuh y col., 1993). El “enhancer II” presenta *in vivo* dos funciones; por un lado estimula los promotores de los genes S y X, y, por otro lado, también puede actuar como “core upstream regulatory sequence” que activa el promotor del core de manera dependiente de la orientación y la posición (Yuh y col. 1991, 1993; Lo y col., 1994).

#### ***1.1.1.2.2.1.2.3. Elemento regulador negativo.***

El elemento regulador negativo (nts 1613-1636), que se encuentra en dirección 5’ respecto al “enhancer II” y al “core upstream regulatory sequence”, tiene la capacidad de actuar negativamente sobre estos dos elementos de secuencia en células diferenciadas de hígado, mostrando de esta manera una acción hepato-específica. El elemento regulador negativo se compone al menos de tres subregiones diferentes: alfa, beta y gamma, que actúan de forma sinérgica para suprimir la actividad del promotor del core. La actividad de los dos primeros depende del tipo de célula, puesto que son inactivos en células de línea celular humana no hepática y activos en células de hepatoma.

#### ***1.1.1.2.2.1.3. Especificidad hepática del promotor del gen precore-core.***

Se ha propuesto que la especificidad hepática del VHB viene determinada por la acción combinada del PBC y los “enhancers” I y II (Honigwachs y col., 1989). La especificidad hepática y la diferente regulación del promotor del gen precore-core es el resultado de la interacción entre sus elementos cis activadores con factores trans activadores presentes en varios tejidos y diferentes estadios de la diferenciación de los hepatocitos. Algunos factores de transcripción se unen a elementos del promotor del gen precore-core.

Muchos miembros de la superfamilia de receptores nucleares que son factores de transcripción, como el HNF4, RXR, PPAR, COUP-TF1 o ARP1, se unen al PBC y regulan de forma diferencial la síntesis del ARN<sub>precore</sub> y ARN<sub>core</sub> (Raney y col., 1997; Yu y

Mertz, 1997). El HNF4 inhibe la síntesis de ARNprecore, el PPAR estimula la síntesis del ARNcore y COUP-TF1 inhibe la síntesis de los dos ARNs. Se piensa que la síntesis de ARNprecore y ARNcore es dirigida por promotores separados y diferencialmente regulados (Yu y col., 1996). En la siguiente figura se representan los diferentes factores de transcripción que se unen al promotor del gen precore-core.

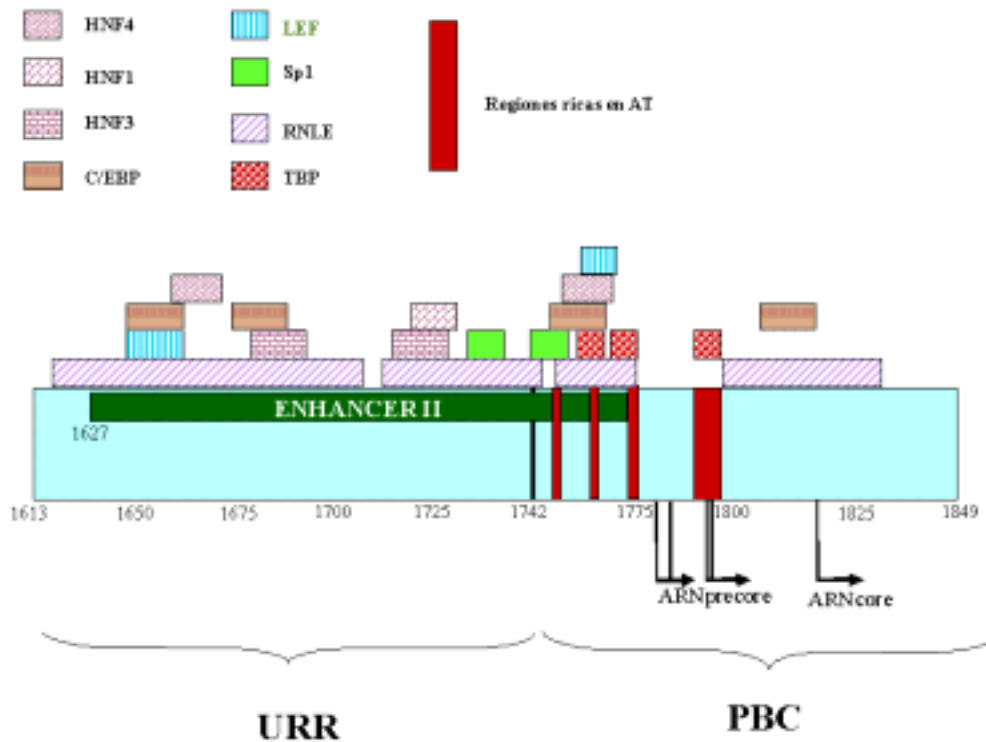


Figura 5. Mapa de los lugares de unión para factores de transcripción en el promotor del gen precore-core del VHB.

HNF: Factor nuclear del hepatocito; C/EBP: “CCAAT/enhancer binding protein”; LEF: liver-enriched factor; Sp1: Proteína Sp1 humana; RNLE: “rat nuclear liver extract”; TBP: “TATA-binding protein”; URR: “upper regulatory region”; PBC: promotor básico del core.

### 1.1.1.2.3. “Enhancer”.

Como se ha comentado previamente, un “enhancer” es un elemento intensificador de la transcripción. En el VHB se han descrito dos “enhancers”: el “enhancer I”, situado entre las posiciones 966 y 1308, dentro del gen P, y en zonas donde no hay superposición de genes (Huan y col., 1993; Shaul y col., 1985). Y el “enhancer II” que se encuentra localizado entre las posiciones 1627-1774, dentro del promotor del gen precore-core.

El “enhancer I” parece ser importante a dos niveles, en primer lugar a nivel nucleotídico, debido a que la unión de proteínas del virus o del huésped al “enhancer I”

incrementan la expresión de los genes virales, y, en segundo lugar, también a nivel proteico, al codificar aminoácidos muy específicos para la polimerasa viral (Miller y col., 1989). Los promotores del VHB bajo el control de este intensificador se han mostrado mucho más activos en células hepáticas diferenciadas que en otros tipos de células, habiéndose caracterizado factores específicos hepáticos para los cuales el “enhancer I” tiene lugares de unión (Trujillo y col., 1991). Las características y funciones del “enhancer II” se han comentado en el apartado 1.1.1.2.2.1.2.2.

#### ***1.1.1.2.4. Región que responde a los glucocorticoides.***

La región que responde a los glucocorticoides es una secuencia de 18 nucleótidos, situada dentro del gen S, entre las posiciones 2095-2110. Su función consiste en intensificar hasta en 5 veces la expresión génica en presencia de glucocorticoides. Este efecto se ha demostrado tanto en pacientes infectados, como en células en cultivo o en ratones transgénicos. (Tur-Kaspa y col., 1986).

#### ***1.1.1.2.5. Señal de poliadenilación.***

Se trata de una señal esencial para la terminación de la transcripción y la adición de colas poli-A al extremo 3' de los transcritos de ARN, que es utilizada por todos los transcritos mayores (Cattaneo y col., 1983). La señal de poliadenilación está situada al comienzo del gen C, entre las posiciones 1916 y 1960, aproximadamente 20 bases delante del extremo 5' de la cadena negativa de ADN, y comienza con una secuencia TATAAA. De esta manera todos los ARN transcritos del virus terminan en este lugar y poseen el mismo extremo 3'.

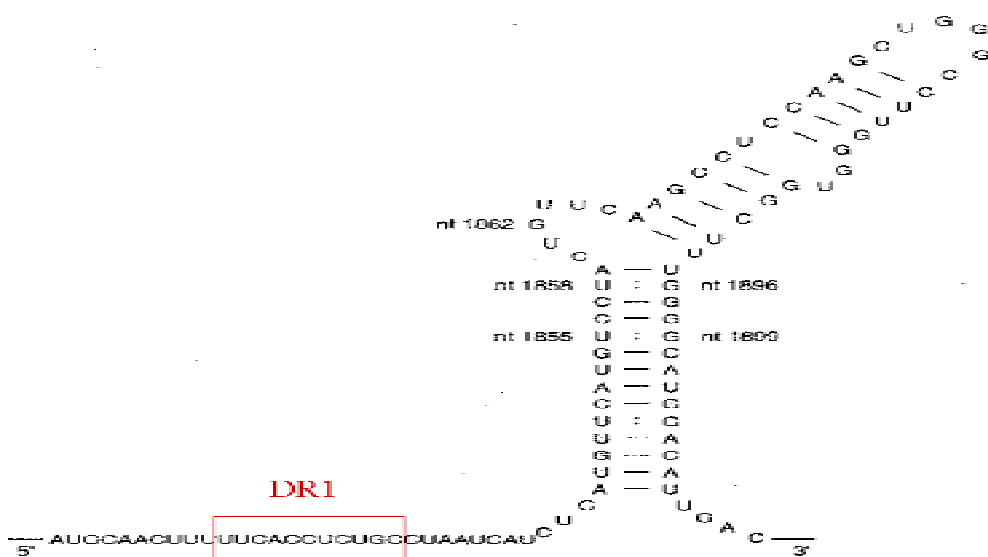
#### ***1.1.1.2.6. Secuencia análoga a la región U5 de los retrovirus.***

La secuencia del genoma del VHB análoga a la región U5 de los retrovirus se denomina de esta manera debido a su homología con las repeticiones largas del extremo 5' de los retrovirus. Se halla situada dentro de la región del precore, entre las posiciones 1855 y 1905, siendo la secuencia más conservada de todo el genoma del VHB. Consta de 62 nucleótidos, entre los que hay una secuencia de 25 consecutivos que permanecen invariables. Esta región se debe haber conservado sobre todo por su función reguladora a nivel nucleotídico pero no a nivel proteico. Se ha demostrado que el péptido precore, cuya secuencia coincide con esta región, no es esencial para la propagación del virus

(Carman y col., 1989; Ulrich y col., 1990); no obstante, se ha descrito una función inhibitoria de la síntesis del ADN viral para este péptido (Lamberts y col., 1993), no conociéndose la implicación de esta función con la conservación a nivel aminoacídico de la secuencia U5. Por otro lado, la región análoga a la región U5 se solapa completamente con la señal de encapsulación del ARNpregenómico (1847-1907) (Pollack y col., 1993), lo que podría justificar su fuerte conservación. A pesar de todo, la función propia de esta secuencia todavía está por esclarecer.

### 1.1.1.2.7. Señal de encapsulación en el ARNpregenómico.

La señal de encapsulación en el ARNpregenómico, llamada también “épsilon”, hace que la encapsulación del ARNpregenómico sea altamente selectiva para este transcrito, a diferencia del ARNprecore. La encapsulación es dependiente de los genes C y P, y de la señal “épsilon” que actúa en cis y que se encuentra entre las posiciones 1847-1907 en dicho ARNpregenómico, totalmente solapada con la secuencia análoga a la de la región U5 de los retrovirus (Junker-Niepmann y col., 1990; Pollack y col., 1993). Esta señal presenta una potencial estructura secundaria formada por dos regiones con fuerte apareamiento intracatenario, una región central formada por 6 bases desapareadas llamada "bulge" (joroba) y, en su extremo, otra región desapareada de 6 bases o "loop". Los estudios de Pollack y col. en 1993 han demostrado que el estado de apareamiento de los nucleótidos que forman esta estructura es más importantes que la propia secuencia de los mismos. En la Figura 6 se representa un esquema de la señal de encapsulación.

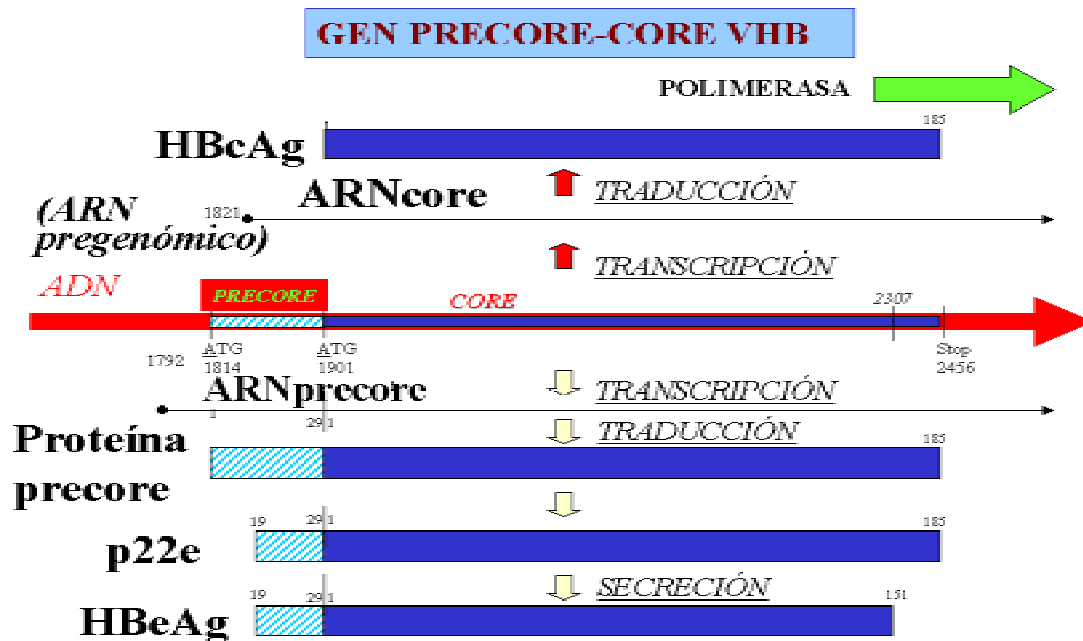


**Figura 6. Estructura secundaria de la señal de encapsulación del ARNpregenómico.**

**DR1: repetición directa corta; nt: nucleótido.**

### 1.1.2. PROTEÍNAS CODIFICADAS POR EL GEN PRECORE-CORE DEL VHB.

El gen precore-core o gen C, situado entre las posiciones 1814-2458 del ADN-VHB, presenta dos códigos de iniciación (ATG) que corresponden a las posiciones 1814 y 1901. La secuencia corta de ADN del VHB (87 nucleótidos) situada entre estos dos códigos se denomina precore. El gen precore-core se transcribe en dos ARNs: el ARNprecore de 3.5 kb y el ARNcore, algo más corto que el anterior (tiene 30 nucleótidos menos en el extremo 5'). El ARNprecore codifica el HBeAg mientras que el ARNcore codifica el HBcAg, la ADNpolimerasa viral y, de manera adicional, es utilizado por el VHB como ARNpregenómico, que se empaqueta con la ADNpolimerasa viral para formar las partículas virales, y que sirve también como molde para la retrotranscripción. En la Figura 7 está representado el gen precore-core con sus dos transcritos (ARNcore y ARNprecore) y sus productos proteicos correspondientes.

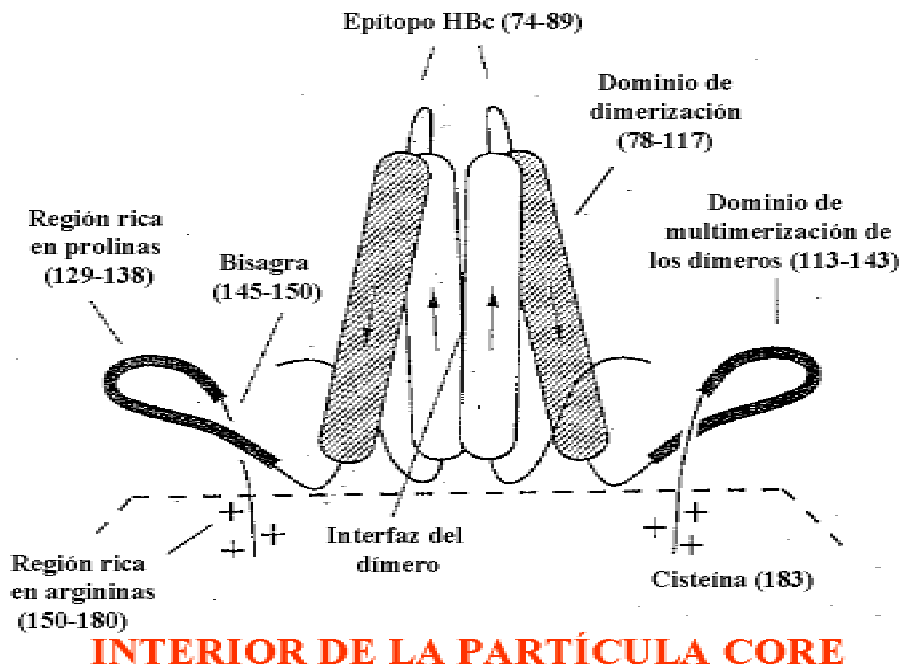


**Figura 7. Expresión del gen precore-core del VHB.**

### **1.1.2.1. El HBcAg del VHB.**

El HBcAg (22 Kd) se encuentra como componente interno de las partículas del VHB. Está formado por 185 aminoácidos en los subtipos adw y adw2 debido a una inserción de 6 nucleótidos entre las posiciones 2354-2359; mientras que en los demás subtipos está constituido por 183 aminoácidos. La proteína del core consiste en cuatro hélices alfa, con dos hélices interiores formando una horquilla antiparalela. Dos monómeros de proteína core forman un dímero (Zhou and Strading, 1992; Günther, 1999), y 90 o 120 dímeros se ensamblan para formar una partícula core icosaédrica de unos 28 nm de diámetro, que presenta en la superficie de la partícula viral la región de unión de la horquilla antiparalela, zona que se observa en forma de espículas por microscopía electrónica (Crowther y col., 1994; Günther, 1999). El epítipo del HBcAg inmunodominante para las células B (aminoácidos 74-89) (Salfeld y col., 1989) probablemente se encuentre localizado en o cerca de la zona superior de estas espículas. La proteína del core se puede dividir en dos dominios principales, el extremo N-terminal, hasta la posición 144, involucrado en la dimerización (dominio de dimerización) y el ensamble (dominio de multimerización de los dímeros), y el extremo C-terminal, rico en argininas (aminoácidos 150-180), que se localiza en el interior de las partículas (Seifer and Standring., 1994; Zlotnick y col., 1997). El extremo C-terminal es imprescindible para unirse al ARNpregenómico, para la replicación del genoma viral, y está relacionado con la fosforilación y el transporte nuclear de la proteína core (Nassal, 1992; Yeh y col., 1990).





**Figura 8.** Modelo tridimensional del dímero de la proteína del core (Böttcher y col., 1997; Conway y col., 1997). En la Figura se muestran, en lo que sería el exterior de una cápside viral, las dos hélices alfa centrales (cajas) que forman una horquilla antiparalela, la región relacionada con la dimerización de las partículas (gris), la zona del epítipo inmunodominante para las células B (epítipo HBc) y la región de multimerización de los dímeros (negro). En el interior de la cápside se encontraría el extremo C-terminal, región rica en argininas (cargada positivamente) relacionada con la unión al ARNpregenómico y la replicación viral.

La proteína core del VHB es una diana importante para la inmunólisis celular, mediada por células T, de los hepatocitos infectados por el VHB. Se conocen considerables evidencias experimentales de que, en los pacientes crónicos infectados por el VHB, el antígeno de la nucleocápside, HBcAg, es la diana para la citotoxicidad de los hepatocitos y la presencia intrahepática de linfocitos T-VHB específicos apoya de manera importante un mecanismo mediado por el sistema inmune.(Moreno y col., 2000).

### **1.1.2.2. El HBeAg del VHB.**

La segunda proteína codificada por el gen precore-core es el HBeAg, que se descubrió en 1972 como un antígeno soluble en el suero de pacientes infectados por el VHB, mostrándose física y antigénicamente diferente del HBsAg y del HBcAg (Magnius y col., 1972). El ARNprecore codifica la “proteína precore” que está constituida por la secuencia de aminoácidos del HBcAg y 29 aminoácidos adicionales (codificados por la región precore) situada en el extremo amino terminal. Esta extensión de 29 aminoácidos contiene una señal peptídica de 19 aminoácidos muy hidrofóbicos que se encarga de

dirigir la “proteína precore” al retículo endoplasmático (Ou y col., 1997). Al alcanzar el lumen, una peptidasa elimina esta señal, generándose una proteína, la p22e, que es transportada a través de la membrana del retículo endoplasmático al compartimento post-retículo endoplasmático –aparato de Golgi- donde, por acción de una aspartil-peptidasa en múltiples sitios del extremo carboxi terminal rico en residuos de arginina, se eliminan un número variable de aminoácidos, secretándose una población heterogénea de polipéptidos HBeAg con pesos moleculares comprendidos entre los 17 y los 22 Kd (Jean Jean y col., 1989; Wang y col., 1991; Ou, 1997). Parece ser que una fracción de la proteína p22e es devuelta desde el retículo endoplasmático al citoplasma (García y col., 1988; Yeh y Ou, 1991).

El HBeAg, una vez sintetizado, en general, tiene un peso molecular de 17 Kd y está constituido por 159 aminoácidos, pero en los subtipos adw y adw2 una inserción de 6 nucleótidos entre las posiciones 2354-2359 genera dos aminoácidos más. El HBeAg no es un componente estructural del virus, una vez sintetizado se segrega a la circulación, detectándose en suero siempre en forma libre, soluble y monomérico, generalmente unido a proteínas séricas. (Ou, 1997).

No se conoce la función del HBeAg en el ciclo biológico del VHB, habiéndose demostrado que esta proteína no es necesaria para la replicación del virus (Chang y col., 1987; Schilcht y col., 1987). Sin embargo, la conservación del gen del precore en todos los hepadnavirus parece confirmar que esta proteína tendría una función importante en el ciclo biológico de estos virus. Experimentos *in vitro* han descrito que la ausencia de expresión de la proteína precore da lugar a un aumento de la encapsulación o de la replicación del VHB. Este hecho se ha atribuido a la pérdida de un posible efecto regulador negativo de la proteína precore en estos procesos (Lamberts y col., 1993; Buckwold y col., 1996; Gudotti y col., 1996). Una posible explicación para este fenómeno sería que la p22e citosólica (precursor del HBeAg), muy similar a la proteína core, actuaría interfiriendo la encapsulación del ARNpregenómico, etapa esencial en la multiplicación del VHB (Buckwold y col., 1996; Scaglioni y col., 1997b). No obstante, este resultado no se ha observado en otros estudios (Tong y col., 1992). Otros autores sugieren que el HBeAg puede modular la compleja interacción entre el VHB y el sistema inmunitario del huésped y estaría implicado en la inducción y mantenimiento de la infección (Milich y col., 1990; Milich y col., 1993; Milich, 1997; Thomas y col., 1988). Con relación al papel del HBeAg en la inducción de la infección, estudios

realizados en modelos murinos transgénicos sugieren que el HBeAg puede atravesar la placenta y actuaría como un auto-antígeno, de manera que las células T específicas para el HBeAg experimentarían una selección negativa vía delección clonal o anergia. Un proceso análogo ocurriría con las células Th específicas para el HBcAg, dada la reacción cruzada de este antígeno con el HBeAg a este nivel tanto en ratones como humanos. De esta manera, se establecería tolerancia en las células Th para el HBeAg y el HBcAg (Milich, 1997). Estos autores proponen que este mecanismo sería el responsable del gran índice de cronicidad (90% aproximadamente) observado en los hijos de madres HBeAg positivas infectados en el periodo perinatal (Milich y col., 1993). Así, pues, la conservación del HBeAg podría representar una estrategia del virus para garantizar su persistencia durante la transmisión vertical del mismo, vía mayoritaria de transmisión del VHB en áreas donde esta infección es endémica. Estudios más recientes sugieren un mecanismo mediante el cual el HBeAg mantendría o induciría la cronicidad de la infección en la edad adulta. Este mecanismo se basa en resultados obtenidos con animales de experimentación en los que se observaba que el HBeAg es capaz de deplecionar las células tipo Th1 específicas para HBeAg y HBcAg, y potenciar las células tipo Th2. Estas últimas producen citoquinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10) que inhibirían la expansión de las CTL específicas para HBeAg y HBcAg, y las células Th1 necesarias para la eliminación del virus. De esta manera, el HBeAg inhibiría el proceso de eliminación del VHB, lo que conduciría a la persistencia del mismo (Milich, 1997).

Puesto que el HBeAg tiene gran parte de la secuencia de aminoácidos igual al HBcAg, ambas proteínas contienen determinantes antigénicos comunes; no obstante, estos determinantes en el HBeAg quedarían enmascarados por la unión de alta afinidad entre este antígeno y algunas proteínas séricas como la albúmina y la alfa 1 antitripsina. Cuando la proteína del core es ensamblada en partículas core, los determinantes del HBeAg quedan a su vez enmascarados y sólo se exponen a los anticuerpos por disrupción de estas partículas y liberación de las cadenas polipeptídicas. (Takahashi y col., 1980). Por este motivo no existe reacción cruzada entre los anticuerpos anti-HBe y anti-HBc.

### *1.1.3. CICLO BIOLÓGICO Y REPLICACIÓN DEL VHB.*

Cuando los viriones alcanzan las células hepáticas, el dominio pre S1, localizado en la superficie de la partícula viral, contacta con moléculas específicas no identificadas de la superficie celular del hepatocito (Bruss y col., 1996). La envoltura viral se rompe, libera la nucleocápside al citoplasma, y ésta se dirige al núcleo conducida por la señal de localización nuclear presente en la proteína del core (Yeh y col., 1993; Aiba y col., 1997). La nucleocápside se puede desintegrar en la membrana nuclear liberando el ADN viral para su posterior transporte al núcleo celular y, una vez en el núcleo de los hepatocitos, el genoma infectante se convierte en un ADN circular cerrado covalentemente (ADNccc) por acción de la polimerasa viral. La cadena negativa del ADNccc sirve de molde para la transcripción de los distintos ARN virales mediante la ARNpolimerasa II del hepatocito dirigida por los promotores y “enhancers” anteriormente señalados en los apartados correspondientes. Estos ARNs se transportan al citoplasma utilizando posiblemente proteínas celulares que interaccionan con elementos del ARN. Una vez en el citoplasma, todos los transcritos funcionan como ARNm para su traducción en las diferentes proteínas del VHB utilizando las mismas vías que los ARNm celulares. Por otro lado, uno de estos ARNm virales, el ARNcore, tiene además la función de ARNpregenómico al servir de molde para la retrotranscripción. En este proceso se sintetiza el genoma de ADN parcialmente de doble cadena a partir del ARNpregenómico del VHB. Para ello el ARNpregenómico interacciona con sus dos productos génicos (proteínas C y P) formando cápsides inmaduras de ARN viral en las cuales tiene lugar la retrotranscripción por acción de la proteína P que, a medida que sintetiza el ADN, va degradando el ARN que le sirve de molde mediante su actividad ARNasa (Nassal, 1999). La etapa clave para este proceso es la unión de la proteína P al ARNpregenómico en la señal de encapsulación situada en posición 5' del ARNpregenómico. La unión a la proteína P desencadena la adición de dímeros de proteína C, formándose las cápsides. Además, se sintetiza un pequeño oligonucleótido de ADN de 3-4 bases complementario a una parte de la zona denominada “bulge” o joroba de la señal de encapsulación. Este pequeño oligonucleótido actuará de “primer” en la síntesis de la cadena complementaria de ADN y será su extremo 5', proceso de retrotranscripción catalizado por la proteína P. Posteriormente se sintetiza la cadena complementaria a esta primera cadena de ADN. Finalmente, el ADN viral puede ser de nuevo liberado en el núcleo o bien las

nucleocápsides maduras (con ADN parcialmente de doble cadena) se recubren en el retículo endoplasmático con una envuelta lípido-proteica característica, son transportadas al aparato de Golgi y desde allí son liberadas al espacio extracelular. Probablemente la síntesis de ADN induzca un cambio conformacional en la cápside externa que permita la interacción entre la cápside y las proteínas de la envoltura externa (proteínas S) insertadas en la membrana del retículo endoplasmático (Summers y col., 1982).

Las proteínas de la envuelta (proteínas S) son proteínas de membrana que, después de ser sintetizadas en los ribosomas de los hepatocitos, inicialmente se insertan en la membrana del retículo endoplasmático. Posteriormente, la mayor parte de estas proteínas forman en el lumen del retículo endoplasmático partículas S no infecciosas compuestas sólo por proteína S y lípidos, que son exportadas al exterior por el mismo mecanismo que las partículas infecciosas.

Las diferentes etapas del ciclo biológico del VHB se representan en la Figura 9.

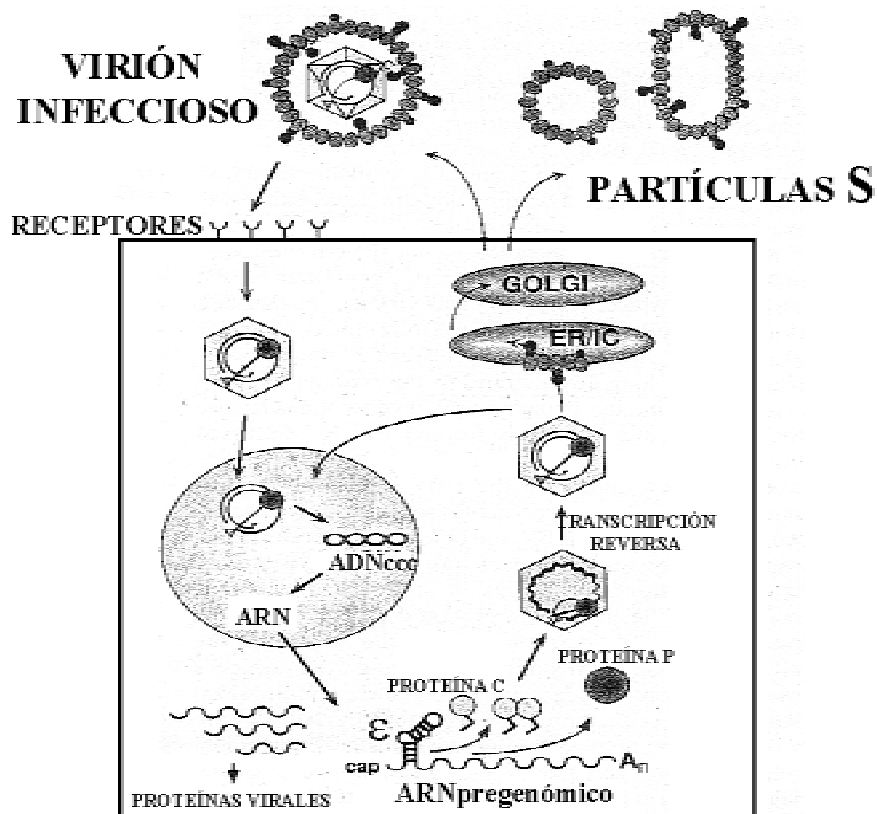


Figura 9. Ciclo biológico del VHB.

## **ER/IC: Retículo endoplasmático.**

### **1.1.3.1. Mecanismo molecular de la retrotranscripción.**

Como se ha dicho anteriormente, en primer lugar la proteína P se une a la señal de encapsulación del extremo 5' del ARN<sub>pregenómico</sub> para sintetizar un "primer" de 3-4 nucleótidos complementario de una parte de la "joroba" de la señal de encapsulación. Este "primer" está unido covalentemente a un residuo de Tyr del dominio aminoterminal de la proteína P (dominio TP) y la unión se mantiene durante todo el proceso (Figura 10 A). El complejo covalente se transloca a la región complementaria situada en la copia de la secuencia DR1 del extremo 3' del ARN<sub>pregenómico</sub> (Figura 10 B). A continuación el "primer" se elonga hasta completar la cadena negativa de ADN a la vez que el molde de ARN se degrada por acción de la actividad ARNasa de la proteína P. Esta acción ARNasa no afecta a los 15-18 nucleótidos del extremo 5' del ARN<sub>pregenómico</sub>, que no se verán degradados. Este pequeño fragmento de ARN no degradado que contiene la región DR1 del extremo 5', se transfiere posteriormente a la región complementaria DR2 de la recién sintetizada cadena negativa de ADN. De esta forma este pequeño fragmento de ARN sirve de "primer" para la cadena positiva de ADN elongándose hasta el extremo 5' de la cadena negativa, el cual está constituido por el pequeño cebador inicial de cuatro nucleótidos unido covalentemente a la proteína P. Más tarde ocurre un cambio en el molde para la elongación, se separa el DR1 en 5' de la cadena negativa de su secuencia complementaria en el pequeño fragmento de ADN positivo sintetizado hasta este momento. A este último fragmento de cadena positiva, que se corresponderá a una secuencia DR1, se le une la correspondiente secuencia complementaria también DR1 pero del extremo 3' de la cadena negativa. De esta manera se produce la elongación que da lugar a la cadena positiva formándose la estructura característica de ADN parcialmente bicatenario de los viriones extracelulares del VHB (Nassal, 1999) (Figura 11).

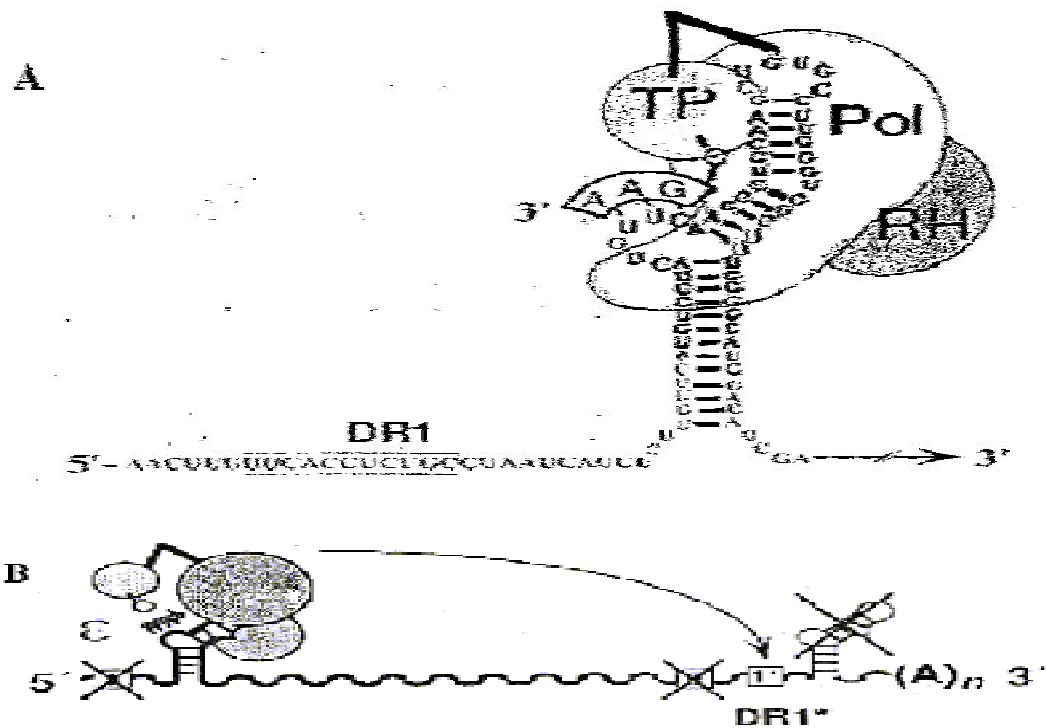


Figura 10. A. Esquema del complejo proteína P-síntesis de encapsulación con sus tres dominios: dominio terminal de la proteína P (TP), ADNpolimerasa (Pol) y ARNasa (RH). También se muestra el pequeño "primer" de 3-4 nucleótidos complementario de una parte de la "joroba" de la síntesis de encapsulación, primer que permanece unido covalentemente a un residuo de Tyr de la proteína.

B. El complejo covalente se transloca a la región complementaria situada en el DR1\* del extremo 3' del ARNpregenómico.

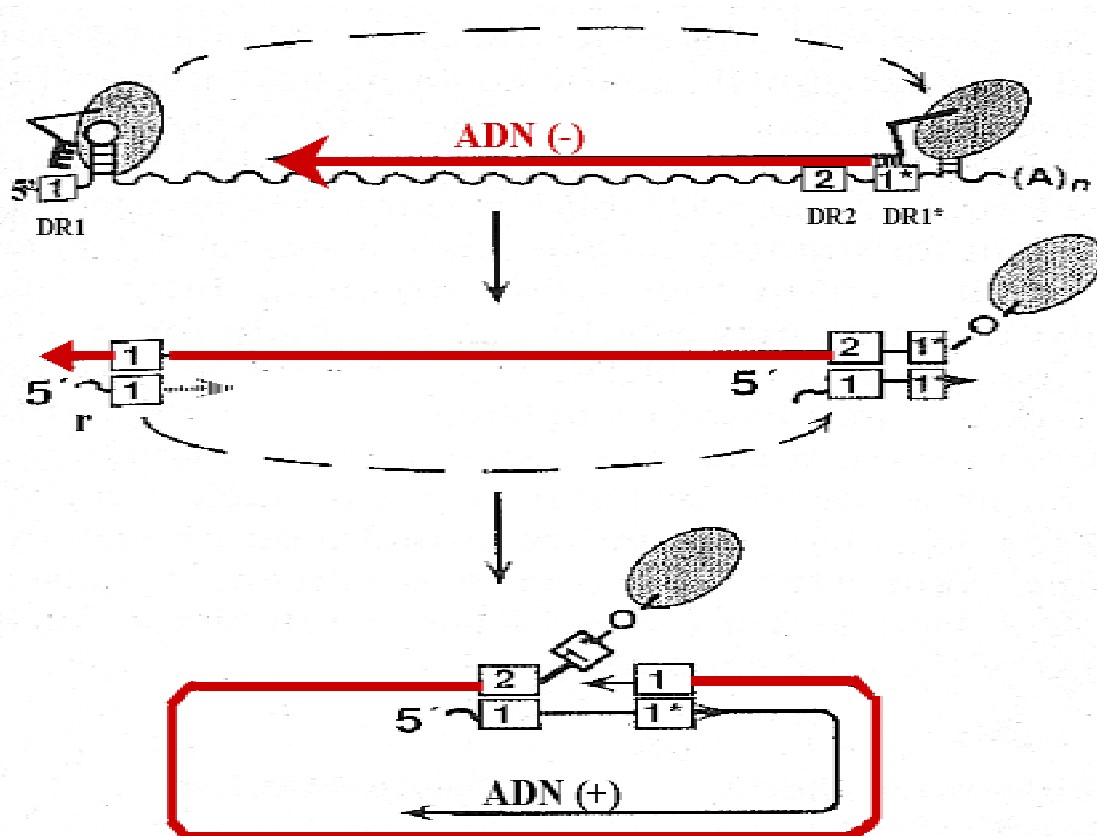


Figura 11. Formación del ADN del VHB mediante retrotranscripción del ARNpregenómico.

r: 15-18 nucleótidos que contiene la región DR1 del extremo 5' del ARNpregenómico y que no es degradado por la actividad ARNasa de la proteína P durante el proceso de replicación.

1: DR1 del extremo 5'; 2: DR2; 1\*:DR1 del extremo 3'.

#### 1.1.4. VARIABILIDAD GENÓMICA DEL VHB.

##### 1.1.4.1. Variabilidad viral.

La evolución genética ocurre en todos los virus pero a distintas velocidades, de manera que los virus ADN son relativamente más estables que los virus ARN, puesto que los primeros presentan, de promedio,  $10^{-9}$  sustituciones/ sitio año mientras que en los virus ARN esta tasa de mutaciones es de  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  sustituciones/ sitio año. Los hepadnavirus, aunque clasificados como virus ADN, requieren un paso de retrotranscripción para generar un ARN intermedio durante la replicación y, por tanto, su velocidad de mutación ( $2 \times 10^{-5}$  sustituciones/ sitio año) es mayor que para los virus ADN convencionales y del mismo orden que algunos virus ARN (Brunetto y col., 1999).

##### 1.1.4.1.1. Evolución filogenética del VHB.

A partir de un predecesor común, el genoma del VHB ha ido divergiendo de acuerdo con la distribución de la especie humana en los distintos continentes. Las primeras



indicaciones de la heterogeneidad de la secuencia del VHB se basaron en la existencia de diferentes determinantes antigénicos del HBsAg. Además del determinante a, común a todos los tipos de HBsAg, se conocen los determinantes mutuamente exclusivos d/y y w/r (Le Bouvier, 1971). De esta manera se clasifica el VHB en cuatro subtipos (adw, adr, ayw, ayr). Pero esta clasificación sólo refleja parcialmente la relación filogenética del VHB. La clasificación genética basada en la comparación de genomas completos clasifica todas las variantes del VHB en 7 grupos o genotipos (A-G) con una distribución geográfica característica. La correspondencia del serotipo con el genotipo es correcta cuando se conoce el origen geográfico del VHB (Okamoto y col., 1988; Orito y col., 1989; Norder y col., 1992; Stuyver y col., 2000) (Tabla 2).

**Tabla 1. Distribución de los genotipos del VHB. Relación con los subtipos virales.**

Genotipo A	adw	USA, Europa Central y del Norte, Sur de África
Genotipo B	adw y adr/ayr	Este de Asia
Genotipo C	adw y adr/ayr	Este de Asia
Genotipo D	ayw	Mediterráneo, Oriente próximo y Medio, Sur de Asia
Genotipo E	ayw	África
Genotipo F	adw	América Central y América del Sur, Polinesia
Genotipo G	adw	USA, Francia

Las diferencias en la secuencia nucleotídica entre los distintos genotipos son siempre superiores a un 8% (entre un 8.8% y un 14.5%) mientras que dentro de cada genotipo las diferencias son considerablemente menores (1.5% - 4.2%) (Norder y col., 1994).

#### ***1.1.4.1.2. Quasiespecies.***

El término quasiespecie fue introducido para referirse a las diversas poblaciones ARN que evolucionan rápidamente y que compiten unas con otras (Domingo, 1985). El generador principal de las quasiespecies es la retrotranscriptasa viral, aunque no se ha podido estudiar su grado de fidelidad durante el proceso de retrotranscripción por causa de la dificultad en su purificación. Bajo este punto de vista, una quasiespecie vírica puede verse como un enjambre de variantes que se pueden encontrar en un huésped y a partir de este “pool” se generan diferencias en el genotipo y el fenotipo. Para un paciente infectado, en un momento dado el “pool” genético de la población vírica consiste en al menos una secuencia predominante que coexiste con una gran variedad de secuencias no predominantes que difieren de la mayoritaria en unas pocas mutaciones

puntuales o deleciones. Este hecho ha sido probado utilizando la amplificación por PCR de genomas del VHB, procedente de tejidos infectados y evitando la adaptación de los virus al cultivo celular (Domingo y Holland, 1993). Cambios en el ambiente pueden desplazar la secuencia predominante seleccionando una secuencia que hasta ese momento había sido minoritaria, convirtiéndola en mayoritaria. Los virus en quasiespecie están dotados de una enorme capacidad para adaptarse a los cambios en el medio y, como consecuencia, en un momento dado puede ser seleccionada una variante que presente un fenotipo completamente distinto del que se había observado al principio de la infección, incluso avirulento. Otra consecuencia de la existencia de quasiespecies es la posibilidad de encontrar distintas secuencias mayoritarias en diferentes compartimentos corporales. El VHB cumple todas estas características para poder ser considerado una quasiespecie. Las mutaciones ocurren al azar a lo largo del genoma del VHB y la selección de una sobre las otras ocurrirá cuando garantice una ventaja biológica para el mutante durante el ciclo de replicación o en la interacción huésped-virus. La selección de una cepa mutante parece ser algo frecuente como adaptación del virus a la acción del sistema inmunitario y/o la terapia antiviral (Brunetto, 1999). Como consecuencia se podrían producir alteraciones en el tropismo del tejido, persistencia de la replicación viral o cronificación de la infección.

#### **1.1.4.2. Variantes genómicas del VHB.**

Como se ha comentado previamente, en el genoma del VHB se encuentran los genes precore-core, P, S y X, de los que se conocen variantes genómicas para todos ellos. Debido al hecho que el virus no parece ser directamente citopático, ya que existen casos con replicación viral y sin enfermedad hepática (Lok y col., 1985; Millich y col., 1990), las alteraciones debidas a estas variedades del VHB parecen estar mediadas por el diferente comportamiento de la respuesta inmune; como el posible escape de la eliminación por parte de los linfocitos T citotóxicos por parte de los hepatocitos infectados por un mutante del gen C, o la ausencia de respuesta frente a la vacuna con HBsAg y la posibilidad de infección por una mutante de la región S. En este trabajo se estudiarán las variantes genómicas del PBC y de la región del precore del gen precore-core.

#### ***1.1.4.2.1. Variantes en el promotor del gen precore-core del VHB.***

El PBC del VHB regula la replicación del virus y la síntesis de HBeAg dirigiendo la transcripción de dos ARNm diferentes: el ARNprecore, a partir del que se sintetiza la proteína precursora del HBeAg, y el ARNcore a partir del que se sintetizan las proteínas P y C, y que sirve también como ARNpregenómico. El PBC presenta lugares de unión para varios factores de transcripción de la superfamilia de los receptores nucleares, incluyendo el factor nuclear 4 del hepatocito (HNF4) y el COUP-TF1 (“chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor 1”) Esos lugares de unión son importantes para la actividad hepato-específica del promotor y la regulación del inicio de la transcripción del ARNcore versus ARNprecore (Raney y col., 1997; Yu y Mertz, 1997).

Se han identificado dos regiones muy conservadas en el PBC localizadas entre las posiciones 1770-1808 y 1813-1849. En la primera de estas regiones se encuentra el lugar de inicio para el ARNprecore y también la región TA4, además de expresar un dominio de la proteína X que se ha demostrado esencial para su función transactivadora (Arii y col., 1992; Koike y Takada, 1995). La segunda de estas regiones contiene el lugar de inicio para el ARNpregenómico, codifica el extremo C-terminal de la proteína X, se solapa con el extremo 5' del ORF del precore y contiene la región DR1.

A continuación se describen las variantes más frecuentes detectadas en la secuencia del PBC.

##### ***1.1.4.2.1.1. Posiciones 1762 y 1764.***

La transversión de una A a una T en la posición 1762 y la transición de una G a una A en la posición 1764 son las mutaciones descritas con mayor frecuencia en el PBC y estas dos sustituciones suelen aparecer conjuntamente. Estudios *in vitro* muestran que la presencia de esta doble mutación disminuye la producción de ARNprecore en un 50-70% y, consecuentemente, la producción de HBeAg (Buckwold y col., 1996; Moriyama y col., 1996; Scaglioni y col., 1997; Günther y col., 1998). Esta doble mutación convierte el sitio de unión del LEF (“liver-enriched factor”), heterodímero compuesto por COUP-TF1 y un LEF no identificado, en un lugar de unión para el HNF1 (Li y col., 1999). En un modelo *in vitro*, variantes con solo la mutación en la posición 1764 todavía retienen capacidad de unión para el LEF, aumentan ligeramente la producción

de ARNprecore y disminuye la replicación viral. En este mismo estudio, la mutación aislada en la posición 1762, al igual que la doble mutación, impide la unión de LEF, reduce la producción de ARNprecore y aumenta la replicación viral. De esta manera, la selección de la doble mutación sobre la mutación en 1762 podría ser debida a su efecto en la secuencia de la proteína X. En un trabajo posterior, realizado en cultivos celulares, los mismos autores observaron que el sitio de unión del LEF no es importante para la transcripción del ARNprecore y del ARNcore, que mutaciones en la proteína X debidas a esta doble mutación suprimen la expresión del gen precore-core y, por último, que la creación del sitio para el HNF1 recupera la producción de ARNcore pero no la de ARNprecore (Buckwold y col., 1997; Li y col., 1999).

En cuanto a la influencia de esta doble mutación en la transcripción del ARNpregenómico y la replicación viral, los resultados *in vitro* son discordantes. Casi todos los estudios encuentran que no hay una influencia significativa en la producción de ARNpregenómico (Nishizono y col., 1995; Buckwold y col., 1996; Scaglioni y col., 1997b; Günther y col., 1998). Algunos de estos estudios (Buckwold., 1996; Scaglioni y col., 1997b) encuentran una mayor replicación del VHB (hasta 5 veces más) debido a un aumento en la encapsulación del genoma, aumento que atribuyen a la menor expresión del HBeAg y, como consecuencia, una posible menor interacción entre el p22e citosólico y la proteína C, mientras que otros autores no encuentran efecto alguno en la replicación del VHB (Günther y col., 1998). Por otro lado, en algunos trabajos se observa un aumento en la replicación viral por una mayor producción de ARNpregenómico y de partículas core (Moriyama y col. 1996).

#### 1.1.4.2.1.2. Posiciones 1753-1757.

Estas posiciones se encuentran en la región TA1. Se ha propuesto que podría existir una estructura secundaria del ARNpregenómico que abarcaría desde la posición 1742 a la posición 1847 y que las mutaciones de las posiciones 1762 y 1764 provocarían cambios en esta estructura que representaría posibles cambios en su funcionalidad (Kidd-Ljunggren y col., 1997). Los mismos autores sugieren que los nucleótidos 1751-1757 forman parte de un tallo en dicha estructura y que las mutaciones en esta región debilitarían su unión por lo que se abriría más fácilmente este tallo en el proceso de retrotranscripción facilitando la replicación viral.

#### 1.1.4.2.1.3. Posiciones 1809-1812.

Las mutaciones en estas posiciones se han descrito en muy pocos pacientes infectados por el VHB, excepto en un estudio realizado en África de Sur donde se encontraron cambios en estas posiciones en el 80% de las secuencias analizadas. Sobre este resultado los autores se inclinan a pensar que las mutaciones en esta región representarían la variante normal en la población estudiada por ellos (Baptista y col., 1999).

#### 1.1.4.2.1.4. Otras alteraciones en la secuencia del PBC.

En la secuencia del PBC se han descrito al menos 20 deleciones distintas que afectan a las regiones TA1, TA2 o ambas, y que se solapan con lugares de unión para factores de transcripción (Günther, 1999). También se han descrito inserciones en el PBC (Laskus y col., 1994; Pult y col., 1997). En un paciente con una exacerbación fulminante de la CH, una inserción provocaba la aparición de un nuevo lugar de unión para el HNF1 y una gran replicación viral. No obstante la frecuencia de todas estas alteraciones en los trabajos publicados es baja

#### 1.1.4.2.1.5. Significado clínico de las variantes en el promotor básico del gen precore-core del VHB.

La mayor parte de los trabajos en pacientes infectados con el VHB sobre las mutaciones en el PBC proceden de Japón y China, por lo que se dispone de poca información sobre la prevalencia de estas mutaciones en otras partes del mundo. Además, y debido a la diferente distribución geográfica de los genotipos del VHB, tampoco se tienen datos suficientes como para establecer, por una parte, una posible relación entre la aparición de mutaciones en el promotor del gen C con el genotipo viral, y, por otro lado, la influencia del área geográfica en la aparición de estas mutaciones, así como su significado clínico. Otro de los inconvenientes en la mayoría de estos estudios es que se limitan al análisis de las mutaciones de las posiciones 1762 y 1764. En los trabajos realizados en Japón y China en diferentes grupos de pacientes, encontraron en pacientes con hepatitis crónica HBeAg positivo entre un 100% y un 49% de casos con mutaciones, en pacientes con hepatitis crónica HBeAg negativo entre un 80% y un 55%, en portadores asintomáticos HBeAg positivo entre un cero y un 26%, en portadores asintomáticos HBeAg negativo entre un 24% y un 70%, y, finalmente, donde

todos parecen coincidir, es que en pacientes con CH o HCC la prevalencia siempre supera el 80% (Chan y col., 2000; Hou y col., 1999; Kurosaki y col., 1996; Okamoto y col., 1994; Takahashi y col., 1999). Trabajos más recientes realizados en estos países, donde los genotipos del VHB predominantes son el B y el C, observaron que las mutaciones en las posiciones 1762 y 1764 se relacionaban con un daño hepático más severo y que el genotipo C se asociaba con una inflamación hepática más pronunciada y una mayor frecuencia de mutaciones en las posiciones 1762 y 1764 (Lindh y col., 1999; Orito y col., 2001). Últimamente se ha publicado un estudio en un área geográfica próxima a la nuestra, en Francia, donde los genotipos mayoritarios son el A y el D. En este trabajo encuentran, en pacientes con hepatitis crónica, un 33% de pacientes HBeAg positivo con mutaciones en las posiciones 1762 y 1764, y un 65% en los pacientes HBeAg negativo. Además señalan que en los pacientes HBeAg negativo de genotipo A la proporción de casos con mutaciones en las posiciones antes indicadas es superior a la encontrada para los pacientes de genotipo D del mismo grupo (75% vs 55%) (Grandjacques y col., 2000).

#### ***1.1.4.2.2. Variantes de la región precore del VHB.***

La existencia de variantes de la región precore incapaces de producir la proteína P25, precursor del HBeAg, es conocida desde el año 1989 cuando se identificó la sustitución de una única base en el codon 28 (posición 1896) de la región precore del virus, convirtiendo un codon TGG para el Trp en un codon stop traduccional TAG (Carman y col., 1989). Se han descrito otros cambios en la región precore en pacientes HBeAg negativos, incluyendo la pérdida del codon de iniciación de esta región y alteraciones por cambio de pauta de lectura debido a inserciones o deleciones (Okamoto y col., 1990).

Resulta interesante el hecho de que de los 10 sitios donde una mutación puntual daría lugar a un codon de "stop" dentro de la secuencia precore (nucleótidos 4, 21, 36, 42, 52, 69, 77, 78 y 83 del gen C) el más común, un 90%, es el cambio observado en la posición 1896 (nucleótido 83 de este gen) (Okamoto y col., 1990). Este hecho puede explicarse por la secuencia en esta zona, en la que existen cuatro G seguidas, posiciones 1896 a 1899, por lo que constituye un "punto caliente" para este tipo de mutaciones. De hecho, se han documentado cambios en todas las G de esta zona, siendo siempre sustituciones del mismo tipo G→A (Carman y col., 1993). En pacientes del área

mediterránea se ha descrito una segunda mutación en el codon 29 (posición 1899), último de la región precore, también de una G por una A, que frecuentemente aparece junto con la mutación del codon 28.

Además de la mutación en la posición 1896 se han descrito otras que también impiden la expresión del HBeAg. De estas mutaciones, las más frecuentes alteran el codon de iniciación (Fiordalisi y col., 1990; Okamoto y col., 1990; Laskus y col., 1993). Con menor frecuencia se ha descrito la aparición de un codon “stop” en el segundo triplete del precore debido al cambio de una C por una T en la posición 1817 (CAA→TAA) (Santantonio y col., 1991; Laskus y col., 1993). También con una frecuencia baja se ha descrito en el codon 28 otras formas de codon “stop” (TAA o TGA) (Miska y col., 1993; Parvez y col., 2001). Esporádicamente se han observado inserciones y deleciones en diferentes puntos de la región precore que causan cambios en la pauta de lectura de la proteína precore, impidiendo la expresión de la misma. En la Tabla 2 se exponen las mutaciones descritas en la región del gen C.

#### 1.1.4.2.2.1. Significado clínico de las variantes de la región del precore del gen precore-core del VHB.

La región del precore codifica la secuencia señal que conduce a la proteína precursora del HBeAg al retículo endoplasmático y, además, forma parte de la señal de encapsulación (posiciones 1847 hasta 1907) que, como se ha visto, interviene en la replicación del VHB. En la señal de encapsulación la posición 1896 se encuentra en el brazo inferior, enfrentada a la posición 1858 (Figura 6). Durante el curso de la infección por el VHB es frecuente la aparición de variantes que impiden la expresión del HBeAg que, se considera, sería debida a un mecanismo de escape inmunológico por parte del VHB. La prevalencia de las variantes del precore que impiden la expresión del HBeAg, fundamentalmente en la posición 1896, presenta una distribución geográfica definida, de manera que se ha demostrado una menor prevalencia en áreas donde predomina el genotipo A (norte de Europa, USA y el sur de África), un subgrupo del genotipo C (Thailandia, Malasia, Vietnam) y el genotipo F (América del Sur), debido a la presencia en estos genotipos de una C en la posición 1858, con lo que la señal de encapsulación perdería estabilidad si se diera el cambio en la posición 1896 de una G por una A. Al contrario que en estos genotipos, en los demás predomina una T en la posición 1858, lo

que posibilita en mayor medida la aparición de una A en la posición enfrentada, 1896 (Alestig y col., 2001).

La mutación de la posición 1896 se ha detectado tan sólo en un 10% de los pacientes con hepatitis fulminante en USA y entre un 12-27% de casos con hepatitis crónica activa en Europa y USA, mientras que esta proporción supera el 50% en pacientes con hepatitis crónica activa en Asia, África, Sur de Europa y Oriente próximo (Hunt y col., 2000). Los datos recogidos de estudios transversales y longitudinales demuestran que las variantes de la región del precore que impiden la expresión del HBeAg aparecen particularmente en el proceso de seroconversión a anti-HBe (Günther y col., 1999).

Se han publicado numerosos trabajos que analizan la relación entre la presencia de variantes en el precore y la lesión hepática. Un trabajo realizado con pacientes japoneses concluía que las mutaciones en el precore en las posiciones 1896 y 1899 se asociaban de manera común con la hepatitis fulminante por el VHB y podrían contribuir a su patogénesis (Hasegawa y col., 1991). Estudios posteriores no encontraron relación entre la presencia de variantes que impiden la expresión del HBeAg y la severidad de la lesión hepática (Akarca y col., 1994; Ballard y col., 2000; Knöll y col., 1999; Lorient y col., 1995; Tur-Kaspa y col., 1992). Por otro lado, Lindh y col. en el año 1996 describieron que los pacientes HBeAg negativo con la variante mutada del precore en la posición 1896 presentaban menor lesión hepática que aquellos pacientes con una C en la posición 1858 y sin la variante mutada de la posición 1896. Sin embargo, en un estudio longitudinal realizado en niños HBeAg positivo que durante el seguimiento seroconvierten, se observó que aquéllos que desarrollaban la mutación en la posición 1896 tendían a presentar valores más elevados de ALT y mayor daño hepático (Chang y col., 1998). Finalmente, en algunos estudios se describe una relación entre una enfermedad hepática más severa y la aparición de la variante mutada en la posición 1899 (Hou y col., 1999; Tillman y col., 1995).

En cuanto a las mutaciones que impiden el inicio de la transcripción (posiciones 1814 a 1817) la bibliografía no es tan extensa como sobre la mutación de la posición 1896. Un estudio realizado en Grecia en pacientes HBeAg negativo que ya presentaban la variante mutada de la posición 1896, indicaba que una proporción significativa (23%) de los mismos desarrollaban mutaciones en las posiciones iniciales del precore que impiden la expresión del HBeAg, lo que parecía asociarse con un aumento en la replicación viral y una enfermedad hepática más severa. Además, y de manera



interesante, en este estudio se observó que los pacientes HBeAg negativo con enfermedad hepática activa, las mutaciones en el inicio del precore aparecían en un 45% de los casos con picos de ALT y sólo en el 15% de los pacientes con ALT persistentemente elevada (Laras y col., 1998).

**Tabla 2. Mutaciones en la región del precore del gen C del VHB (Brunetto y col., 1999).**

TIPO DE MUTACIÓN	NUCLEÓTIDO SUSTITUIDO	POSICIÓN	CAMBIO DE AMINOÁCIDO	EFECTO
Transversión	A→C	1814	Met→Leu	Fallo la iniciación del precore
Transversión	A→T	1814	Met→Leu	Fallo la iniciación del precore
Transición	T→C	1815	Met→Thr	Fallo la iniciación del precore
Transversión	G→T	1816	Met→Ile	Fallo la iniciación del precore
Transversión	G→A	1816	Met→Ile	Fallo la iniciación del precore
Transición	C→T	1817	Gln→Stop	Supresión de la síntesis del precore
Transición	A→G	1818	Gln→Arg	Indeterminado
Inserción	TT	1821-1825	**	Cambio en pauta de lectura a partir del codon 5 y stop en codon 9
Inserción	TT	1825-1826	**	Cambio en pauta de lectura a partir del codon 5 y stop en codon 9
Transición	T→C	1836	Leu→Pro	Mutación del codon stop del gen X
Transición	A→G	1838	Ile→Val	Mutación del codon stop del gen X
Transversión	T→A	1839	Ile→Asn	Indeterminado
Delección	T	1839	**	Cambio en la pauta de lectura a partir del codon 9 y stop en codon 33
Inserción	T	1839-1840	**	Cambio en la pauta de lectura a partir del codon 9 y stop en codon 33
Transversión	A→T	1846	Thr→Gly	Indeterminado
Transición	C→T	1856	Pro→Ser	Se aparea con la posición 1898 para estabilizar la señal de encapsulación
Transición	T→C	1858	Sin cambio	Posición dependiente del genotipo viral
Transversión	G→T	1862	Val→Phe	Indeterminado
Transversión	A→T	1872	Lys→Stop	Supresión en la síntesis de HBeAg
Transición	G→A	1888	Sin cambio	Indeterminado
Inserción	36 nt	1895-1896	**	Codon stop
Transición	G→A	1896	Trp→Stop	Supresión de la síntesis de HBeAg
Transición	G→A	1897	Trp→Stop	Supresión de la síntesis de HBeAg
Transición	G→A	1896	Trp→Stop	Supresión de la síntesis de HBeAg
	G→A	1897		HBeAg
Transición	G→A	1898	Gly→Ser	Indeterminado
Transición	G→A	1899	Gly→Asp	Indeterminado

**\*\*No se indica el cambio de aminoácido debido a que la mutación provoca un cambio en la pauta de lectura.**

## **1.2. PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN POR EL VHB.**

El VHB es un virus no citopático, hepatotrópico, que puede causar una amplia gama de manifestaciones clínicas que van desde hepatitis aguda a hepatitis crónica y carcinoma hepatocelular (Chisari y col., 1995). Se ha considerado a la respuesta inmune como responsable tanto de la eliminación del virus como de la patogénesis de la enfermedad durante la infección. En los pacientes que desarrollan una hepatitis aguda por VHB y que eliminan completamente el virus, se observa una respuesta vigorosa, policlonal y multiespecífica por parte de las células T; sin embargo esta respuesta es relativamente débil y apenas detectable en los pacientes que desarrollan una hepatitis crónica, excepto durante los episodios de exacerbación aguda o tras la eliminación viral espontánea o inducida por alfa interferón. Está generalmente aceptado que son los linfocitos T citotóxicos los responsables de la erradicación del virus mediante la eliminación de los hepatocitos infectados. Recientemente, se ha descrito en ratones transgénicos que los linfocitos T citotóxicos pueden inhibir la expresión de los genes del VHB y su replicación de una manera no citopática, mediante la secreción de citoquinas antivirales (interferón alfa/beta, interferón gamma y factor de necrosis tumoral alfa) que interrumpen el ciclo biológico del VHB. Los datos disponibles sugieren que en las hepatitis agudas por el VHB una intensa respuesta intrahepática por parte de los linfocitos T citotóxicos puede erradicar la infección viral mediante la supresión de su replicación, además de la eliminación de los hepatocitos infectados. Por el contrario, una respuesta inmunológica débil, como la que se da en los pacientes con infección crónica, daría lugar a una reducción en la expresión de los antígenos virales en las células infectadas en un grado suficiente como para eludir el reconocimiento inmunológico, pero no lo bastante como para que el virus sea eliminado, y, de esta manera, esta débil respuesta inmunológica contribuiría a la persistencia del virus y a la enfermedad hepática crónica (Chisari, 1997). Por tanto, la hepatitis crónica sería debida a una respuesta inmune celular subóptima que destruye algunos de los hepatocitos infectados pero que no elimina totalmente las células afectadas, lo que permite que la infección viral se mantenga activa y se desencadene una enfermedad hepática necroinflamatoria de desarrollo lento, indolenta y crónica que sirve de base para el desarrollo de hepatocarcinoma (Chisari, 2000).

En experimentos realizados en modelos animales se detectó alfa interferón simultáneamente al HBsAg pero antes de la detección del anti-HBc, seguido de un

aumento en los antígenos HLA clase I y una elevación de las transaminasas (Pignatelli y col., 1986). Aumentos en la expresión de estos antígenos HLA clase I han sido observados también en humanos en el curso de una hepatitis aguda (Nagafuchi y col., 1986). En la enfermedad crónica se ha demostrado, así mismo, una acumulación de células "natural killer" y citotóxicas en el área periportal del parénquima hepático.

Se ha postulado que el interferón puede ser el responsable de los principales síntomas de la fase prodrómica, como la fiebre y el malestar general. Además de incrementar la expresión de las proteínas HLA clase I, el interferón puede estimular la 2-5A sintetasa a catalizar la producción de oligoadenilatos que activan la ribonucleasa endógena lo que resulta en la eliminación del ARN viral. Posteriormente, la asociación de los antígenos HLA clase I con proteínas de la nucleocápside viral (HBcAg y HBeAg) pueden facilitar la lisis por linfocitos T citotóxicos (Pignatelli y col., 1987). En la infección aguda se ha observado que la primera respuesta inmune celular es frente a los antígenos pre-S, antes de la detección de la enfermedad (Vento y col., 1987). Más tarde se observa una respuesta tipo IgM frente al HBcAg (IgM-anti HBc) y una intensa respuesta al HBsAg ocurre antes de la necrosis hepática. Esta última respuesta no se observa en la infección crónica.

En la actualidad se han acumulado datos que, como se ha indicado anteriormente, incriminan a la respuesta inmune, tanto celular como humoral, en la producción de las lesiones hepáticas y extrahepáticas observadas en la infección por el VHB (Lever, 1987; Bonino y col., 1993). La lesión hepática se produce básicamente en la fase replicativa como consecuencia de la respuesta inmunitaria. Una prueba indirecta de este hecho es que los pacientes tratados con citostáticos, o inmunodeprimidos, apenas muestran lesión hepática a pesar de su intensa replicación viral, observándose en algunos casos un fuerte agravamiento de la enfermedad hepática si los citostáticos se suprimen. La hipótesis más aceptada es que los linfocitos T citotóxicos dirigidos contra los hepatocitos que expresan en sus membranas epítomos de los antígenos HBc y/o HBe junto proteínas HLA clase I, son la causa del mantenimiento de la enfermedad (Waters y col., 1987; Barnaba y col., 1992). De hecho estas dos proteínas presentan reacción cruzada a nivel de los linfocitos T (Bonino y col., 1993).

El estudio de las variantes genómicas del VHB ha permitido observar la importancia que tiene el HBeAg en la respuesta inmunológica en los pacientes con hepatitis crónica por el VHB (Fiordalisi y col., 1990). La alta frecuencia de variantes incapaces de la

expresión de este antígeno parecen indicar que este antígeno es la diana central del sistema inmune y su ausencia representaría una ventaja selectiva para la persistencia viral. Esta estrategia de dejar de producir una proteína antigénica constituye un potente mecanismo para prolongar la infección. Es de remarcar el hecho que el HBeAg no es necesario para la replicación viral ni para su empaquetamiento, no formando parte de los viriones, y sin embargo se trata de una diana antigénica fuertemente conservada entre los diferentes aislados del VHB y los demás hepadnavirus (Ulrich y col., 1990). Este antígeno contiene epítomos comunes con el HBcAg pero, como se ha comentado en el apartado 1.1.2.2., la respuesta inmune es diferente para ambos antígenos, y la producción de HBeAg permite la supervivencia viral al actuar como inhibidor de la respuesta T citotóxica responsable de la eliminación del virus. A pesar de ello, otros autores (Chisari, 1997) sugieren que la aparición de las variantes incapaces de expresar el HBeAg no se debe a un proceso de selección debido a la respuesta inmune sino que se debe a un mecanismo de selección positivo, dado que hay trabajos en los que se demuestra que la variante mutada más frecuente del precore presenta una mayor replicación viral (Hasegawa y col., 1994; Scaglioni y col., 1997), y que la expresión de la proteína del precore disminuye *in vivo* la eficacia de la replicación del VHB (Guidotti y col., 1996).

### **1.3. HEPATITIS CRÓNICA POR EL VHB.**

La hepatitis crónica por VHB, clásicamente, se puede dividir en tres fases (Sherlock y col., 1989):

- Fase de elevada replicación viral. Esta fase es de duración muy variable, incluso de años, con inmunodepresión o tolerancia al VHB. Se caracteriza por una intensa replicación vírica, con concentraciones altas del ADN-VHB. La biopsia hepática muestra poca actividad inflamatoria y escasa necrosis hepatocelular, observándose un gran número de hepatocitos con HBcAg en su núcleo.
- Fase de moderada replicación viral. Se caracteriza por un descenso en la replicación del VHB motivado por la destrucción de los hepatocitos infectados causada por la acción del sistema inmunitario. En esta fase existe un aumento de las transaminasas que corresponde a una mayor necrosis celular. La biopsia muestra una mayor actividad inflamatoria y una disminución del número de hepatocitos que expresan HBcAg. Este

aumento en la actividad de la enfermedad persiste hasta la erradicación de las células infectadas.

- Fase de baja replicación. Las transaminasas descienden hasta valores normales o casi normales, no se detecta el HBeAg, detectándose el anti-HBe. Se observa una importante disminución en la concentración del ADN-VHB, que no se detecta por técnicas de hibridación molecular pero sí por técnicas de PCR, aunque no en todos los casos. La biopsia hepática muestra una gran disminución de la actividad inflamatoria. En ocasiones las lesiones hepáticas de fases anteriores podrían ser lo suficientemente importantes como para alterar la arquitectura hepática, por lo que es posible observar en estos pacientes cambios propios de CH. Serológicamente se sigue detectando el HBsAg, debido a que el genoma viral se ha integrado en el genoma del hepatocito, manteniéndose la estructura del gen-S pero perdiéndose la de los demás genes del VHB.

El paso de las fases de alta a baja replicación tiene lugar por la activación del sistema inmunológico, mediante la acción de linfocitos efectores, básicamente linfocitos T citotóxicos, que destruyen las células hepáticas en las que el virus se replica. Estas células expresan en sus membranas epítomos correspondientes al HBcAg y al HBeAg junto a las proteínas HLA de clase I. Al ser reconocidos los complejos (HLA I/HBc o HLA I/HBe) se activan los mecanismos de lisis celular. Una vez eliminados los hepatocitos infectados cesa la necrosis celular y las transaminasas se normalizan, desapareciendo también los marcadores de replicación del VHB del suero (HBeAg y ADN-VHB). La seroconversión de HBeAg a anti-HBe sucede espontáneamente en la mayoría de portadores del VHB, aunque en períodos de tiempo muy variables. La frecuencia de seroconversión varía extraordinariamente en relación al tipo de pacientes, siendo poco frecuente en inmunodeprimidos y en aquellos que adquieren la infección en la edad neonatal. La frecuencia es más elevada cuando se adquiere la enfermedad en la edad adulta y en sujetos inmunocompetentes. Los pacientes con bajas concentraciones de ADN-VHB en suero, pocos hepatocitos con HBcAg y lesiones hepáticas más activas, tienen más posibilidades de seroconvertir a anti-HBe en un plazo corto de tiempo (Sanchez-Tapias y col., 1988).

### *1.3.1. HEPATITIS CRÓNICA HBeAg POSITIVA*

Existe una notable heterogeneidad entre los pacientes con hepatitis crónica por el VHB que presentan el HBeAg en suero. Algunos casos presentan lesiones de hepatitis crónica persistente con presencia abundante de HBcAg en los hepatocitos; en el suero de estos pacientes se detecta frecuentemente una concentración alta de ADN-VHB, indicando la existencia de una intensa replicación del VHB. En otros pacientes la lesión histológica es más severa, con lesiones de HCA o CH, escasa presencia del HBcAg en el citoplasma de algunos hepatocitos y concentraciones menores de ADN-VHB (Sanchez-Tapias y col., 1992).

### *1.3.2. HEPATITIS CRÓNICA HBeAg NEGATIVO.*

En nuestro medio, alrededor del 60% de los pacientes con hepatitis crónica B no presentan HBeAg en suero, siendo positivos para anti-HBe. La desaparición del HBeAg y la presencia en suero del correspondiente anticuerpo se consideraba como criterio de no replicación del VHB, no obstante en un pequeño porcentaje de estos pacientes se detectaba ADN-VHB por técnicas de hibridación molecular lo que indicaba actividad replicativa del VHB. El desarrollo de técnicas de detección de genomas más sensibles (PCR) ha demostrado la presencia de ADN-VHB en un porcentaje considerable de casos HBeAg negativo/anti-HBe positivo. En la mayoría de estos pacientes se han detectado mutaciones en la región precore del genoma del VHB que impiden la producción del HBeAg pero no la replicación del virus (Carman y col., 1989; Ulrich y col., 1990). Los pacientes portadores de las variantes mutadas en la región precore del VHB representan un porcentaje muy importante de las infecciones crónicas por VHB en el área Mediterránea. En un estudio realizado en 1993 por Brunetto y col. se ha indicado que los pacientes infectados exclusivamente con la variante precore del VHB presentaban tras la terapia con interferón un mayor índice de reactivación que los pacientes infectados exclusiva o mayoritariamente por la forma no mutada del virus. Este hecho sugiere que las mutantes en la región precore escapan de la acción citotóxica, que, sin embargo, elimina la forma no mutada del virus. Estos autores estiman que una viremia con una proporción de más de un 20% de mutantes precore del VHB puede ser un factor importante para predecir la reactivación de la replicación viral, sugiriendo una modificación de la pauta de tratamiento en relación a la presencia de estas mutaciones.

## **OBJETIVOS**



## **2. OBJETIVOS.**

El primer objetivo ha sido estudiar la variabilidad del VHB en las regiones del PBC y del precore en pacientes con infección crónica por el VHB. Dentro de este objetivo se han analizado los siguientes puntos:

1. Conocer la prevalencia y características de las variantes de la región del PBC del VHB en pacientes con hepatitis crónica B y portadores asintomáticos del VHB de nuestra área geográfica. Para ello se han estudiado pacientes con hepatitis crónica HBeAg positivo y HBeAg negativo. Las mutaciones en el PBC se han relacionado con el grado de replicación viral, la concentración de HBeAg, el genotipo del VHB y con la severidad de la lesión histológica hepática. Los trabajos efectuados con anterioridad muestran resultados discordantes, principalmente en cuanto a la relación entre la presencia de las variantes del PBC y la multiplicación del VHB.
2. Detectar las variantes de la región del precore del VHB que impiden la expresión del HBeAg en estos mismos grupos de pacientes. Las variantes del precore se han relacionado con el genotipo viral, la concentración de ADN-VHB y el grado de lesión histológica. La mayoría de estudios realizados previamente carecen de un número significativo de casos y se han llevado a cabo en pacientes con concentraciones elevadas de ADN-VHB debido a su mayor interés clínico y al empleo de técnicas cuantitativas de escasa sensibilidad para la determinación de ADN-VHB. De esta manera, en estos trabajos no se han considerado grupos de pacientes con niveles bajos de replicación.
3. Relacionar las variantes del PBC con las variantes de la región precore teniendo en cuenta el genotipo del VHB. Este tipo de análisis se ha llevado a cabo ampliamente en áreas geográficas donde los genotipos predominantes del VHB son el B y el C, fundamentalmente en Asia. Sin embargo, existen muy pocos trabajos realizados en áreas geográficas, como la nuestra, donde los genotipos A y D son mayoritarios.

El segundo objetivo ha sido conocer el impacto que la coinfección crónica por los VHB, VHC y/o VHD tiene en la replicación del VHB y del VHC, en un grupo de pacientes con coinfección dual y coinfección triple. Así mismo, determinar la potencial influencia que las variantes de las regiones del PBC y del precore del VHB, así como los genotipos virales puedan tener en la interacción entre los tres virus. Para la realización de este objetivo se han determinado cuantitativamente el ADN-VHB y el ARN-VHC y cualitativamente el ARN-VHD.