



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i biologia molecular

Programa de doctorat en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina

Tesi doctoral

Estudi de la composició de la quasiespècies del virus de la hepatitis B a les regions codificants de les proteïnes de l'envolta i la polimerasa viral per seqüenciació massiva: associació de les seves variants genètiques amb el tractament antiviral de la hepatitis B crònica amb anàlegs de nucleòsids/nucleòtids

Autor de la tesi

David Tabernero Caellas

Directors de la tesi

Dr. Francisco Rodríguez Frías

Dra. Maria Buti Ferret

Tutora de la tesi

Dra. Anna Messeguer Navarro

Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 2015

INDEX

INDEX.....	3
AGRAÏMENTS:.....	7
1. ABREVIATURES:.....	9
2. INTRODUCCIÓ:.....	16
2.1. EL VIRUS DE LA HEPATITIS B:.....	16
2.1.1. Estructura de les partícules virals i subvirals del VHB:.....	16
2.1.1.1. Partícules virals:.....	17
2.1.1.2. Partícules subvirals:.....	18
2.1.2. Organització del genoma del VHB:.....	19
2.1.2.1. Les pautes obertes de lectura i proteïnes virals:.....	22
2.1.2.1.1. ORF PC/Core i les proteïnes precore i core:.....	23
2.1.2.1.2. ORF P i la polimerasa:.....	28
2.1.2.1.3. ORF S i les proteïnes de superfície:.....	33
2.1.2.1.4. ORF X i la proteïna X:.....	40
2.1.2.2. Transcrits i elements reguladors de la transcripció:.....	43
2.1.2.2.1. Transcrits:.....	43
2.1.2.2.2. Regulació dels transcrits precore i pregenòmic:.....	45
2.1.2.2.3. Regulació dels transcrits preS1 i preS2/S:.....	47
2.1.2.2.3. Regulació del transcrit X:.....	48
2.1.2.2.4. Altres elements reguladors:.....	50
2.1.3. Classificació taxonòmica:.....	50
2.2. EL CICLE REPLICATIU DEL VHB:.....	52
2.2.1. Unió i entrada del VHB als hepatòcits:.....	52
2.2.2. Transport i entrada al nucli:.....	56
2.2.3. El genoma del VHB al nucli:.....	58
2.2.3.1. Formació de l'ADN circular covalentment tancat:.....	58
2.2.3.2. Regulació de la transcripció de l'ADN circular covalentment tancat: ..	61
2.2.4. Traducció, encapsidació i transcripció reversa de l'ARN pregenòmic:	63
2.2.5. Morfogènesi de noves partícules virals o reciclatge de càpsides al nucli: ...	68
2.3. VARIABILITAT GENÈTICA DEL VHB:.....	70
2.3.1. Estructura en quasiespècies de les poblacions del VHB:.....	70
2.3.1.1. Índexs per estudiar la diversitat de les quasiespècies:.....	73
2.3.2. Els genotips del VHB:.....	75
2.3.2.1. Diferències virològiques i evolutives entre genotips del VHB:	76
2.3.2.2. Impacte dels genotips en l'evolució de la malaltia hepàtica, resposta al tractament antiviral i profilaxi contra el VHB:.....	77

2.3.3. Principals variants genètiques d'interès clínic en el VHB:	78
2.3.3.1. Variants genètiques de l'ORF PC/Core i el promotor bàsic del core (BCP):	79
2.3.3.2. Variants genètiques de l'ORF P:	80
2.3.3.3. Variants genètiques de l'ORF S:	81
2.3.3.4. Variants genètiques de l'ORF X:	82
2.3.4. Estudi de les variants genètiques de la quasiespècies del virus de la hepatitis B:	83
2.3.4.1. Tècniques genotípiques basades en hibridació:	84
2.3.4.2. Tècniques genotípiques basades en anàlisi de fragments de restricció de longitud polimòrfica (RFLP):	86
2.3.4.3. Tècniques genotípiques basades en seqüenciació directa d'amplicons o amb un pas previ de clonatge molecular:	86
2.3.4.4. Tècniques de seqüenciació massiva:	88
2.3.4.4.1. La tecnologia d'"Ultra-deep pyrosequencing" (UDPS):	90
2.4. EPIDEMIOLOGIA I IMPLICACIONS CLÍNQUES DE LA INFECCIÓ PER VHB:	96
2.4.1. Epidemiologia:	96
2.4.2. Patogenicitat:	98
2.4.3. Història natural de la hepatitis B crònica:	99
2.5. TRACTAMENTS CONTRA LA HEPATITIS B:	101
2.5.1. Resistència al tractament antiviral amb anàlegs de nucleòsids i nucleòtids (NUCs):	104
2.5.1.1. Resistències a L-Nucleòsids:	107
2.5.1.2. Resistències a D-Ciclopentans:	109
2.5.1.3. Resistències a Fosfonats acíclics:	110
2.5.1.4. Resistències creuades:	112
2.5.2. Trasplantament hepàtic:	113
2.5.3. Nous tractaments per eliminar la infecció per VHB:	115
2.6. HIPÒTESIS I OBJECTIUS:	117
3. PRIMER ESTUDI: ULTRA-DEEP PYROSEQUENCING DETECTS CONSERVED GENOMIC SITES AND QUANTIFIES LINKAGE OF DRUG-RESISTANT AMINO ACID CHANGES IN THE HEPATITIS B VIRUS GENOME.....	120
3.1. INTRODUCCIÓ:	120
3.2. HIPÒTESIS I OBJECTIUS:	121
3.2.1. Hipòtesis:	121
3.2.2. Objectius:	122
3.3. RESUM DE L'ESTUDI:	122
3.3.1. Filtratge i validació de les dades obtingudes per UDPS:	123
3.3.2. Anàlisi de les mostres pretractament:	127

3.3.3. Anàlisi longitudinal de les mostres del tractament seqüencial amb NUCs:	134
3.3.4. Conclusions:	142
3.4. ARTICLE ORIGINAL:	143
4. SEGON ESTUDI: HEPATITIS B VIRUS QUASISPECIES EVOLUTION AFTER LIVER TRANSPLANTATION IN PATIENTS UNDER LONG-TERM LAMIVUDINE PROPHYLAXIS WITH OR WITHOUT HEPATITIS B IMMUNE GLOBULIN	144
4.1. INTRODUCCIÓ:	144
4.2. HIPÒTESI I OBJECTIUS:	145
4.2.1. Hipòtesis:	145
4.2.2. Objectius:	145
4.3. RESUM DE L'ESTUDI:	145
4.3.1. Anàlisi de l'eficàcia dels tractaments profilàctics:	148
4.3.2. Anàlisi de la quasiespècies del VHB en pacients amb recurrència post-trasplantament:	150
4.3.3. Conclusions:	160
4.4. ARTICLE ORIGINAL:	160
5. DISCUSSIÓ:	162
5.1. MÈTODES D'ESTUDI DE LA COMPOSICIÓ DE LA QUASIESPÈCIES:	164
5.1.1. Estudi de la quasiespècies per tècniques convencionals:	165
5.1.1.1. Tècniques basades en hibridació: la hibridació reversa:	165
5.1.1.2. Anàlisi de fragments de restricció de longitud polimòrfica (RFLP):	167
5.1.1.3. Seqüenciació directa d'amplicons o amb un pas previ de clonatge molecular:	167
5.1.2. Estudi de la quasiespècies per tècniques basades en seqüenciació massiva:	169
5.1.2.1. Elecció de la plataforma de seqüenciació massiva pels estudis d'aquesta tesi:	169
5.1.2.2. Filtratge i correcció d'errors en "Ultra-deep Pyrosequencing":	172
5.2. ANÀLISI DEL DOMINI DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA (ORF P) I EL BUCLE ANTIGÈNIC DE LA REGIÓ HIDROFÍLICA PRINCIPAL (ORF S):	174
5.2.1. Anàlisi del domini RT de la polimerasa en mostres de pretractament:	174
5.2.2. El determinant "a" i anàlisi de posicions conservades:	176
5.2.3. Codons stop a l'ORF S:	178
5.2.4. Anàlisi longitudinal del domini RT de la polimerasa durant el tractament seqüencial amb NUCs:	179
5.2.5. Anàlisi de la diversitat de la quasiespècies del VHB:	183
5.3. PERSPECTIVES DE FUTUR:	187
6. CONCLUSIONS:	190
7. ANNEX 1: ARTICLE ORIGINAL DEL PRIMER ESTUDI	194

8. ANNEX 2: PRIMERA PÀGINA I TAULES PRINCIPALS DEL SEGON ESTUDI	209
9. ANNEX 3: ALTRES ESTUDIS DE LA QUASIESPÈCIES DEL VIRUS DE L'HEPATITIS B ON EL DOCTORAND HA PARTICIPAT DURANT EL PERÍODE DE LA SEVA TESI.....	212
10. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES:	222

AGRAÏMENTS:

Ha estat un camí llarg des que vaig començar aquest projecte. Durant tot el temps que ha durat he viscut moltes experiències i he après un munt! M'he format i he crescut com a científic i com a persona al llarg d'aquest camí, que m'ha permès acumular aptituds i coneixements que espero haver estat capaç reflectir en aquest treball. Arribat ja al final d'aquest projecte, miro cap endarrere i veig molta gent que m'ha acompanyat durant aquest temps i sense els quals el que he fet no hauria estat possible. Alguns, per diferents circumstàncies, ja no estan amb mi al laboratori, altres encara m'acompanyen i espero seguir amb ells durant molt de temps! Em sabria greu deixar-me alguna d'aquestes persones amb els que he fet part o tot aquest camí, per tant m'agradaria començar els agraïments amb un GRÀCIES! en general a tots els que han estat amb mi, encara que el seu nom no surti aquí.

Per començar dono les gràcies als meus directors, els doctors Francisco Rodríguez (Paco) i Maria Buti. Gràcies Paco, per tot el que m'has ensenyat dia a dia al laboratori. No només coneixements pràctics, sinó també maneres de pensar, enfocar problemes, raonar, hipotetitzar... En poques paraules gràcies per ensenyar-me a fer recerca . Gràcies Maria per la teva ajuda durant aquest temps, per l'entusiasme amb el que sempre ens proposes nous projectes i reptes, sense els quals aquesta tesi no hauria estat possible. També li vull donar les gràcies al doctor Rafael Esteban, l'investigador principal del nostre grup del CIBERehd. El seu prestigi i reconeixement ens ha permès consolidar-nos com el grup d'investigació que som avui en dia.

També voldria donar el meu sincer agraïment a les persones amb qui he estat treballant colze a colze al laboratori i que en aquest moment, per diferents raons ja no hi són: em refereixo al Dr. Rossend Jardí i a la Montserrat Gimferrer (Tona), que ara mateix estan gaudint d'una merescuda jubilació. Per altra banda, valoro molt el suport de la Dra. Melanie Schaper que em va ajudar a donar els primers passos en el món de la biologia molecular i que posteriorment va acceptar formar part de la comissió de seguiment d'aquesta tesi. Aprofito també per agrair els consells al llarg de tot aquest període de la resta de membres de la comissió de seguiment, les Dres. Maria Martell i Silvia Sauleda.

Continuant amb la gent del laboratori, no em puc descuidar els companys amb qui estem compartint el dia a dia. Per començar la Dra. Maria Homs, que m'ha acompanyat i donat suport al llarg de tots aquests anys, i les companyes que han arribat a la darrera fase d'aquesta tesi: la Rosario Casillas (Chari), Maria Blasi, Irene Belmonte i la més recent, la Marta Vila. La seva

ajuda ha estat inestimable, tant dins com fora del laboratori. Juntament amb l'Andrea Caballero i la Tona formem el millor equip, l'"Hepatitis Team"!

Agraïxo també al Gerard Ruiz, la Montse Saez i el Leonardo Nieto (Leo), per la seva feina diària al laboratori, que col·labora en el funcionament d'aquesta maquinària, a vegades complexa, que és la nostra unitat de patologia hepàtica. No vull descuidar-me les diferents promocions de residents que han anat rotant per la nostra unitat, i especialment vull fer esment dels que en aquest moment estan fent-hi la seva tesi o estan col·laborant en la recerca: Carolina González, Alicia Ruiz i Pilar Reimundo.

Vull també dedicar un agraïment al grup de Malalties Hepàtiques de l'Institut de Recerca. Per començar el Dr. Josep Quer pel seu suport i ajuda incondicionals, sense ell aquesta tesi no hauria estat possible. A banda de ser un gran professional també és un bon amic. Per altra banda, no puc deixar de fer esment de l'ajuda del Damir Garcia i la Dra. Maria Cubero. Tampoc vull descuidar-me dels bioinformàtics que han fet possible els estudis d'aquesta tesi: els Drs. Alexandre Sánchez, Israel Ortega i Josep Gregori (Biopep).

Finalment i no menys importants, la meva família, que m'han donat suport, animat i moltes vegades "aguantat" al llarg de tot aquest procés. Mare, Maria, avis, el vostre afecte ha estat, és i seguirà sent clau en tots els projectes que emprengui. Així com també el meu pare, que sempre estarà a la meva memòria. També vull agrair als amics les estones d'oci que hem compartit i els seus bons consells, que m'han ajudat molt tot aquest temps, Gemma, Alex, Anna, David, Ivan, Joan... Però sobretot, a qui vull dedicar un agraïment molt especial és a l'Ada, la meva parella. La seva comprensió, paciència, afecte i suport incondicionals han estat imprescindibles per afrontar aquest repte i altres que se'm puguin plantejar a la vida. Aviat serem dos doctors a casa!

1. ABREVIATURES:

*	Codó stop (si * indica una cosa diferent s'explica al text)
µm	Micròmetre

A

aa	Aminoàcid
AANN	Àcids nucleics
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ADN-VHB	Àcid desoxiribonucleic del virus de la hepatitis B
ADV	Adefovir
AGL	“Antigenic Loop” o Bucle antigènic de la SHBs
Alix	“Apoptosis-linked gene 2-interacting protein”
ALT	Alanina aminotransferasa
anti-HBc	Anticossos contra l'antigen core del virus de l'hepatitis B
anti-HBe	Anticossos contra l'antigen e del virus de la hepatitis B
anti-HBs	Anticossos contra l'antigen de superfície del virus de l'hepatitis B
AP-1	“Activator protein-1”
APC	Cèl·lula presentadora d'antigen
APOBEC3G	“Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G”
ARNasa H	Ribonucleasa H
ATP	Adenosina trifosfat

B

B74-84	Epítop de limfòcits B entre els codons 74 i 84 de la HBcAg
BCP	Promotor basal del Core

C

C/EBP	“CCAAT/enhancer-binding protein”
CBP	“CREB-binding protein”
cccADN	ADN del virus de la hepatitis B circular covalentment tancat
CCD	Dispositiu de càrrega acoblada
COUP-TF	“Chicken ovoalbumin upstream promoter transcription factor”
CREB	“C-AMP-response element binding protein”
CTL	Limfòcits T citotòxics

CUL4-DDB1	“Cullin4A-DDB1 ubiquitin E3 lligasa”
CURS	“Core upstream regulatory sequence”
CV	Coeficient de Variació

D

DDB1	“DNA damage binding protein 1”
dn	Canvi de nucleòtid no sinònim
DNMT3A	“DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A”
dNTP	Desoxiribonucleòtid trifosfat
DR1 / DR2	Repeticions Directes 1 i 2
ds	Canvi de nucleòtid sinònim
dsADN	ADN de doble cadena
dslADN	ADN del virus de la hepatitis B lineal de doble cadena
DVHB	Virus de la hepatitis B de l'ànec (<i>Anas domesticus</i>)

E

EASL	Associació europea per l'estudi del fetge
emPCR	Reacció en cadena de la polimerasa en emulsió
EN1 i 2	Enhancers 1 i 2 del genoma del virus de la hepatitis B
ERGIC	Compartiment entre el reticle endoplasmàtic i l'aparell de Golgi
ESCRT	Complex de classificació endosòmica necessari pel transport
ESLD	Malaltia hepàtica en etapa terminal
ETV	Entecavir
ezVHB	Virus de la hepatitis B de diamants zebrats (<i>Taeniopygia guttata</i>)

G

GADPH	“Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase”
GGH	“Ground Glass Hepatocytes”
GRE	Element de resposta a Glucocorticoides

H

HBC	Hepatitis B crònica
HBcAg	Antigen core del virus de l'hepatitis B
HBeAg	Antigen e del virus de la hepatitis B
HBIG	Immunoglobulines contra el virus de la hepatitis B
HBsAg	Antigen de superfície del virus de la hepatitis B

HBSP	Proteïna del virus de la hepatitis B generada per “splicing”
hBubR1	“Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 beta”
HBx	Proteïna X del virus de l’hepatitis B
HBXIP	“Hepatitis B X-interacting protein”
HCC	Hepatocarcinoma
HDAC1	Desacetilasa d’histones de classe I
HNF	“Hepatocyte Nuclear Factor”
Hsp	“Heat shock proteins”
HSPG	Proteoglicans heparan sulfat
HVDAC3	“Human voltage-dependent ion channel 3”
HVHB	Virus de la hepatitis B del bernat pescaire (<i>Ardea cinerea</i>)

I

IFN α	Interferó α
indels	Insercions i delecions
Inr	Element Iniciador de la transcripció
INSDC	“International Nucleotide Sequence Database Collaboration”
IPS-1	“Interferon β promoter stimulator-1 factor”

K

Kb	Quilobases
KDa	Quilodaltons

L

LAM	Lamivudina
LdT	Telvibudina
LHBs	Proteïna de superfície del virus de l’hepatitis B llarga

M

mARN	ARN missatger
Mf	Freqüència de mutació
Mg	Mil·ligrams
MHBs	Proteïnes de superfície del virus de l’hepatitis B mitjana
MHR	“Major Hydrophilic Region” o regió hidrofílica principal de la SHBs
MID	“Multiplex identifier”
mL	Mil·lilitre

MT	Microtúbuls
MTOC	Centre organitzador de microtúbuls
MVB	Cos Multivesicular

N

NES	Senyal d'exportació del nucli cel·lular
NF1	“Nuclear Factor 1”
NF-κB	“Nuclear factor kappa B”
NGS	Seqüenciació de nova generació
NHEJ	Unió d'extremes no homòlegs
NLS	Senyal de localització al nucli cel·lular
NPC	Complex del porus nuclear
NRE	“Negative Regulatory Element”
Nt	Nucleòtid
NTCP	Pèptid co-transportador de sodi-taurocolat
NTP	Ribonucleòtid trifosfat
NUCs	Antivirals orals anàlegs de nucleòtids i nucleòsids
Nup153	Nucleoporina 153

O

OH	Grup hidroxil
OLT	Trasplantament hepàtic ortotòpic
OMS	Organització Mundial de la Salut
ORF	Pauta oberta de lectura

P

P	Polimerasa del virus de la hepatitis B
Pb	Parells de bases
PC	Regió precore del genoma del virus de l'hepatitis B
pcARN	ARN precore
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PEG-IFN α	Interferó α pegilat
PF-rcADN	ADN del virus de la hepatitis B relaxat circular lliure de proteïnes
pgARN	ARN pregenòmic
Pi	Diversitat nucleotídica
PKC	Proteïna quinasa C

PP1	“Protein Phosfatase 1”
PPAR α	“Peroxisome proliferator-activate receptor” α
PPi	Pirofosfat
PRE	Element regulador postranscripcional
PRMT1	“Protein arginin N-methyltransferase 1”
PTB	“Polypyrimidine tract binding protein”
PTP	Placa “PicoTitter”

R

R	Redundància terminal de la cadena - del rcADN
rcADN	ADN del virus de la hepatitis B relaxat circular
RE	Reticle Endoplasmàtic
RER	Reticle Endoplasmàtic Rugós
RFLP	Anàlisi de fragments de restricció de longitud polimòrfica
RH	Domini ARNasa H de la polimerasa del virus de l’hepatitis B
RT	Domini de la transcriptasa reversa de la polimerasa del virus de l’hepatitis B
RVS	Resposta virològica sostinguda

S

S	Proteïnes de superfície del virus de l’hepatitis B
SD	Desviació estàndard
SHBs	Proteïna de superfície del virus de l’hepatitis B curta
SLC10A1	“Solute carrier family 10A1”
Sn	Entropia de Shannon
SP	Domini espaiador de la polimerasa del virus de l’hepatitis B
Sp1	“Specificity protein 1”
ssADN	ADN de cadena simple
SVP	Partícules subvirals

T

TALENs	“Transcription activator-like effector nucleases”
TBP	“TATA-binding protein”
TDF	Tenofovir
TDP1 i 2	Tirosil-ADN-fosfodiesterases 1 i 2
TGF- β	“Transforming growth factor β ”
Th	Limfòcits T col·laboradors o helper

Th50-69	Epítip de limfòcits T col·laboradors entre els codons 50 i 69 de la HBcAg
TIR	Toll-IL1 receptor
TLR	Toll-like receptor
TM1-4	Domini transmembrana 1 a 4 de les proteïnes de superfície
TNF- α	“Tumor necrosis factor α ”
TOP1 i 2	Topoisomereses 1 i 2
TP	Domini de la proteïna terminal de la polimerasa del virus de l’hepatitis B

U

UDPS	“Ultra-deep pyrosequencing”
UI	Unitats internacionals
URR	“Upper Regulatory Region”

V

VBK	Rebot virològic o “Viral Breakthrough”
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VHD	Virus de l’hepatitis D
VIH	Virus de la immunodeficiència humana

W

WVHB	Virus de la hepatitis B de la marmota (<i>Marmota monax</i>)
------	--

INTRODUCCIÓ

2. INTRODUCCIÓ:

2.1. EL VIRUS DE LA HEPATITIS B:

El virus de l'hepatitis B (VHB) és un patògen que causa una malaltia del fetge coneguda com hepatitis B, un problema de salut a nivell global que pot presentar-se des d'una malaltia lleu fins una malaltia greu i potencialment mortal, com s'explicarà a 2.4. Epidemiologia i implicacions clíniques de la infecció per VHB. Aquest virus pot causar des d'infeccions agudes, que poden durar unes poques setmanes o mesos, fins a infeccions cròniques que poden durar tota la vida del pacient i el posa en risc elevat de patir cirrosi i hepatocarcinoma (HCC) (1).

El VHB humà és el membre prototip de la família *Hepadnaviridae* [virus d'Àcid desoxiribonucleic (ADN) que infecten el fetge], juntament amb altres virus que infecten altres mamífers i aus, que comparteixen organització genòmica similar, tropisme pels mateixos òrgans i una estratègia de replicació del seu genoma única (2) com s'explicarà a 2.1.3. Classificació taxonòmica. Les primeres evidències de l'existència del VHB van venir del descobriment del seu antígen de superfície (HBsAg) l'any 1965 per Blumberg i col·laboradors en el sèrum d'un aborigen australià (3), per això també es conegut amb el nom d'antigen Austràlia. En un primer moment aquest antígen no va ser associat al VHB, el qual va ser descrit per primera vegada el 1967 per Krugman i col·laboradors (4), en un estudi en que es van definir dos tipus diferents d'hepatitis infecciosa causades per dos virus diferents, MS-1 i MS-2, que corresponien al que actualment es coneix com hepatitis A i hepatitis B respectivament. Aquell mateix any el HBsAg va ser associat a les hepatitis virals (5) i el 1969 es va associar específicament al VHB (6,7).

2.1.1. Estructura de les partícules virals i subvirals del VHB:

Les partícules virals del VHB van ser descobertes el 1970 per Dane i col·laboradors (8) mentre estudiaven immunocomplexes del HBsAg aleshores anomenat únicament antigen Austràlia, per microscòpia electrònica. Es va observar que entre un gran excés de petites partícules pleomòrfiques [que actualment s'anomenen partícules subvirals (SVP)] hi havia unes de més grans on es distingia un nucli intern, a les que es va anomenar partícules Dane. El 1971 Almeida i col·laboradors van observar que les partícules Dane estan recobertes externament d'antigen Austràlia (a partir de llavors també conegut com a antigen de superfície del VHB o HBsAg) (9).

El 1973, Kaplan i col·laboradors van detectar activitat polimerasa endògena en les partícules Dane (10), i un any més tard es va identificar l'ADN viral com el seu producte (11).

2.1.1.1. Partícules virals:

Les partícules virals del VHB tenen un diàmetre d'uns 42 nm (les més petites entre els virus d'ADN humans) amb envolta, dins la qual hi ha una càpsida icosaèdrica que conté el genoma viral d'ADN unit a la polimerasa viral i algunes proteïnes de l'hoste (figura 1):

Envolta: formada per una bicapa de fosfolípids que té inserides tres tipus de glicoproteïnes de superfície [gran (LHBs), mitjana (MHBs) i petita (SHBs)], que en conjunt formen el HBsAg (12).

Càpsida: formada per entre 180 i 240 proteïnes core (HBcAg), les quals formen homodímers estabilitzats per un pont disulfur entre els seus residus cisteïna-61 (13), cosa que dona lloc a una estructura similar a una lletra T invertida que forma una mena d'espigues a la superfície de la càpsida. Aquests homodímers s'acoblen entre ells al citoplasma per formar dos tipus diferents de càpsides fenestrades i de simetria icosaèdrica:

- 90 dímers amb un nombre de triangulació $T=3$, d'uns 30 nm de diàmetre (13).
- 120 dímers, amb un nombre de triangulació $T=4$, d'uns 34 nm de diàmetre (14).

Ambdues càpsides es troben a les cèl·lules infectades però les càpsides $T=4$ semblen seleccionar-se preferentment per ser embolcallades i formar partícules infeccioses (15).

Genoma i polimerasa virals i proteïnes de l'hoste: a l'interior de la càpsida s'hi troba el genoma viral, una molècula d'ADN parcialment de doble cadena que es sintetitza a partir d'un àcid ribonucleic missatger (mARN) viral, l'ARN pregenòmic (pgARN). Aquest ARN interacciona amb la polimerasa viral mitjançant una estructura secundària en el seu extrem 5' denominada bucle ϵ (16,17). Aquesta unió és estabilitzada per un complex de proteïnes de la família de les xaperones de la pròpia cèl·lula hoste, cosa que dona lloc a una estructura ribonucleoproteica al voltant de la qual es recluten els homodímers de HBcAg que formaran la càpsida (16,17). Aquest procés s'explicarà amb més detall a 2.2.4. Traducció, encapsidació i transcripció reversa de l'ARN pregenòmic. Dins les càpsides del VHB també s'han identificat proteïnes quinasa, com les isoformes específiques de la proteïna quinasa C (PKC) $\alpha/\beta/\gamma$ i altres (18,19).

2.1.1.2. Partícules subvirals:

Les proteïnes de superfície presents a l'envolta, poden acoblar-se espontàniament a les membranes del compartiment entre el reticle endoplasmàtic (RE) i l'aparell de Golgi (ERGIC) per les SVP (20). Aquestes partícules tenen formes quasiesfèriques d'uns 20 nm de diàmetre (més petit que el de les partícules virals) i simetria octaèdrica formades per uns 48 dímers de SHBs (21), o de filaments del mateix diàmetre i longitud variable (figura 1). Les SVP estan buides (durant la seva formació no inclouen nucleocàpsida ni proteïnes de l'hoste) no són infeccioses, i es secreten al sèrum dels portadors del VHB en un gran excés respecte les partícules virals (partícules Dane): les SVP quasiesfèriques es poden trobar al sèrum de pacients infectats fins a 10.000 vegades més que les partícules virals [10^{13} per mil·lilitre (mL)] i són més abundants que els filaments, que tot i així estan en una concentració 100 vegades més alta que les partícules virals (fins a 10^{11} /mL) (22).

La forma de les SVP i de les partícules virals depèn en gran mesura de la relació entre proteïnes SHBs i LHBs que s'hi incorporen durant la seva formació: mentre que les SVP quasiesfèriques estan compostes essencialment per proteïnes SHBs i MHBs, la proporció de proteïnes LHBs és més gran en els filaments i encara més gran en les partícules virals (12). La relació entre la quantitat de proteïnes SHBs i LHBs també pot influir sobre l'abundància de les diferents SVP i les partícules virals en el sèrum dels portadors del VHB, ja que les proteïnes LHBs causen una inhibició dosi-dependent de la secreció de partícules virals i subvirals (23,24). Les proteïnes MHBs es comporten com les SHBs per la retenció de partícules i la seva proporció és similar (25). En quant als lípids, només representen un 25% del pes d'aquestes partícules (26), la qual cosa suggereix que no estan organitzats en una bicapa convencional, cosa que s'ha confirmat més recentment per crio-microscòpia electrònica (21).

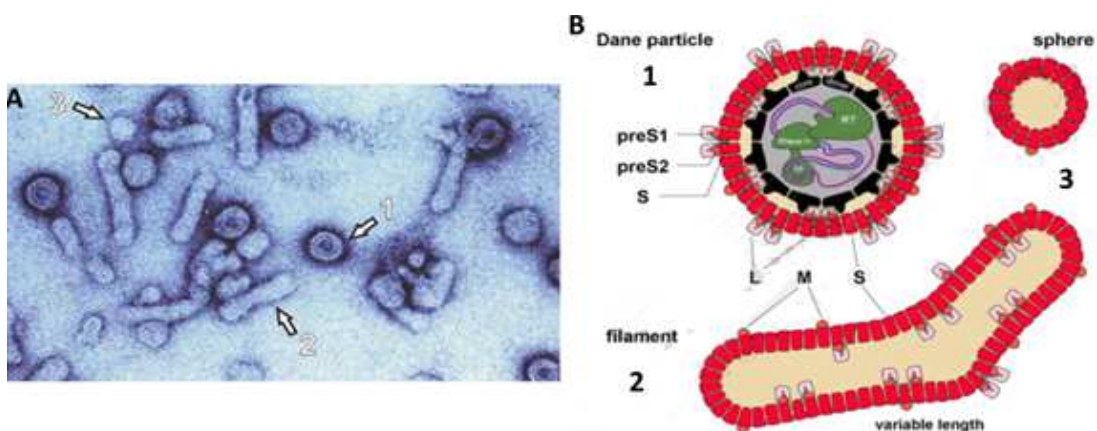


Figura 1: (A) Fotografia obtinguda per microscòpia electrònica de les partícules virals (partícules esfèriques més grans i electrodenses) i partícules subvirals (partícules més petites, en forma de filaments o esferes i menys electrodenses). (B) Estructura de les partícules virals i subvirals del VHB. Modificat de (27)

2.1.2. Organització del genoma del VHB:

El genoma del VHB està format per una molècula d'ADN circular d'unes 3,2 quilobases (Kb). Aquesta molècula d'ADN es pot trobar en tres formes diferents al llarg del cicle replicatiu del VHB:

ADN relaxat circular (rcADN): El 1975 Summers i col·laboradors (28) van proposar un model per l'estructura de l'ADN extret de partícules Dane, segons el qual aquest és circular i parcialment de doble cadena, perquè té regions de cadena simple perquè una de les cadenes està incompleta: a la cadena completa se la va anomenar cadena - o codificant (té polaritat oposada als mARN del virus), i a la incompleta cadena +. El 1977 Landers i col·laboradors (29) van establir la longitud de la cadena - en unes 3,2 Kb i la de la cadena + entre 1,7 i 2,8 Kb, per tant el seu extrem 3' és variable. Les principals característiques d'aquesta forma del genoma viral es mostren a la figura 2 i estan íntimament relacionades amb el mecanisme pel qual es sintetitza, com s'explicarà a 2.2.4. Traducció, encapsidació i transcripció reversa de l'ARN pregenòmic. Entre aquestes característiques destaca:

1. La cadena - es sintetitza per transcripció reversa del pgARN mitjançant la polimerasa viral (30). Com a resultat del seu particular mecanisme de transcripció reversa la polimerasa queda unida covalentment al seu extrem 5' mitjançant un enllaç tirosil-fosfodiéster (31-33) (veure 2.1.2.1.2. ORF P i la polimerasa), i per tant aquesta cadena no és un cercle tancat tot i ser completa. En els extrems 5' i 3' d'aquesta cadena hi ha dues seqüències de 8-9 nts denominades redundàncies terminals (r), crítiques per la síntesi de rcADN (22).
2. La cadena + té unit al seu extrem 5' un oligonucleòtid d'ARN derivat del pgARN, que va servir com a primer per la seva síntesi. Aquest ARN residual té la seqüència de la repetició directa 1 (DR1) als 12 últims nucleòtids (nt) del seu extrem 3', i està protegit contra la degradació gràcies a la caputxa o casquet ("cap") que s'afegeix al pgARN, igual que als mARN cel·lulars (16,22).
3. Les cadenes - i + tenen dues seqüències de 11 nts anomenats repeticions directes (DR1 i DR2) que mantenen la configuració circular del rcADN per complementarietat. Els DRs també són essencials per la replicació viral (22).

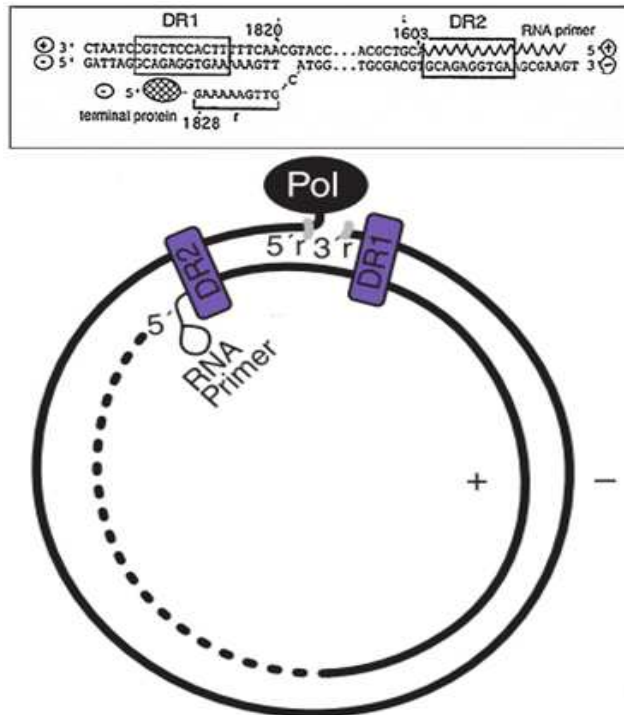


Figura 2: Estructura de l'ADN relaxat circular (rcADN), on s'indica la cadena negativa (-), amb les redundàncies terminals als seus extrems 5' i 3' (5'r i 3'r) i la polimerasa unida covalentment a l'extrem 5'. A la cadena positiva (+) s'indica el primer d'ARN unit covalentment al seu extrem 5'. Finalment s'indiquen les dos repeticions directes (DR1 i DR2). Aquestes peculiaritats estructurals s'amplien a la figura. Modificat de (22,34).

ADN circular covalentment tancat (cccADN): A principis de la dècada de 1980 diferents estudis van observar que al fetge d'individus infectats per VHB i altres hepadnavirus existien formes extracromosòmiques de l'ADN del VHB (ADN-VHB) que semblaven tenir una estructura superenrotllada (35–37). Estudis posteriors van demostrar que el rcADN és el precursor majoritari d'aquesta forma del genoma del VHB (38), el cccADN, la funció principal de la qual és servir com a motlle per la transcripció del mARN virals (veure 2.1.2.2.1. Transcrits).

Durant la primera meitat de la dècada del 1990 varis estudis determinaren que el cccADN s'organitza en una estructura molt semblant a la cromatina: mostra la típica estructura de “collar de perles” al microscopi electrònic deguda a l'empaquetament en nucleosomes, per tant s'associa de manera estable a histones i dona lloc a un mini cromosoma viral en el nucli de les cèl·lules infectades (39,40). Aquest mini cromosoma conté tots els diferents tipus d'histones (H1, H2A i B, H3 i H4), encara que sembla que H3 i H2B són les més abundants (41) formen a una mitjana de 18 nucleosomes molècula de cccADN que donen lloc a una unitat de repetició d'uns 180 nt (39) enlloc dels típics 200 nt de la cromatina (42). Això és possible perquè el mini cromosoma també interacciona amb el HBcAg i redueix l'espai entre els nucleosomes en un 10% (41). A més, la proteïna X del VHB (HBx) també interacciona amb el mini cromosoma de

cccADN, tot i que més que formar part de la seva estructura actua com a regulador de la transcripció a través de la interacció amb altres proteïnes que si que contacten amb el cccADN (43) (veure 2.1.2.1.4. ORF X i la proteïna X).

ADN-VHB integrat: El 1980 Bréchet i col·laboradors (44) van detectar ADN-VHB integrat al genoma de les cèl·lules de teixit hepàtic tumoral i en línies cel·lulars d'hepatoma. Aquest fenomen té lloc tant en infeccions agudes com cròniques i es detecta freqüentment en HCC per VHB (45–48). La integració del genoma viral en el de l'hepatòcit infectat no és completa, a més d'alteracions al genoma cel·lular també causa trencaments i/o reordenaments a l'ADN viral. Els fragments del genoma del VHB integrats tenen grans delecions, difereixen entre elles en mida i estructura i no són replicativament competents (45–47).

L'anàlisi de les seqüències dels punts d'unió de l'ADN viral amb el de l'hoste ha mostrat que en la majoria de casos la integració es dona pels DRs situats a cada extrem del genoma viral (49). Per altra banda, estudis "in vitro" han mostrat que l'ADN-VHB es pot integrar amb més freqüència quan aquest està en forma d'ADN lineal de doble cadena (dslADN) (50). Aquesta forma minoritària del genoma del VHB s'origina durant la transcripció reversa del pgARN a rcADN com es veurà a 2.2.4. Traducció, encapsidació i transcripció reversa de l'ARN pregenòmic. El dslADN es pot encapsidar i també pot donar lloc a cccADN, que per transcripció reversa donarà nous dslADNs (50).

La integració d'ADN-VHB en el genoma de la cèl·lula hoste té lloc a prop o dins de llocs fràgils o altres regions repetitives com per exemple les seqüències Alu i microsatèl·lits, que són propensos a la inestabilitat en el desenvolupament de tumors i la seva progressió (48). Aquesta integració s'ha detectat en múltiples loci de diferents cromosomes però té lloc de manera preferent en gens involucrats en la senyalització i el control de la mort cel·lular i proliferació (51). Així doncs, les seqüències virals integrades poden contribuir a la transformació hepatocel·lular maligne de diferents maneres:

1. La producció de proteïnes virals alterades, especialment la HBx, que es codifica en les seqüències adjacents als DRs (per on el VHB s'integra preferentment). La producció de proteïnes X i preS/S truncades pot activar vies de senyalització implicades en oncogènesi (trans-activació) com es veurà a 2.1.2.1.3. ORF S i les proteïnes de superfície i 2.1.2.1.4. ORF X i la proteïna X (52,53).
2. La modificació de l'expressió gènica o alteració de l'estructura i/o funcionament de proteïnes cel·lulars, degudes a la integració de l'ADN viral en les seves regions reguladores o codificants (cis-activació) (54–57). La integració de fragments d'ADN-VHB al genoma

d'hepatòcits pot donar lloc a proteïnes híbrides amb propietats tumorogèniques, com les proteïnes híbrides VHB-ciclina A o VHB-receptor de l'àcid β -retinoic (56,57).

2.1.2.1. Les pautes obertes de lectura i proteïnes virals:

El 1979 varis grups van aconseguir clonar per primera vegada el genoma del VHB en *Escherichia coli* i seqüenciar-lo (58–60). Entre altres troballes, aquests estudis van revelar que el genoma d'aquest virus té quatre pautes obertes de lectura (ORF) a la cadena - del genoma del VHB i en la mateixa orientació que codifiquen set proteïnes diferents (figura 3). L'elevat grau de solapament del genoma del VHB no es limita als ORFs ja que també conté varies seqüències reguladores i senyals en cis, necessaris per la replicació viral. Degut a la mida relativament petita del genoma del VHB (3,2 Kb) hi ha un alt grau de solapament entre els quatre ORFs de manera que cada nt participa en la codificació de com a mínim una proteïna viral, però la majoria d'ells ho fan en 2 o més proteïnes. Per exemple, en el cas dels nt que codifiquen la SHBs, també formen part de les altres dues proteïnes de superfície (MHBs i LHBs) i de la transcripcatasa reversa (RT), per tant quatre proteïnes diferents (figura 3). A més, l'estructura secundària que adopta aquest genoma també és important per dirigir processos del cicle replicatiu del VHB com la transcripció, transcripció reversa, etc. (16,17), per tant al genoma del VHB hi ha bases que formen part de seqüències reguladores i estructurals essencials pel virus i a més estan incloses a la regió codificant d'alguna de les seves proteïnes.

Els VHB té una gran heterogeneïtat genètica. L'anàlisi per filogènesi de genomes de diferents orígens ha donat lloc a la seva classificació en 10 genotips diferents (anomenats per ordre alfabètic de l'A al J) amb una divergència nucleotídica superior al 7,5% del total del seu genoma (61) i amb longituds lleugerament diferents degut a insercions i delecions (62). Tot això s'explicarà amb més detall a 2.3.2. Els genotips del VHB. Aquestes diferències de longitud entre els diferents genotips dificulten la localització dels ORFs i elements reguladors dins el genoma del VHB: per consens la numeració de les posicions dels genomes del VHB comença a la seqüència de la diana única de l'enzim de restricció EcoRI (59), o al lloc on hauria d'estar aquesta diana si no està present, i en la majoria de genomes del VHB la numeració és comuna aproximadament fins el nucleòtid 1910 a partir d'on comença a divergir (63). Per tal de localitzar de manera inequívoca els diferents elements del genoma del VHB que es comentaran, en aquesta memòria s'ha referit la localització dels diferents elements del genoma del VHB sempre que ha estat possible a una seqüència de genoma complert de genotip A i subtipus adw2, a la qual s'ha anotat exhaustivament la localització dels ORFs i múltiples elements reguladors del genoma del VHB (63). La seqüència d'aquest genoma junt amb el conjunt de les seves

que es segrega, per tant el HBeAg no forma part de la partícula viral madura. Aquest antigen tampoc és necessari per la replicació viral (67).

Aquesta proteïna es comença a traduir pel codó d'inici que comença al nt 1814 i acaba al nt 2458, amb la qual cosa dona lloc a la proteïna PC o p25, de 25 quilodaltons (KDa) de pes molecular i entre 212 i 214 aminoàcids (aa) de longitud. Els 29 aa de l'extrem N-Terminal d'aquesta proteïna són els codificats per la regió PC de l'ORF PC/Core, i els seus aa hidrofòbics són un senyal que dirigeixen la proteïna PC a la via secretora de la cèl·lula, per la qual cosa aquesta proteïna es trascolada de al lumen del reticle endoplasmàtic rugós (RER), on comença el seu processament post-traduccional que es resumeix a la figura 4, al final del qual dona lloc al HBeAg madur o p17, d'uns 17-18 KDa de pes molecular i una longitud d'uns 159 aa (68). També s'han observat partícules Dane buides (sense àcids nucleics dins seu) en el sèrum de pacients amb infecció per VHB, amb càpsides formades per proteïnes de 22 KDa (p22cr) que podrien provenir d'un processament alternatiu de la p25 (69) (figura 4). Aquestes partícules Dane ADN/ARN negatives podrien servir de reclams pel sistema immunitari.

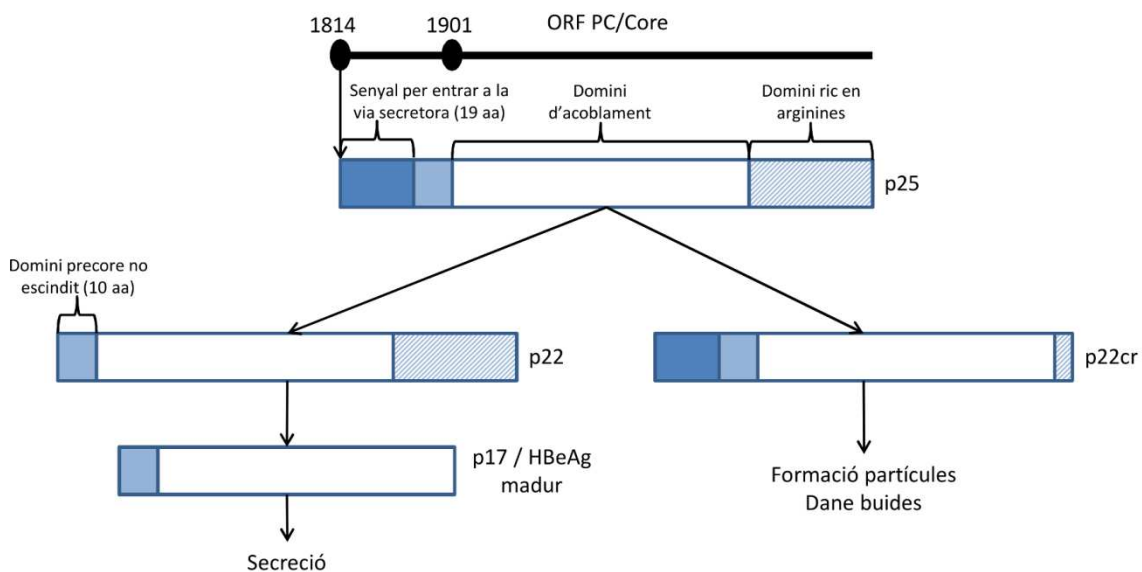


Figura 4: Esquema del processament post-traduccional de la proteïna p25. Aquesta proteïna es tradueix des del primer codó d'iniciació de la traducció de l'ORF PC/Core (posició 1814) i el seu processament post-traduccional pot donar lloc a dues proteïnes de 22 KDa: la p22 s'origina en tallar els 19 aminoàcids (aa) de l'extrem N-terminal per una peptidasa de senyal (66). La p22 conserva en el seu extrem N-terminal 10 aa de la regió PC, entre els que es troba una cisteïna en la posició 7 que interacciona amb la que està a la posició 61, de manera que evita la formació dímers com el HBcAg, i preserva les propietats que tindrà el HBeAg (70). Després d'això, la p22 passa a la xarxa trans-Golgi on s'escindeixen els 34 aa del domini ric en arginines del seu extrem C-terminal per proteïnes transmembrana d'aquesta xarxa, cosa que dona lloc al HBeAg madur o p17 (68). La p22 "core related" (p22cr), en canvi, no perd la senyal del seu extrem N-terminal però sí que perd el domini ric en arginines de l'extrem C-terminal (69).

La funció principal del HBeAg és atenuar les respostes immunitàries innates i específiques al HBcAg (71–73), per tant és una molècula immunomoduladora. Aquest antigen és capaç de

travessar la placenta, per tant inclús podria tenir un paper immunotolerogen a HBcAg “in utero”, amb la qual cosa promou la persistència del virus després de la infecció perinatal (74).

El sistema immunitari innat ataca patògens exògens per mitjà de receptors que reconeixen patrons moleculars. Els principals receptors que s'encarreguen de realitzar aquesta funció són els Toll-like receptors (TLR), que promouen una resposta basada en citocines proinflamatòries a través de la via Toll/IL-1 receptor (TIR) (75). El HBeAg es capaç d'interaccionar amb diferents elements d'aquesta via de senyalització, tant a nivell del receptor (TLR2) com de molècules que formen part de la cascada de senyalització (Mal i TRAM), per tal de suprimir l'activació de factors inflamatoris i factors de transcripció inflamatoris (71). D'aquesta manera s'indueix un estat d'immunosupressió de la resposta innata, que evita l'aclariment immunitari de la infecció per VHB i permet la seva persistència.

El sistema immunitari adaptatiu inclou els limfòcits T i B, que s'activen mitjançant la presentació de components específics de proteïnes virals (antígens) per cèl·lules presentadores d'antigen. El HBeAg disminueix la presentació d'antigen regulant a la baixa l'expressió de la molècula co-estimuladora CD86 a les cèl·lules de Kupffer i monòcits CD14-positives (73), i d'aquesta manera bloqueja l'estimulació i maduració de limfòcits T col·laboradors o “helper” (Th) indiferenciats. El HBeAg produeix principalment una resposta immunitària humoral estrictament dependent de limfòcits T (76), que dona lloc als anticossos contra el HBeAg (anti-HBe), ja que indueix preferentment una resposta limfòcits T del tipus Th² (per tant provoquen l'activació de limfòcits B). De totes maneres aquest antigen també es capaç d'induir una resposta del tipus Th¹ (que poden provocar l'activació de macròfags) segons les citocines que hi hagi a l'entorn (72).

El HBeAg també es capaç de regular l'expressió de diferents gens de la cèl·lula relacionats amb regulació de la transcripció, receptors de la superfície de la membrana cel·lular, regulació del cicle cel·lular, biosíntesi d'àcids nucleics i senyalització i transport intracel·lulars (77). Per tant en les hepatitis B cròniques (HBC), la positivitat d'aquest antigen és un predictor fort de desenvolupament de HCC (78).

Proteïna core: L'existència del HBcAg va ser observada per primer cop el 1971 en el treball d'Almeida i col·laboradors (9), que després d'aïllar els nuclis de les partícules Dane van demostrar que els pacients amb hepatitis B fabriquen anticossos (anti-HBc) contra els antígens d'aquest nucli.

El HBcAg és el producte que té lloc en començar la transcripció de l'ORF PC/Core pel seu 2n codó d'inici (posició 1901, figura 5). Aquest transcrit dona lloc a una proteïna d'entre 183 i 185 aa i un pes molecular de 21 KDa, per això al HBcAg també se l'anomena p21 (22). Tot i que la seva funció principal és formar les càpsides del VHB (veure 2.1.1.1. Partícules virals), les HBcAg també es poden trobar al nucli dels hepatòcits com a components del minicromosoma de cccADN (41). La localització del HBcAg al citoplasma, al nucli o tots dos compartiments cel·lulars sembla dependre, al menys en part, de la fase de la HBC (veure 2.4.3. Història natural de la hepatitis B crònica): el HBcAg es troba al citoplasma durant la inflamació hepàtica per aclariment immunitari, una fase en la que l'hepatòcit necessita dividir-se per regenerar el teixit danyat, mentre que en fase de tolerància immunitària, en que les cèl·lules no s'han de dividir, s'incrementa la seva concentració nuclear (79).

L'estructura del HBcAg ha estat resolta per cristal·lització (14). D'aquesta manera s'ha observat que la proteïna core té una estructura del tipus "hairpin" en forma de L, amb dues hèlix alfa antiparal·leles ($\alpha 3$ i $\alpha 4$) unides per un "loop". Aquestes dues hèlix estan unides a una altra hèlix alfa perpendicular ($\alpha 5$) (figura 5). Les hèlix $\alpha 3$ i $\alpha 4$ juntament amb el loop que les uneix formen unes estructures en forma d'espiga que sobresurten de la superfície de la càpsida, les quals donen lloc a la principal regió epitòpica del HBcAg (80). De fet el HBcAg és una proteïna altament immunògena, que dona lloc a una resposta humoral (formació d'anti-HBc) forta i duradora en el temps. També indueix respostes de limfòcits T tant Th com citotòxics (CTL), tot i que el HBcAg funciona també com a antigen independent de limfòcits T (76). A la figura 5 es pot veure que la proteïna core està dividida en dos dominis estructuralment i funcionalment diferents: La regió N-terminal (fins l'aa 149 o 151 segons el genotip), fa possible la dimerització del HBcAg i l'acoblament de la càpsida, per això se l'anomena domini d'acoblament. Els darrers 34 aa de l'extrem C-terminal (que s'eliminen de la p22 durant el seu processament postraduccional cap a HBeAg madur) creen un domini ric en arginines (domini protamina) que permet la interacció del HBcAg amb el pgARN, la qual cosa és essencial per l'encapsidació del complex pgARN-polimersa (25,81). Al domini C-terminal del HBcAg també s'hi troben les senyals de localització (NLS) i d'exportació (NES) nuclear que li permeten unir-se al complex del porus nuclear i traslladar-se del nucli al citoplasma i viceversa en diferents situacions (82). Finalment, al domini protamina també es troben els residus serina que són els principals llocs de fosforilació del HBcAg (figura 5), essencials per l'encapsidació i retrotranscripció del pgARN (83) així com per regular la localització nuclear de les nucleocàpsides a través de l'activació del NLS (84) (veure 2.2.2. Transport i entrada al nucli i 2.2.4. Traducció, encapsidació i transcripció reversa de l'ARN pregenòmic).

Les proteïnes core formen dímers entre elles al citoplasma, gràcies a l'establiment d'un pont disulfur entre els seus residus cisteïna-61 (13). Això es possible perquè aquestes proteïnes no tenen la seqüència de la regió PC com s'ha comentat a l'apartat anterior (proteïna precore). La interacció de dos HBcAg dona lloc a estructures similars a una T invertida: el pal vertical està format per quatre hèlix α (dos α_3 i dos α_4), amb un "hairpin" per cada proteïna que forma una protuberància cap a l'exterior de la proteïna, mentre que el pal horitzontal format per dos hèlix α_5 actua de mediador de l'associació entre diferents dímers (14) (figura 5). L'associació d'aquests dímers es dona en grups de cinc o sis, organitzats al voltant d'un eix de simetria quàntuple o quasi-sèxtuple (14,85). Finalment es forma la càpsida, que és una estructura fenestrada (14), amb porus que es creu que permeten la lliure difusió de desoxiribonucleòtids (dNTPs) cap a l'interior de la càpsida durant la transcripció reversa del pgARN i de ribonucleòtids (NTPs) cap a l'exterior en degradar-se el pgARN després de la seva retrotranscripció.

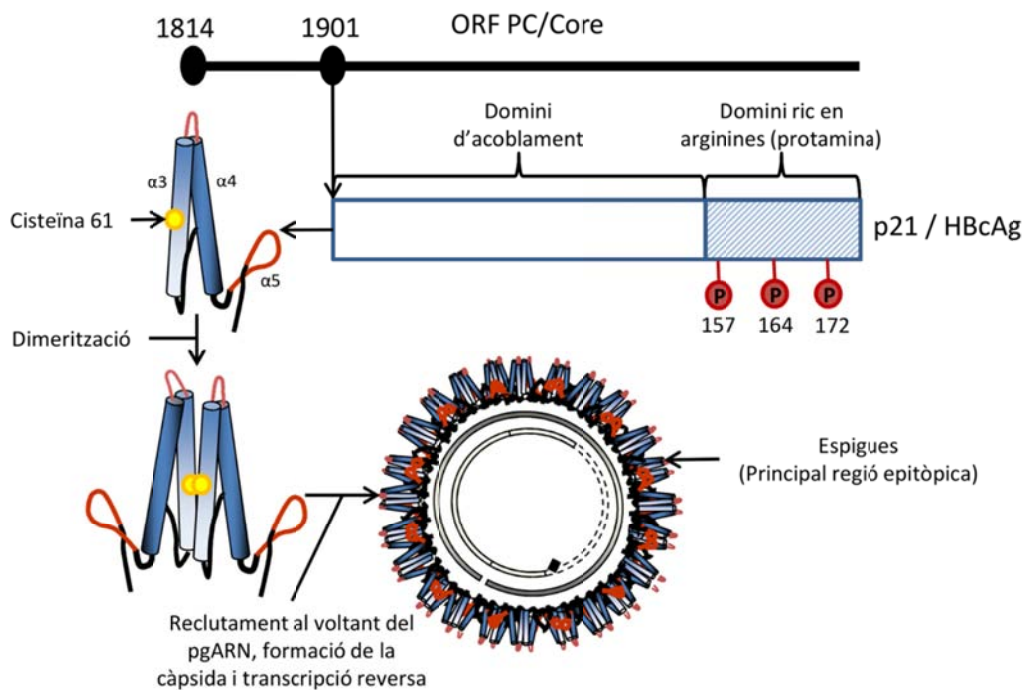


Figura 5: Esquema de la proteïna core (HBcAg o p21) i el seu acoblament en càpsides virals. Aquesta proteïna consta de dos dominis estructuralment i funcionalment diferenciats: el domini N-terminal gràcies al qual les proteïnes core poden acoblar-se, primer dimeritzen a partir dels residus cisteïna-61 i després aquests dímers s'acoblen entre ells en subunitats que acabaran formant la càpsida viral. El domini C-terminal, ric en arginines, aminoàcids bàsics rics en càrregues positives. En aquest domini estan indicats els residus serina de les posicions 157, 164 i 172 que es fosforilen segons [localització d'aquestes posicions extreta de (22)].

2.1.2.1.2. ORF P i la polimerasa:

L'ORF P és el més gran del genoma del VHB, ocupa el 80% de la seva seqüència, i es solapa en menor o major mesura amb els altres tres ORFs (figura 3). Aquest ORF codifica la polimerasa viral (proteïna P). El mecanisme real de funcionament d'aquest enzim va ser descrit per primer cop el 1982 per Summers i col·laboradors en un model de virus d'hepatitis B d'ànec (*Anas domesticus*) (DVHB) (30). Segons els resultats d'aquest estudi la polimerasa present en les partícules core del DVHB retro-transcrivien en primera instància un motlle d'ARN i en un segon pas la nova cadena d'ADN-VHB gràcies a una ribonucleasa H (ARNasa H) acoblada. Aquesta capacitat de la polimerasa del VHB per retro-transcriure ARN, eliminar el motlle d'ARN i sintetitzar ADN evidencia la similitud del mecanisme de replicació del VHB amb el dels retrovirus.

La proteïna P té un pes molecular de 90 KDa i és multifuncional: s'uneix al pgARN i col·labora en la seva encapsidació i la síntesi del nou genoma del VHB, gràcies a la seva activitat encebadora de la transcripció reversa i de polimerasa ARN i ADN depenent. A més és capaç de degradar el seus motlles d'ARN gràcies a l'activitat ARNasa H (22). Aquestes funcions les realitza gràcies als seus quatre dominis repartits al llarg de la seva seqüència: proteïna terminal (TP, nt 2307-2862), espaiador (SP, nt 2863-129), transcriptasa reversa (RT, nt 130-1161) i ARNasa H (RH, nt 1162-1623) (figura 6), dels que no es disposa de dades estructurals directes perquè encara no s'ha pogut cristal·litzar la proteïna P degut a la seva alta insolubilitat (17). Actualment aquesta proteïna és la única diana del propi VHB que s'ha aconseguit aprofitar amb èxit per a la teràpia antiviral mitjançant antivirals orals anàlegs de nucleòtids o nucleòsids (NUCs), com s'explicarà a 2.5. Tractaments contra la hepatitis B.

Dominis de la regió N-terminal: Aquesta regió d'uns 349 aa conté els dominis TP i SP (figura 6). En no disposar de dades estructurals directes de la proteïna P no es sap pràcticament res sobre l'estructura tridimensional d'aquests dos dominis, perquè no comparteixen homologia amb altres proteïnes d'estructura coneguda recollides en bases de dades. No obstant això s'han pogut identificar motius i residus crítics per varies de les activitats de la polimerasa mitjançant estudis genètics i bioquímics (31–33,86–91) (figura 6).

El domini TP és essencial per la replicació del VHB ja que és imprescindible per la unió de la polimerasa viral amb el pgARN. Aquesta unió té lloc a través de la interacció amb una estructura secundària que es forma a l'extrem 5' del pgARN, la seqüència d'encapsidació o ϵ , localitzada a la seqüència de la regió PC (entre els nt 1851 i 1904) (92,93), amb la col·laboració de xaperones com les "heat-shock proteins" Hsp90, Hsc70 i les seves respectives co-xaperones

Hop i Hsp40 (16,17). Això dona lloc a un complex ribonucleoproteic format per la proteïna P, la seqüència ϵ i xaperones, que indueix l'encapsidació del pregenoma i la iniciació de la síntesi de la cadena - del rcADN encebada pel propi domini TP com s'explicarà en detall a 2.2.4. Traducció, encapsidació i transcripció reversa de l'ARN pregenòmic. El fet d'encebar la síntesi d'àcids nucleics (AANN) a partir d'una proteïna (la pròpia polimerasa viral) s'ha observat en altres virus d'ADN i ARN (94–97). En tots aquests casos un aa de la proteïna terminal aporta un grup hidroxil (OH) lliure que substitueix el OH 3' dels encebadors oligonucleòtids, de manera que el nt de l'extrem 5' de la nova cadena quedarà unit covalentment a aquest aa mitjançant un enllaç fosfodièster. Per altra banda, aquest mecanisme és molt inusual en les transcriptases reverses i cap altra de les polimerases encebades per proteïnes conegudes conté la seva proteïna terminal com un dels seus dominis integrals, per tant les polimerases de VHB i els hepadnavirus són úniques en aquests aspectes (17). El domini TP té dues regions conservades, importants per les seves funcions:

- A la regió N-terminal de la TP hi ha uns 50 aa conservats que comencen al voltant de la posició 42 de la TP del VHB i que contenen l'aa donador de l'OH al que s'uneix covalentment l'extrem 5' del rcADN. En el cas de la TP del VHB humà aquest aa és la tirosina que hi ha a la posició 63 (Y63, enllaç tirosil-fosfodièster) (31–33) (figura 6).
- A la regió C-terminal de la TP es troba una altra seqüència d'uns 65 aa conservats, que comença aproximadament a la posició 112 de la TP del VHB humà. En aquesta regió hi ha intercalats varis residus aromàtics, així com un motiu altament conservat i hidrofòbic format per la seqüència Alanina-Glicina-Isoleucina-Leucina-Tirosina-Lisina-Arginina (AGILYKR) anomenat T3, que intervé en totes les funcions de la TP (98,99) (figura 6). Aquest motiu s'ha estudiat sobretot en el model del DVHB, on s'ha observat que s'exposa a la superfície junt amb tota la regió C-terminal de la TP, per l'acció de xaperones (88). Donat que la majoria dels residus del motiu T3 són hidrofòbics es creu que en ser exposat a la superfície aquest motiu pot actuar com a punt de contacte molecular amb una regió del domini RT (RT-1) (figura 6), per formar el lloc d'unió de la proteïna P amb la seqüència ϵ del pgARN (99).

A continuació del domini TP es troba una regió interna que és el domini SP, que sembla tenir com a única funció unir la TP amb els dominis de l'extrem C-terminal mitjançant una connexió flexible com una frontissa (22) (figura 6). Aquesta hipòtesi sembla estar avalada perquè la major part del domini SP pot ser sotmès a mutagènesi sense alterar significativament l'activitat de la proteïna P (86). No obstant això, aquest domini conté tres cisteïnes a l'extrem C-terminal, que juntament amb una altra cisteïna entre el final de l'extrem C-terminal del TP i el N-terminal del domini RT són necessàries per l'encapsidació del pgARN (91) (figura 6).

Dominis de la regió C-terminal: En aquesta regió d'uns 500 aa es troben els dos dominis catalítics de la polimerasa, RT i RH (figura 6). A diferència dels dominis de la regió N-terminal, els alineaments de la seqüència primària d'aquests dominis van revelar l'homologia del domini RT amb els de les transcriptases reverses dels retrovirus, amb les que comparteix motius universalment conservats (100). Pel que fa al domini RH l'homologia de seqüència amb ARNases H de transcriptases reverses de retrovirus i altres retroelements és baixa però significativa (86,101,102).

El domini RT actua com a transcriptasa reversa (utilitza el pgARN com a motlle per la síntesi de la cadena - del rcADN) i ADN polimerasa (utilitza la cadena - com a motlle per la síntesi de la +). Hi ha varies evidències que demostren l'homologia entre el domini RT del VHB i la transcriptasa reversa del Virus de la Immunodeficiència humana-1 (VIH-1), com:

- l'homologia entre les seqüències d'aa (103).
- El fet que varis inhibidors de la transcriptasa reversa del VIH-1 (tractaments antivirals de la família dels NUCs) també tenen una potent activitat contra el VHB i les mutacions que confereixen resistència a aquests tractaments tenen lloc en posicions equivalents segons les prediccions estructurals (103,104). La importància d'aquestes mutacions pel tractament de la HBC ha portat a assumir per convenció una numeració dels aa del domini RT per poder referir de manera inequívoca les posicions de les mutacions associades a resistència a NUCs independentment de les variacions degudes al genotip o del genoma individual del VHB. Segons aquesta numeració el domini RT comença amb el motiu EDWGPCDEHG i té 344 aa indicats pel prefixe rt (rt1 a rt344) (105).
- L'anàlisi mutacional d'aquestes posicions dona lloc a fenotips similars entre les dues RT (106,107).

Gràcies a les dades estructurals directes obtingudes de la transcriptasa reversa del VIH-1 s'ha pogut generar models estructurals plausibles del domini RT del VHB (103,108–110). Segons aquests models, el domini RT presenta una configuració similar a una mà dreta, amb un palmell, uns dits i un polze, de manera similar a totes les polimerases de les que s'ha aconseguit resoldre l'estructura (111,112) (figura 6). La posició dels dits i el polze defineix una escletxa en el palmell amb el centre actiu del domini RT a la seva base, a través de la qual va passant l'extrem 5' de la cadena en extensió (113). La regió que catalitza aquesta extensió es pot subdividir al seu torn en set dominis funcionals o catalítics (A-G) (figura 6):

- Domini A (aa rt75-rt90): Aquest domini forma part de la butxaca d'unió de dNTPs, una estructura que es forma en desplaçar els dits cap al palmell, la qual cosa redueix l'espai entre el palmell i els dits i redueix l'escletxa del palmell a una butxaca gairebé cega pels dNTPs (114). Aquesta estructura permet al nt entrant interaccionar amb varis residus de la

polimerasa, i a més permet que l'àcid aspàrtic de la posició 83 (rtD83), molt conservat en les ARN polimerases ARN dependents, s'aproximi a uns altres dos residus d'àcid aspàrtic en el domini C (rtD205 i rtD206) també altament conservats (102). Els residus del domini A estan implicats en la coordinació de la meitat trifosfat dels dNTPs entrants i els cations Mg^{2+} (necessaris per catalitzar la formació de l'enllaç fosfodièster) de manera que el seu grup fosfat més proper a la desoxiribosa (fosfat α) pugui ser atacat per grup OH de l'extrem 3' de la cadena d'ADN en extensió (114,115). Els canvis d'aa en aquest domini poden afectar la flexibilitat dels dits i el palmell, cosa que altera la forma de la "butxaca" d'unió de dNTPs.

- Domini B (aa rt159-rt182): Aquest domini, està format per una hèlix α amb una regió en bucle que col·labora en posicionar correctament la cadena motlle dins la regió catalítica (115). Els canvis d'aa en aquest domini solen tenir lloc dins o als voltants de l'hèlix α d'aquest domini i semblen alterar el posicionament de la cadena motlle en relació al centre actiu de la RT.
- Domini C (aa rt200-rt210): Aquest domini juntament amb el domini A participa en la interacció directa amb els dNTPs entrants i la catàlisi de l'enllaç fosfodièster amb la cadena d'ADN en extensió, dins la butxaca d'unió dels dNTPs. El domini C conté el motiu YMDD, que inclou dos residus d'àcid aspàrtic altament conservats rtD205 i rtD206, juntament els residus tirosina 203 (rtY203), metionina 204 (rtM204). Aquest motiu forma part del centre actiu del domini RT juntament amb el residu rtD83 del domini A. El motiu YMDD molt conservat en les ARN polimerases de diferents virus de plantes i animals (116). Els canvis d'aa en aquest motiu redueixen l'eficiència replicativa de la polimerasa (86,117), tot i que en VIH-1 s'ha observat que les polimerases amb canvis en els aa Y183 (equivalent a rtY203) i M184 (equivalent a rtM204) tenen una fidelitat més alta en copiar la cadena motlle que les "wild-type" (118).
- Domini D (aa rt230-rt241): Aquest domini està fora de la butxaca d'unió de dNTPs en el model de VIH-1, però els canvis en ell poden modificar-ne la conformació indirectament perquè aquest domini estableix interaccions amb residus del domini A (119).
- Domini E (aa rt247-rt257): Aquest domini, juntament amb el domini B, intervé en el posicionament precís de la cadena motlle dins la butxaca d'unió de dNTPs, tot i que no en forma part, a través de la seva col·laboració en l'adherència del fosfat del nt entrant a la cadena en extensió ("primer grip") (115). Així doncs, alteracions en aquesta regió alterar la interacció entre l'encebador de la polimerasa i la cadena en extensió.
- Domini F (aa rt37-rt47) i G (aa rt24-rt36): Aquests dominis es troben "upstream" del domini A i són anàlegs als motius 2 i 1 de la RT de VIH-1 respectivament. El domini F no forma part de la butxaca d'unió dels dNTPs, però per analogia al motiu 2 de la RT del VIH-1 es creu que pot interaccionar amb els dNTPs entrants i amb la cadena motlle (114). El

domini G, en canvi, sí que es creu que forma part de la butxaca d'unió de dNTPs, ja que el seu anàleg del VIH-1 (el motiu 1 de la seva RT) conté aa bàsics que interaccionen amb els fosfats α i γ dels dNTPs (100). No s'ha descrit l'efecte de les mutacions en aquests dos dominis sobre el domini RT del VHB.

El domini RH (figura 6) actua com una ARNasa H, unes endonucleases no específiques de seqüència que degraden les cadenes d'ARN en híbrids ARN/ADN. En el cas del VHB, el domini RH degrada el pgARN durant la síntesi de la cadena - del rcADN (120). En diferents membres de la família de les ARNasa H s'ha observat que la degradació de la cadena d'ARN es catalitzada per dos cations divalents, coordinats gràcies a una regió d'uns 100 aa del seu extrem N-terminal que conté els aa DEDD (121) (figura 6). Aquests aa carregats negativament també es troben al domini RH de la polimerasa del VHB i són essencials per la replicació viral (120,122). A més de l'activitat ARNasa H, el domini RH també col·labora en l'encapsidació del complex ribonucleoproteic format pel pgARN, xaperones i la pròpia polimerasa viral (123).

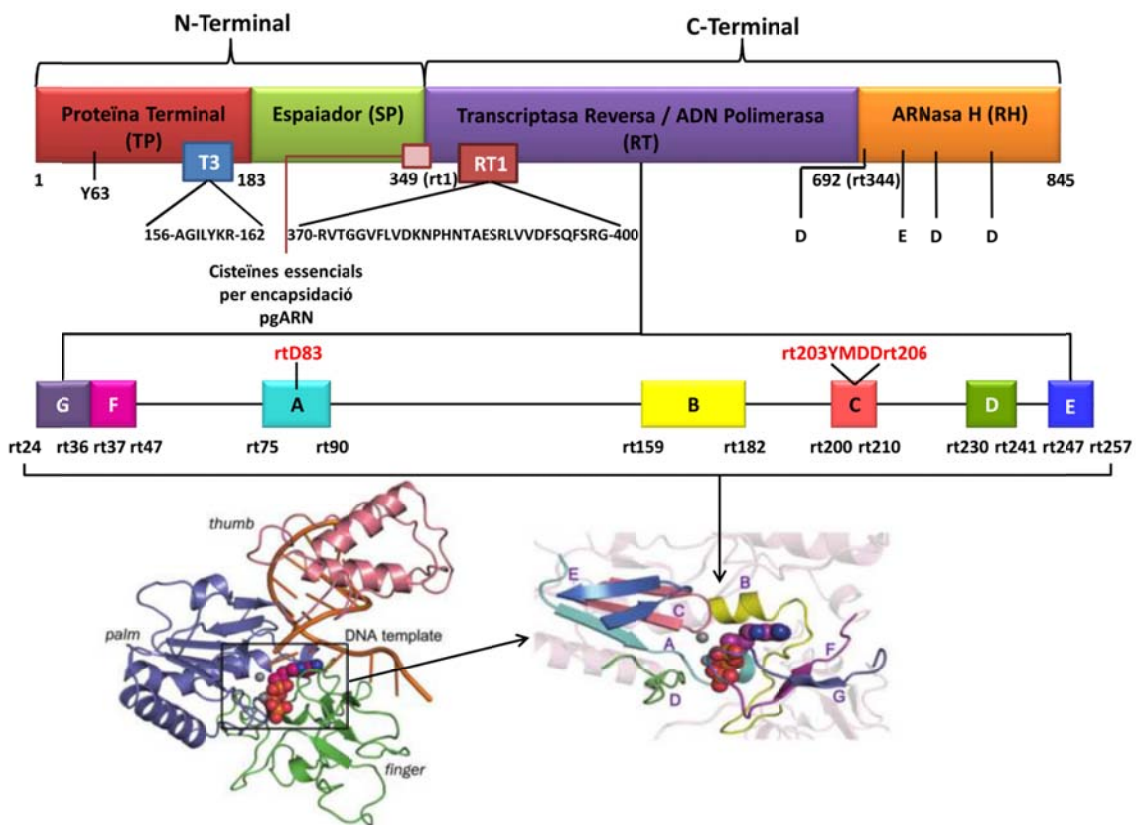


Figura 6: Esquema de les regions més importants dels dominis de la proteïna P (agafant com a referència la seqüència AM282986). La localització de les cisteïnes essencials per l'encapsidació del pgARN i al domini SP i els residus DEDD del domini RH s'ha aproximat segons la referència (124). El domini RT s'ha ampliat per mostrar la situació dels seus diferents dominis funcionals o catalítics segons la numeració de concens (105), on s'indiquen els residus dels dominis A i C que formen part del centre actiu del RT. També es mostren models estructurals del domini RT de la polimerasa del VHB (palmell, polze i dits) i de la disposició dels seus dominis funcionals (125).

2.1.2.1.3. ORF S i les proteïnes de superfície:

L'ORF S està totalment solapat al P, comparteix la seqüència de nts dels dominis SP i una gran part del RT (figura 3). Aquest ORF té tres codons d'iniciació de traducció en fase que defineixen tres regions: preS1 (nt 2854-3211), preS2 (nt 3211-155) i S (nt 155-835) (figura 3). Aquestes tres regions codifiquen les tres proteïnes de superfície, que tenen un extrem C-terminal comú però diferents extrems N-terminal donat que els seus codons d'iniciació de traducció estan en la mateixa pauta de lectura. Així la LHBs conté la seqüència de les regions preS1+preS2+S, la MHBs de preS2+S i la SHBs de S. Aquestes proteïnes són integrals de membrana i es sintetitzen al RER de la cèl·lula hoste, on adquireixen una topologia relativament complexa (126,127). En les partícules virals i les SVP aquestes proteïnes es troben inserides a l'envolta del VHB i en conjunt formen el l'antigen de superfície del VHB o HBsAg (12). Aquest antigen és el principal marcador diagnòstic de la infecció per VHB (1) i va ser el descrit per primera vegada el 1965 per Blumberg i col·laboradors (3).

El HBsAg és un antigen amb una gran heterogeneïtat immunitària. El 1969, Levene i Blumberg van descriure un epítot del HBsAg comú en diferents individus, el determinant antigènic "a", i dos de variables ("b" i "c") (128) i pocs anys després es van descriure dues parelles d'epítots addicionals al determinant "a", variables i mútuament excloents entre ells: d/y (129) i w/r (130). Això va fer possible la classificació del VHB en quatre grans subtipus de HBsAg: adr, adw, ayr i ayw (131), un sistema de classificació fenotípica del VHB que va esdevenir el primer a classificar VHB de diferents orígens. Aquest sistema de classificació es va anar refinant amb la descripció de fins a quatre subdeterminants del determinant w (w1-w4) (132) i la divisió dels individus amb el subtipus adr segons si tenien el determinant q present o absent (133). Amb el temps s'han arribat a descriure fins a 10 subtipus resultants de les combinacions d'aquests determinants i subdeterminants (figura 7) que presenten una marcada distribució geogràfica que es va definir a principis dels anys 80 (134). El desenvolupament de tècniques de seqüenciament de l'ADN va evidenciar que la base molecular que diferencia els subtipus es troba en polimorfismes de la SHBs (135,136), situats fonamentalment a la seva principal regió antigènica [veure a continuació la proteïna de superfície curta (SHBs)]. Les posicions de la SHBs més importants per definir el subtipus es resumeixen a la figura 7.

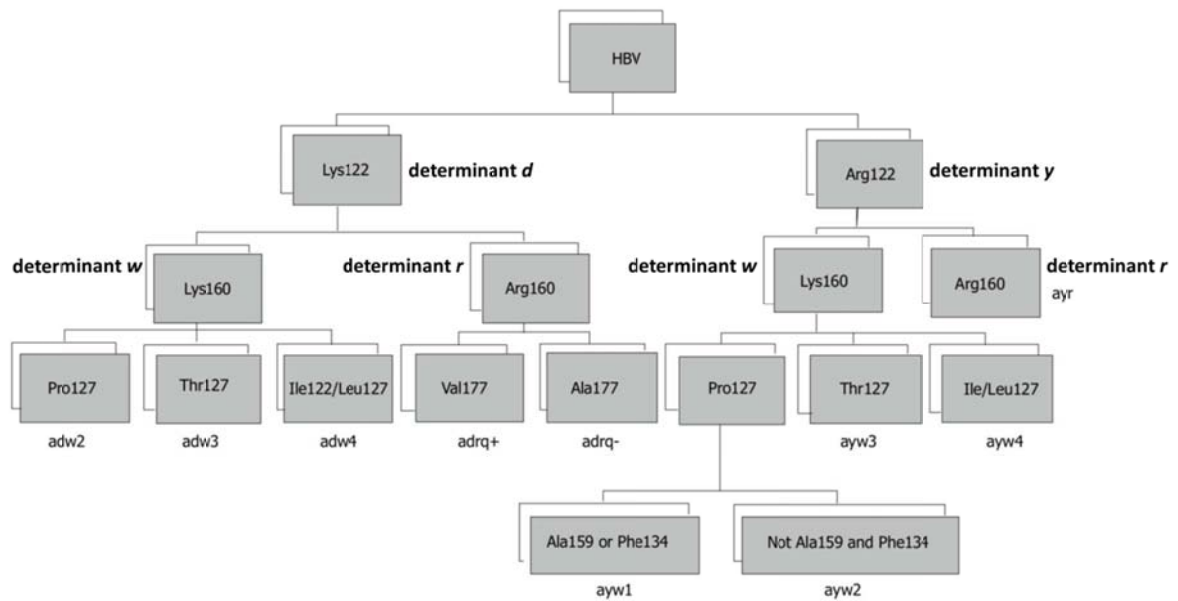


Figura 7: Aminoàcids de l'estructura primària de la proteïna de superfície curta (SHBs) rellevants per determinar el subtipus del VHB (HBV). Modificat de (137).

Proteïna de superfície curta (SHBs): Aquesta proteïna consta de 226 aa i un pes molecular entre 24 i 27 KDa. Aquests aa són els que tenen en comú a l'extrem C-terminal totes les proteïnes de superfície, i és el principal component de l'envolta del VHB. La seva seqüència és rica en aa hidrofòbics, cosa que li permet crear dominis transmembrana a través dels quals les proteïnes de superfície s'insereixen a l'envolta de les partícules virals i les SVP (127).

La SHBs adquireix la seva topologia des del moment en el que es sintetitza a la membrana del RER. En un domini hidrofòbic dins els primers 30 aa del seu extrem N-terminal hi ha una seqüència senyal (senyal I), que no és tallada per les peptidases de senyal i dona lloc a la inserció co-traduccional a la membrana del RER del primer domini transmembrana de la SHBs (TM1, aa s8-s22) i fa que es trasloquin els aa 1 a 7 del seu extrem N-terminal cap al seu lumen del RE (127). Aquest senyal no té activitat intrínseca d'aturada de la transferència de la nova cadena d'aa al lumen del RER, aquesta es para gràcies a una segona senyal interna de la SHBs (senyal II), que conté un motiu molt conservat i altament hidrofòbic. Aquest motiu s'insereix a la membrana en una orientació específica donant lloc al TM2 (aa s80-s98) (127). La inserció del TM2 fa que es formi un bucle entre el TM1 i el TM2 (aa s23-s79) que queda exposat al citoplasma i que es trasloqui la resta de la seqüència cap a l'interior del lumen del RE (25,127). La topologia de la regió C-Terminal a partir del TM2 no està ben caracteritzada, no obstant, en varis models estructurals s'admet que aquesta regió s'organitza en dos dominis transmembrana: TM3 aproximadament entre els aa s170 i s191 i TM4 aproximadament entre els aa s202 i s223 (138,139). Això dona lloc a dos bucles més, un situat entre el TM2 i el TM3 dins el lumen del RE, aproximadament entre els aa s99-s169, i un altre de citoplasmàtic que uneix el TM3 amb el

TM4, aproximadament entre els aa s192-s201. Després de la formació de la partícula viral madura, els bucles que queden a l'interior del lúmen (s1-s7 i s99-s169) queden exposats a la superfície externa de la partícula viral, mentre que els bucles exposats al citoplasma (s23-s79 i s192-s201) queden a l'interior de la partícula viral (25,127). La conformació final de les SHBs en una partícula viral madura es mostra a la figura 8.

El bucle entre el TM2 i el TM3 és una regió hidrofílica i altament immunògena per això s'anomena “major hydrophilic region” (MHR) o “antigenic loop” (AGL). Aquesta regió conté pràcticament tots els aminoàcids que defineixen els diferents determinants antigènics que donen lloc als subtipos del VHB (figura 7). A més, també conté la seqüència del determinant antigènic comú a tots els subtipos, el determinant “a” (s124-s147) (figura 8), el principal epítip conformacional del HBsAg (140), que dona lloc a la resposta immunitària més efectiva en la neutralització del VHB després d'una infecció viral o d'una vacuna i de fet és el principal epítip contra el que es dirigeixen els anticossos contra el HBsAg (anti-HBs) (141). A més, aquest també és el principal epítip que detecten en els enzimoimmunoassaigs en que es basen els tests de laboratori de detecció del HBsAg (142,143), per tant alteracions en la seva estructura poden donar lloc tant a escapament al sistema immunitari o la vacunació antiviral com a falsos negatius en la detecció del HBsAg (143–145).

Actualment s'han identificat dos funcions importants del determinant “a” dins el cicle replicatiu del VHB. En primer lloc intervé en la secreció de les partícules virals (però no de les SVP) gràcies a la N-glicosilació de l'asparagina en la posició 146 (N146) (figura 8), que es dona aproximadament en la meitat del total de les proteïnes de superfície (L, M i SHBs) (26,146) i té lloc al lumen del RE per N-glicosiltransferases (22). La glicosilació parcial del residu N146 dona lloc a com a mínim una forma glicosilada i una altra sense glicosilar de la L, M i SHBs. En el cas de la SHBs la forma no glicosilada té un pes molecular de 24 KDa (p24), i la glicosilada té un pes molecular de 27 KDa (gp27) (12). El determinant “a” també té és important per la infectivitat del VHB: la seva funció en aquest procés s'ha associat recentment a la unió amb baixa afinitat a proteoglicans heparan sulfat (HSPG) de la membrana dels hepatòcits mitjançant els residus R/K122 y K141 (147). La conformació de la MHR i en particular del determinant “a” són essencials pel posicionament precís de R/K122 i K141 per la seva interacció amb els HSPG. La conformació d'aquesta estructura s'estabilitza gràcies als nombrosos residus cisteïna d'aquesta regió (vuit dels 14 que hi ha a la SHBs estan en aquesta regió). A més, per tal que es produeixi una interacció entre les partícules virals i els HSPG de la membrana cel·lular amb suficient avidesa perquè el virus s'hi pugui unir de manera estable cal que les proteïnes de superfície formin agrupaments a la membrana de l'envolta (147). Les proteïnes de superfície poden formar homodímers (entre dos SHBs) o heterodímers (entre SHBs i MHBs o LHBs) per

unions creuades entre cisteïnes (148). La dimerització de les proteïnes de superfície es dona gràcies a l'acció de la proteïn dissulfat isomerasa, una proteïna resident del lumen del RE que connecta residus de cisteïna lliures (20). Així doncs, els ponts dissulfur que estableixen la conformació del MHR són fonamentals per les propietats funcionals i antigèniques de les proteïnes de superfície, així com també per la secreció de les SVP (149,150).

Proteïna de superfície mitjana (MHBs): Aquesta proteïna es tradueix a partir de les seqüències preS2 i S, per tant conté la seqüència de la SHBs amb la mateixa topologia i 55 aa extrems, que donen lloc a una proteïna de 281 aa (figura 8). Els 55 aa del preS2 són traslocats al lumen del RE per la senyal I del TM-1 (151). Això deixa accessible per les N-glicosiltransferases d'aquest compartiment el residu d'asparagina en la posició 4 (N4) de la seqüència preS2, que en les MHBs sempre es glicosila "in vivo" (figura 8) (12). Així doncs les MHBs poden tenir fins a dos residus N-glicosilats cosa que dona lloc a una proteïna monoglicosilada (a N4) de 33 KDa (gp33) i una biglicosilada (a N4, i N146 de la seqüència S) de 36 KDa (gp36). Si s'escindeixen els glicans units a asparagina s'obté una forma no glicosilada de 30 KDa (p30) (12). A més, en alguns casos les MHBs i en menor mesura les LHBs poden tenir una O-glicosilació en el residu treonina 37 (T37) de la regió preS2 (152) (figura 8). A diferència de les N-glicosilacions, aquesta O-glicosilació té lloc a l'aparell de Golgi i en els VHB de genotip A no té lloc, ja que aquest genotip no té residu treonina a les posicions 37 o 38 (153).

La funció de les MHBs encara no està clara, s'ha observat que no són necessàries per la infectivitat, secreció o morfogènesi de les partícules virals ni per la formació de les SVP i de fet el model de DVHB no té aquest tipus de proteïnes de superfície (només té SHBs i LHBs) (154,155). Tanmateix s'ha trobat seqüències codificants de MHBs amb truncaments a l'extrem 3' inserides en una elevada proporció d'hepatòcits de teixits o línies cel·lulars d'hepatocarcinoma (53). Aquestes MHBs truncades no es dirigeixen al lumen del RE per entrar a la via secretora de la cèl·lula, sinó al compartiment citoplasmàtic (156). Gràcies a això, aquestes proteïnes truncades poden ser fosforilades per la PKC i desencadenen l'activació de les vies de senyalització c-Raf-1 i Erk2, que al seu torn activen els factors de transcripció "nuclear factor kappa B" (NF-κB) i "activador proteïn-1" (AP-1), que activen la proliferació cel·lular i per tant podrien promoure la formació de tumors (157).

Proteïna de superfície gran (LHBs): Aquesta proteïna té entre 389 i 400 aa perquè conté la seqüència de tot l'ORF S, és a dir, els 226 aa codificats per la regió S, els 55 aa per la preS2 i els 108-119 aa (segons el genotip) per la preS1 (figura 8).

En la LHBs les seqüències preS1 i preS2 no es trasloquen co-traduccionament al lumen del RE i per tant queden inicialment a la cara citosòlica del RER (158,159). La senyal que determina la inserció co-traducciona d'aquesta proteïna és la senyal II (al TM2), per tant el domini TM1 no s'insereix a la membrana del RE, i les dianes potencials de N-glicosilació com les asparagines N4 del preS2 i N15 de preS1 no es glicosilen, perquè queden inaccessibles a les N-glicosiltransferases del lumen del RE (158,160) (figura 8). Així doncs, la LHBs pot tenir una forma no glicosilada de 39 KDa (p39) i una altra de monoglicosilada (en el residu N146 de la seqüència de la SHBs) de 42 KDa (gp42) (12). Una altra modificació co-traducciona important de la LHBs és la unió covalent d'una molècula d'àcid mirístic el seu residu glicina 2 (G2) de la regió preS1, que es creu que s'insereix la regió N-terminal de la LHBs a la membrana del RER tot i que no s'ha demostrat (161) (figura 8). La miristilació de les LHBs és essencial per la infectivitat de les partícules virals (162,163) i és una senyal de retenció al RE (164,165).

Després de la traducció, aproximadament el 50% de les LHBs pateixen una reorientació topològica post-traducciona per la qual el seu extrem N-terminal es traslocat al lumen del RE (158) per un mecanisme probablement controlat per xaperones tals com les "heat shock proteins" Hsc70/Hsp40 i BiP (166), tot i que no està ben caracteritzat. Això dona lloc a dos formes topològiques de la de la regió preS en les LHBs, amb diferents funcions en el cicle replicatiu del VHB:

- La forma citosòlica (i-preS) (figura 8), que correspon a les LHBs que no han estat traslocades al lumen del RE. La repressió d'aquesta traslocació té lloc gràcies al determinant d'ancoratge citosòlic, una seqüència situada a l'extrem C-terminal de la regió preS1 entre els aa 70 i 94 aproximadament (160,167) (figura 8). Aquest determinant és el lloc d'unio de la xaperona citosòlica Hsc70, per tant aquesta xaperona és la responsable de la repressió de la traslocació co-traducciona de la regió preS (167). Aquesta forma de la LHBs recluta nucleocàpsides i promou la formació de l'envolta al seu voltant, gràcies a una seqüència entre els aa 103 (extrem C-terminal preS1) i 124 (extrem N-terminal preS2) molt conservada entre diferents genomes de VHB i també en el model de VHB de marmota (*Marmota monax*) (WVHB), per tant està relacionada amb la morfogènesi de les partícules virals madures (168) (figura 8). La regió preS2 de la forma i-preS pot activar les vies de senyalització de c-Raf-1 i Erk2 i per tant realitzar funcions trans-activadores tal com passa amb les MHBs truncades, ja que igual que en aquestes la regió preS2 també queda exposada al citosol (157,169).
- La forma del lumen del RE (e-preS) (figura 8), que correspon a les LHBs que han estat traslocades a aquest compartiment. El mecanisme pel qual la regió preS creua la membrana no està clar però es creu que hi té un paper important la proteïna BiP, una xaperona resident al lumen del RE que interacciona amb la regió preS quan e-preS es trasloca al lumen (166,170) juntament amb el senyal del TM2 (171). En ser traslocada al lumen del RE, és

probable que la senyal I de l'extrem N-terminal de la SHBs creui la membrana de manera similar a com ho fa amb les SHBs i les MHBs i per tant el TM1 hi quedi inserida (25) (figura 8). Aquesta forma de la LHBs és responsable del reconeixement de la cèl·lula hoste i de la infectivitat del virus, per tant està relacionada amb la interacció entre el virus i la cèl·lula, com s'explicarà a 2.2.1. Unió i entrada del VHB als hepatòcits.

Les LHBs a més de la seva tendència a ser retingudes intracel·lularment també poden trans-inhibir la secreció de S i MHBs com més elevada sigui la seva proporció respecte aquestes dues proteïnes, cosa que dona lloc a una disminució de les concentracions sèriques de HBsAg i a l'acumulació intracel·lular de proteïnes de superfície (164). S'ha observat que l'acumulació de HBsAg a la cèl·lula provoca l'engrandiment del RE degut a la sobrecàrrega de proteïnes de superfície al seu interior, cosa que dona lloc a hepatòcits amb un citoplasma d'aspecte opac, vidriós, llis i uniforme al microscopi òptic, que va ser descrits per primer cop el 1973 per Hadziyannis i col·laboradors com a "ground glass hepatocytes" (GGH) (172). Existeixen diferents tipus de GGH entre els quals en els GGH de tipus II s'ha observat que solen acumular proteïnes de superfície amb deleccions a preS2. Aquestes proteïnes amb deleccions s'han relacionat amb l'origen d'un procés de cirrosi o HCC (173) i amb escapament immunitari, perquè les deleccions a preS2 poden afectar a un epítot de limfòcits T citotòxics d'aquesta regió (174).

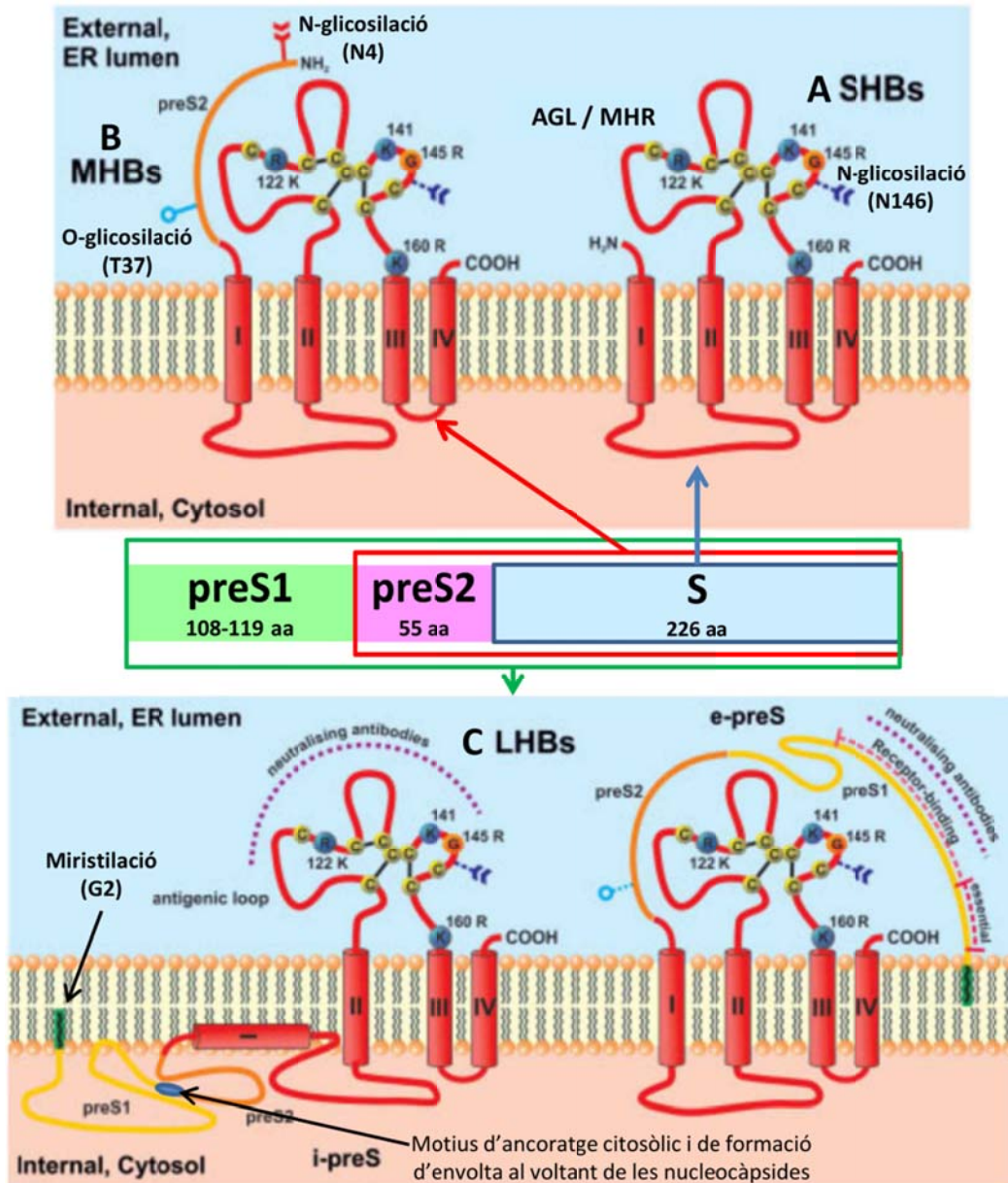


Figura 8: Topologia de la membrana de les proteïnes de superfície. En cada una d'elles es mostren els quatre dominis transmembrana transmembrana (I-IV corresponents a TM1-4) de la seqüència de la proteïna de superfície curta (SHBs) (A) per on s'inserten a la membrana del reticle endoplasmàtic o l'envolta segons els models estructurals (138,139). El bucle entre els dominis II i III (TM2 i 3), correspon a la "major hydrophilic region" (MHR) o "antigenic loop" (AGL), i s'hi indiquen les principals posicions implicades en la determinació dels subtipus del HBsAg (sK/R122 i sK/R160), interacció amb heparan sulfat (sK/R122 i sK141), escapament a immunitari o a la vacunació antiviral (sG145) (175), i glicosilació de les proteïnes de superfície (sN146). Finalment es mostra la xarxa de cisteïnes (C, punts gros a la figura) que estableixen l'estructura de d'aquest bucle o formen unions creuades entre proteïnes de superfície. (B) A la proteïna de superfície mitjana (MHBs) s'indiquen els punts de glicosilació de la regió preS2 propis d'aquesta proteïna. (C) La LHBs pot tenir dos configuracions: amb tota la regió preS orientada cap al citosol en el reticle endoplasmàtic i a l'interior de l'envolta en les partícules virals (i-preS), en aquesta forma s'indica la posició a la regió C-terminal de preS1 i N-terminal de preS2 dels motius d'ancoratge citosòlic i de formació d'envolta al voltant de les nucleocàpsides. La LHBs també pot tenir tota la regió preS orientada cap al lumen del reticle endoplasmàtic i cap a la cara externa de l'envolta en les partícules virals (e-preS). Totes dues formes tenen una molècula d'àcid mirístic unida al residu G2 de preS1, que es creu que s'insereix a la membrana. S'indiquen les posicions dels epítops per anticossos neutralitzants a la seqüència de la SHBs i de preS1. Modificat de (176).

Partícules subvirals (SVP): Les característiques d'aquestes s'han descrit a l'apartat 2.1.1.2. Partícules subvirals. La unitat estructural de les SVP, sobretot les quasiesfèriques de 20 nm de diàmetre, són els dímers de SHBs formats al lumen del RE [veure l'apartat de les proteïnes de superfície curtes (SHBs)]. Aquestes SHBs s'acoblen a la regió del RE situada a l'espai perinuclear, on formen filaments ramificats que es pleguen i s'uneixen entre ells en estructures similars a cristalls. Aquestes estructures s'inclouen en vesícules que són transportades des del RE cap a l'ERGIC, per uns mecanismes i factors cel·lulars que encara no s'han caracteritzat (177,178). A l'ERGIC els filaments es desempaqueten i es relaxen, i com que no poden entrar a la via secretora clàssica de la cèl·lula, a través de l'aparell de Golgi (probablement degut a la seva forma) es converteixen espontàniament en les partícules quasiesfèriques de 20 nm de diàmetre (177,178). Finalment, aquestes partícules es segreguen sense associar-se a la membrana plasmàtica, per un mecanisme que no s'ha caracteritzat (126).

La funció de les SVP no està clara, tot i que s'especula que la sobreproducció de HBsAg pot tenir una funció immunomoduladora, per exemple podria afectar les rutes de la resposta immunitària innata disminuint la capacitat de les cèl·lules presentadores d'antigen (APC) per estimular limfòcits T (179,180), tot i que en alguns estudis no s'observa que disminueixi la capacitat dels diferents APCs per estimular limfòcits T (181). Per altra banda les SVP quasiesfèriques de 20 nm són altament immunògenes i s'utilitzen per fabricar moltes vacunes contra el VHB, per la qual cosa es produeixen grans quantitats de SHBs "in vitro" (182), cosa que pot donar suport a la funció immunomoduladora d'aquestes partícules. Una altra possible funció de les SVP és potenciar la replicació viral a través de la funció trans-activadora o de l'activació de vies de senyalització cel·lular que podria activa el domini preS de les seves proteïnes de superfície (183).

2.1.2.1.4. ORF X i la proteïna X:

Aquest ORF és el més petit del genoma del VHB i es solapa en bona part amb el domini RH de l'ORF P i amb el promotor i l'extrem 3' de l'ORF PC/Core (figura 3). L'ORF X té una seqüència altament conservada entre els hepadnavirus que infecten a mamífers però està absent en molts dels hepadnavirus que infecten aus (184,185). En els models de DVHB i virus de l'hepatitis B del bernat pescaire (*Ardea cinerea*) (HVHB) s'expressen HBcAg que engloben la seqüència de l'ORF PC/Core i l'ORF X en els hepadnavirus de mamífers, i que poden realitzar una activitat similar a la del producte de l'ORF X (186). De fet l'ORF X podria haver aparegut més recentment que els demés ORFs del genoma dels hepadnavirus: en un estudi recent (187) s'ha detectat la seqüència d'un hepadnavirus endogen ancestral inserit al genoma de diamants zebrats (*Taeniopygia guttata*) (ezVHB), que s'estima que pot tenir una antiguitat d'entre 12 i 80

milions d'anys. Aquesta seqüència ha permès reconstruir el genoma viral quasi en tota la seva totalitat i no té cap vestigi d'aquest ORF. Aquest ORF va ser identificat per primera vegada el 1979 per Galibert i col·laboradors en els primers estudis de clonatge i seqüenciació del genoma del VHB (59) i posteriorment se li va assignar el nom de X (188), ja que en un principi no es coneixia la seva funció.

La HBx és un polipèptid d'entre 145-154 aa (segons el genotip del VHB) i un pes molecular d'uns 17 KDa. Aquest polipèptid no és una proteïna estructural del VHB i té una activitat reguladora multifuncional tant en el cicle replicatiu del VHB com en la cèl·lula hoste, gràcies a la seva capacitat per interaccionar amb una gran varietat de factors que li permeten modular l'activitat d'un ampli ventall de promotors virals i cel·lulars (189). Degut a la seva capacitat moduladora de promotors cel·lulars aquesta proteïna ha estat relacionada amb el desenvolupament de HCC en múltiples estudis (190,191). De fet, tal i com passava amb la regió preS2 de les proteïnes de superfície, s'han descrit formes truncades de HBx freqüentment associades a HCC, sobretot a la regió C-terminal (192), un domini trans-activador (193) que a pesar d'aquestes delecions conserva la seva funcionalitat. És comú trobar l'ORF X amb delecions integrat en teixit hepàtic tumoral (52,53) (Veure ADN integrat a 2.1.2. Organització del genoma del VHB). Per altra banda el domini C-terminal de HBx pot ser reprimat pel seu domini N-terminal que és un regulador negatiu (194), la qual cosa indica que la pròpia proteïna té un mecanisme d'auto-regulació que evita la trans-activació excessiva. A més el seu mARN s'acumula a nivells més baixos que els demés mARN virals en el teixit hepàtic infectat (sovint no detectables) (185).

Es pot trobar la HBx al citoplasma, on interacciona amb components de múltiples vies cel·lulars de transducció de senyals i orgànuls, i al nucli, on és reclutada a la cromatina tot i que no interacciona directament amb l'ADN sinó que ho fa a través de l'activació de factors de transcripció (189), modificacions epigenètiques tant al genoma de l'hoste com al cromosoma de cccADN (43,195), etc. Les principals funcions o processos cel·lulars i virals en els que participa la HBx en les seves diferents localitzacions s'han revisat recentment a la referència (189), d'on s'ha extret la informació resumida a continuació, a no ser que s'indiqui una referència diferent:

Regulació de la transcripció: La HBx interacciona amb reguladors transcripcionals nuclears com els components de la maquinària transcripcional basal i també amb metiltransferases com "DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A" (DNMT3A) i histona-desacetilases com "Histone deacetylase 1" (HDAC1), a través de les quals regula l'expressió de varis gens mitjançant modificacions epigenètiques.

Regulació de l'apoptosi i cicle cel·lular: La HBx té funcions anti-apoptòtiques a través de la inhibició de l'activitat transcripcional de proteïnes supressores de tumors com p53, vies apoptòtiques dependents i independents de caspases. Paradoxalment la HBx també té funcions pro-apoptòtiques com per exemple, activant la mort cel·lular a través de l'augment dels nivells citoplasmàtics de calci, alterant les membranes mitocondrials a través de la unió amb la xaperona Hsp60 i "human voltatge-dependent ion channel 3" (HVDAC3) o augmentant la susceptibilitat de les cèl·lules a l'apoptosi mitjançada per "tumor necrosis factor alpha" (TNF- α). Durant la mitosi, la HBx pot causar anomalies cromosòmiques, a través de la unió amb "hepatitis B X-interacting protein" (HBXIP), o de "Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 beta" (hBubR1), un component del complex del punt de control mitòtic. La HBx també pot activar la proliferació cel·lular (196,197).

Modulació de vies cel·lulars de senyalització: La HBx té la capacitat de modular vies cel·lulars de senyalització per produir canvis en el metabolisme de la cèl·lula hoste, com per exemple en el metabolisme de lípids i la gluconeogènesi. La HBx també pot activar la hepatocarcinogènesi a través de l'activació dels factors de transcripció NF- κ B i AP-1, que activen la proliferació cel·lular, igual que passava amb proteïnes de superfície amb truncaments a preS2. Per altra banda HBx també induïx de l'angiogènesi. Finalment HBx pot actuar com una proteïna immunomoduladora actuant sobre la via del "Transforming growth factor β " (TGF- β), implicada en processos inflamatoris. La sobreexpressió de TGF- β pot donar lloc a metastasi. Aquesta proteïna també pot regular els processos inflamatoris a través de la interacció amb la fosfatasa de treonina/serina PP2C α i la resposta immunitària innata unint-se directament al "interferon β promotor stimulator-1 factor" (IPS-1) i inhibint l'expressió de l'interferó β induïda per ADN de doble cadena (dsADN) com el del VHB (198).

Inhibició de la reparació de lesions a l'ADN i vies de degradació proteica: El marcatge de proteïnes cel·lulars per la seva degradació pel proteasoma és crític pel funcionament cel·lular normal. La HBx pot inhibir el marcatge amb ubiquitina per la seva degradació pel proteasoma d'alguns factors de transcripció clau com c-Myc. La HBx també pot incidir en la ubiquitinització a través de la seva interacció directa amb "DNA damage binding protein 1" (DDB1), un dels seus principals lligands, que reprograma l'activitat ubiquitin-lligasa del complex "Cullin4A-DDB1 ubiquitin E3 lligasa" (CUL4-DDB1). Inicialment es va descriure DDB1 com una subunitat del complex UVDDDB, que té la funció d'unir-se a l'ADN danyat i iniciar el mecanisme de reparació per escissió, que és inhibit en unir-se HBx a DDB1 (199). A més, estudis de diferents grups han demostrat que la interacció entre HBx i DDB1 és essencial per la replicació del VHB, tot i que es desconeix el seu paper exacte (200,201). Per altra banda la HBx també pot interaccionar directament amb subunitats del proteasoma, cosa que s'ha

observat que causa una reducció moderada de l'activitat proteolítica del proteasoma "in vitro", però per altra banda això causa la degradació de la pròpia HBx. De fet, les interaccions amb el proteasoma són una via per regular l'estabilitat de la HBx, que sol tenir una vida mitja curta.

Replicació Viral: La síntesi de l'ADN-VHB està regulada per alguns factors de transcripció cel·lulars i proteïnes d'unió a ADN. El paper d'algun d'ells ja s'ha comentat com el cas de IPS-1 i la subunitat DDB1. També tenen un paper destacat en la replicació viral els factors de transcripció de la família "Cyclic-AMP-response element binding protein" (CREB), que actuen sobre el metabolisme i la proliferació cel·lular (202). La HBx estabilitza la unió de CREB amb el minicromosoma de cccADN a l'enhancer 1 (EN1), que regula la pròpia expressió de l'ORF X, i també a preS2 (202), per tant això pot estar relacionat amb l'activació de la transcripció per HBx. A més HBx també interacciona amb el complex "CREB-binding protein" (CBP)/p300, per potenciar l'acció de CREB (203), i amb "Protein Phosphatase 1" (PP1), per inhibir la desfosforilació de CREB i evitar la supressió de la seva activitat transcripcional. Altres factors de transcripció cel·lular dels que HBx estabilitza la unió al minicromosoma de cccADN són "CCAAT/enhancer-binding protein" α (C/EBP α), que potencia la transcripció del pgARN. Per altra banda HBx bloqueja la "protein arginin N-methyltransferase 1" (PRMT1) que també interacciona amb el genoma del VHB i té una activitat inhibidora de la seva replicació.

Durant la replicació viral HBx és reclutada al minicromosoma de cccADN amb una cinètica paral·lela a la de la pròpia replicació (43). En models "in vitro" s'ha observat que genomes del VHB que no expressen la HBx no poden iniciar una infecció productiva, cosa que pot ser compensada amb HBx expressat exògenament (43,204). La replicació del genoma viral està regulada a través del control epigenètic de la transcripció del cccADN mitjançant l'estat d'acetilació de les histones H3 i H4 unides al minicromosoma de cccADN (205): en absència de la HBx aquestes histones són desacetilades ràpidament per desacetilases d'histones i disminueix significativament la transcripció del pgARN (43). Per altra banda, també s'ha descrit que la HBx estimula la fosforilació dels residus essencials de serina del domini protamina del HBcAg (veure 2.1.2.1.1. ORF PC/Core i les proteïnes precore i core, figura 5) (83).

2.1.2.2. Transcrits i elements reguladors de la transcripció:

2.1.2.2.1. Transcrits:

Les proteïnes virals descrites als apartats anteriors es tradueixen a partir de cinc mARN diferents regulats per quatre promotors: els ARN preCore (pcARN) i pregenòmic (pgARN) es

transcriuen des del promor preCore/pregenòmic i són més llargs que el propi genoma del VHB (taula 1). Els tres mARN subgenòmics són preS1 i preS2/S, que es transcriuen a partir dels promotors S1 i S2 respectivament i X que es transcriu des del promotor X (taula 1).

Promotor	Posicions nt del genoma del VHB	mARNs transcrits	Longitud del mARN transcrit	Proteïna viral
PreCore/pregenòmic	1613-1841	pgARN	3,5 Kb	HBcAg
		pcARN	3,5 Kb	P
S1	2716-2834	preS1	2,4 Kb	HBeAg
S2	2966-35	preS2/S	2,1 Kb	MHBs
				SHBs
X	1177-1340	X	0,7-0,9 Kb	HBx

Taula 1: Promotors dels ORF del genoma del VHB amb la seva localització en el genoma: en el promotor PreCore/Pregenòmic les posicions s’han referit a la revisió (206). En el promotor S1 s’han utilitzat les anotacions de la seqüència de referència amb número d’accés AM282986 (63) i en el S2 el seu extrem 3’ s’ha col·locat a la posició 35 situar-hi els diferents motius descrits a les publicacions (207–209). Les posicions del promotor X no estan ben definides i s’han aproximat segons diferents publicacions (210–212). També s’indiquen els ARN missatgers (mARN) que regula cada un d’ells, la seva longitud i la proteïna que codifiquen (202,212): antigen core (HBcAg), polimerasa (P), antigen e (HBeAg), proteïnes de superfície del virus de l’hepatitis B llarga (LHBs), mitjana (MHBs) i curta (SHBs), i proteïna X (HBx).

Com els mARN eucariotes, els mARN del VHB tenen una caputxa o casquet (“cap”) al seu extrem 5’ que consisteix en l’adició de 7-metilguanosa trifosfat, i una cua de poliadenines al seu extrem 3’ (212). La transcripció d’aquests mARN és unidireccional i acaba en la senyal de poliadenilació comuna (seqüència TATAA). Aquesta senyal es troba entre els nt 1916 i 1921, per tant solapada amb l’extrem 5’ de la regió C de l’ORF PC/Core (figura 3). Així doncs tots els mARN anteriors tenen la mateixa seqüència al seu extrem 3’ mentre que l’extrem 5’ és variable perquè depèn de la localització del seu promotor.

També s’han detectat fenòmens de “splicing” en els mARN virals iguals que els que tenen lloc en els mARN eucariotes per eliminar-ne els introns, i permeten la creació de transcrits virals amb “splicings” simples i dobles. Per exemple: el primer transcrit del VHB on es va descriure un fenomen de splicing es tractava d’ un transcrit de 2,2 Kb amb una deleció de 1.223 bases des de l’últim codó del core fins a la meitat de l’ORF S (213). Altres transcrits del VHB creats a partir de fenòmens de splicing, poden encapsidar-se i ser retrotranscrits per donar lloc a partícules virals defectives (214–216), o traduir-se per donar lloc a noves proteïnes virals com l’anomenada proteïna del VHB generada per “splicing” (HBSP), que conté 46 aa de la

polimerasa viral seguits de 47 aa d'una pauta de lectura nova creada pel desfasament degut a la deleció introduïda per el "splicing" (217). S'han detectat anticossos contra la HBSP i s'ha associat amb la replicació viral i la severitat de la fibrosi hepàtica (217,218).

2.1.2.2.2. Regulació dels transcrits precore i pregenòmic:

El pgARN i el pcARN es transcriuen a través del promotor PreCore/Pregenòmic (taula 1). Aquest promotor està format per una petita regió d'uns 108 pb anomenada promotor basal del core (BCP), que és suficient per dirigir la iniciació correcta del pgARN i pcARN (219) i una seqüència "upstream" del BCP que regula la seva activitat i que es coneix com a "upper regulatory region" (URR) (206) (figura 9). El promotor PreCore/Pregenòmic és extremadament dèbil per si mateix i necessita l'activació per part de l'EN1 (220). A més l'enhancer 2 (EN2) té la seqüència solapada amb aquest promotor i també pot estimular-ne l'expressió (219) (figura 9).

El BCP es troba entre l'extrem 3' de l'ORF X i l'extrem 5' de l'ORF PC/Core i es solapa amb el DR1. Tot i que el pgARN i el pcARN es produeixen a partir d'aquesta regió, la seva síntesi comença a partir de seqüències diferents i es regulen independentment (221). Aquestes seqüències segueixen una configuració semblant a la típica dels promotors d'ARN polimerasa II. Per una banda, tot i no tenir una seqüència canònica de les "TATA box" (TATAAA), hi ha quatre regions riques en AT anomenades "TATA-box like". Les tres primeres controlen la síntesi del pcARN que diferents estudis han situat el seu inici als nt 1785-1786 i 1791-1797 (206). La quarta "TATA-box like" controla la síntesi del pgARN del que s'ha situat l'origen al nt 1815 (± 5 nt) (206). La situació d'aquestes regions s'indica a la figura 9. Així doncs, el pcARN és lleugerament més llarg i les seqüències dels seus extrems 5' més variables que les del pgARN. De manera homòloga als promotors cel·lulars de la ARN polimerasa II, el pcARN i pgARN tenen els seus respectius elements iniciadors de la transcripció (Inr), que són els elements promotors mínims solapats a l'inici de transcripció, els quals potencien l'efecte de les "TATA-box like" (222). La seqüència del Inr del pcARN està solapada a la de la quarta "TATA-box like", els dos elements dins d'un motiu de 15 nt entre les posicions 1788 i 1802 suficient per dirigir la iniciació del pcARN i pgARN (223).

La URR conté elements reguladors positius ["core upstream regulatory sequence" (CURS)] i negatius ["negative regulatory element" (NRE)] de l'activitat del BCP (219,224) (figura 9). CURS actua com una regió reguladora que activa la transcripció del BCP específicament en hepatòcits o cèl·lules d'hepatoma ben diferenciades (206), la seva estructura es pot veure a la figura 9. El NRE és capaç de reprimir l'activitat de CURS i EN2 en cèl·lules hepàtiques

diferenciades, i tot i que té un efecte inhibitori dèbil per si mateix la seva activitat és potenciada pel propi EN2 (225). Aquest element regulador es divideix en les subregions NRE- α , β i γ , que per separat tenen un efecte inhibitori dèbil de l'activitat del promotor, però a conjuntament tenen un efecte sinèrgic que augmenta la inhibició (224). Les dues regions de l'URR (CURS i NRE) contribueixen a l'especificitat hepàtica de la replicació del VHB.

Tota la seqüència del promotor PreCore / Pregeòmic (BCP i URR) conté llocs d'unió per factors de transcripció cel·lular ubics i específics del fetge com C/EBP α i β , "Hepatocyte Nuclear Factor" (HNF) 3 i 4, "Peroxisome proliferator-activate receptor" (PPAR), RXR, "chicken ovoalbumin upstream promoter transcription factor" (COUP-TF), "Specificity protein 1" (Sp1), etc. (202). Aquests interaccionen cooperativament, són responsables de l'especificitat d'aquest promotor per expressar-se al fetge i permeten que el pcARN i el pgARN es regulin de manera coordinada o diferenciada. Així, per exemple, mentre que Sp1 estimula selectivament la síntesi de pgARN, HNF4 inhibeix selectivament la síntesi de pcARN (221). A més, el segon lloc d'unió de HNF4, que s'estén per la seqüència "TATA-Box like" que regula l'expressió del pcARN, també és la diana d'altres factors de transcripció, com l'heterodímer format per PPAR γ -RXR α que activa la síntesi de pgARN o COUP-TF1, que reprimeix coordinadament la síntesi tan de pgARN com de pcARN (226).

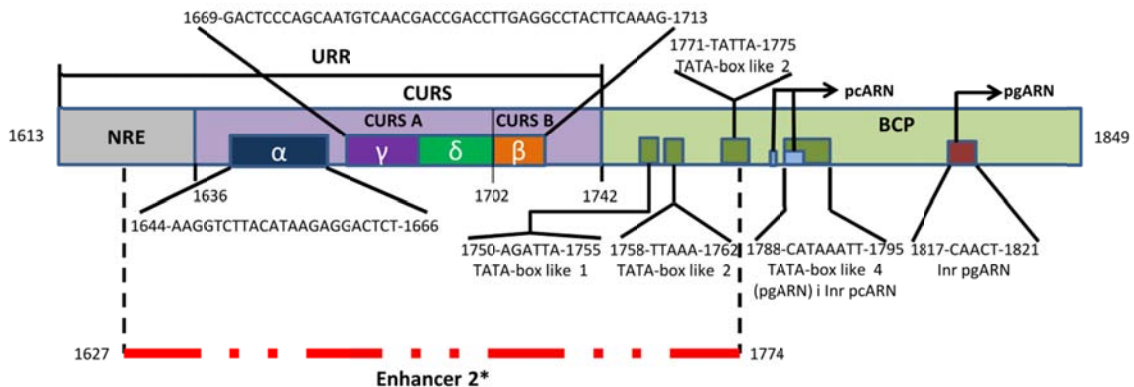


Figura 9: Estructura del promotor PreCore/Pregeòmic. Les posicions nucleotídiques del promotor i els seus elements s'han extret d'una revisió de referència (206), tret dels elements dels que s'indica la seqüència de nucleòtids, dels que tant la seqüència com les posicions estan referides a la seqüència de referència AM282986 (63), on no estaven anotades. En el promotor basal del core (BCP) s'indiquen les posicions dels quatre elements TATA-box like (quadres verds) i els iniciadors (Inr) de l'ARN precore (pcARN) (quadres blaus) i pregeòmic (pgARN) (quadre vermell). En la "upper regulatory region" (URR) s'indiquen les posicions del "negative regulatory element" (NRE) i la "core upstream regulatory sequence" (CURS), subdividida en els dominis CURS A i B, que contenen els motius anomenats "caixes" α , γ i δ que regulen positivament l'activitat del BCP i β que la regula negativament (219). La seqüència de l'Enhancer 2 (EN2) està solapada a aquesta regió però està marcada amb una línia discontinua i un asterisc (*) ja que no està ben definida, es podria situar entre les posicions marcades a la figura (206). S'ha confirmat que EN2 es solapa necessàriament amb les "caixes" α , γ i δ i β del CURS, i la seva funció és estrictament dependent d'una estructura bipartida formada per les seqüències de les "caixes" α i β (219).

2.1.2.2.3. Regulació dels transcrits preS1 i preS2/S:

La transcripció de les diferents proteïnes de superfície és regulada per dos promotors diferents (S1 i S2). L'EN1 té poc efecte sobre la seva transcripció, en canvi l'EN2 sí que pot estimular tots dos promotors de manera independent de la seva orientació (227).

L'ARN preS1 de 2,4 Kb està regulat pel promotor S1, que està solapat amb la seqüència que codifica el domini TP de la polimerasa en l'ORF P (taula 1). Aquest promotor és l'únic del VHB que conté una seqüència "TATA-box" clàssica (228), on s'uneix el factor de transcripció "TATA-binding protein" (TBP), que juntament amb un lloc d'unió per HNF-1 situat "upstream" d'aquest motiu són els dos únics motius que necessita aquest promotor per la seva activitat transcripcional basal (229) (figura 10). A part d'aquests dos motius essencials, l'activitat de S1 també es regulada per factors de transcripció ubics com Sp1 (que també s'uneix a la "TATA-box") i específics del fetge com HNF-3 (230,231).

L'ARN preS2/S de 2,1 Kb es transcriu des del promotor S2 (taula 1), que està situat dins el mateix ORF S, entre les regions preS1 i preS2. Aquest no és un promotor típic d'ARN polimerasa II ja que no té cap motiu "TATA-box" (232), simplement conté un motiu CCAAT i dos elements d'inici de la transcripció que poden actuar independentment (209). El motiu CCAAT, al que s'uneixen els factors de transcripció NF-Y i CBF (233,234), regula les concentracions relatives de les diferents proteïnes de superfície a nivell transcripcional, perquè estimula la producció de l'ARN preS2/S, alhora que reprimeix la producció de l'ARN preS1. Així doncs, el motiu CCAAT és essencial per mantenir una proporció elevada de transcrits preS2/S en relació a preS1, necessari per la regulació de les proporcions relatives de les diferents proteïnes de superfície i per tant per la secreció de partícules virals (235). En la seqüència del promotor S2 s'han identificat set elements transcripcionals (anomenats des de l'A fins al G, figura 10) cada un dels quals conté dianes per factors de transcripció ubics o específics del fetge com per exemple COUP-TF, HNF-3, CREB i "nuclear factor 1" (NF1) (202,207): les regions A, B i C estimulen l'activitat del promotor. La regió D també estimula l'activitat del promotor i és necessària perquè aquest arribi a la seva activitat màxima a través de la seva unió amb un factor de transcripció que no ha estat identificat. La regió F regula negativament el promotor S2 a través de la interacció amb factors de transcripció que encara no s'han identificat, tot i que el seu efecte és contrarestat pels factors de transcripció que s'uneixen a la regió E. La regió G per la seva banda es solapa amb la seqüència iniciadora de la transcripció. El factor de transcripció Sp1 té quatre dianes repartides per les regions B, D, E i F (208) (figura 10). Finalment, el promotor S2 també és activat per l'augment de les concentracions de LHBs,

probablement per l'expressió de factors de transcripció que modulen positivament el promotor S2, que s'expressen com a conseqüència de l'acumulació de LHBs al RE (236).

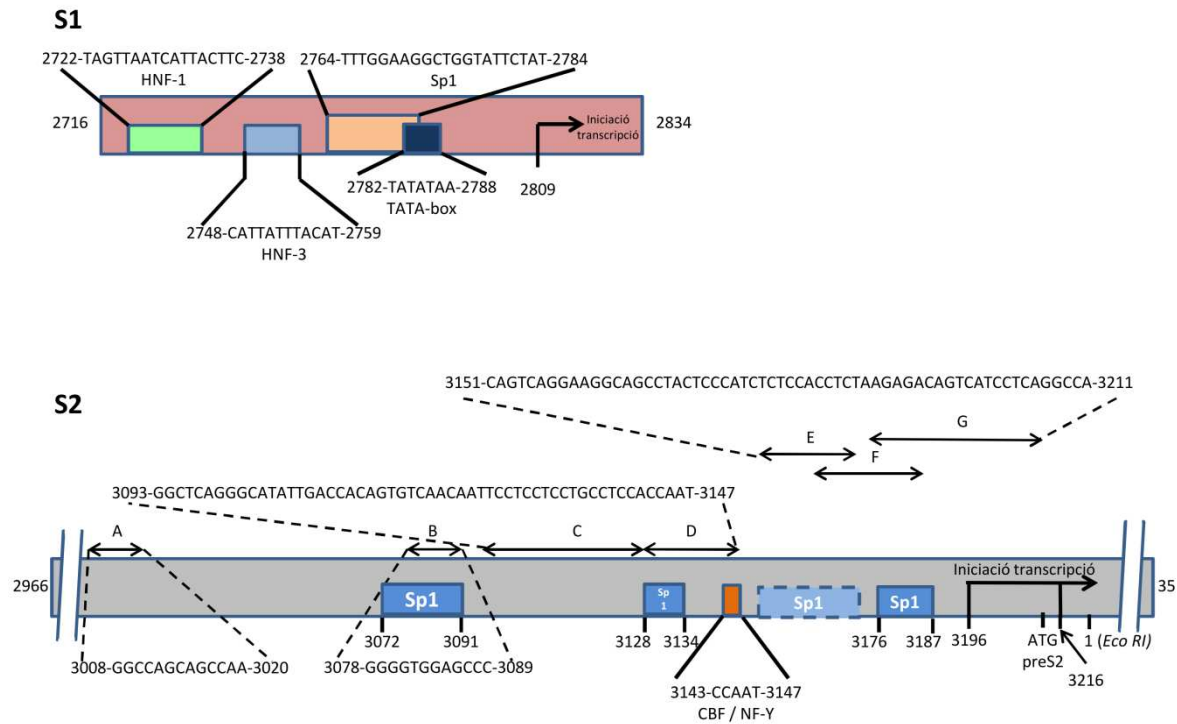


Figura 10: Estructura dels promotors S1 i S2. Les posicions nucleotídiques del promotor S1 i l'extrem 5' del S2 estan referides a les anotacions de la seqüència de referència AM282986 (63). La posició de l'extrem 3' del S2 s'ha ampliat fins la posició 35 per col·locar-hi els diferents motius descrits a les publicacions (207–209), tot i que les seqüències nucleotídiques i les seves posicions corresponen a la seqüència AM282986 on no estaven anotades. S'indiquen algunes de les dianes per la unió de factors de transcripció més rellevants com les d'“Hepatocyte Nuclear Factor” (HNF-1 i 3), “Specificity protein 1” (Sp1) [de les quatre dianes que conté el promotor S2, la solapada amb la regió E no se n'ha caracteritzat les posicions amb precisió (208), per això s'ha marcat amb una línia discontinua i blau clar], “TATA-box” en el promotor S1, i domini CCAAT i regions d'unió a factors de transcripció A a G en el promotor S2.

2.1.2.2.3. Regulació del transcrit X:

El promotor X està solapat a l'extrem 3' de l'EN1 que n'estimula l'activitat (210,211,237). De fet aquests dos elements formen la unitat que regula la transcripció de l'ORF X i els seus límits no estan ben definits, tot i que s'assumeix que la seqüència d'aquesta unitat reguladora es troba totalment solapada a l'ORF P, a la regió entre els ORFs S i X, per tant entre l'extrem 3' del domini RT i l'extrem 5' del RH de la polimerasa viral. L'activitat del promotor X també és estimulada per l'EN2 (227). Aquest promotor regula la producció dels transcrits X, que tenen diversos orígens de transcripció i per tant es caracteritzen per tenir extrems 5' heterogenis (210,238), la qual cosa dona lloc a transcrits de diferents mides (taula 1). Aquesta característica és comuna amb el promotor S2, i com aquest no té seqüències TATA-box o similars (210).

Malgrat l'absència de seqüències "TATA-box", aquest promotor conté diferents seqüències per la unió tant de factors de transcripció ubics com específics del fetge. Guo i col·laboradors (211) van descriure un fragment de 120 nt a la zona de solapament entre X i EN1 on s'agrupen quatre llocs d'unió per factors de transcripció que controlen l'activitat d'aquests dos elements (figura 11). Els dos llocs d'unió més allunyats de l'inici de transcripció de l'ARN X són 2c i EP, tots dos essencials per l'activitat d'EN1 i constitueixen el seu mòdul basal. A 2c s'uneix el factor de transcripció específic del fetge HNF-3 (239) i dona especificitat hepàtica a l'activitat d'EN1. A més, aquests dos llocs d'unió estan solapats a una regió reguladora transcripcional de l'EN1 anomenada LSR (figura 11), la qual activa el promotor X eficientment per si sola en cèl·lules hepàtiques i de manera independent de l'orientació (240). En aquesta regió s'uneixen factors transcripcionals específics del fetge i també ubics (figura 11). Els altres dos llocs d'unió descrits per Guo i col·laboradors (211), més propers a l'inici de transcripció i solapats ja amb el promotor X, formen un mòdul accessori que augmenta l'activitat de l'EN1 unes 10 vegades però no és essencial perquè aquesta tingui lloc. Aquests dos llocs d'unió són l'E que és un lloc d'unió pels factors de transcripció C/EBP, AP-1 i CREB, essencial per l'activitat del promotor X, i un lloc d'unió per NF1 que probablement actua mitjançant la unió entre els mòduls basal i accessori de l'EN1 (figura 11). El lloc d'unió NF1 està parcialment solapat a una seqüència de 20 nt que constitueix la regió mínima suficient per l'activitat del promotor X (241) (figura 11). L'activitat d'aquest promotor mínim és modulada per la pròpia HBx que l'estimula, i pel supressor de tumors p53 que la reprimeix (241). La repressió per p53 es cancel·lada per la HBx, per tant p53 i HBx tenen efectes antagònics en la regulació de la expressió de l'ORF X.

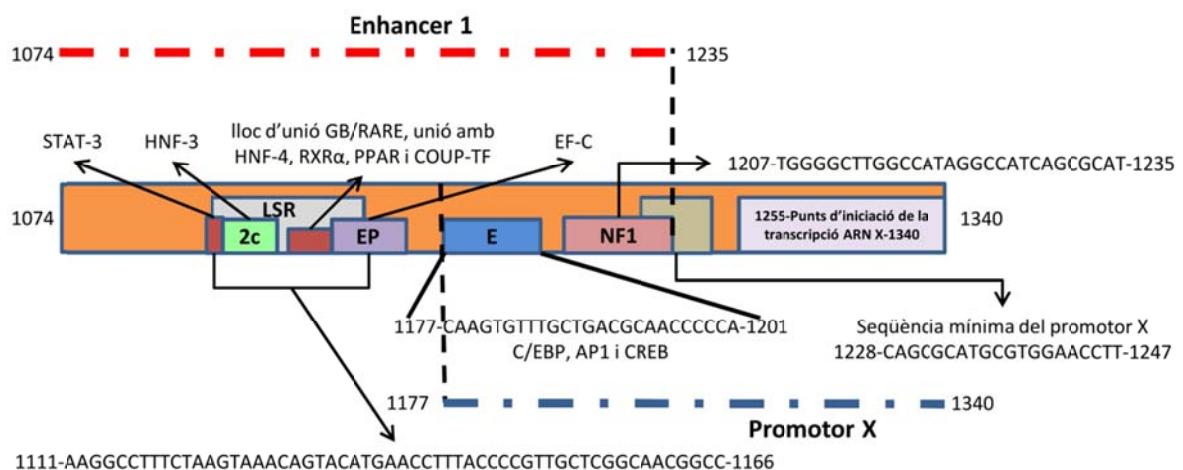


Figura 11: Estructura de la unitat reguladora de la transcripció de l'ARN X formada per l'enhancer 1 i el promotor X. Les dianes d'unió dels diferents factors de transcripció i la seva seqüència s'han extret de la referència AM282986 (63), i les posicions del promotor X i l'enhancer I s'han aproximat segons la bibliografia (per això estan marcades amb línies discontinues) (210–212). Els transcrits regulats per aquest promotor tenen diferents orígens de transcripció entre els nucleòtids 1255 i 1340 (210), però no han estat ben caracteritzades i per tant no s'ha precisat la seva localització a la figura.

2.1.2.2.4. Altres elements reguladors:

Element de resposta a Glucocorticoides (GRE): En el genoma del VHB hi ha una diana per la unió de glucocorticoides (242) que consisteix en una seqüència curta, entre 10 i 20 nt, situada “upstream” del nucleòtid 735 des de la diana d’EcoRI, a la regió on es solapen el domini RT de la polimerasa del VHB i la proteïna SHBs. El GRE, activa la transcripció i la replicació virals (242,243), explicant la reactivació del VHB en tractaments antineoplàsics basats en esteroides (244).

Element regulador post-transcripcional (PRE): La majoria de mARN eucariotes pateixen un procés de “splicing” per eliminar les seves seqüències intròniques, que està associat a l’exportació d’aquests mARN al citoplasma (245). Els mARN del VHB també poden experimentar “splicing”, però els principals que s’exporten al citoplasma no ho necessiten. En el genoma del VHB s’ha descrit una seqüència anomenada element regulador post-transcripcional o PRE (246), que actua a nivell post-transcripcional inhibint el procés de “splicing” i facilitant el transport i utilització dels transcrits del VHB, per la qual cosa és necessària per l’expressió de productes genètics de VHB a nivells elevats. PRE té una longitud aproximadament d’entre 365 i 533 nt i està a la regió comuna a l’extrem 3’ de tots els mARN virals, aproximadament entre el promotor X i el promotor preCore/Pregenòmic (247,248). El PRE té una estructura molt conservada entre els diferents genotips d’hepadnavirus de mamífers, formada per tres subelements α , $\beta 1$ i $\beta 2$ que actuen sinèrgicament per donar plena competència per l’exportació dels mARN virals (249) i als que encara no s’han descrit factors cel·lulars que s’hi uneixin (248). En una regió de PRE situada fora d’aquestes estructures s’ha descrit la unió a “glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase” (GAPDH) i “polypyrimidine tract binding protein” (PTB) (250,251), que actua com una llançadora entre el nucli i el citoplasma i per tant podria ser un efector cel·lular de PRE (251). No obstant això, Heise i col·laboradors (252) han demostrat més recentment que PRE té poca influència en l’exportació del pgARN. Així doncs, a nivell del pgARN PRE regula el “splicing” i contribueix a la seva estabilitat, en canvi a nivell dels ARN subgenòmics (preS1, preS2/S i X) la unió de PTB amb PRE podria regular-ne l’exportació nuclear.

2.1.3. Classificació taxonòmica:

El VHB humà és el prototip de la família *Hepadnaviridae* (virus d’ADN hepatotròpics), descrita el 1986 per Gust i col·laboradors (2). Aquesta família està formada per virus que infecten a mamífers i aus (WVHB, HVHB, DVHB, ezVHB, etc.). Els membres d’aquesta família

comparteixen una sèrie de característiques úniques que els distingeixen dels altres virus coneguts, que es resumeixen a la taula 2:

Característica	Descripció	
TROPISME	Virus hepatotròpics	
PARTÍCULES VIRALS	Partícules virals d'entre 40 i 50 nm de diàmetre, formades per:	
	<i>Envolta</i>	Bicapa lipídica amb proteïnes de superfície inserides
	<i>Nucleocàpsida</i>	D'uns 27-30 nm de diàmetre, formada per proteïnes core i de simetria icosaèdrica.
	<i>Genoma</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <u>rcADN</u>: Una única molècula d'ADN circular parcialment de cadena doble, d'entre 3000-3300 nt: una cadena completa amb un tall a l'extrem 5', on té unida covalentment la polimerasa viral, i una cadena incompleta. • Conté 3-4 ORFs, col·locades totes a la cadena completa (cadena -) en la mateixa orientació.
PARTÍCULES SUBVIRALS	<ul style="list-style-type: none"> • Formades essencialment per proteïnes de superfície. • Poden tenir formes esfèriques de diàmetres variables, i en la majoria de casos també poden tenir formes filamentoses, d'uns 22 nm de diàmetre. • Es secreten al torrent circulatori de l'hoste en excés respecte les partícules virals. 	
REPLICACIÓ DEL MATERIAL GENÈTIC	<p>Transcripció reversa d'un motlle de pgARN més llarg que el propi genoma viral:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Té lloc al citoplasma de la cèl·lula hoste, dins la càpsida. • La porta a terme una polimerasa amb una subunitat RT que transcriu el pgARN i una subunitat TP que s'utilitza com a encebador. 	
PERMANÈNCIA DEL GENOMA AL NUCLI DE L'HOSTE	Després de la infecció, el genoma viral es queda com un episoma estable al nucli de la cèl·lula infectada en forma de cccADN.	

Taula 2: Principals característiques comunes dels membres de la família *hepadnaviridae*. Extretes de (2,22,253). rcADN=ADN relaxat circular, ORF="Open Reading Frame" o pauta oberta de lectura, nt=nucleòtid, pgARN=ARN pregenòmic, RT=transcriptasa reversa, TP=Pèptid terminal. cccADN=ADN circular covalentment tancat.

El terme *Hepadnaviridae* va ser utilitzat per primera el 1978 per Summers i col·laboradors (254) en aïllar en marmotes canadenques (*Marmota monax*) un virus de l'hepatitis (WVHB) que mostrava pràcticament totes les propietats de VHB humà, aproximadament el 60% d'homologia de seqüència, i fins i tot una reactivitat creuada serològica del HBcAg. Poc després d'aïllar-se el VHB de les marmotes, Mason i col·laboradors (255) també van aïllar un virus similar al VHB humà en ànecs de Pequín (*Anas domesticus*) (DVHB): hepatotròpic, capaç de causar virèmies altes sense símptomes evidents, que presentava sobreproducció de proteïnes de superfície i amb una morfologia i organització genòmica similars a les del VHB, que també es va agrupar dins

els hepadnavirus. A pesar de les seves similituds, hi ha diferències importants entre els hepadnavirus que infecten a mamífers i els que infecten les aus: el DVHB no té MHBs i les HBcAg engloben la seqüència de l'ORF X, que està absent en molts dels hepadnavirus de les aus (155,186). A més l'homologia de les seqüències dels genomes dels hepadnavirus de les aus amb les del VHB són més baixes en general que els hepadnavirus de mamífers (pot arribar 83% en el cas del WVHB, mentre que en el DVHB pot ser del voltant d'un 40%) (62,256). Tenint en compte aquestes diferències d'homologia de les seqüències dins la família *Hepadnaviridae* s'han establert dos gèneres: els virus que infecten mamífers s'agrupen en el gènere *Orthohepadnavirus* i els virus que infecten aus s'agrupen en el gènere *Avihepadnavirus*.

El membre més característic del gènere *Orthohepadnavirus*, després del VHB, és el WVHB, però també s'ha aïllat altres virus similars en mamífers rosegadors com els esquiroles de terra de Califòrnia (*Spermophilus beecheyi*) i esquiroles àrtics (*Spermophilus parryi kennicotti*) (253). També s'han aïllat virus de l'hepatitis B en primats no humans d'Àfrica com els gorilles (*Gorilla gorilla*) i ximpanzés (*Pan troglodytes*) i del sud-est asiàtic com orangutans (*Pongo spp*) i gibons (*Hylobates agilis*) (257). Recentment, també s'ha descobert un nou membre del gènere *Orthohepadnavirus* en una espècie de rat-penats (*Miniopterus fuliginosus*) de la regió de Myanmar (sud-est asiàtic) (258).

Pel que fa als *Avihepadnavirus*, a part del DVHB i el HVHB també s'han aïllat virus similars al VHB en el berrat pescaire (*Ardea cinerea*), algunes espècies d'oques (*Chen rossii* o *Anser rossii*, *Chen caerulescens*, etc.), cigonyes blanques (*Ciconia ciconia*), etc. (253) Recentment també s'ha aïllat un hepadnavirus en cotorres de Kramer (*Psittacula krameri*) a Polònia (259).

2.2. EL CICLE REPLICATIU DEL VHB:

2.2.1. Unió i entrada del VHB als hepatòcits:

El primer pas del cicle replicatiu del VHB consisteix en la interacció de les proteïnes de superfície amb la superfície dels hepatòcits i la seva entrada al citoplasma dels hepatòcits. El mecanisme d'unió i entrada als hepatòcits de virus de l'hepatitis D (VHD) és molt similar al del VHB, ja que aquest utilitza les proteïnes de superfície del VHB per la seva propagació (260) i en varis estudis s'ha utilitzat aquest virus com a substitut del VHB per estudiar la seva entrada als hepatòcits infectats (147,261,262). Aquest procés té lloc en diferents fases que es resumeixen a la figura 12:

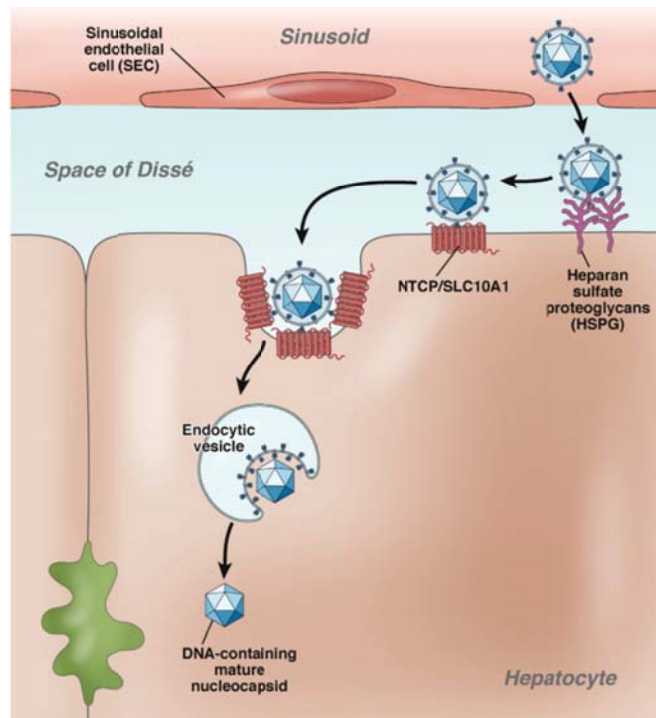


Figura 12: Model d'entrada del VHB (similar per virus hepatitis D) als hepatòcits. Les partícules virals que circulen pels sinusoides hepàtics (un tipus de capil·lar fenestrats) entren a l'espai perisinusoidal o de Disse i allà s'uneixen a la membrana basolateral dels hepatòcits. En primer lloc les partícules virals interaccionen amb baixa afinitat amb proteoglicans heparan sulfat (HSPGs) (263,264) i a continuació amb el seu receptor específic, el pèptid co-transportador de sodi-taurocolat (NTCP) amb elevada especificitat i de manera irreversible (265). L'entrada al hepatòcit es creu que té lloc per endocitosis de les partícules virals mitjançant un procés d'hemifusió de les membranes. Extret de (266).

El VHB inicia el procés d'infecció en unir-se a heparan sulfat (figura 12), un glucosaminoglicà que es troba a la superfície cel·lular o a la matriu extracel·lular de tots els teixits animals, habitualment com a heparan sulfat proteoglicà o HSPG, unes proteïnes altament glicosilades (267). Els HSPG són molt abundants a la membrana plasmàtica dels hepatòcits i la interacció amb baixa afinitat del VHB amb aquestes molècules és essencial per la seva infectivitat (263,264). Com s'ha indicat a 2.1.2.1.3. ORF S i les proteïnes de superfície, en un estudi recent (147) s'ha descrit que la unió amb els HSPG depèn sobretot dels residus del determinant "a" R/K122 (que determina els subtipus d/y) i K141. Arginina (R) i lisina (K) són aa bàsics, amb càrrega elèctrica positiva que els permet interaccionar electrostàticament amb els HSPG de càrrega elèctrica negativa. A part d'aquests dos residus, també tenen un paper molt important la xarxa de cisteïnes i prolins, que defineixen la conformació del determinant "a" i la resta de l'AGL necessària pel posicionament correcte dels residus R/K122 i K141. En aquest estudi (147) també es va apuntar la possibilitat que la regió preS, amb càrrega elèctrica neta positiva, també podria contribuir a establir interaccions electrostàtiques amb HSPG, però es va demostrar la seva eliminació no impedia la unió de les partícules virals amb aquestes molècules.

Després d'interaccionar amb HSPG, les partícules virals interaccionen amb elevada especificitat amb el seu receptor específic (figura 12) identificat recentment per Yan i col·laboradors (265) com el pèptid co-transportador de sodi-taurocolat (NTCP), que interacciona específicament amb domini d'unió al receptor de preS1. El NTCP és membre de la família de gens de proteïnes transportadores SLC10 i també s'anomena "solute carrier family 10A1" (SLC10A1). Aquest receptor s'expressa principalment al fetge i es localitza a la membrana plasmàtica basolateral dels hepatòcits (268), que està enriquida en HSPG. El NTCP és un transportador d'àcids biliars dependent de sodi i té un paper central en el flux d'entrada al fetge de sals biliars conjugades des de la circulació portal, tot i que també pot transportar altres molècules com hormones esteroides, de tiroïdes i fàrmacs lliures o conjugats amb sals biliars (269). A la seqüència de NTCP s'ha identificat dues regions que determinen la seva funció com a receptor per VHB i VHD: un motiu entre els aa 157 i 165 (265) i un altre entre els aa 84 i 87 (270). També s'ha descrit que la mutació del NTCP S267F, impedeix la unió a aquest receptor de pèptids preS1 i també la infecció per VHB i VHD (271). Aquesta mutació està present en un 7,5% de la població dels estats units d'origen xinès, en el 3,1% de la població coreana i un 9,2% de la població vietnamita i impedeix gairebé per complet l'absorció de sals biliars (272,273). En el seu estudi inicial Yan i col·laboradors (265) van observar que el silenciament de l'expressió de NTCP de les línies cel·lulars Huh7 i HepG2 transfectades amb aquest receptor no inhibeix totalment la infecció per VHB, cosa que suggereix que hi podria haver altres factors cel·lulars implicats en la entrada d'aquests virus.

Un altre element clau en l'entrada del VHB i VHD a la cèl·lula és la LHBs. En un estudi "in vitro" realitzat amb un plasmidi que tenia inserit un genoma viral de genotip D subtipus ayw3, es va observar que els 75 aa de l'extrem N-terminal de la regió preS1 (que només està present en la LHBs) són essencials per la infectivitat d'aquests dos virus (274) (figura 13). Tot i que aquesta regió és bastant variable entre diferents genotips del VHB, la regió N-terminal de preS1 té un paper fonamental en la infectivitat de les partícules virals: En aquesta regió es troba el lloc d'unió de la LHBs amb el NTCP, com prova la inhibició eficient de la infecció per VHB i VHD "in vitro" per un pèptid sintètic amb la seqüència dels aa 2 a 48 (també del el genotip D) amb una molècula d'àcid mirístic unida al residu glicina en posició 2 (G2) (275) [essencial per la infectivitat de les partícules virals (162,163)] (figura 13). Dins aquest pèptid es va delimitar una seqüència de 10 aa entre les posicions 9 i 18, altament conservada en tots els hepadnavirus de primats (275) i dins aquesta seqüència es va observar que els aa entre les posicions 10 i 16 són essencials per la infectivitat (276) (figura 13). De totes maneres, en intentar bloquejar aquesta regió essencial mitjançant anticossos neutralitzats contra els dominis N i C-terminal de preS1 induïts en ratolins (figura 13) es va observar que només els anticossos generats contra la seqüència dels aa 2 a 48 neutralitzaven la infecció (277). Els anticossos generats contra aa 1 al

21, de l'extrem N-terminal, només reaccionaven bé contra pèptids preS1 no miristilats i no eren capaços de neutralitzar la infecció. Això suggereix que la unió a una molècula d'àcid mirístic afavoreix una topologia de la LHBs en que la seqüència essencial per la infectivitat no queda accessible als anticossos neutralitzants.

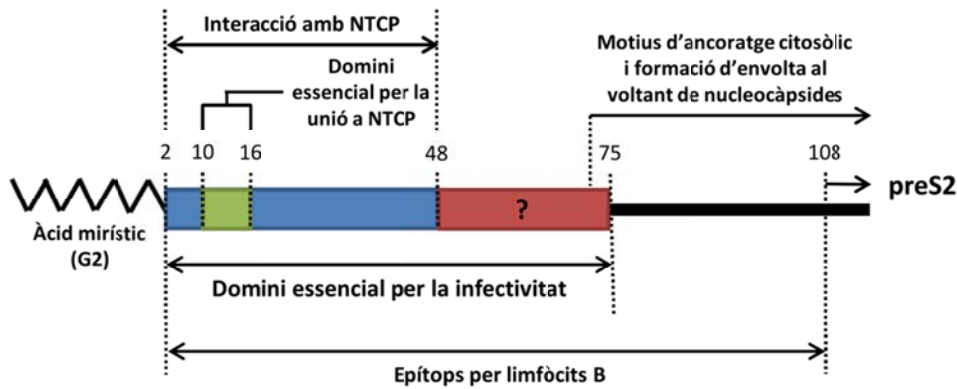


Figura 13: Estructura esquemàtica del domini preS1 de les proteïnes de superfície grans (agafant com a model el genotip D del VHB tal com s'explica en el text), on es col·loquen els determinants per la infectivitat del VHB: la miristilació del residu de glicina 2 (G2), el domini essencial per la infectivitat (aa 2 a 75), en el que la regió entre els aa 2 a 48 interacciona amb el pèptid co-transportador de sodi-taurocolat (NTCP), amb el motiu altament conservat entre els aa 10 i 16. Per altra banda es desconeix encara la funció del domini entre els aa 49 a 75. La resta de la regió preS1 conté determinants essencials per evitar la translocació de preS1 al lumen del reticle endoplasmàtic durant la seva síntesi, i per l'envolcallament de nucleocàpsides madures (veure 2.1.2.1.3. ORF S i les proteïnes de superfície).

Després de la interacció de la regió preS1 de les partícules virals amb el NTCP, les partícules virals són absorbides a l'interior de la cèl·lula. S'han proposat dues vies a través de les que es pot produir l'absorció de les partícules virals (278): per fusió de l'envolta viral amb la membrana plasmàtica o per endocitosi i alliberament de les nucleocàpsides des de vesícules d'endocitosi. Actualment l'opció que es creu més probable és la segona (figura 12). Tot i que encara no s'ha caracteritzat el subcompartiment endosòmic des del que les nucleocàpsides serien alliberades al citoplasma, es creu que el domini TM1 de la SHBs (comuna a la seqüència de les tres proteïnes de superfície) té un paper essencial en aquest pas, que podria tenir lloc per hemifusió de membranes (279). La hemifusió consisteix en la fusió seqüencial de les dues capes de lípids de l'envolta amb les dues capes de la membrana cel·lular (280) i és un mecanisme que sembla ser utilitzat per varis virus amb envolta per entrar a la cèl·lula hoste (281–283). L'energia necessària per les reorganitzacions de la membrana lipídica requerides per dur a terme la hemifusió generalment és generada per canvis de conformació en proteïnes de superfície d'aquests virus, denominades proteïnes de fusió (279,280). En el cas del VHB aquesta proteïna podria ser el domini TM1 de la SHBs (284), que conté tres agrupacions d'aa hidrofòbics, la presència dels quals a la LHBs és necessària per la infectivitat, i a més també són necessaris per l'expressió de proteïnes de superfície (285). La composició lipídica de l'envolta viral, i en

particular de colesterol, també podria tenir un paper important en l'entrada de les partícules virals a la cèl·lula hoste. L'envolta de les partícules virals conté aproximadament un 15% de colesterol (26), que en cultius d'hepatòcits primaris s'ha demostrat essencial per la infecció per VHB mentre que la composició de colesterol de la membrana cel·lular no afectava a la infectivitat de les partícules virals (286).

2.2.2. Transport i entrada al nucli:

En molts virus amb envolta, la fusió de la membrana cel·lular amb la vesícula d'endocitosi per alliberar la nucleocàpsida al citoplasma és desencadenada per una acidificació d'aquesta vesícula (287), la qual cosa provoca importants canvis estructurals en les nucleocàpsides que infecten a la cèl·lula, que poden ser utilitzats per dirigir-les específicament cap al nucli (288). Això no es necessari en les nucleocàpsides dels hepadnavirus, que no pateixen canvis estructurals per acidificació després d'entrar a la cèl·lula hoste. Així doncs les nucleocàpsides entrants i les sintetitzades a la pròpia cèl·lula tenen la mateixa estructura i totes dues poden ser transportades al nucli (288).

Un cop alliberades al citoplasma, les càpsides es dirigeixen cap als complexos del porus nuclear (NPC) a través de microtúbuls (MT) per un mecanisme de transport actiu (amb despesa d'energia per part de la cèl·lula) (289,290). Els MT s'estenen des d'un centre organitzador de microtúbuls (MTOC), situat a l'espai perinuclear, cap a la perifèria de la cèl·lula per polimerització de les seves subunitats α - i β -tubulina (288) i són indispensables pel transport intracitosòlic de les nucleocàpsides (289). No obstant això, en estar els MT units al MTOC i no directament al nucli les nucleocàpsides haurien de ser transportades fins el NPC mitjançant algun mecanisme de transport que encara no està clar.

El NPC és un complex proteic que travessa la doble membrana nuclear i és la única via d'intercanvi molecular entre el nucli i el citoplasma (291). Aquest complex està format per uns 29 tipus diferents de proteïnes, anomenades globalment nucleoporines i té 18 tipus de proteïnes associades que formen el porus entre el nucli i el citoplasma (291,292). Aquest porus permet el pas de molècules o complexos amb un diàmetre fins a 39 nm com les nucleocàpsides del VHB, que el creuen íntegres com s'ha observat en un model "in vitro" amb oòcits de granota (*Xenopus laevis*) (290). La senyal NLS del domini C-terminal de les HBcAg (veure 2.1.2.1.1. ORF PC/Core i les proteïnes precore i core) permet que la càpsida interaccioni amb una molècula d'importina α . Aquesta molècula permet la unió a receptors de transport nuclear de la superfamília de la importina β , que faciliten la unió de la nucleocàpsida amb el NPC (84). El NLS dels HBcAg està amagat al lumen de les càpsides que contenen pgARN, perquè aquest

interacciona amb el domini protamina del HBcAg on es troba aquesta senyal (293). L'exposició d'aquesta senyal està associada a la maduració del genoma: al llarg de la conversió de pgARN a rcADN el HBcAg es va desfosforilant, cosa que provoca canvis conformationals les càpsides, que indueixen l'exposició del NLS (288). Així doncs, totes les nucleocàpsides que han experimentat un cert grau de maduració del genoma exposen el NLS i poden unir-se a les importines i travessar el NPC fins a la cistella nuclear, una estructura en forma de gàbia situada a la cara nuclear del NPC. Allà les càpsides amb un genoma madur en forma de rcADN es desacoblen i alliberen el HBcAg i el genoma viral al carioplasma (294). Aquesta estratègia d'entrada al nucli és única entre els virus que travessen el NPC (295). La retenció de les nucleocàpsides amb la cistella nuclear té lloc gràcies a la seva interacció amb la nucleoporina 153 (Nup153) que participa en el transport nuclear via importina β (296). Els llocs d'unió per les nucleocàpsides i per importina β de Nup153 estan solapats, però les càpsides s'hi uneixen amb una afinitat 150 vegades superior (una afinitat molt elevada). El model d'entrada al nucli mitjançant la interacció amb Nup153 es resumeix a la figura 14.

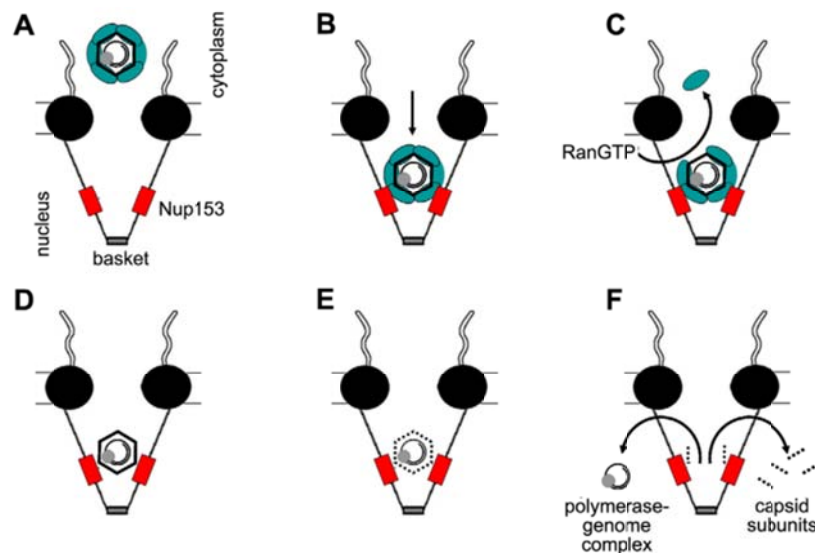


Figura 14: Model d'entrada al complex del porus nuclear (NPC) i alliberament del genoma i HBcAg al carioplasma. **(A)** El complex format per les nucleocàpsides i les importines α i β s'uneix al NPC. **(B)** El complex passa a través del porus i queda retingut a la cistella nuclear del NPC mitjançant la interacció entre importina β i la nucleoporina 153 (Nup153). **(C)** La GTPasa RanGTP s'uneix a l'extrem N-terminal de la importina β i provoca la seva dissociació de la nucleocàpsid i el seu reciclatge al citoplasma. **(D)** Després de la dissociació d'importina β la nucleocàpsid interacciona directament amb Nup153, si el genoma del seu interior encara no ha finalitzat la seva transformació en ADN relaxat circular (rcADN), la nucleocàpsid queda arrestada a la cistella nuclear fins que aquest completi la seva maduració. **(E)** Les càpsides amb el genoma madur es desacoblen i **(F)** el complex genoma-polimerasa i les subunitats de HBcAg que formen la càpsid passen al carioplasma. Extret de (296).

Després del desacoblament de la càpsid a la cistella nuclear, el genoma viral podria ser dirigit a l'interior del carioplasma per alguna senyal de la polimerasa del VHB que està unida covalentment a ell a través de la interacció amb la seqüència "ε", o de les xaperones que

estabilitzen aquesta interacció (288). El HBcAg que formava les nucleocàpsides és alliberat al carioplasma pot reacoblar-se i formar càpsides de nou dins el nucli en presència d'ARN cel·lular (297). Això suggereix que el desacoblament de la càpsida del VHB només pot tenir lloc en l'ambient de la cistella nuclear, mentre que tant al citoplasma com al carioplasma l'acoblament de les càpsides està afavorit.

2.2.3. El genoma del VHB al nucli:

2.2.3.1. Formació de l'ADN circular covalentment tancat:

Un cop alliberat al carioplasma, el complex format pel rcDNA madur i la polimerasa es converteix en cccADN, una molècula d'ADN circular covalentment tancada totalment de doble cadena, estable i que no es perd durant la divisió cel·lular (16). Degut al mecanisme de transcripció reversa del pgARN, el rcADN resultant té una sèrie de característiques estructurals inusuals (figura 15). Això implica que el rcADN ha de patir una sèrie de modificacions que inclouen:

1. L'alliberament de la polimerasa viral unida covalentment a l'extrem 5' de la cadena -.
2. L'eliminació de l'oligonucleòtid d'ARN de l'extrem 5' de la cadena +.
3. L'eliminació també d'una de les redundàncies terminals o r de la cadena -.
4. La finalització de la síntesi de la cadena + (incompleta en el rcADN).
5. La lligació covalent dels extrems 5' i 3' de les dos cadenes d'ADN viral, la qual cosa dona lloc a una estructura similar a un plasmidi.
6. Finalment, la formació de nucleosomes per donar lloc a un minicromosoma no integrat a l'ADN de l'hoste.

Aquestes modificacions requereixen varies activitats enzimàtiques resumides a la figura 15. Els responsables i la manera com es duen a terme aquestes activitats encara es desconeixen en gran part, però ja al 1995 un estudi de Guidotti i col·laboradors (298) suggeria que per la formació del cccADN són necessaris enzims cel·lulars específics de l'espècie de la cèl·lula hoste. Tot i així, aquest procés també podria ser catalitzat per la pròpia polimerasa viral mitjançant l'energia alliberada per la hidròlisi de l'enllaç fosfodièster de l'extrem 5' de la redundància terminal o r de l'extrem 3' del genoma del VHB, i la mateixa polimerasa podria lligar la discontinuïtat de la cadena - del genoma viral. No obstant això, en cultius cel·lulars del model del DVHB s'ha observat que la r de l'extrem 5' s'ha eliminat completament o al menys parcialment del cccADN, per tant la que queda ha de provenir de r en 3', cosa que contradiu l'anterior hipòtesi i suggereix que l'alliberament de la polimerasa i la reparació del rcADN té lloc independentment

de l'activitat enzimàtica viral i per tant depèn completament dels enzims cel·lulars que reparen l'ADN (299). Aquest fet, pot ajudar a entendre perquè la inhibició de la polimerasa viral mitjançant anàlegs de nucleòsids o nucleòtids no inhibeix, o només inhibeix parcialment la formació inicial de cccADN (300,301).

Sembla clar que el primer pas en la formació del cccADN és la desproteïnitització del rcADN, és a dir, l'escissió de la polimerasa de l'extrem 5' de la cadena -, això sembla succeir en VHB però no en DVHB, aquesta escissió dona lloc a l'acumulació d'una forma intermediària lliure de proteïnes (PF-rcADN) (302). La polimerasa viral estableix un enllaç covalent amb el rcADN estructuralment molt similar als adductes causats per les topoisomerases, uns enzims que regulen el superenrotllament de l'ADN tallant una de les seves cadenes (la topoisomerasa 1 o TOP1) o totes dues (la topoisomerasa 2 o TOP2) per tal de reduir-ne l'estrès torsional durant la replicació o la transcripció (303). Igual que la polimerasa del VHB, les topoisomerases queden unides per un enllaç tirosil-fosfodiéster a l'ADN, la TOP1 a l'extrem 3' del tall i la TOP2 a l'extrem 5' (303), la qual cosa suggereix que el VHB podria utilitzar els enzims que reparen els adductes causats per les topoisomerases per escindir la seva pròpia polimerasa. Un dels mecanismes de reparació d'aquests adductes es basa en els enzims anomenats tirosil-ADN-fosfodiesterases (TDP), que tallen específicament l'enllaç tirosil-fosfodiéster: els adductes causats per TOP1 poden ser reparats per TDP1 i els causats per TOP2 poden ser reparats per TDP2 (304). En un estudi recent (305) Königer i col·laboradors han comparat l'activitat de TDP1 i TDP2 tant d'origen humà com de pollastre i TDP1 de llevat, que té activitat tirosil-fosfodiesterasa en extrems 5' (306). En aquest estudi es va observar que "in vitro" els enzims TDP2 d'origen humà i de pollastre i només TDP1 de llevat poden escindir específicament substrats sintètics units a l'extrem 5' d'oligonucleòtids d'ADN amb la mateixa seqüència que l'extrem 5' de la cadena negativa de DVHB mitjançant un enllaç que imita l'enllaç tirosil-fosfodiéster entre la polimerasa i el genoma viral. Aquests tres enzims també són capaços de catalitzar l'escissió d'una polimerasa recombinant de DVHB del complex que forma "in vitro" amb xaperones i una seqüència d'ARN que imita la senyal "ε", i el que és més important, d'alliberar la polimerasa de rcADN autèntic extret de nucleocàpsides de VHB i DVHB.

No obstant tot i els resultats obtinguts "in vitro", avui en dia el paper fisiològic de TDP2 en la formació de cccADN és controvertit. En un estudi molt recent (307) també s'ha confirmat la capacitat d'aquest enzim per trencar l'enllaç tirosil-fosfodiéster "in vitro". No obstant, en aquest estudi els resultats obtinguts en diferents experiments amb línies cel·lulars "knockout", "knockdown" i amb sobreexpressió de TDP2 semblen indicar que aquest enzim podria no ser necessari per la formació de cccADN "in vivo". En interpretar aquests resultats respecte el paper fisiològic de TDP2 cal tenir en compte que les cèl·lules disposen d'una maquinària de

reparació de l'ADN molt complexa i sofisticada, en la qual la fallada d'una via de reparació pot ser compensada per l'activitat d'altres per tal de mantenir la integritat del genoma (308). Així doncs, TDP2 podria intervenir realment en la producció de PF-rcADN però no ser indispensable per l'escissió de la polimerasa viral, ja que podria ser substituïda altres mecanismes de reparació de l'ADN com vies nucleolítiques que també poden reparar els adductes causats per les TOP (303). De fet, en l'estudi de Königer i col·laboradors es va proposar el complex MRN (format per MRE11, RAD50 i NBS) com un possible candidat per substituir TDP2 (305). El complex MRN és un dels principals complexos proteics en múltiples fases de la reparació dels trencaments de doble cadena de l'ADN, entre els quals els adductes generats per TOP1 i 2 (309,310), i té un paper destacat en vies de reparació de l'ADN per recombinació homòloga i vies clàssiques i alternatives d'unió d'extremes no homòlegs (NHEJ) (309).

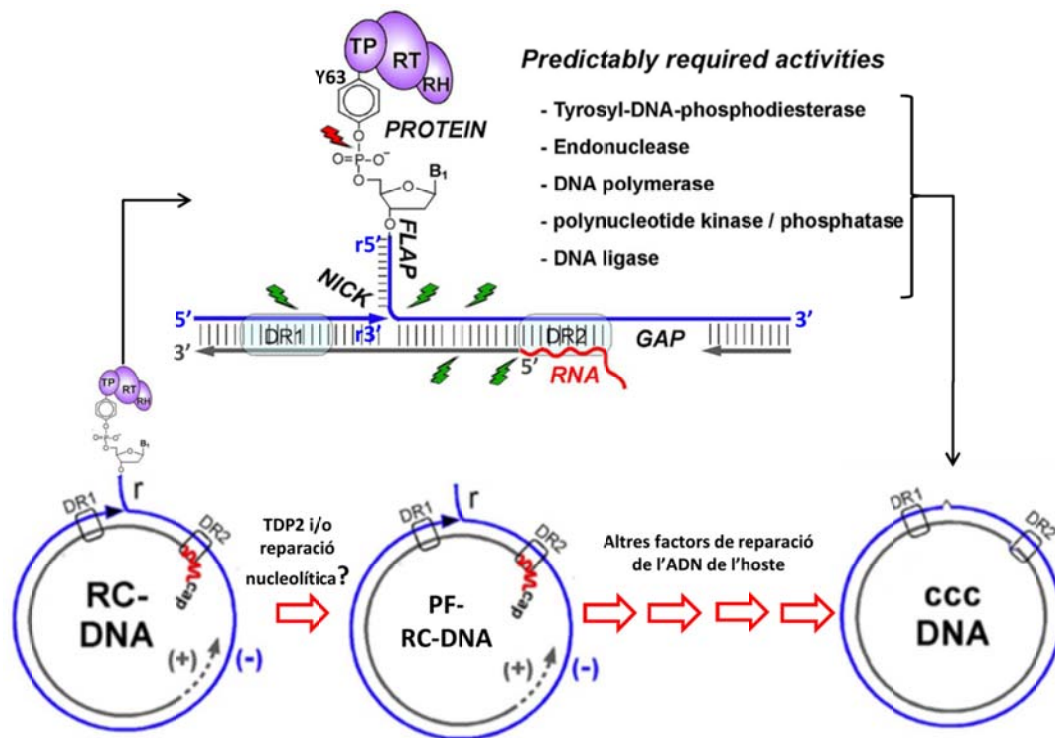


Figura 15: L'ADN relaxat circular (RC-DNA) té una sèrie de peculiaritats estructurals. La polimerasa viral està unida a la seva cadena negativa (-) a través de la d'un enllaç tirosil-fosfodièster amb el residu tirosina 63 (Y63) del seu domini proteïna terminal (TP), que forma un adducte amb aquesta cadena (NICK) i queda un fragment d'ADN de cadena simple (FLAP) format per la redundància terminal (r) de l'extrem 5'. La cadena positiva (+) està incompleta (GAP) i té un primer d'ARN, que prové de l'ARN pregenòmic. Els punts de la cadena que atacarien les endonucleases de la via nucleolítica s'indiquen amb els llamps verds, mentre que el punt atacat per les tirosil-ADN-fosfodiesterases (TDP) està marcat amb un llamp vermell. Aquests enzims catalitzarien el pas del RC-DNA a RC-DNA sense la polimerasa (lliure de proteïnes o PF-RC-DNA). Per completar el pas de RC-DNA a ADN circular covalentment tancat (cccDNA) són necessaris altres factors de les vies de reparació de l'ADN de la cèl·lula hoste. Les activitats enzimàtiques necessàries pel pas de RC-DNA a cccDNA es resumeixen a la figura. Modificat de (308).

Una petita part del cccADN no prové del rcADN sinó de la forma lineal del genoma del VHB, el dslADN, creat per “in situ priming” durant el procés anomenat replicació il·legítima (50), com es veurà a 2.2.4. Traducció, encapsidació i transcripció reversa de l’ARN pregenòmic. Tot i les diferències estructurals amb el rcADN, aquesta forma del genoma viral també té la polimerasa viral unida a l’extrem 5’ de la cadena negativa i per tant la seva conversió en cccADN també comença per la desproteïnitació (302). A continuació, el dslADN es circularitza probablement mitjançant NHEJ, un mecanisme en el que també pot participar el complex MRN (309). El mecanisme de NHEJ té tendència a cometre errors (311) i la seqüència on s’uneixen els dos extrems pot contenir en molts casos petites delecions i/o insercions, majoritàriament dins i al voltant de r, amb la qual cosa impedeix que el pgARN sintetitzat a partir del dslADN circularitzat es retrotranscrigui correctament (50). De fet, tal com s’ha explicat prèviament (veure secció 2.1.2. Organització del genoma del VHB), el dslADN tendeix més aviat a integrar-se en el genoma de l’hoste (50).

2.2.3.2. Regulació de la transcripció de l’ADN circular covalentment tancat:

El cccADN és un episoma estable del nucli de la cèl·lula infectada que després de la seva formació s’associa a histones i altres proteïnes, per tant forma nucleosomes i adopta la típica estructura en forma de “collaret de perles” de la cromatina, cosa que li permet organitzar-se com un mini cromosoma de la cèl·lula infectada (39–41) tal com s’ha descrit a l’apartat del cccADN de 2.1.2. Organització del genoma del VHB. Aquesta organització permet al cccADN utilitzar mecanismes de regulació epigenètica (que permeten regular l’accés a l’ADN i per tant l’expressió gènica sense alterar-ne la seqüència) com es pot veure a la figura 16. Així s’ha demostrat que les histones H3 i H4 del cccADN s’acetilen per estimular l’expressió dels ORFs del VHB tant en cultius cel·lulars com “in vivo” en pacients amb HBC (205). Probablement per aquest motiu paral·lelament a la replicació viral “in vitro” es recluten acetil-transferases d’histones com PCAF/GCN5 i CBP/p300 al cccADN. En canvi el reclutament de desacetilases com HDAC1 i hSirt1 correlaciona amb baixa replicació i per tant baixos nivells de virèmia (43,205). Com ja s’ha comentat en la secció 2.1.2.1.4. ORF X i la proteïna X, la proteïna reguladora HBx també té un important paper en la regulació epigenètica de la transcripció del cccADN (43). HBx evita la hipoacetilació de les histones unides al cccADN, com s’ha observat en variants defectives per l’expressió d’aquesta proteïna en les que el reclutament de p300 al cccADN pateix una disminució severa mentre que el reclutament de les desacetilases HDAC1 i hSirt augmenta i té lloc abans que en variants no defectives. A més disminueix la replicació perquè es redueix també la transcripció de pgARN (43). HBx també estimula la replicació viral potenciant l’acció dels factors de transcripció de la família CREB augmentant la unió a ells de

CBP/p300 per tal de facilitar la seva interacció amb el cccADN (202,203). Recentment s'ha observat que l'interferó α (IFN α , un tractament antiviral autoritzat contra l'hepatitis B crònica poc utilitzat avui en dia) és capaç d'inhibir directament la transcripció de tots els mARN del VHB mitjançant la hipacetilació de les histones del cccADN i el reclutament actiu del complex repressor transcripcional PRC2 i de les desacetilases d'histones HDAC1 i hSirt1 (312).

La transcripció del cccADN també pot ser regulada a través de la metilació de les seves illes CpG (figura 16), la qual cosa redueix l'expressió de les proteïnes virals (313). En el genoma del VHB s'han identificat tres illes CpG, tot i que s'hi han observat variacions en diferents genotips (314). En pacients amb HBC on les variants majoritàries del VHB no expressen HBeAg (pacients HBeAg negatius) s'ha observat nivells de metilació del cccADN més elevats que els pacients que l'expressen (pacients HBeAg positius) (315), cosa que concorda amb la capacitat replicativa reduïda del cccADN en pacients HBeAg negatius respecte als positius observada en altres estudis (316,317). Finalment, també s'ha descrit ARN antisentit transcrits a partir de la cadena + del genoma viral, que s'expressen a nivells molt més baixos que els mARN del VHB (318,319). A través d'aquests ARN antisentit el VHB podria auto-regular negativament la transcripció dels mARN o la seva traducció en hibridar-se els dos ARN entre ells, imitant el sistema de regulació epigenètic de l'ADN cel·lular (320).

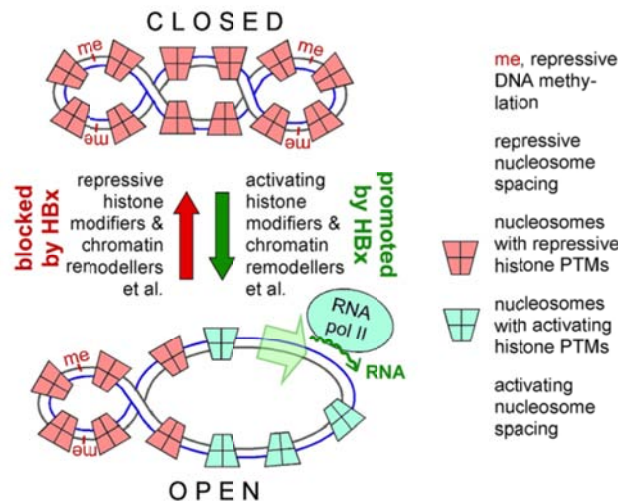


Figura 16: Regulació epigenètica de l'ADN circular covalentment tancat (cccADN). L'accessibilitat dels factors de transcripció i l'ARN polimerasa II està regulada per l'organització del cccADN en forma de cromatina juntament amb les seves modificacions com la metilació (me). La cromatina pot patir modificacions post-traduccionals (PTM) de les seves histones que modifiquen l'estabilitat i l'espai entre els nucleosomes i fan la cromatina accessible a la maquinaria transcripcional cel·lular (conformació oberta) o inaccessible (conformació tancada). El HBx promou la transcripció de la cromatina estímulant les PTM que l'activen i inhibint les que la reprimeixen. Extret de (308).

2.2.4. Traducció, encapsidació i transcripció reversa de l'ARN pregenòmic:

Traducció: L'exportació dels mARN virals del nucli al citoplasma, al menys en el cas dels ARN subgenòmics, pot estar regulada per l'element PRE que tots ells tenen al seu extrem 3' comú (veure 2.1.2.4. Altres elements reguladors) (248–252). Un cop al citoplasma els transcrits virals, que tenen la mateixa estructura que els cel·lulars, es tradueixen als ribosomes des del primer codó d'iniciació (AUG) del seu extrem 5' (22). Entre aquests transcrits, el pcARN i el pgARN tenen una longitud de 3,5 Kb, i per tant són més llargs que el propi genoma viral, degut al fet que en transcriure'ls l'ARN polimerasa II només utilitza la senyal de poliadenilació la segona vegada que passa per ella (321). Gràcies a això, aquests ARN tenen una seqüència redundant de 120 nt a l'extrem 3', que inclou una segona copia de la seqüència DR1 (que en endavant s'anomenarà DR1*) i la seqüència ϵ així com el principi de l'ORF PC/core (figura 17). Tot i tenir la mateixa estructura i pràcticament la mateixa seqüència (veure 2.1.2.2.2. Regulació dels transcrits precore i pregenòmic) aquests dos transcrits tenen funcions totalment diferents: el pcARN es tradueix per donar lloc a la proteïna precore, la precursora del HBcAg i p22cr. En canvi el pgARN és bicistrònic: dona lloc al HBcAg i a la polimerasa viral o proteïna P com a proteïnes separades, a més és l'únic que s'encapsida i s'utilitza com a motlle per la transcripció reversa que dona lloc de nou al rcADN. El mecanisme pel qual es regula la funció de cada un d'aquests ARN no està clar, però és probable que els ribosomes que tradueixen la regió precore no permetin que la polimerasa viral s'uneixi a la seqüència ϵ que està solapada amb la seqüència del HBcAg (92,322), amb la qual cosa tant l'encapsidació com la síntesi de HBcAg estarien bloquejades en el pcARN.

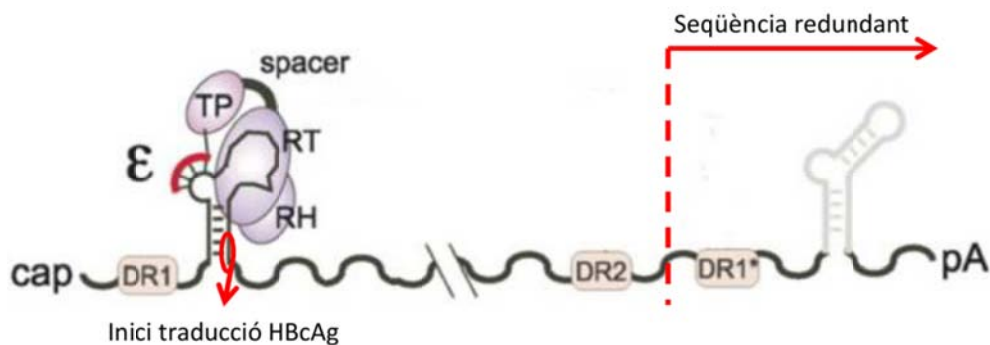


Figura 17: Estructura de l'ARN pregenòmic (pgARN), amb la polimerasa viral unida a la seva seqüència d'encapsidació o "ε", que forma una estructura secundària característica, que inclou el codó d'inici de traducció del HBcAg, als extrems 5' i 3' del pgARN tot i que la única que s'utilitza per la transcripció reversa és la de l'extrem 5'. Modificat de (17).

Tot i traduir-se a partir del mateix mARN, el HBcAg i la polimerasa segueixen patrons diferents: totes dues s'acumulen al citoplasma amb una relació d'aproximadament 200-300 HBcAg per una proteïna P (22). Aquest desequilibri entre les dues proteïnes és esperable ja que

l'ORF P està situat més a 3' que l'ORF PC/core en el pgARN, cosa que en els ARN eucariòtics (que generalment són monocistrònics) implica nivells molt baixos de traducció, si aquesta arriba a tenir lloc. Tot i això, l'ORF P es tradueix de manera relativament ràpida en el model de DVHB i la polimerasa viral és detectable al citoplasma al mateix temps o abans que HBcAg, posteriorment la relació proteïna P/HBcAg decau amb el temps (323). S'ha establert que aquesta acumulació citoplasmàtica de polimerasa en DVHB (també observada en VHB) regula negativament la formació de pgARN i l'acumulació intracel·lular de HBcAg i càpsides (324), així doncs la polimerasa viral pot tenir funcions addicionals a la de la transcripció reversa del pgARN.

Unió de la polimerasa viral al pgARN: Després de ser utilitzat per la traducció de les proteïnes P i HBcAg, el pgARN s'utilitzarà com a motlle per la transcripció reversa del pgARN a rcADN. Aquest procés comença amb la unió de la polimerasa del VHB amb el bucle format per la seqüència ϵ de l'extrem 5' del pgARN (figura 17). Habitualment el pgARN al que s'uneix una determinada proteïna P és el mateix a partir del que s'ha traduït (93), la qual cosa implica que la capacitat d'un determinat genoma viral per ser replicar-se dependrà principalment de la polimerasa que ell mateix codifica i en menor mesura de la trans-complementació amb una polimerasa codificada per un altre genoma. La unió entre la proteïna P i el senyal d'encapsidació és suficient per desencadenar el co-empaquetament d'aquesta proteïna amb el pgARN en nucleocàpsides de nova formació i l'encebament proteic de P (325,326). Tot i això, a més del pgARN i els seus productes la transcripció reversa també és estrictament dependent de les xaperones cel·lulars. En el model de DVHB s'ha observat que la proteïna P les necessita per canviar la seva conformació, mitjançant el consum d'energia en forma d'adenosina trifosfat (ATP), de manera que pugui exposar a la superfície l'extrem C-terminal del seu domini TP, per tal que el seu motiu T3 interaccioni amb el RT-1 del domini RT per forma el lloc d'unió de la proteïna P amb el motiu ϵ del pgARN (99) (veure 2.1.2.1.2. ORF P i la polimerasa). Tanmateix un cop unida a ϵ , P esdevé independent de l'activitat de les xaperones per seguir la síntesi del rcADN (88). Per dur a terme aquesta activació s'ha demostrat que són suficients la xaperona Hsc70 (forma de la xaperona Hsp70 expressada constitutivament) amb la seva co-xaperona Hsp40 i ATP. Tanmateix, la xaperona Hsp90 amb la seva co-xaperona Hop i el factor intercanviador de nucleòtids Bag-1 poden estimular l'activació de la polimerasa de quatre a cinc vegades (327,328). En el cas de Hsp90/Hop, semblen ser necessàries per establir encebament proteic "in vitro" i a més Hsp90 interacciona amb centenars de lligands cel·lulars amb funcions reguladores, la qual cosa fa pensar que "in vivo" podrien ser també imprescindibles de manera directa o indirecta per la replicació viral, però això està pendent de ser determinat.

Encapsidació del complex pgARN-polimerasa: L'acoblament de la càpsida al voltant del complex ribonucleoproteic format per la proteïna P, el pgARN i les xaperones depèn de fortes interaccions electrostàtiques entre el pgARN, que té càrrega elèctrica negativa i el domini protamina de l'extrem C-terminal de la HBcAg, ric en residus d'arginina amb càrrega elèctrica positiva (25). No obstant, el domini C-terminal de la HBcAg no és necessari per la formació de les càpsides, ja que proteïnes HBcAg amb aquest domini deletat són capaces d'autoacoblar-se espontàniament "in vitro" i donar lloc a càpsides molt similars a les purificades a partir de cèl·lules que expressen el VHB, no obstant no són capaces d'encapsidar AANN (81). Tal com s'ha descrit en l'apartat 2.1.2.1.1. ORF PC/Core i les proteïnes precore i core i es pot veure a la figura 5, la formació de la càpsida "in vivo" comença amb la formació d'homodímers de HBcAg al citoplasma gràcies a l'establiment d'un pont disulfur entre els seus residus cisteïna-61 (13). Aquests dímers s'associen posteriorment entre ells en oligòmers més grans que contenen xaperones (329). El mecanisme d'acoblament de la càpsida del VHB "in vivo" encara no es coneix en detall, però sembla probable que perquè tingui lloc el HBcAg ha de patir un canvi de conformació regulat al·lostèricament: en experiments "in vitro" s'ha observat que la interacció de HBcAg amb cations divalents de zinc pot potenciar l'acoblament del HBcAg a través de la formació d'un intermediari que desapareix ràpidament, tot i que aquests cations podrien no ser els que activessin l'acoblament de les càpsides "in vivo" (330).

En models "in vitro" que no expressen VHB, la càpsida es forma al voltant de qualsevol ARN, simplement per interaccions electrostàtiques amb el domini C-terminal del HBcAg (331). En canvi, en models que expressen el VHB l'acoblament de les càpsides es produeix exclusivament en càpsides buides [sorprenentment abundants tant en cultius cel·lulars com entre les càpsides intracel·lulars i inclús en sèrum de pacients (332)] i al voltant de complexos polimerasa-xaperones-pgARN (325). Per aquest motiu s'ha proposat que la regulació del procés d'acoblament podria tenir un paper en l'encapsidació específica del complex polimerasa-xaperones-pgARN, amb alguna proteïna cel·lular actuant com a xaperona per evitar l'acoblament inadequat i l'empaquetament inespecífic d'ARN (333).

Transcripció reversa del pgARN: Un cop dins la càpsida, el complex ribonucleoproteic inicia la seva transcripció reversa, que inclou varis canvis de motlle per part de la polimerasa situats als dos extrems del pgARN corresponent, per acabar donant lloc de nou al rcADN.

Al principi del procés la polimerasa està unida covalentment al bucle de la senyal ϵ de l'extrem 5' del pgARN, mitjançant la tirosina que hi ha a la posició 63 del seu domini TP. El grup OH lliure de la tirosina és utilitzat per encebar la síntesi dels primers nt del que serà la cadena - del rcADN (31-33). Gràcies a això la polimerasa copia els nt de la meitat 3' del bucle de la senyal

ϵ , amb la qual cosa dona lloc a un “primer” curt d’ADN que posteriorment és transferit a l’element DR1*, a l’extrem 3’ del pgARN, pel que la identitat entre la seqüència motlle de la senyal ϵ i el lloc acceptor de DR1* és molt important (figura 18) (326). Tanmateix, el “primer” d’ADN només té entre tres i quatre nt, per tant podria hibridar inespecíficament a molts altres llocs del genoma del VHB. Per evitar-ho, existeixen altres factors que defineixen DR1* com l’acceptor correcte d’aquest “primer”: un element a 30 nt de l’extrem 5’ de DR1* anomenat ϕ (334) i un altre element que es solapa amb l’extrem 3’ de DR1* anomenat ω (335). S’ha proposat que la senyal ϵ i els elements ϕ i ω podrien interaccionar entre ells com s’il·lustra a la figura 18. Com a conseqüència d’aquesta interacció el lloc acceptor del “primer” d’ADN de DR1* es mantindria en una conformació de cadena senzilla i es col·locaria a prop d’aquest “primer” d’ADN, el qual es podria transferir a aquesta seqüència amb un petit moviment.

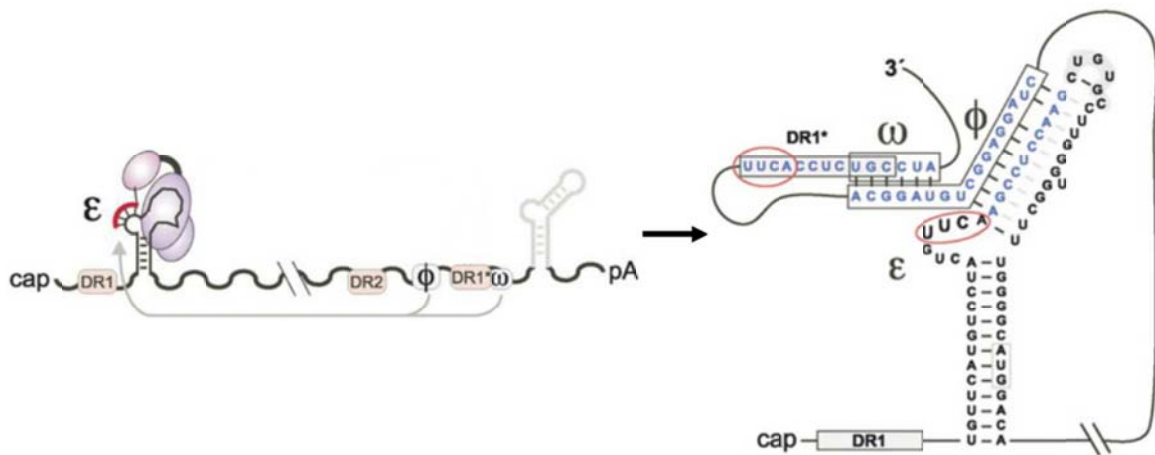


Figura 18: Primer canvi de motlle de la transcripció reversa de l’ARN pregenòmic (pgARN) entre la senyal ϵ a del seu extrem 5’ i l’element DR1* del seu extrem 3’. Segons el model proposat per Abraham i Loeb (335), la transferència del “primer” d’ADN des de la senyal ϵ a DR1* està controlada pels elements ϕ i ω , que causen la juxtaposició del bucle del senyal ϵ amb el lloc acceptor de DR1* (encerclat en vermell en la seqüència del DR1*). Simultàniament l’aparellament de bases que manté l’estructura del senyal ϵ es trenca i per tant aquesta estructura pot canviar dràsticament. Modificat de (17).

Un cop transferit el “primer” al seu acceptor de l’element DR1* continua l’elongació de la cadena - del rcADN cap a l’extrem 5’ del pgARN (3’ de la nova cadena -). Durant aquest procés el pgARN és degradat pel domini RH de la polimerasa. Malgrat això, aquest domini no degrada el pgARN sencer sinó que s’atura a una posició fixa situada a uns 11-16 nt del seu extrem 5’ (336) (figura 19). Aquest petit fragment d’ARN no degradat unit a la caputxa (“cap”) de 7-metilguanosa trifosfat conté la seqüència DR1, cosa que permet la seva translocació per hibridació amb la seqüència idèntica a la seva de DR2 on l’ARN actua com un “primer” convencional per la síntesi de la cadena + del rcADN (17) (figura 19). En aquest punt del procés de la transcripció reversa és on es pot originar el dslADN, si enlloc de translocar-se a DR2 el “primer” d’ARN es queda a la seva posició original i s’estén la cadena + des d’allà, un procés denominat “in situ priming” (50,337) (figura 19). Aquesta via d’amplificació de la cadena + és

minoritària, la qual cosa a priori és sorprenent donat que a la seva posició original la seqüència del “primer” d’ARN és totalment complementària a l’extrem 3’ de la cadena -, mentre que en traslocar-se només són complementàries les seqüències de DR1 i 2. S’ha proposat, tant en VHB com en el model de DVHB, que la translocació del primer d’ARN està afavorida per interaccions a llarga distància entre diferents segments de la cadena -: En DVHB s’han descrit tres elements anomenats 5E i 3E (propers als dos extrems de la cadena -) i M (al mig del genoma) que interacciona amb 5E i 3E (338), cosa que fa que s’acostin DR 1 i 2 (figura 19).

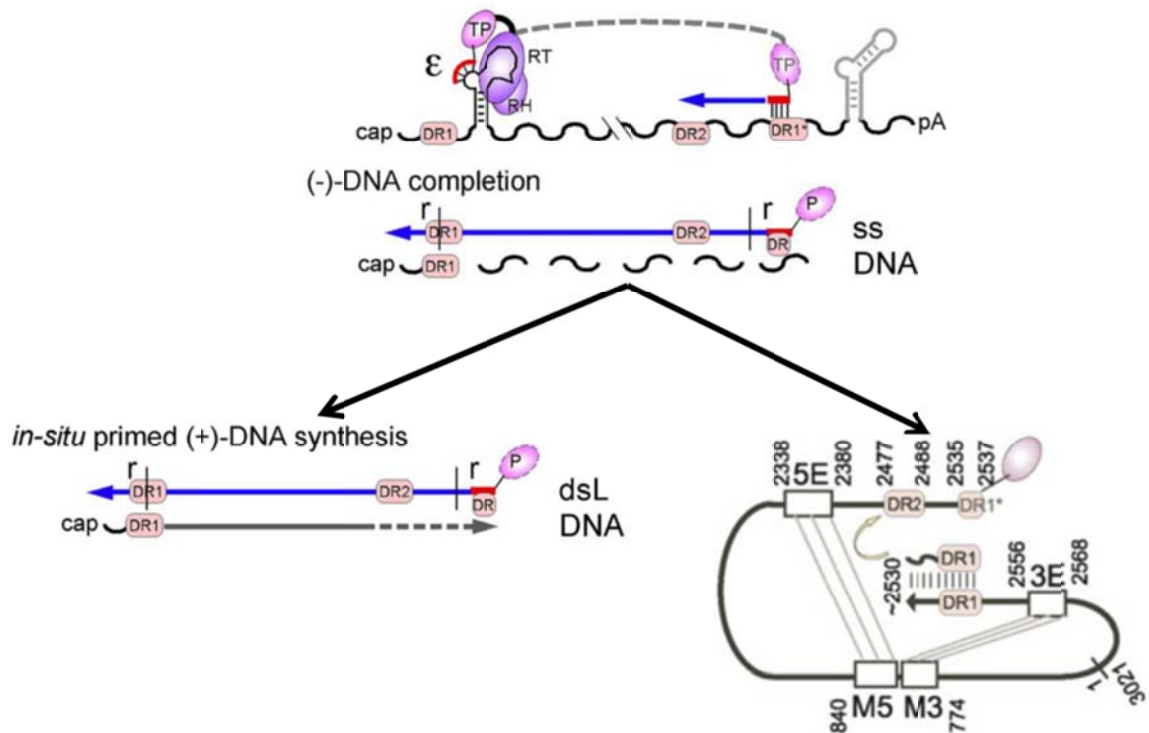


Figura 19: Segon canvi de motlle de la transcripció reversa de l’ARN pregenòmic (pgARN) entre DR1 i 2. Durant l’estensió de la cadena - de l’ADN relaxat circular (rcADN) el pgARN és degradat excepte els 11-16 nucleòtids del seu extrem 5’. Aquest oligonucleòtid d’ARN servirà de “primer” per la síntesi de la cadena + del rcADN, habitualment mitjançant la transferència d’aquest “primer” a DR2. En el model de VHB d’ànec (DVHB) s’ha proposat que això és possible gràcies a les interaccions a llarga distància entre l’element M (bipartit en M3 i M5) i els elements 5E i 3E que acosten DR1 i 2 (338). En una minoria de casos, la translocació del “primer” d’ARN a DR2 no té lloc i l’estensió de la cadena + es porta a terme per “in situ priming”, cosa que dona lloc a l’ADN lineal de doble cadena (dsLADN). Modificat de (17,308).

Després de traslocar-se el “primer” d’ARN a DR2 comença la síntesi de la cadena + del rcADN fins a l’extrem 5’ de la cadena - (figura 20). Per tal de continuar copiant la cadena - és necessari un tercer canvi de motlle que permeti continuar estenent la cadena + a partir de l’extrem 3’ de la negativa. Això és possible gràcies a les redundàncies terminals o r, unes seqüències idèntiques de 8-9 nts situades als extrems 5’ i 3’ de la cadena - (22), que es juxtaposen gràcies a l’acostament entre DR1 i 2 mediat per la interacció de 5E i 3E amb M en el model de DVHB (338) (figura 20). D’aquesta manera l’extrem 3’ de la nova cadena + pot passar de r en 5’ a r en 3’ i continuar estenent-se, per donar lloc al rcADN final (figura 20).

Aquest canvi de motlle és molt eficient tant en virus humans com d'aus, no obstant el VHB humà no té un element 5E homòleg a M5 i per altra banda es poden anar acumulant mutacions en aquests elements que afectin l'aparellament de bases entre aquests elements (17). Per aquest motiu es pensa que podria existir algun mecanisme addicional per generar rcADN adequadament, que encara no s'ha descrit.

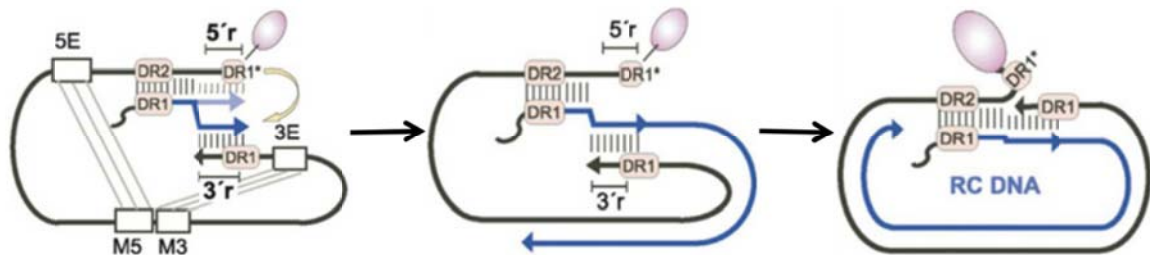


Figura 20: Tercer canvi de motlle de la polimerasa viral, entre les redundàncies terminals (r) de l'extrem 5' i 3' de la cadena - de l'ADN relaxat circular (rcADN o RC DNA a la figura). La cadena + s'estèn entre DR2 i l'extrem 5' de la cadena -, un cop copiada la r en 5' la cadena + en creixement es trasloca a r en 3', probablement gràcies a la homologia de la seva seqüència i la proximitat a l'espai. A continuació pot continuar la síntesi de la cadena + que queda incompleta. Modificat de (17).

2.2.5. Morfogènesi de noves partícules virals o reciclatge de càpsides al nucli:

Tal com s'ha vist a l'apartat anterior, durant la formació de les nucleocàpsides el pgARN s'empaqueta en el seu lumen i allà es converteix primer en ADN de cadena simple (ssADN) i després en rcADN. Durant aquest procés les nucleocàpsides van madurant, un procés mediat per passos seqüencials de fosforilació i desfosforilació dels residus serina dels motius SPRRR repetits al domini protamina de la HBcAg (15). Al llarg de la conversió de pgARN a rcADN el HBcAg es va desfosforilant, cosa que contribueix a estabilitzar les interaccions electrostàtiques entre les càrregues positives de les arginines (R) dels motius SPRRR i les càrregues negatives que s'acumulen durant la síntesi de la cadena + del rcADN (339). Aquest procés provoca canvis conformationals a les nucleocàpsides (veure 2.2.2. Transport i entrada al nucli).

Les nucleocàpsides madures poden embolcallar-se i formar noves partícules virals o retornar al nucli, on alliberaran el rcADN per augmentar el pool de molècules de cccADN (reciclatge nuclear) (25,288). Alternativament, també es poden segregat nucleocàpsides o inclús càpsides buides nues. La secreció d'aquestes càpsides depèn d'una proteïna multifuncional amb papers clau en la biologia de la membrana cel·lular anomenada "apoptosis-linked gene 2-interacting protein" (Alix) (340). Els mecanismes de secreció d'aquestes partícules nues encara no es coneixen, però podrien estar relacionats amb la capacitat d'Alix per deformar la membrana.

Embolcallament de nucleocàpsides i formació de partícules virals: Mentre que al citoplasma es poden trobar càpsides amb diferents graus de maduració, només les càpsides madures s'embolcallen i formen partícules virals, ja que aquestes són les úniques que poden interaccionar amb el domini de formació d'envolta al voltant de les nucleocàpsides de la forma citosòlica (i-preS) de les proteïnes de superfície LHBs entre l'extrem C-terminal de preS1 i els primers aa de l'extrem N-terminal de preS2 (168) (veure figura 8 i 2.1.2.1.3. ORF S i les proteïnes de superfície). Tot i que encara no està clara la naturalesa de la senyal que permet distingir entre les càpsides madures i les immadures per ser embolcallades, sembla clar que l'estat de fosforilació de les arginines de la regió protamina del HBcAg, que tal com s'ha comentat abans està relacionat amb el grau de maduració de la nucleocàpsida, podria ser part d'aquesta senyal. És possible que aquest senyal estigui molt relacionat amb el canvi conformacional a la butxaca hidrofòbica de la base de les espigues que sobresurten de la càpsida (341), com suggereix el fet que el canvi d'aa I97L a la seqüència de HBcAg, un residu amb la cadena lateral orientada a prop d'aquesta butxaca hidrofòbica (15), pugui donar lloc a càpsides que s'embolcallin sent immadures (342). Per altra banda certs canvis d'aa a HBcAg que bloquegen l'embolcallament de la nucleocàpsida també s'agrupen a la base de l'espiga i en el solc entre diferents espigues (343). Igual que a tot el domini preS de la forma i-preS de les LHBs, el bucle entre els dominis transmembrana 1 i 2 (TM1 i 2) de la proteïna de superfície SHBs també queda exposat a la cara citosòlica del RE durant la síntesi de les proteïnes de superfície. Així doncs, aquest bucle també s'orientarà cap a l'interior de les partícules virals i podrà interaccionar amb la càpsida. Aquesta hipòtesi està recolzada per l'observació que delecions curtes a la meitat C-terminal d'aquest bucle inhibeixen la formació de partícules virals però no de SVP (344). Tanmateix, algunes substitucions d'aa puntuals en aquesta regió no són suficients per bloquejar l'embolcallament (25).

Com molts altres virus amb envolta les nucleocàpsides del VHB s'embolcallen per gemmació. Aquest procés depèn estrictament de LHBs i SHBs (MHBs és prescindible) (345). Tanmateix, recentment s'ha demostrat que la formació de les partícules virals no té lloc a l'ERGIC (tal com passa amb les SVP) sinó en cossos multivesiculars (MVB), uns compartiments intracel·lulars especials que tenen la capacitat de generar vesícules intraluminals des del citosol que posteriorment es fusionen amb la membrana plasmàtica per alliberar aquestes vesícules. La gemmació del VHB en els MVB depèn de la maquinària del complex de classificació endosòmica necessari pel transport (ESCRT) (346,347), un sistema format per diferents complexos multiproteics que estan involucrats en passos claus de remodelació i escissió de la membrana (348). El procés de formació de vesícules intraluminals està mediat per unes proteïnes especials que recluten la maquinària de l'ESCRT cap a la membrana desitjada. Aquestes proteïnes reconeixen dominis d'acoblament tardà que normalment consisteixen en una

seqüència curta de quatre aa (348). El HBcAg conté un domini similar a aquests [PPAY, entre els aa 129-132 (14)], que exposa a la superfície de les càpsides i pot reclutar el complex ESCRT per unió directa o a través d'altres proteïnes cel·lulars com Nedd4 i adaptina gamma (349).

Reciclatge nuclear: Aquest procés té lloc per tal d'amplificar les còpies de cccADN al nucli de la cèl·lula infectada i té lloc poc després de la infecció, quan els nivells de proteïnes de superfície encara són baixos i no s'han començat a produir partícules virals (38). Tal com s'ha explicat a l'apartat 2.2.2. Transport i entrada al nucli, les nucleocàpsides que han experimentat un cert grau de maduració del genoma al citoplasma de la cèl·lula hoste poden ser importades al nucli perquè exposen el NLS del domini C-terminal de les HBcAg (84), però només aquelles amb un genoma madur en forma de rcADN es desacoblen a la cistella nuclear del complex del NPC i alliberen el genoma viral al cariplasma (294). D'aquesta manera, entre el rcADN que arriba a la cèl·lula a través de les partícules virals que l'infecten i el de les nucleocàpsides creades a partir del propi cccADN, s'estima que es poden acumular entre una i 50 molècules de cccADN en una mateixa cèl·lula (350–352). Aquesta acumulació de còpies permetria al cccADN persistir en el nucli de les cèl·lules filles després de la divisió cel·lular, tot i que la seva concentració s'hi diluiria en absència de síntesi de nou cccADN (353).

En el model de DVHB, s'ha observat que el destí de les nucleocàpsides produïdes en un hepatòcit infectat (formació d'una partícula viral i secreció o reciclatge nuclear) està regulat per LHBs (354,355): Si LHBs està absent, les nucleocàpsides alliberen el genoma viral al nucli com en la infecció inicial, i s'amplifica el nombre de còpies de genomes virals, mentre que si la LHBs està present, les càpsides s'emboquen formant partícules virals i es segreguen. Aquesta funció reguladora la realitza el domini de formació d'envolta al voltant de les nucleocàpsides del que s'ha parlat prèviament a l'apartat 2.1.2.1.3. ORF S i les proteïnes de superfície.

2.3. VARIABILITAT GENÈTICA DEL VHB:

2.3.1. Estructura en quasiespècies de les poblacions del VHB:

Tot i que les seqüències d'ADN dels genomes del VHB que formen part d'una mateixa infecció estan estretament relacionades entre elles no són idèntiques. Aquesta heterogeneïtat genètica té l'origen en els diferents passos de transcripció i transcripció reversa que tenen lloc durant el complex cicle replicatiu del VHB (figura 21). En primer lloc l'ARN polimerasa II transcriu els ARN pregenòmics i subgenòmics del VHB, entre els que hi ha el pgARN, per tant aquesta polimerasa podria contribuir a la variabilitat dels genomes del VHB. No obstant, no hi ha una

estimació clara de la taxa d'error de l'ARN polimerasa II en transcriure el cccADN, a més aquesta pot estar fortament afectada per algunes subunitats del complex de l'holoenzim, així doncs no està clar fins a quin punt pot afectar a la variabilitat genètica del VHB (356). Un cop transcrit, el pgARN surt al citoplasma on es traduirà la polimerasa viral i els HBcAg a partir d'ell, a continuació formarà un complex ribonucleoproteic amb aquesta polimerasa i xaperones al voltant del qual s'acoblaran els HBcAg per donar lloc a la nucleocàpsida (veure 2.2.4. Traducció, encapsidació i transcripció reversa de l'ARN pregenòmic). Un cop dins la nucleocàpsida, el complex ribonucleoproteic inicia la seva transcripció reversa mitjançant la polimerasa del VHB (figura 21), la qual incorpora erròniament a la nova cadena de rcADN un de cada 10^4 - 10^3 nt perquè no té activitat de correcció/edició ("proofreading/editing") 3'-5' (357). Això sembla justificar l'elevada taxa de mutació del VHB, que s'estima entre $1,4 \times 10^{-5}$ i $7,9 \times 10^{-5}$ substitucions de nt per posició del genoma/any (358-360), una taxa més elevada que la d'altres virus d'ADN de doble cadena i similar a la d'alguns virus d'ARN com els retrovirus (361). Si a aquestes elevades taxes de mutació es suma el fet que el VHB té una elevada taxa replicativa (cada dia es produeixen de l'ordre de 10^{11} - 10^{12} partícules virals) (362,363) i un genoma molt petit (d'unes 3,2 Kb), és concebible que en un pacient infectat es pugui produir qualsevol mutació en qualsevol posició del genoma viral varis cops en un mateix dia. La suma de tots aquests factors genera l'ampli espectre de genomes del VHB amb seqüències d'ADN estretament relacionades però no idèntiques que co-infecten un mateix pacient. Aquests genomes s'estructuren en diferents poblacions virals anomenades variants genètiques que en conjunt donen lloc a una quasiespècie viral (364,365). El concepte de quasiespècie va ser desenvolupat durant la dècada de 1970 per Eigen i Schuster en estudiar l'evolució de macromolècules simples amb capacitat replicativa (366). Aquest concepte es va aplicar ràpidament a virus d'ARN amb una elevada taxa de mutació que dona lloc a poblacions genèticament heterogènies (367-369), on es pot definir quasiespècie com una "unitat de selecció" que davant una pressió selectiva que la pertorba (com el tractament antiviral o el sistema immunitari de l'hoste), el conjunt de variants genètiques que en formen part modificarà la seva distribució, per tal d'escapar-se'n i continuar-se replicant (370).

Tot i que en general s'assumeix que la font principal de variabilitat de la quasiespècie del VHB són els errors de la polimerasa viral en dur a terme la transcripció reversa del pgARN, alguns factors del propi hoste també poden contribuir a l'heterogeneïtat genètica del VHB. L'exemple més ben caracteritzat és el de l'enzim "apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G" (APOBEC3G) (figura 21), un mecanisme de defensa antiviral de l'hoste que indueix la hipermutació de guanina a adenina en VHB (371) i també en retrovirus i retrotransposons (372). També poden contribuir a l'heterogeneïtat genètica el reciclatge nuclear de les nucleocàpsides que té lloc poc després de la infecció (38): les noves nucleocàpsides

creades a partir del pgARN transcrit a partir del cccADN de la mateixa cèl·lula poden contenir noves mutacions produïdes durant la transcripció reversa o per l'activitat d'APOBEC3G, per tant els genomes que re-infecten el nucli poden ser diferents dels que infectaven el nucli prèviament. Així la re-infecció del nucli pot donar lloc a una quasiespècies diferent a la que es pot veure en el torrent circulatori dels pacients. A més l'heterogeneïtat d'aquesta quasiespècies intracel·lular també pot enriquir-se per la infecció de la mateixa cèl·lula per múltiples partícules virals (figura 21).

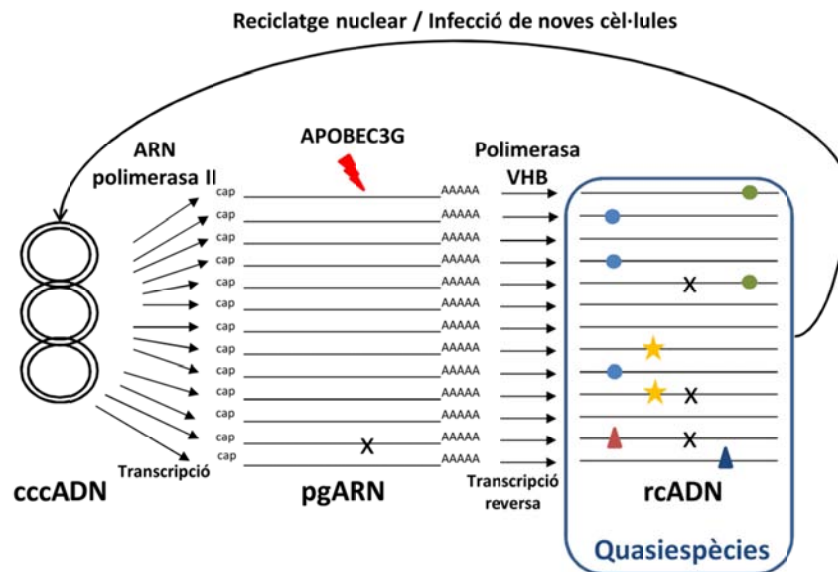


Figura 21: Generació d'heterogeneïtat genètica entre els diferents genomes que co-infecten el mateix pacient, que dona lloc a una quasiespècies viral. Aquest procés inclou factors de l'hoste com "apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G" (APOBEC3G) i virals, com la polimerasa de VHB (sense activitat de correcció d'errors 3'-5') que té una taxa elevada d'errors en realitzar la transcripció reversa d'ARN pregenòmic (pgARN) a ADN relaxat circular (rcADN). En canvi es desconeix fins a quin punt genera variabilitat genètica la transcripció de l'ADN circular covalentment tancat (cccADN) per l'ARN polimerasa II. En l'esquema els diferents símbols a cada línia, que representa una molècula de rcADN, indica diferents mutacions. Cada una d'aquestes línies correspondria a una variant genètica, amb capacitat per reinfectar el nucli de la cèl·lula hoste o una nova cèl·lula.

La polimerasa viral no només comet errors d'incorporació de nous nt, sinó que en certes regions del genoma del VHB pot tenir un major risc d'introduir errors per "lliscament" al copiar-les. Aquest fenomen està associat principalment a les característiques de la seqüència d'aquestes regions, com per exemple la presència d'homopolimers (repeticions de tres o més nt) i donaria lloc a errors per delecció o inserció la qual cosa pot alterar els ORFs virals i donar lloc a variants genètiques potencialment deficientes o defectives (373–376). La versatilitat de l'estructura en quasiespècies pot proporcionar mecanismes de trans-complementació que permetin tolerar aquestes variants i mantenir-les dins la quasiespècies. Així per exemple, en un estudi "in vitro" (86) es va observar que en co-transfectar en cultiu cel·lular genomes de VHB amb diferents mutacions que suprimien l'activitat de la polimerasa viral però amb l'ORF PC/Core intacte i

genomes amb el l'ORF P intacte però incapaços d'expressar HBcAg funcional, aquests eren capaços de trans-complementar-se entre ells i donar lloc a nucleocàpsides que contenen una polimerasa activa. El manteniment d'aquests genomes defectius dins la quasiespècies del VHB suggereix que també tenen un paper dins el cicle replicatiu del VHB, com per exemple la síntesi de noves proteïnes a partir de les mutacions que els fan defectius, amb noves funcionalitats, com per exemple les MHBs truncades que són capaces de regular vies de senyalització cel·lular que activen la proliferació cel·lular (157). Així doncs l'estructura en quasiespècies del VHB podria augmentar la capacitat codificant del VHB.

Per altra banda el genoma de les variants que formen la quasiespècies viral no pot variar lliurement degut a la mida petita del genoma del VHB, que fa que la seva seqüència contingui molta informació "empaquetada" pel fort solapament dels seus quatre ORF (58–60) que fa que tot el seu genoma sigui codificant. Per aquesta raó dins les regions codificants s'inclouen seqüències reguladores i senyals en cis, necessaris per dur a terme els diferents passos del cicle replicatiu del VHB, tal com s'ha anat veient al llarg dels apartats anteriors. Aquesta restricció no afecta de la mateixa manera a tot el genoma viral: per exemple l'ORF PC/Core és el que té un grau de solapament més baix amb altres ORF, això li permet tenir epítops molt variables amb un paper molt important en la resposta contra el VHB (377), en canvi el domini RT de la polimerasa viral està més conservat, tant per les seves funcions fonamentals pel cicle replicatiu del VHB com per està totalment solapat amb l'ORF S (138).

2.3.1.1. Índexs per estudiar la diversitat de les quasiespècies:

La complexitat de la barreja de poblacions virals que forma la quasiespècies del VHB pot estar associada a l'evolució clínica de la infecció viral (378), la probabilitat de respondre al tractament antiviral (379,380) o la seroconversió a anti-HBe dels pacients amb HBcAg positiu (381,382). Així doncs, la comparació de diferents índexs de diversitat en mostres seqüencials de pacients o entre diferents grups de pacients pot proporcionar informació virològica i clínica rellevant sobre la quasiespècies del VHB.

L'estimació de la diversitat de poblacions genèticament heterogènies com una quasiespècies és complexa, ja que té múltiples variables: el nombre i freqüència relativa de les variants genètiques que la componen i la quantitat de llocs polimòrfics que contenen (383). Tot i que existeixen una sèrie d'índexs útils per estudiar aquestes variables cap d'ells és capaç de caracteritzar-les totes completament, ni n'existeix cap universalment admès. A més aquests

índexs són difícils d'estimar donada la diversitat esperada d'una quasiespècies i la mida relativament limitada del mostreig d'aquesta susceptible de ser analitzat (384) (figura 22).

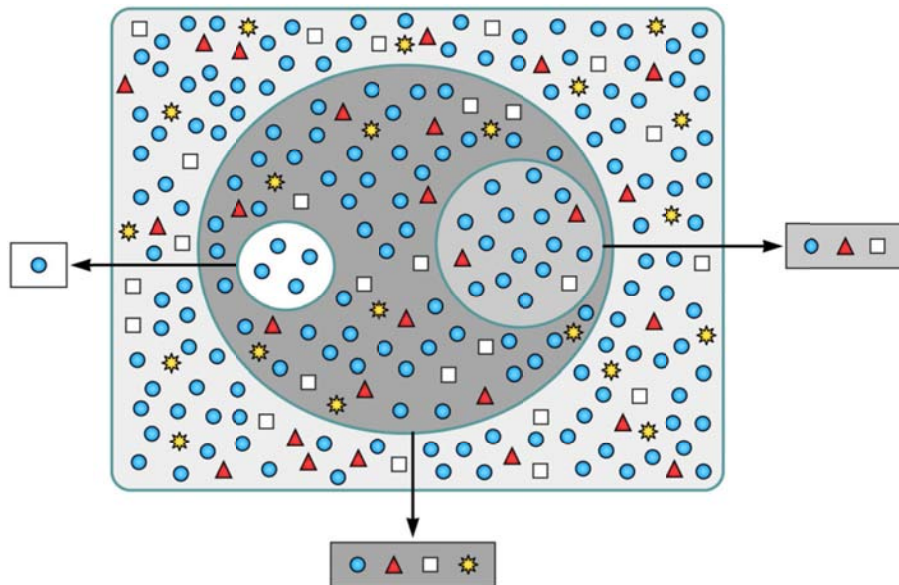


Figura 22: Efecte de la mida del mostreig sobre la diversitat estimada d'una quasiespècies viral. El rectangle gran representa la quasiespècies viral sencera. Cada un dels diferents símbols representa un genoma de VHB que pertany a la mateixa població (variant genètica) que altres genomes representats amb el mateix símbol. Si s'analitza una mostra petita (cercle blanc a l'esquerra) la quasiespècies serà molt homogènia, i la seqüència màster estarà sobrerepresentada. En analitzar una mostra més gran (cercle gris a la dreta) s'obté una imatge més real de la composició de la quasiespècies viral, però pot tenir un cert biaix en les proporcions relatives de cada variant i distorsionar els índex de diversitat calculats. Si s'estudia una mostra el més gran possible (cercle gran) la imatge de la quasiespècies s'acostarà més a la realitat i el càlcul dels índex de diversitat serà més acurat. Extret de (384).

Els índexs de diversitat més simples mesuren la complexitat de la quasiespècies pel nombre d'haplotips (seqüències diferents obtingudes, cada una de les quals representa una variant genètica), llocs polimòrfics o de mutacions diferents, aquests índex poden ser considerats com a índex de la riquesa de variants de la quasiespècies (383). Altres índexs com l'entropia de Shannon (385) mesuren la diversitat o uniformitat d'una quasiespècies viral quan són normalitzats a la diversitat màxima (S_n). La S_n permet mesurar la diversitat de la quasiespècies tenint en compte la quantitat d'haplotips o variants que s'hi han trobat i la freqüència relativa entre elles però no té en compte l'heterogeneïtat de les diferents variants de la quasiespècies ja que és insensible al nombre de mutacions (383,386). L'heterogeneïtat d'una quasiespècies, és a dir, com són de diferents les variants genètiques que la componen entre elles, es pot mesurar amb la freqüència de mutació (M_f) definida com l'heterogeneïtat genètica respecte la variant dominant o seqüència màster de la quasiespècies, o la diversitat nucleotídica (P_i) definida com l'heterogeneïtat genètica global de la població tenint en compte la mitjana del nombre de mutacions entre cada parella de variants de la quasiespècies (383,386).

2.3.2. Els genotips del VHB:

El 1988 Okamoto i col·laboradors (387) van classificar per primera vegada diferents genomes del VHB segons la seva diversitat genètica. En el seu cas, van classificar 18 genomes de VHB de diferents orígens geogràfics basant-se en la divergència de la seva seqüència de nt completa. D'aquesta manera van establir quatre grups diferents, que van anomenar de l'A al D, els quals divergien en el 8% o més de la seva seqüència de nt. També van observar que genomes classificats en diferents grups podien tenir el mateix subtip, un sistema de classificació fenotípic basat en polimorfismes de les proteïnes de superfície (veure 2.1.2.1.3. ORF S i les proteïnes de superfície), a pesar de l'alt grau de divergència genètica entre ells. Tot i això, encara que els subtipos no semblin reflectir la vertadera variabilitat genètica del VHB s'ha descrit l'associació entre subtipos, genotips i subgenotips (61,388) i avui en dia es continua utilitzant la classificació basada en els subtipos de les proteïnes de superfície. Actualment es classifica el VHB en vuit genotips diferents: els quatre grups (A-D) descrits a l'estudi d'Okamoto i col·laboradors i quatre més descrits posteriorment (E-H), a més també existeixen dos genotips putatius (I i J) (389) (figura 23). Aquests 10 grups tenen una divergència nucleotídica superior al 7,5% del total del seu genoma (61). Dins aquests grups s'han descrit uns 40 subgrups amb una divergència nucleotídica entre el 4% i el 7,5% del total del seu genoma (61) denominats subgenotips (figura 23). Alguns subgenotips també poden ser dividits en grups més petits anomenats clades, amb una divergència nucleotídica inferior al 4% del total del seu genoma (389). En un estudi (390) on es va realitzar un anàlisi filogenètic de 3403 seqüències de genoma complet de VHB descarregades de la base de dades Genbank (391), es va observar que 1047 d'aquestes seqüències (aproximadament el 30%) podien ser recombinants. La recombinació entre diferents genotips o subgenotips del VHB és el resultat de la co-infecció d'un hoste amb genomes de diferents genotips/subgenotips. Aquest fenomen es veu afavorit en certes regions geogràfiques per diferents factors: dos o més genotips/subgenotips de VHB circulant a la mateixa població, amb un alt índex de HBC i nivells de salut pública baixos (poca profilaxi i control de la infecció viral). Aquestes condicions es donen a països subdesenvolupats de l'est d'Àsia i Àfrica, on es poden trobar recombinants entre els diferents genotips i subgenotips que són típics d'aquelles àrees, com entre genomes de subgenotips B2 a B5 i genomes de genotip C (392) o els genotips D i E (393). Estudis epidemiològics han mostrat que els genotips i subgenotips del VHB tenen una distribució geogràfica específica (figura 23). Tanmateix aquesta distribució pot veure's alterada per les tendències actuals de la mobilitat humana, que pot dispersar certs genotips per zones on abans no estaven presents (389).

L'anàlisi filogenètic de les seqüències de nt del genoma complet del VHB és el mètode de classificació genotípica i subgenotípica del VHB més fiable (394) i es considera el "gold

standard” per aquest tipus d’anàlisi (389). A pesar d’això aquest mètode és relativament car i laboriós i, donada l’elevada divergència de nt entre diferents genotips, habitualment és suficient realitzar l’anàlisi filogenètic només amb fragments del genoma viral per determinar-los, com per exemple la regió preS (395). Pel que fa als subgenotips, no és suficient l’anàlisi d’un sol fragment del genoma viral per determinar-los acuradament ja que tenen una divergència genètica més baixa, per tant sempre s’haurien de determinar per filogènesis de genoma complet amb resultats reproduïbles en repetir-los diferents vegades (“bootstrap” filogenètic) (389).

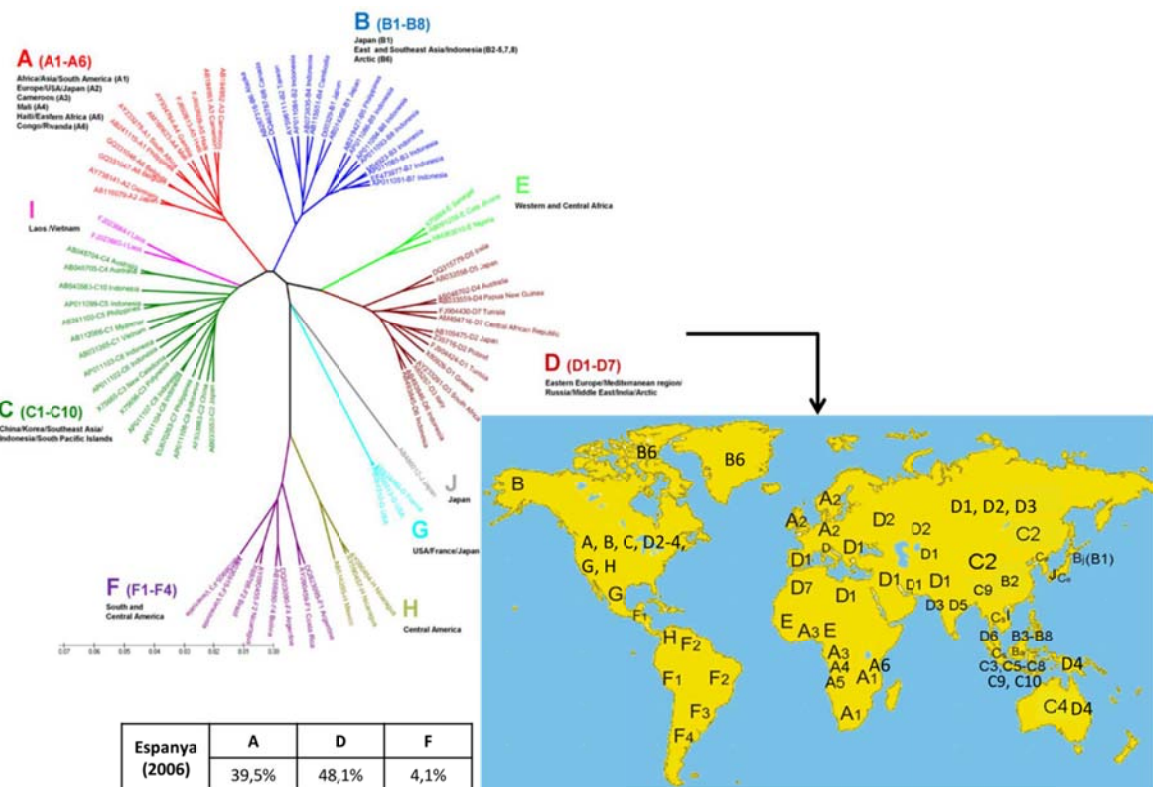


Figura 23: Genotips i subgenotips del VHB i la seva distribució geogràfica. També es mostren les freqüències dels diferents genotips a Espanya, obtingudes en un estudi realitzat en el grup del doctorand (396). Modificat de (397,398).

2.3.2.1. Diferències virològiques i evolutives entre genotips del VHB:

L’elevat nivell de divergència en les seqüències de nt de variants de diferents genotips és producte d’un procés evolutiu i adaptatiu a llarg termini. Durant aquest procés, a més de canvis de nt, s’han anat acumulant insercions i delecions al genoma del VHB cosa que fa que els genomes de diferents genotips del VHB puguin tenir longituds diferents: un genoma del VHB prototípic podria tenir una longitud d’uns 3215 nt, però el del genotip A té 3221 nt, el del D 3182 nt (és el més petit entre els diferents genotips del VHB) i el del G 3248 nt (és el més gran) (62). A més d’aquestes diferències de longitud, diferents genotips també poden presentar diferències en quant a la seqüència i expressió de les proteïnes virals i en quant a la seva

heterogeneïtat genètica. Per exemple, els genomes de genotip G no poden produir HBeAg perquè tenen dos codons stop a la regió PC de l'ORF PC/core (399). Per altra banda, l'expressió de HBeAg també pot ser suprimida pel canvi de nt G1896A a la regió PC, que dona lloc a un codó stop prematur (400). En un estudi del grup del doctorand (401) es va determinar l'elevada prevalença d'aquesta mutació en el genotip D, molt més elevada que en el genotip A, en el que té lloc en una minoria de casos. En el genotip A i també en el H són més prevalents les substitucions de nt A1762T i G1764A a la regió del BCP del promotor PreCore/Pregenòmic que s'han relacionat amb disminució de l'expressió del HBeAg, l'augment de la replicació viral i la severitat de la malaltia hepàtica (400,402). A la regió preS les delecions i substitucions de nt són més prevalents en el genotip C que en el B (403).

La diferent heterogeneïtat genètica i taxa de substitucions entre diferents genotips fa que mentre que els genotips A, B, C, D i F (i també l'I) s'hagin classificat en diferents subgenotips, els genotips E, G i H no s'hagin subdividit (404). Recentment, en un anàlisi evolutiu per caracteritzar l'origen del VHB en humans (405), s'ha estimat que mentre que el temps transcorregut des de l'ancestre comú més recent es similar en els genotips A, B, D i F (entre 8,9 i 12,7 milers d'anys) els genotips E, G i H han aparegut més recentment (entre 0,7 i 6 milers d'anys). Això suggereix que aquests genotips més recents i menys heterogenis podrien haver divergit a partir dels més antics i heterogenis (l'anàlisi filogenètic dels genotips mostra que els genotips F i H estan estretament relacionats, igual que passa amb els genotips D i E, figura 23) i encara no haurien tingut temps suficient per diversificar-se en subgenotips. En aquest estudi el genotip C es va classificar com el més antic (va divergir de l'ancestre comú més recent amb els demés fa aproximadament 17,5 milers d'anys). Això coincideix amb el fet que el genotip C és el que es subdivideix en més subgenotips (figura 23).

2.3.2.2. Impacte dels genotips en l'evolució de la malaltia hepàtica, resposta al tractament antiviral i profilaxi contra el VHB:

Alguns genotips estan associats a certs pronòstics de la malaltia hepàtica. Per exemple, els pacients infectats pel genotip F tenen taxes de mortalitat per causa hepàtica més elevades que els infectats pel genotips A i D (406). Per altra banda, els genotips C i D s'associen amb més freqüència a cirrosi i HCC que els genotips A i B (407). Dins el mateix genotip també pot variar el pronòstic de la malaltia hepàtica, així el subgenotip B1 (característic de Japó) té una probabilitat més elevada de donar lloc a hepatitis agudes i fulminants (408), tanmateix solen desenvolupar HCC a edats més avançades que pacients infectats amb altres subgenotips del genotip B (409,410).

Els genotips del VHB també influeixen la resposta a diferents tractaments antivirals. En pacients amb HBC tractats amb IFN α estàndard es defineix resposta sostinguda a aquest tractament com la seroconversió del HBeAg en pacients HBeAg positius (pèrdua de la detecció del HBeAg i detecció dels seus anticossos específics, anti-HBe), normalització dels nivells sèrics d'alanina aminotransferasa (ALT, principal marcador bioquímic de lesió hepàtica) i nivells indetectables d'ADN-VHB sis mesos després de finalitzar el tractament. Així, els nivells de resposta sostinguda a aquest tractament són significativament millors en pacients infectats per genotip A que en pacients infectats per genotip D (411). A més, després del tractament amb IFN α també s'ha observat una major pèrdua sostinguda del HBeAg i HBsAg en pacients amb genotip A que en pacients amb altres genotips (412). En el cas del tractament amb NUCs, el subgenotip B2 s'associa més freqüentment a la selecció de variants amb resistències a lamivudina (LAM, un anàleg de nucleòsids, veure 2.5. Tractaments contra la hepatitis B) que el B1 i en alguns estudis s'ha observat que el genotip A selecciona variants amb resistències a aquest tractament antiviral més ràpid que el D (402).

Finalment els diferents genotips del VHB també poden estar relacionats amb el fracàs de la profilaxi antiviral mitjançant les actuals vacunes contra el VHB, dirigides contra el determinant "a" de les proteïnes de superfície del VHB derivat dels genotips A i D (413). Tot i que en general la vacunació antiviral és efectiva (1) s'han descrit casos en que aquesta ha fallat a causa del genotip, com per exemple el cas d'un pacient alemany que tot i tenir títols detectables d'anticossos anti-HBs va desenvolupar una hepatitis B aguda per infecció amb el genotip F sense mutacions típiques d'escapament a la vacunació antiviral (414). Per altra banda, la freqüència d'aquest tipus de mutacions també varia segons el genotip i en alguns casos fins i tot es consideren motius "wild-type" de certs genotips (415).

2.3.3. Principals variants genètiques d'interès clínic en el VHB:

L'elevada taxa de mutació del VHB fa possible l'aparició de variants amb mutacions en ORFs o elements reguladors al llarg del genoma viral que poden tenir implicacions clíniques i patològiques rellevants. Aquesta característica, pròpia de l'estructura en quasiespècies, dona una gran plasticitat a la infecció per VHB que li permet adaptar-se ràpidament i persistir en l'hoste a pesar dels canvis en les condicions ambientals, com per exemple les pressions selectives imposades per la resposta del sistema immunitari o els tractaments antivirals.

2.3.3.1. Variants genètiques de l'ORF PC/Core i el promotor bàsic del core (BCP):

L'ORF PC/Core consta de dos regions: PC de la posició nucleotídica 1814 a la 1901 i C de 1901 a la 2458. La regió PC codifica el HBeAg i les variants amb canvis en aquesta regió solen ser incapaces d'expressar aquest antigen. El canvi de nt més comú en aquesta regió és el G1896A, que dona lloc a un codó stop (canvi de TGG a TGA) en la posició 28 de la proteïna precore, la precursora del HBeAg (65,66) (pcW28*, on * vol dir codó stop), i per tant la seva traducció finalitza prematurament. Aquest canvi de nt s'ha detectat en quasi tots els estadis de la infecció per VHB, des de les més severes fins les més benignes (416,417). Tot i la seva incapacitat per expressar HBeAg les variants amb el canvi G1896A tot i no expressar HBeAg poden donar lloc a noves infeccions (418) i causar hepatitis agudes o fulminants (408,418). Tal com s'ha comentat a 2.3.2.1. Diferències virològiques i evolutives entre genotips del VHB, la mutació G1896A té una elevada prevalença en el genotip D (401). Aquesta mutació també és prevalent en els genotips B i E, en canvi és rara en els genotips A i H (402). El canvi de nt G1899A, que causa el canvi d'aa pcG29D, es sol detectar juntament amb G1896A i està associat a cirrosi (417,419). Tots dos canvis s'han associat a també a HCC (420). S'han descrit casos de reactivacions de la replicació viral amb el canvi G1896A en pacients immunodeprimits positius pels anticossos anti-HBc, entre els quals hi ha un de publicat pel grup del doctorand (421).

La regió C de l'ORF PC/Core codifica el HBcAg que és altament immunogènic: s'han descrit múltiples regions epitòpiques de limfòcits B i T col·laboradors al llarg de tota la seva seqüència (80). En aquesta regió el grup del doctorand ha analitzat la variabilitat de l'epítot de limfòcits B flanquejat pels codons 74 a 84 (B74-84), que comparteixen HBeAg i HBcAg (422), i el de limfòcits Th entre els codons 50 i 69 (Th50-69). La variabilitat en aquests dos epítops s'ha relacionat amb l'escapament immunitari, la persistència de la infecció i la fallada del tractament amb IFN (423,424). A més, aquests estudis també van demostrar canvis en epítops immunodominants del HBcAg associats a NUCs, tot i que aquest tipus de tractaments antivirals no actuen directament sobre el HBcAg. Per altra banda, en un estudi amb pacients de genotip C (420) s'ha observat que els canvis d'aa en el HBcAg es solen agrupar en la regió que conté els epítops presentats pel complex major d'histocompatibilitat II i han estat associats al desenvolupament de HCC. Alguns d'aquests canvis són cP5H/L/T, cD32N/H, cC/E43K, cP50A/H/Y, cE83D, cI97F/L, cL100I, cA131G/N/P, cS181H/P i cC/Q182K/*.

L'expressió del HBeAg, la replicació viral i el grau de severitat de la malaltia hepàtica també poden ser modulats per canvis en el BCP (veure 2.1.2.2.2. Regulació dels transcrits precore i pregenòmic). Aquest element regulador es troba entre l'extrem 3' de l'ORF X i l'extrem 5' de

l'ORF PC/Core i controla la síntesi del pgARN i el pcARN (219). Els canvis clínicament rellevants més comuns en aquesta regió són el doble canvi de nt A1762T i G1764A, associat a descensos dels nivells de HBeAg i increments de l'activitat replicativa del VHB (425) i amb la severitat de la malaltia hepàtica (426,427). Aquests canvis de nt afecten la seqüència de la "TATA-box like" 2 del BCP i també l'EN2, un altre element regulador que es solapa amb el BCP pel seu extrem 3' i controla principalment l'activitat dels promotors PreCore/Pregenòmic i S1 i 2. El doble canvi A1762T/G1764A afecta a llocs d'unió per factors de transcripció enriquits al fetge, els quals ja no es podran unir a la regió de solapament entre el BCP i l'EN2, cosa que disminueix la síntesi de pcARN i va acompanyat d'un augment en la síntesi de pgARN (425). Això explicaria els efectes d'aquest doble canvi sobre la síntesi de HBeAg i la replicació viral. Els seus efectes sobre la severitat de la malaltia hepàtica podrien venir donats per la seva associació amb els aa 130 i 131 de la HBx, que poden contribuir al desenvolupament de HCC (428). Tal com s'ha comentat a 2.3.2.1. Diferències virològiques i evolutives entre genotips del VHB, el doble canvi A1762T/G1764A és més prevalent el genotips A i H (402).

2.3.3.2. Variants genètiques de l'ORF P:

L'ORF P codifica la polimerasa viral, una proteïna multifuncional amb diferents dominis al llarg de la seva seqüència. Aquesta proteïna s'uneix al pgARN gràcies al seu domini TP i col·labora en la seva encapsidació, sintetitza el rcADN a partir d'aquest ARN gràcies al seu domini RT, i degrada l'ARN motlle gràcies al seu domini RH (22) (veure 2.2.4. Traducció, encapsidació i transcripció reversa de l'ARN pregenòmic i 2.1.2.1.2. ORF P i la polimerasa).

Actualment l'opció de tractament contra l'HBC més àmpliament utilitzada és la basada en NUCs, els quals inhibeixen la transcripció reversa del pgARN a la cadena - del rcADN actuant directament sobre el domini RT de la polimerasa (429). Aquests fàrmacs competeixen amb els dNTPs, els substrats naturals del domini RT, per unir-se al centre actiu d'aquest domini (veure 2.1.2.1.2. ORF P i la polimerasa). Tot i l'elevat nivell de conservació del domini RT, s'han descrit variants amb canvis d'aa en aquesta regió que canvien l'estructura d'aquest domini disminuint-ne l'afinitat pels NUCs i per tant l'eficàcia antiviral d'aquests (103,109), però que encara són replicativament competents, tot i que poden fer-ho amb una eficiència reduïda (117). Les variants amb aquests canvis poden ser seleccionades durant el tractament amb NUCs de manera que augmenta la seva proporció a la quasiespècies fins arribar a ser-hi les variants dominants, i llavors causen el fenomen de la resistència al tractament antiviral (430). Aquest fenomen serà comentat a l'apartat 2.5.1. Resistència al tractament antiviral amb anàlegs de nucleòsids i nucleòtids (NUCs), juntament amb els canvis d'aa més rellevants que s'hi associen.

2.3.3.3. Variants genètiques de l'ORF S:

L'ORF S està totalment solapat al P i té tres codons d'inici de traducció en la mateixa pauta de lectura que defineixen tres regions: preS1(nt 2854-3211) i preS2 (nt 3211-155), que en conjunt formen la regió preS, i S (nt 155-835). La regió preS està solapada gairebé en la seva totalitat amb el domini SP de la polimerasa, la major part del qual no realitza funcions imprescindibles per la replicació viral (veure 2.1.2.1.2. ORF P i la polimerasa), i per tant pot tolerar una elevada variabilitat. Els principals canvis en la regió preS són les delecions (400), que estan relacionades amb el desenvolupament de HCC i l'adquisició de la morfologia de "ground glass hepatocytes" per part dels hepatòcits (173,431) (2.1.2.1.3. ORF S i les proteïnes de superfície). S'ha descrit que els pacients amb HCC tenen una taxa de delecions en la regió preS significativament més elevada que els pacients amb HBC (432). En els pacients amb HCC, aquestes delecions s'agrupen principalment a entre l'extrem C-terminal de preS1 i el N-terminal de preS2, coincidint amb el domini de formació d'envolta al voltant de les nucleocàpsides (168) (veure figura 8 i 2.1.2.1.3. ORF S i les proteïnes de superfície). Totes aquestes delecions inclouen epítops de limfòcits T i B.

Com que els tres codons d'inici de traducció de l'ORF S estan a la mateixa pauta de lectura, la regió S és comuna a les tres proteïnes de superfície. Aquesta regió conté l'AGL de la MHR on es troba el determinant antigènic "a" (s124-s147), el principal epítop conformacional del HBsAg (140) i un motiu estructural fonamental per la infectivitat de les partícules virals (147). A més, a diferència de la regió preS, la regió S es solapa totalment amb el domini RT de la polimerasa. Aquests dos factors restringeixen fortament la seva variabilitat, tot i això en aquesta regió es poden seleccionar variants amb mutacions que afecten el determinant "a", que dona lloc a la resposta immunitària més efectiva en la neutralització del VHB després d'una infecció viral o de la vacuna (141). Contra aquest epítop es dirigeixen els anti-HBs, cosa que constitueix un estímul evolutiu per la selecció de variants amb canvis que inhibeixen el seu reconeixement per aquests anticossos. La selecció d'aquest tipus de variants no només afecta a l'escapament a la vacunació del VHB sinó també la immunoprofilaxi amb immunoglobulines contra el VHB (HBIg) per evitar la infecció del fetge després del trasplantament hepàtic (433,434). A més la selecció de variants amb canvis en el determinant "a" també pot donar problemes de detecció del HBsAg per alguns mètodes de diagnòstic utilitzats rutinàriament als laboratoris clínics (435). Els principals canvis d'aa al determinant "a" relacionats amb aquest tipus de problemes són sG145R, sD144A, sP142S, sK141E, sQ129H, sI/T126N/S/A, sT131I/S, sM133L/I/T (144,145). No obstant això, en un estudi recent en població iraniana (436), s'ha observat que la

major part de les mutacions detectades al llarg de l'ORF S tenen lloc fora del determinant "a" i s'agrupen sobretot en epítops de limfòcits T citotòxics.

Finalment, durant el tractament amb NUCs es poden seleccionar variants amb canvis d'aa a la regió S com a conseqüència de la selecció al domini RT de variants relacionades amb la resistència a aquests tractaments. Alguns d'aquests canvis poden donar lloc a la unió reduïda a anticossos anti-HBs, com per exemple sG145R, sE164D, sW196S, sI195M o rtM198I, seleccionats durant el tractament amb LAM a causa de la selecció de les mutacions rtW/R153Q, rtV173L, rtM204I, rtM204V o rtV207I respectivament, totes elles relacionades amb la resistència a aquest tractament (437). Per altra banda, la selecció de certes variants relacionades amb la resistència a NUCs també pot causar l'aparició de codons stop prematurs a la regió S, com per exemple sW172* per la selecció de rtA181T al domini RT (438). Aquest codó stop té un efecte negatiu sobre la secreció de partícules virals i causa l'acumulació intracel·lular de proteïnes de superfície "in vitro". També la mutació rtM204I pot seleccionar sW196* (430) i rtV191I selecciona sW182* (439). La selecció d'aquestes variants amb codons stop prematurs a les proteïnes de superfície pot donar lloc al desenvolupament de HCC (440–442).

2.3.3.4. Variants genètiques de l'ORF X:

L'ORF X es solapa en bona part amb el domini RH de l'ORF P i amb el promotor i l'extrem 3' de l'ORF PC/Core. Aquest ORF codifica la proteïna HBx, un polipèptid amb activitat reguladora multifuncional gràcies a la seva capacitat per interaccionar amb una gran varietat de lligands que li permeten modular l'activitat de promotors virals i cel·lulars (189). En la cèl·lula hoste HBx intervé en la regulació de la transcripció, de l'apoptosi i del cicle cel·lular, modula vies de senyalització cel·lulars, interacciona amb vies de degradació proteica i inhibeix la reparació de lesions a l'ADN (189). En el cicle replicatiu del VHB HBx estimula la replicació viral a través de la regulació epigenètica de la transcripció del cccADN (43,205). Aquest ampli ventall de funcions indica que els canvis en la seqüència de nt en l'ORF X tindran conseqüències importants en la infecció viral. Alguns dels canvis típics de l'ORF X es troben al seu extrem 3', en una regió que es solapa entre les "TATA-box like" 2 i 3 del BCP, com per exemple el doble canvi A1762T/G1764A a la seqüència de la "TATA-box like" 2, que s'associa als canvis d'aa xI130M, xV131I i xF132Y de la HBx i, sobretot els dos primers canvis, poden contribuir al desenvolupament de cirrosi i HCC (428). En pacients amb HCC també s'ha trobat amb freqüència canvis en els aa 5, 38 i 94 de la HBx, codificats per codons fora de la regió de l'ORF X solapa entre les "TATA-box like" 2 i 3 del BCP (428).

A més d'aquests canvis d'aa, en el moment de redactar aquesta memòria en el grup del doctorand s'està duent a terme un estudi per seqüenciació massiva de la regió 3' de l'ORF X on s'ha observat que les mutacions més freqüents en aquesta regió són delecions de vuit nt que trenquen la pauta de lectura d'aquest ORF i sovint creen un codó stop "de novo" a la posició 134. Per tant aquestes delecions donen lloc a una forma de HBx truncada en els darrers 20 aa del seu extrem C-terminal, que podria tenir alteracions en la seva funció pro-apoptòtica (443) i trans-activadora (193). Formes de l'ORF X amb delecions a l'extrem C-terminal també poden trobar-se integrades al genoma de l'hoste i s'associen al desenvolupament de HCC (444).

2.3.4. Estudi de les variants genètiques de la quasiespècies del virus de la hepatitis B:

Al llarg de l'apartat 2.3. Variabilitat genètica del VHB s'ha explicat com certes variants de la quasiespècies del VHB poden estar implicades en la progressió de la malaltia hepàtica a cirrosi o hepatocarcinoma (417,419,420,428,432,440), a la resistència al tractament antiviral (430) o a l'escapament al sistema immunitari (144,145). Els genotips del VHB també poden estar implicats en major o menor mesura en aquests fenòmens (402,406,411,415). Variants relacionades amb aquests fenòmens poden coexistir en la mateixa quasiespècies viral, inclús variants de genotips diferents (445), i ser seleccionades davant de certes condicions ambientals o canvis en aquestes (tractament antiviral, pressió del sistema immunitari...) per assegurar la persistència de la infecció. Així doncs, l'estudi de les variants que formen la quasiespècies del VHB té un gran interès clínic i virològic.

Al llarg dels anys s'han desenvolupat diferents tècniques genotípiques per estudiar la composició de variants de la quasiespècies del VHB, les més convencionals es basen en:

- Tècniques moleculars indirectes, que es centren en la detecció de canvis d'aa específics prèviament establerts, tot i que també s'utilitzen per determinar els genotips del VHB. Aquestes tècniques permeten diferenciar entre variants amb diferents al·lels en la posició del canvi estudiat, o amb diferents genotips, però encara que permetin estudiar més d'un canvi simultàniament, no poden determinar la seva localització en una mateixa variant. Les tècniques moleculars indirectes més comunes són sobretot les basades en hibridació, entre les que destaquen els assaigs d'hibridació reversa (446), i també les basades en anàlisi de fragments de restricció de longitud polimòrfica (RFLP) (447,448). Les tècniques basades en hibridació i RFLP seran comentades breument a continuació, tot i que existeixen moltes altres aproximacions moleculars indirectes per la detecció de canvis concrets o genotips a la quasiespècies del VHB, com per exemple assaigs de nucleasa en 5' (449), anàlisi de corbes

de fusió (“melting point”) (450) o utilització de primers específics (451) mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) a temps real, etc.

- Tècniques per la seqüenciació del genoma viral, que estan basades principalment en l'automatització del mètode de terminadors de cadena descrit el 1977 per Frederick Sanger (452). Avui en dia aquest mètode permet determinar seqüències d'ADN d'entre 300 i 900 pb i segueix sent àmpliament utilitzat (453), tot i ser en general més laboriós que les tècniques moleculars indirectes. Es basen sobretot en assaigs “in house”, amb l'excepció de la tècnica comercial TRUGENE genotyping test (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, USA). L'estudi de la quasiespècies del VHB mitjançant aquestes tècniques s'ha portat a terme mitjançant dues aplicacions diferents: la seqüenciació directa o poblacional i la seqüenciació amb un pas previ de clonatge molecular.

Finalment, en els darrers 10 anys l'estudi de les quasiespècies virals ha experimentat una gran revolució amb la introducció de les tècniques de seqüenciació massiva o de nova generació (NGS). Aquestes tècniques han experimentat una evolució molt ràpida en diverses plataformes basades en tecnologies molt diferents que permeten la seqüenciació d'alt rendiment: generen milers o milions de lectures de seqüència en paral·lel en la mateixa carrera de seqüenciació (453–455).

2.3.4.1. Tècniques genotípiques basades en hibridació:

Les tècniques de genotipatge basades en hibridació utilitzades en l'estudi de la quasiespècies del VHB es fonamenten en la hibridació de petits fragments d'ADN amb sondes d'oligonucleòtids (hibridació reversa i seqüenciació en xips d'ADN) o en una matriu per la seva posterior ionització i anàlisi per espectrometria de masses (MALDI-TOF) (456–458). Això implica que no es determinen les proporcions de variants individuals de la quasiespècies del VHB. A més, una de les limitacions més importants d'aquestes tècniques és la seva especificitat: com que no es determina directament la seqüència de l'ADN-VHB es requereixen nous conjunts de sondes específiques per hibridar les regions d'interès on es troben les mutacions a detectar, i la variabilitat natural de la seqüència que les envolta en aquestes regions d'interès redueix la capacitat discriminant i l'especificitat d'aquestes tècniques (459).

Tot i això les tècniques d'hibridació són molt utilitzades en els laboratoris clínics, perquè són fàcilment aplicables a la rutina analítica per la relativa simplificació tècnica i la rapidesa amb que generen resultats. A més permeten detectar mutacions presents en variants de la quasiespècies del VHB amb una sensibilitat molt més elevada que les tècniques de seqüenciació basades en el mètode de Sanger (1-10%, segons la tècnica). Tot i això la sensibilitat amb la que

es detecten mutacions presents en poblacions virals minoritàries es pot veure reduïda si la seqüència del voltant de la mutació estudiada forma estructures secundàries que poden dificultar la hibridació del fragment d'ADN amb la regió d'interès (459).

Entre les tècniques genotípiques basades en hibridació més comunes que es pot trobar avui en dia als laboratoris clínics estan les tècniques comercials d'hibridació reversa en sondes d'oligonucleòtids INNO-LiPA [Fujirebio (Innogenetics), Ghent, Bèlgica] (figura 24), desenvolupades a principis de la dècada del 2000 per detectar mutacions al domini RT de la polimerasa prèviament relacionades amb la resistència al tractament antiviral (446), presents en petites fraccions (5-10%) de les variants de la quasiespècies. Com que aquestes tècniques només permeten la detecció de les mutacions capaces d'hibridar a les sondes d'oligonucleòtids, a mesura que s'han anat descrivint noves mutacions rellevants per la resistència als tractaments antivirals de la família dels NUCs s'han anat desenvolupant noves versions d'aquests assaigs amb noves sondes per detectar-les (457,460,461). També s'han desenvolupat versions d'aquestes tècniques per detectar mutacions comunes a la regió del BCP del promotor PreCore/Pregenòmic i a la regió PC, relacionades amb la transició de HBC amb HBeAg positiu a HBeAg negatiu (G1896A, A1762T i G1764A) (462).

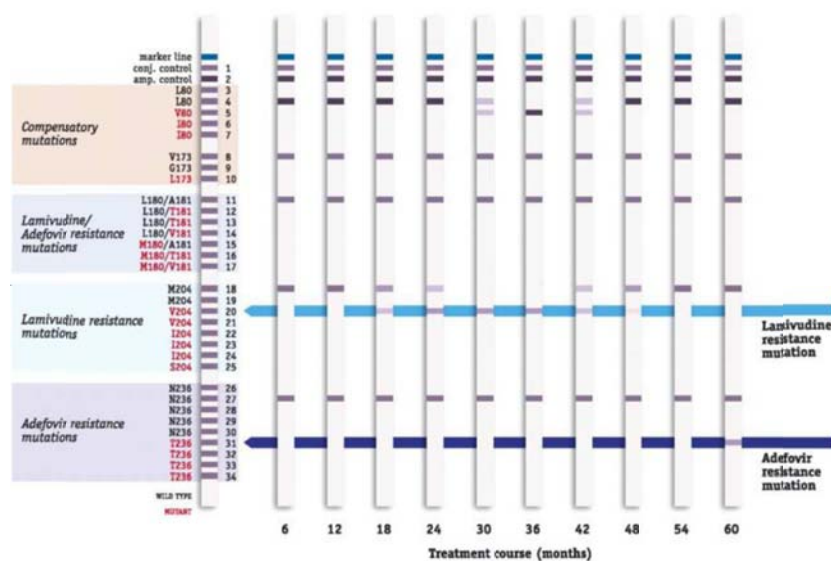


Figura 24: Exemple del resultat obtingut de l'anàlisi de variants resistents al tractament amb anàlegs de nucleòsids o nucleòtids amb el kit INNO-LiPA Multi DR. Cada una de les sondes, fixades en tires de nitrocel·lulosa permet detectar un al·lel concret d'una posició determinada del domini transcriptasa reversa de la polimerasa viral. Imatge proporcionada pel fabricant [Fujirebio (Innogenetics), Ghent, Bèlgica].

2.3.4.2. Tècniques genotípiques basades en anàlisi de fragments de restricció de longitud polimòrfica (RFLP):

Aquestes tècniques es basen en reaccions de digestió amb conjunts d'endonucleases específiques i anàlisi dels patrons de migració dels fragments resultants en un gel d'electroforesi (459) (figura 25). S'utilitzen sobretot en assaigs "in house" per detectar mutacions prèviament caracteritzades que creen dianes de restricció conegudes en el genoma viral. Per exemple, en el grup de recerca del doctorand s'han utilitzat tècniques basades en RFLP per analitzar la selecció de mutacions en la posició rtM204, del motiu YMDD del centre actiu del domini RT de la polimerasa viral en mostres de pacients en tractament amb LAM (rtM204 és la principal posició associada a la resistència a aquest tractament antiviral, com s'explicarà a 2.5.1.1. Resistències a L-Nucleòsids) (447). També s'han proposat mètodes de determinació ràpida del genotip del VHB mitjançant l'anàlisi dels patrons de digestió per diferents endonucleases, tot i que en alguns casos poden generar-se patrons atípics deguts a la variabilitat genètica del VHB que requeririen un re-anàlisi per seqüenciació i filogènesi, el mètode de referència per la determinació del genotip del VHB (448).

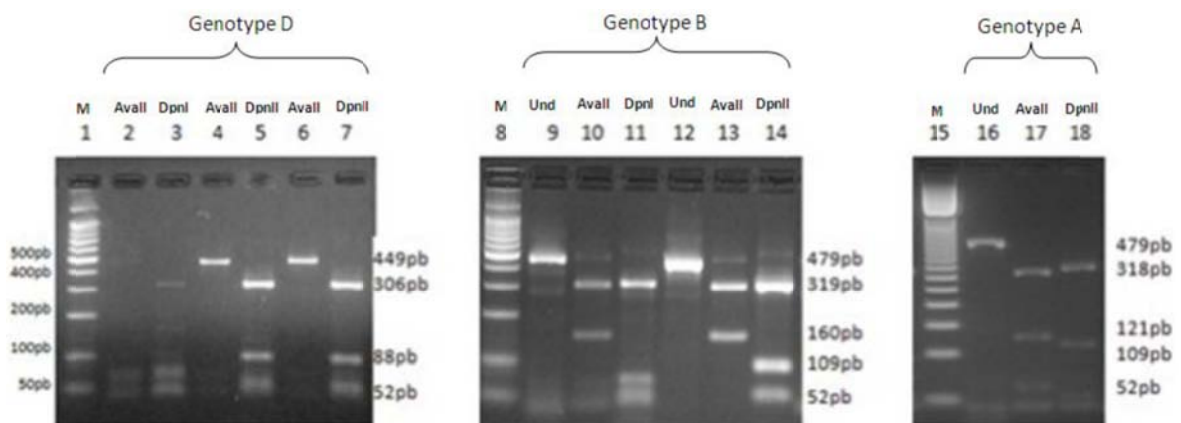


Figura 25: Exemple de determinació del genotip del VHB mitjançant l'anàlisi de fragments de restricció de longitud polimòrfica (RFLP). Extret de (448).

2.3.4.3. Tècniques genotípiques basades en seqüenciació directa d'amplicons o amb un pas previ de clonatge molecular:

El mètode de seqüenciació de Sanger ha estat el més utilitzat per la seqüenciació d'ADN en els darrers 40 anys. Aquest mètode es basa en una reacció de seqüenciació amb didesoxiribonucleòtids trifosfat marcats amb un fluorocrom que actuen com a terminadors de la cadena. Això dona lloc a una barreja de fragments d'ADN de diferents mides que acaben amb un dels terminadors de cadena fluorescents. Posteriorment aquests fragments són separats segons la seva mida en seqüenciadors basats en electroforesi en capil·lar, i la fluorescència

emesa pels fragments de la mateixa mida és registrada durant la seva migració a través del capil·lar per un detector (452,463,464) (figura 26). Habitualment abans de la seqüenciació cal amplificar per PCR la regió d'interès per tal d'obtenir la màxima quantitat possible d'ADN, que doni lloc a un nivell de senyal fluorescent adequat durant la seqüenciació.

La seqüenciació directa o poblacional de les molècules d'ADN produïdes per PCR (amplicons) de la regió d'interès a analitzar en el genoma del VHB genera una única seqüència formada pels nt que es troben en una proporció $\geq 20\%$ en cada posició dels amplicons seqüenciats, sense que la seqüència que les envolta doni problemes d'especificitat com podia passar en les tècniques d'hibridació o RFLP. Així doncs, aquesta tècnica no pot determinar seqüències de nt de variants individuals, sinó que la seqüència obtinguda és la mitjana de la de les variants genètiques presents a la quasiespècies en una proporció $\geq 20\%$ d'aquesta (459).

Les limitacions que presenta la seqüenciació directa per estudiar variants concretes de la quasiespècies del VHB poden ser superades aplicant un pas previ de clonatge molecular a la seqüenciació dels amplicons d'ADN, cada un dels quals obtingut a partir d'un sol genoma de la quasiespècies, per tant representarà una variant genètica concreta. Aquesta tècnica consisteix a clonar els amplicons obtinguts per PCR en plasmidis amb els que es transformen bacteries competents, i analitzar una a una les colònies seqüenciant (igual que per seqüenciació directa) els plasmidis amb els que se'ls ha transformat prèviament (445) (figura 26), del que hauran generat milers o milions de còpies idèntiques. Aquesta tècnica és molt més laboriosa que totes les anteriors però dona molta més informació sobre la composició de la quasiespècies, ja que permet obtenir la seqüència de variants individuals i per tant determinar-ne la seva composició real.

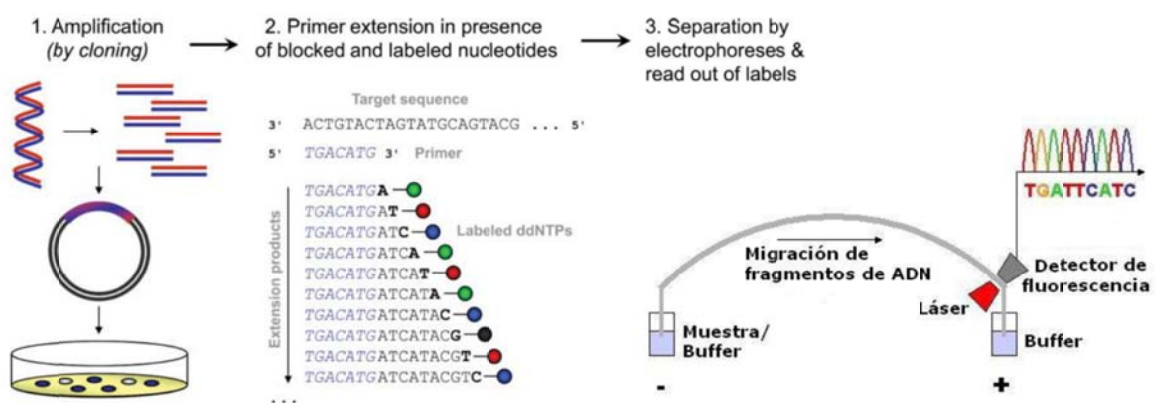


Figura 26: Seqüenciació d'ADN pel mètode de Sanger. A la figura, el primer pas mostra el pas previ de clonatge de les molècules d'ADN amplificades per reacció en cadena de la polimerasa (PCR), és a dir els amplicons: aquestes molècules es clonen en un plasmidi amb el que es transforma bacteries competents, que formen colònies on s'amplifica el plasmidi clonalment. Posteriorment s'extreu aquest plasmidi de cada colònia i es seqüencia pel mètode de Sanger. Des d'aquest pas cap endavant, el procediment és comú

amb la seqüenciació directa o poblacional: Es seqüencia utilitzant didesoxinucleòtids trifosfat (ddNTPs) marcats amb fluorocroms, que generen una barreja de fragments d'ADN que són separats segons la seva mida en seqüenciadors basats en electroforesi en capil·lar, i la seva fluorescència és registrada durant la seva migració a través del capil·lar per un detector. Modificat de (465).

2.3.4.4. Tècniques de seqüenciació massiva:

Malgrat que la seqüenciació pel mètode de Sanger, també coneguda com a seqüenciació de primera generació, ha tingut molt èxit en les darreres dècades i s'han desenvolupat instruments automatitzats que permeten la seqüenciació d'ADN mitjançant aquest mètode no és una tècnica d'alt rendiment, per tant té un cost molt elevat a nivell econòmic, de temps i de feina per seqüenciar multitud de mostres i/o grans genomes. A més, els resultats que pot donar en el camp de la virologia es veuen limitats per la incapacitat per seqüenciar material genètic de genomes individuals en barreges d'organismes (una situació igual que la d'una quasiespècies viral) sense un pas previ de clonatge molecular (466,467). Moltes d'aquestes limitacions han pogut ser superades per una segona generació de tecnologies de seqüenciació anomenades tècniques de seqüenciació massiva o de nova generació, NGS. En comparació amb la primera generació de seqüenciadors basats en el mètode de Sanger, la majoria de plataformes de seqüenciació solen donar lloc a lectures de seqüència (anomenades "reads" en l'àmbit de la seqüenciació massiva) més curtes (466) (tot i que la seva longitud ha anat augmentant a mesura que les seves tecnologies s'han anat desenvolupant), però el vertader avantatge de les tècniques de NGS roman en la capacitat de seqüenciar clonalment i en paral·lel la seqüència de milers o inclús milions de molècules d'ADN (453,454), cosa que permet analitzar barreges complexes de molècules d'ADN (com les quasiespècies virals) en una sola carrera de seqüenciació ("run") (466). Per tant es tracta de tecnologies d'alt rendiment que permeten generar de 1000 a 10.000 vegades més informació que la seqüenciació de Sanger, a un cost baix per megabase seqüenciada (468) i amb un estalvi considerable de temps i feina.

La mida relativament curta dels "reads" que generen aquesta segona generació de tecnologies les distingeix d'una nova generació de plataformes de seqüenciació que ha evolucionat més tard, les de tercera generació, capaces de donar lloc a "reads" de varies Kb. Tanmateix, en el moment de redactar aquesta memòria moltes de les plataformes de tercera generació encara estan en desenvolupament, i en general tenen un rendiment més baix que les de segona generació i una taxa d'error més alta (466). Certament, la principal limitació de les tecnologies de NGS és basa la seva taxa d'error relativament elevada en realitzar les lectures de les diferents seqüències, per això cal un processament bioinformàtic dels "reads" obtinguts que inclou varis passos de filtratge, alineament i correcció d'errors (469,470).

Aquestes plataformes tenen múltiples aplicacions en el camp de la virologia perquè permeten la seqüenciació de nous genomes virals o re-seqüenciació de genomes coneguts, per exemple per detectar perfils de resistència a tractaments antivirals i al sistema immunitari, estudis de metagenòmica en mostres clíniques o ambientals, per caracteritzar nous patògens o la diversitat viral en mostres ambientals, transcriptòmica, etc. (471). Les principals plataformes de seqüenciació massiva utilitzades en el camp de la virologia moment de la redacció d'aquesta memòria junt amb les seves característiques més importants es resumeixen a la taula 3.

Fabricant	Roche		Illumina/Solexa		Life Technologies		Pacific Biosciences
Plataforma	GS-Junior	GS-FLX+	MiSeq	HiSeq	Ion torrent PGM	Proton	RSII
Amplificació de les biblioteques d'amplicons	PCR en emulsió en "beads" (emPCR)		PCR en pont "in situ"		PCR en emulsió en "beads" (emPCR)		No s'amplifica abans de seqüenciar
Mètode de seqüenciació	Seqüenciació per síntesi (Piroseqüenciació)		Seqüenciació per síntesi (terminadors reversibles fluorescents)		Seqüenciació per síntesi (alliberament de protons)		Seqüenciació a temps real durant la síntesi de molècules d'ADN
Longitud dels "reads" (pb)	400	700	250-300	100-125	200-400	125-200	8500 (50% dels "reads" >10 Kb)
"Reads" per Run (milions)	0,1	1	25	3.000	4	60-80	0,8
Font d'error primària	Indels		Substitucions de nt		Indels		Indels
Principals avantatges	"Reads" llargs, plataforma consolidada		Fluxe de treball més senzill, plataforma consolidada		Plataformes més econòmiques, carrera de seqüenciació curta		Dona els "reads" més llargs
Principals inconvenients	Errors en zones homopolimèriques i elevat cost per Megabase		Dona els "reads" més curts i té els temps de carrera de seqüenciació més llargs		Errors en zones homopolimèriques		Elevada taxa d'error i plataforma amb alt cost econòmic

Taula 3: Comparació de les característiques més rellevants de les principals plataformes de seqüenciació massiva utilitzades en el camp de la virologia en el moment d'escriure aquesta memòria. pb=parells de bases, PCR=Reacció en cadena de la polimerasa. Indel=Insercions o delecions de nucleòtids. Les zones

homopolimèriques són repeticions de tres o més nucleòtids flanquejats per altres nucleòtids no idèntics a ells. Informació extreta de (467,472).

2.3.4.4.1. La tecnologia d'“Ultra-deep pyrosequencing” (UDPS):

Els dos estudis que formen part d'aquesta tesi s'han basat en la tecnologia d'“Ultra-deep pyrosequencing” (UDPS), la qual utilitzen les plataformes GS-FLX+ i GS-Junior distribuïdes per Roche (taula 3). La UDPS va ser la primera tecnologia comercial de NGS descrita el 2005 per Margulies i col·laboradors (473). Tal com es pot veure a la taula 3, una de les seves principals avantatges és el fet que dona uns “reads” relativament llargs en comparació amb les altres plataformes, i en el moment de l'inici d'aquesta tesi eren les que donaven els “reads” més llargs. Això permet caracteritzar de manera més completa el perfil de canvis de nt i aa de les diferents variants de la quasiespècies, tal com s'explicarà en més detall a l'apartat 5.1.2.1. Elecció de la plataforma de seqüenciació massiva pels estudis d'aquesta tesi. L'obtenció de les lectures de les seqüències de les molècules d'ADN és un procés dividit en diferents passos que es resumeixen a continuació:

Creació d'una biblioteca d'amplicons de la regió d'interès: Igual que la seqüenciació pel mètode de Sanger o de primera generació, el primer pas del procediment de seqüenciació és delimitar la regió de la que interessa determinar la seqüència tenint en compte la limitació de la longitud dels màxima dels “reads”: en el primer estudi, realitzat amb la plataforma GS-FLX (una versió anterior de la plataforma GS-FLX+) la longitud d'aquesta no podia excedir 250 pb, en el segon estudi realitzat amb la plataforma GS-Junior no podia excedir 400 pb. Aquesta regió s'amplificarà mitjançant PCR, en el darrer pas d'amplificació s'han d'utilitzar uns “primers” denominats pel fabricant “fusion primers” (figura 27), els quals porten uns adaptadors al seus extrems 5' i 3' que s'incorporaran a la seqüència dels amplicons obtinguts i els permetran interaccionar amb els diferents elements del sistema d'UDPS, com es veurà en els següents passos.

Forward primer (Primer A-Key):

5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG-MID-template-specific-sequence-3'

Reverse primer (Primer B-Key):

5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG-MID-template-specific-sequence-3'

Figura 27: Esquema dels “Fusion primers”. A l'extrem 5' en blau hi ha la seqüència dels adaptadors A i B, que serà utilitzada posteriorment per unir-se a altres components del sistema en l'amplificació clonal i la reacció de seqüenciació. Tant l'adaptador A com el B acaben amb la seqüència clau (“key”) TCAG, en vermell, fonamental pel processament bioinformàtic del senyal obtingut al final del procés de seqüenciació massiva en paral·lel, com es veurà més endavant. A continuació es troba la seqüència del

“Multiplex Identifier” (MID), un identificador únic que és una seqüència de 10 nucleòtids establerta pel fabricant i que s'utilitzarà durant l'anàlisi bioinformàtic per identificar la mostra a la que pertany cada “read”. L'ús d'aquesta seqüència és opcional i permet barrejar en una mateixa porció d'una placa PicoTiter els amplicons provinents de diferents mostres. Finalment a l'extrem 3' es troba la seqüència específica del motlle que li permetrà hibridar amb aquest i amplificar-lo. Figura i informació proporcionats pel fabricant (Roche, 454 Life Sciences, Branford, USA).

El conjunt d'amplicons obtinguts es denomina biblioteca d'amplicons. Abans de passar al següent pas del procediment de seqüenciació, aquesta biblioteca d'amplicons passa per diferents passos de purificació per eliminar “primers” i dNTPs no incorporats, sals i enzims que podrien interferir en passos posteriors. En aquest pas és crític eliminar els fragments d'ADN curts generats durant la PCR. Un cop purificades les biblioteques, cal una quantificació molt precisa de les molècules d'ADN de la biblioteca d'amplicons per tal d'ajustar la quantitat de molècules entrants en el següent pas del procediment. El fabricant recomana la quantificació específica de dsADN per fluorimetria. Finalment es creen pools de les llibreries d'ADN obtingudes de cada mostra que seran processats per separat i carregats en les diferents porcions de les plaques “PicoTiter” (PTP, plaques amb pouets microscòpics on té lloc la seqüenciació): en GS-FLX+ com a mínim són dos porcions i en GS-Junior, en ser les plaques més petites no poden subdividir-se i sempre es treballa amb un sol pool.

Amplificació clonal per PCR en emulsió (emPCR): Abans de la seqüenciació massiva és necessària l'amplificació clonal de cada una de les cadenes dels amplicons inclosos a cada biblioteca, mitjançant una emPCR, el procediment de la qual es resumeix a la figura 28.

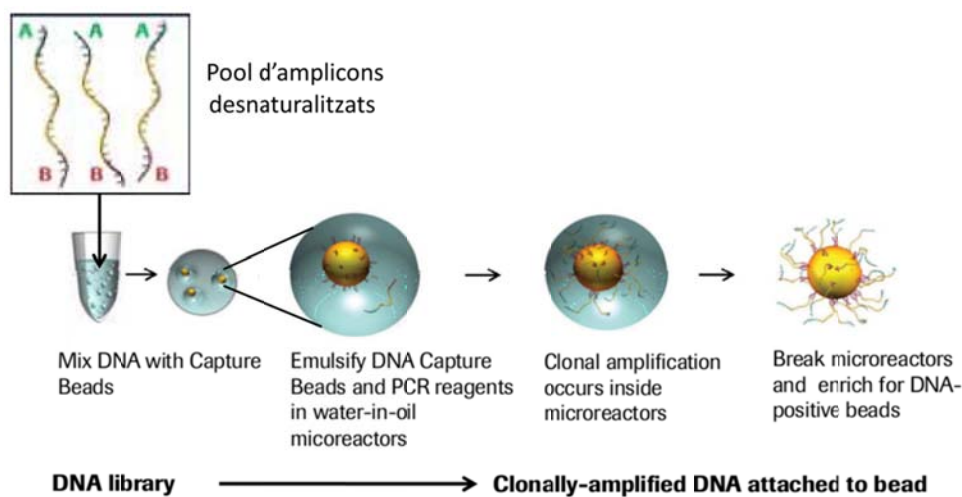


Figura 28: Esquema del procediment de la reacció en cadena de la polimerasa en emulsió (emPCR). En primer lloc els amplicons són desnaturalitzats de manera que s'obtenen cadenes simples d'ADN (ssADN). Els fragments d'ADN de cadena sencilla es barregen en una emulsió d'“aigua-en-oli” amb unes boles microscòpiques anomenades “DNA Capture Beads” d'uns 28 micròmetres de diàmetre (473), en unes condicions que afavoreixen que en una gota de l'emulsió entri una sola “bead” i una sola molècula de ssADN. Aquesta molècula és immobilitzada en les “beads” recobertes de sondes d'oligonucleòtids amb seqüències complementàries a les dels adaptadors A i B. D'aquesta manera es formen microreactors on una única cadena de cada amplicó de la biblioteca serà amplificada varis milions de vegades i les

copies recobriran la “bead”. Informació proporcionada pel fabricant, figura modificada a partir de figures proporcionades pel fabricant (Roche, 454 Life Sciences, Branford, USA).

Després de l’amplificació per emPCR, l’emulsió es trenca per recuperar les “beads”. Tanmateix en moltes de les “beads” recuperades no haurà tingut lloc ampliació d’ADN. Aquestes “beads” es denominen negatives i caldrà eliminar-les en la màxima mesura possible perquè no ocupin pouets de la PTP, que no donaran lloc a cap “read”. Aquest pas s’anomena enriquiment i es resumeix a la figura 29.

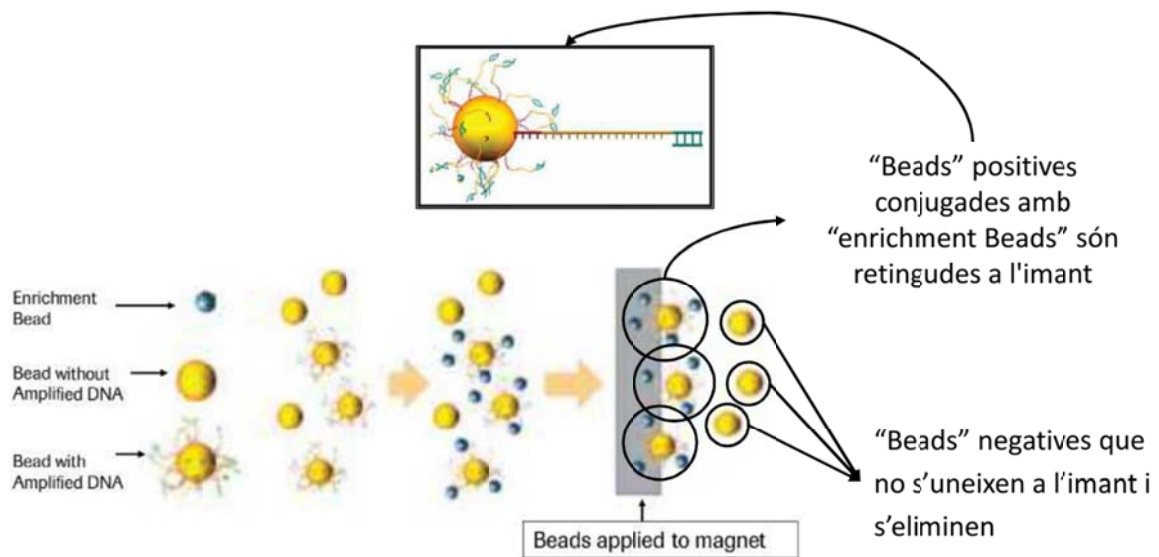


Figura 29: Esquema del procediment de l’enriquiment. Les “beads” recobertes d’ADN (positives) són separades de les que no ho estan (negatives) per unió a unes “beads” paramagnètiques anomenades “enrichment beads” que són retingudes a un imant mentre que les “beads” negatives no ho són i s’eliminen. La unió de les “beads” positives amb les “enrichment beads” té lloc mitjançant un “primer” conjugat amb biotina (“enrichment primer”): els amplicons que recobreixen les “beads” positives es desnaturalitzen i s’hibriden amb l’“enrichment primer” a través dels adaptadors del seu extrem no unit a la “bead”. Les “enrichment beads” estan recobertes de streptavidina, per tant s’uneixen a la biotina dels “enrichment primers”. Un cop separades les “beads” positives de les negatives, s’hi hibrida un altre “primer” que actuarà com encebador de la reacció de piroseqüenciació (com es pot veure en la imatge de la part superior d’aquesta figura). Informació proporcionada pel fabricant, figura modificada a partir de figures proporcionades pel fabricant (Roche, 454 Life Sciences, Branford, USA).

Un cop finalitzat l’enriquiment, es valora la qualitat del procediment d’emPCR per comptatge de les “beads” recuperades al final de l’enriquiment. L’òptim és recuperar entre el 5% i el 20% dels 10 milions de “beads” utilitzades en l’emPCR (entre 500.000 i 2.000.000 de “beads”). Un enriquiment per sota del 5% es considera baix i donaria pocs “reads” en una carrera de seqüenciació, i per sobre del 20% es considera que hi ha una elevada probabilitat que en un percentatge important de les gotes d’emulsió hagi entrat més d’una molècula de ssADN. En aquest cas hi hauria una barreja de seqüències unides a una mateixa “bead”, amb la qual cosa s’obtindria un “read” de mala qualitat (amb ambigüitats a la seva seqüència) que seria eliminat pels filtres del “software” bioinformàtic de la plataforma.

Seqüenciació massiva i en paral·lel de les biblioteques d'amplicons: Un cop obtingudes les “beads” enriquides, aquestes seran dipositades als pouets d'una PTP, formada per una làmina tallada a partir d'un bloc de fibres òptiques fusionades entre si. La superfície d'aquestes plaques està recoberta de pouets microscòpics, d'uns 44 micròmetres (μm) de diàmetre, que només permet l'entrada d'una sola “DNA capture bead”, i 55 μm de profunditat (473) (figura 30). Juntament amb les “DNA capture beads” es dipositen altres tipus de “beads”: unes amb els enzims necessaris per les reaccions de piroseqüenciació (“enzyme beads”) i unes altres per tal de mantenir el conjunt de tots els components del sistema de piroseqüenciació dins els pouets (“packing beads”). El dipòsit de les “beads” en els pouets de la PTP es fa per capes a través de varis cicles de càrrega i centrifugació (figura 30).

Un cop carregada, la PTP es diposita dins el seqüenciador (GS-FLX+ o GS-Junior) i comença el procés de seqüenciació massiva (figura 30). En aquest punt cal recordar que després de l'enriquiment les còpies clonals de les cadenes directa i reversa de cada amplicó estan unides a una “DNA capture bead” diferent, i hibridades amb un primer en el seu extrem lliure (figura 29). El subsistema de fluídica de la plataforma allibera els reactius necessaris per la piroseqüenciació (tampons i dNTPs) en fluxos sobre la PTP. En cada un d'aquests fluxos només s'allibera un dels quatre dNTPs i aquesta alliberació té lloc en un ordre concret. Quan en algun d'aquests fluxos s'afegeix un o més dNTPs en la cadena motlle unida a les “DNA capture beads” es produeix l'alliberació d'un nombre de pirofosfats (PPi) proporcional a la quantitat de dNTPs afegida a la nova cadena. Aquests PPi iniciaran una reacció enzimàtica acoblada que donarà lloc a la producció de quimioluminescència (figura 30):

- Les molècules de PPi alliberades són utilitzades per l'ATP sulfurilasa per produir ATP proporcionalment al PPi alliberat.
- Aquest ATP aporta l'energia necessària perquè la luciferasa oxidi la luciferina a oxiluciferina, cosa que genera llum visible d'una intensitat proporcional a la quantitat d'ATP (proporcional al nombre de nt incorporats en cada cicle). Els dNTPs no incorporats i l'ATP no utilitzat són degradats per l'apirasa.
- Aquesta senyal lumínica es transmet a través d'una segona placa de fibra òptica (que està en contacte amb el fons dels pouets) a una càmera formada per un dispositiu de càrrega acoblada (CCD) integrada en la plataforma, que la registra. A cada flux d'un dNTP s'agafa una imatge dels pouets, se n'analitza el soroll de fons i es filtra d'acord amb els criteris de qualitat interns de “software” de l'instrument.

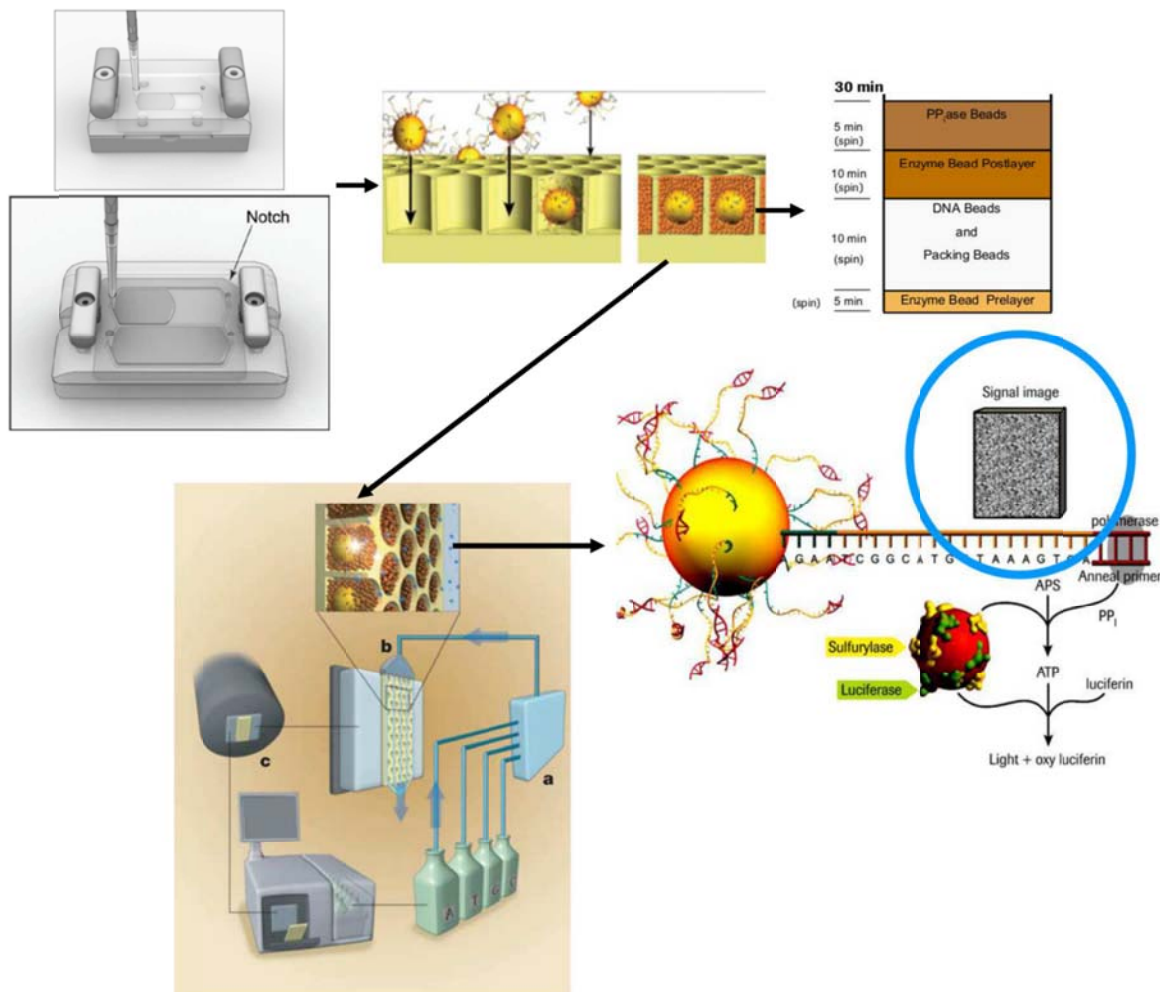


Figura 30: Esquema del procediment de seqüenciació de les plataformes GS-FLX+ i GS-Junior. A la part superior de la figura es pot observar la càrrega de les “beads” en capes dins els pouets de la placa “PicoTiter”, i la disposició de les capes dins de cada un d’aquests pouets. A la part inferior es poden veure els principals subsistemes de les plataformes GS-FLX i GS-Junior: (a) Subsistema de fluidica que dispensa els reactius, connectat a un subministre de cada un dels quatre desoxinucleòtids trifosfat (dNTPs). (b) Cambra de flux on es col·loca la placa “PicoTiter” per ser sotmesa a fluxos iteratius dels dNTPs del dispensador de fluids. Ampliat en aquesta imatge es pot veure les “beads” en cada pouet i la generació de quimioluminescència en un d’ells i a la dreta, la reacció enzimàtica acoblada per la que es produeix. (c) Subsistema òptic format per una càmera formada per un dispositiu de càrrega acoblada (CCD) que capta una imatge de la placa després de cada flux d’un dNTP. Modificat de (473) i de figures proporcionades pel fabricant (Roche, 454 Life Sciences, Branford, USA).

Anàlisi de les imatges obtingudes: Cada experiment d’UDPS (i de qualsevol tecnologia de NGS en general), genera un gran volum de dades que requereixen un complex processament bioinformàtic. Les plataformes GS-FLX+ i GS-Junior disposen d’un “software” que els permet combinar la intensitat de senyal i la informació posicional de cada imatge generada després de cada flux de dNTPs en la PTP. Això permet convertir aquestes dades en “reads”, un procés conegut com a assignació de base o “base calling”: En primer lloc, s’identifica la sèrie d’imatges generades en cada pouet de la PTP. Els paràmetres de cada imatge com la intensitat del senyal, el soroll de fons, etc. s’analitzen pel “software” de la plataforma de seqüenciació, que aplica una sèrie de passos de normalització, correcció i filtratge del senyal obtingut i

Així mateix, els les virtuts i febleses dels algorismes utilitzats en cada estudi s'han comentat a la discussió a l'apartat 5.1.2.2. Filtratge i correcció d'errors en "Ultra-deep Pyrosequencing".

2.4. EPIDEMIOLOGIA I IMPLICACIONS CLÍNiques DE LA INFECCIÓ PER VHB:

2.4.1. Epidemiologia:

S'estima que a tot el món 2000 milions de persones presenten evidències d'haver estat en contacte en el passat o el present amb el VHB, i 240 milions són portadors crònics del HBsAg, el seu principal marcador serològic (475). La prevalença de HBsAg segons l'edat varia molt segons la regió geogràfica (figura 32): en general, les prevalences més elevades (>5% de la població) es donen a l'Àfrica central i subsahariana, l'est d'Àsia, parts de la regió dels Balcans, illes de l'oceà Pacífic i a la conca de l'Amazones a Sud-Amèrica. Per contra les prevalences més baixes (<2% de la població) es donen en regions tropicals i del centre de l'Amèrica llatina, Amèrica del nord i Europa de l'oest (475). Les rutes de transmissió del VHB varien entre aquestes les zones del món amb diferents prevalences. En les zones amb més elevada prevalença, la transmissió perinatal és la principal ruta de transmissió i un factor important en el manteniment del reservori de la infecció, particularment a la Xina i el sud-est asiàtic. En les àrees d'alta prevalença també és important la transmissió horitzontal dins la mateixa família o d'infant a infant. En canvi, en àrees de baixa prevalença com Europa, la infecció es dona principalment per exposició percutània o de mucoses a sang o altres fluids corporals infectats, per exemple per contacte sexual, inoculació accidental durant procediments mèdics o quirúrgics, ús de xeringues no esterilitzades adequadament (sobretot en addictes a drogues inoculades per via parenteral), etc. (476,477)

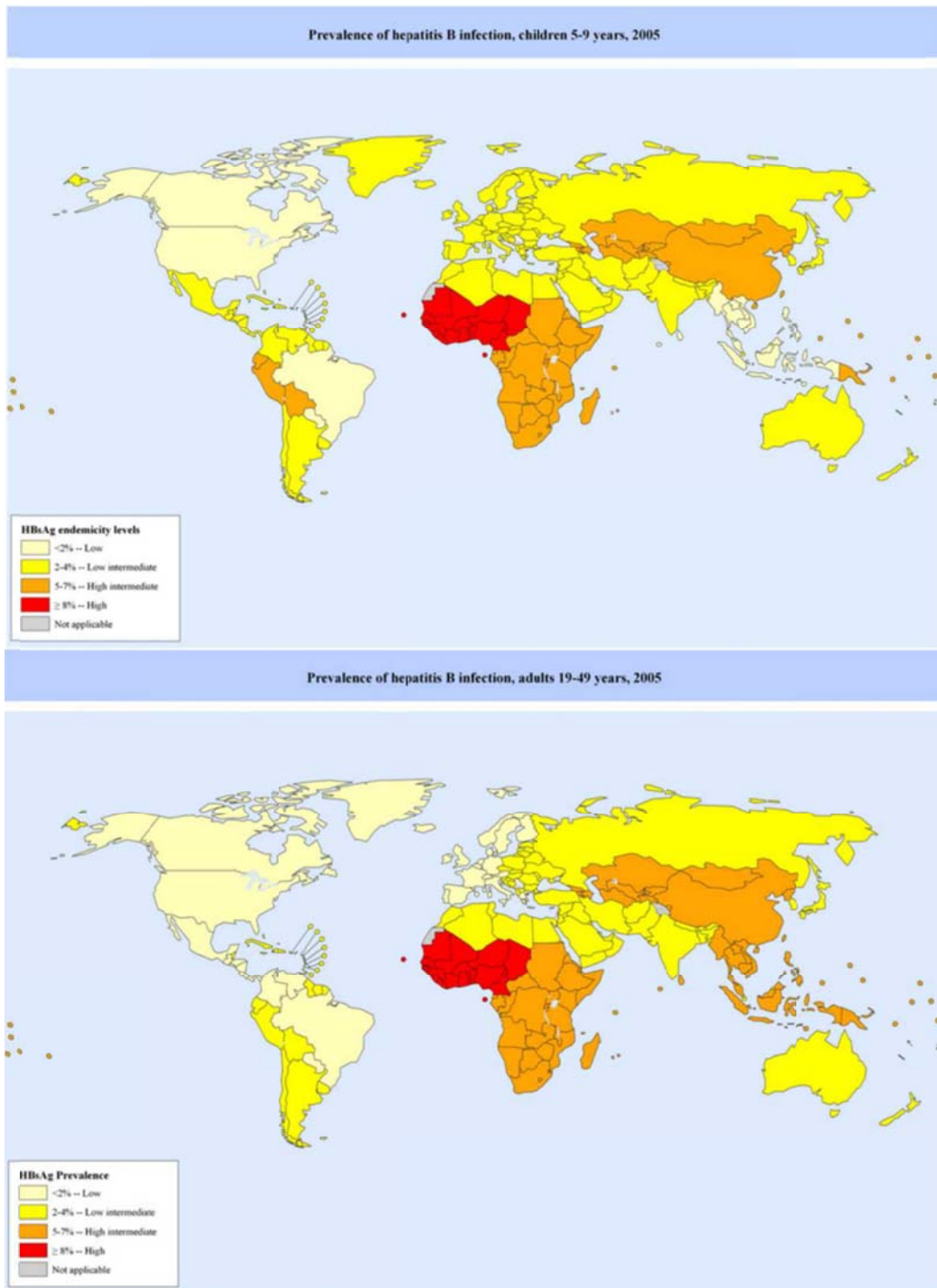


Figura 32: Distribució geogràfica de la infecció per virus de la hepatitis B (VHB) a nivell global actualitzat a 2005. El mapa superior correspon a la infecció per VHB en infants i l'inferior a adults. En els dos mapes, les zones amb una prevalència baixa (<2% de la població) de detecció de l'antigen de superfície del VHB (HBsAg) estan acolorides en groc pàl·lid, mentre que les que presenten una prevalença baixa-mitja (2-4%) estan acolorides en groc intens, les de prevalença alta-mitja (5-7%) en taronja i les d'alta prevalença (≥8%) en vermell. Extret de (475).

Avui en dia es disposa d'una vacuna segura i eficaç contra el VHB, molts països del món l'administren en recent nascuts o durant la primera infància (478). Aquesta estratègia ha permès reduir la incidència i la prevalença de la hepatitis B en moltes àrees endèmiques en les passades

dècades (475,479). En el cas d'Espanya, la introducció de la vacunació contra el VHB en el sistema nacional de salut a la dècada de 1990 ha disminuït notablement la incidència de l'hepatitis B. En un estudi realitzat a Catalunya es va observar que la prevalença d'anti-HBc i HBsAg ha baixat del 15,6 i 1,5% respectivament el 1989 al 8,7 y 0,7% al 2002 (480).

2.4.2. Patogenicitat:

El 2010 es va estimar que a nivell global la mortalitat total per hepatitis B va ser 786.000 persones (481). El VHB pot donar lloc a infeccions agudes o cròniques, que poden anar des de asimptomàtiques o lleus a tenir conseqüències severes o (rarament) fulminants:

- Les hepatitis B agudes normalment són patologies auto limitades en més del 95% dels adults immunocompetents (482), i es caracteritzen per una inflamació hepàtica aguda i necrosi hepatocel·lular. Són fatals entre el 0,5 i l'1% dels casos (483).
- L'HBC és una infecció per VHB persistent, definida per la persistència del seu HBsAg en sang o sèrum de pacients durant més de sis mesos, amb o sense replicació viral activa i senyals de dany hepatocel·lular i inflamació (484). L'edat és un factor clau a la hora de definir el risc de contraure una infecció crònica: la cronificació de la infecció per VHB és comuna en nounats (95% dels casos) i en infants entre un i cinc anys (20-30% dels casos). En canvi la cronificació és rara quan la infecció es contrau en edat adulta (<5% dels casos) (482). Per aquest motiu, la majoria de pacients amb HBC van contraure la infecció en néixer o durant la primera infància.

La patologia causada per la HBC abasta un espectre molt ampli: en alguns pacients és una malaltia inactiva que no dona lloc a patologies hepàtiques significatives. En altres pacients, en canvi, pot donar lloc a fibrosi hepàtica progressiva, que pot acabar donant lloc a cirrosi i malaltia hepàtica en etapa terminal (ESLD). A més la HBC incrementa en gran mesura el risc de patir HCC, independentment de la presència de cirrosi, habitualment molts anys després de la infecció inicial (485). Els estudis longitudinals en pacients amb HBC que no reben tractament antiviral indiquen que, cinc anys després del diagnòstic: el risc acumulatiu de contraure cirrosi és entre un 8% i un 20%, en pacients amb cirrosi compensada la incidència acumulativa de descompensació hepàtica és aproximadament un 20%, i els pacients amb cirrosi descompensada tenen una supervivència baixa (entre el 14% i el 35%) (486–491). La incidència anual de HCC per infecció crònica per VHB és elevada i va del 2% al 5% en pacients amb cirrosi prèvia. No obstant aquesta incidència varia geogràficament, així és més elevada en àrees endèmiques (taxa acumulativa als cinc anys del 15%) que en països de l'oest amb baixa prevalença de la infecció (taxa acumulativa al cinc anys del 10%) (492). La taxa de progressió de la malaltia hepàtica a

cirrosi i hepatocarcinoma pot augmentar per coinfeccions amb altres virus com, virus de la hepatitis C (VHC), VHD i VIH o també per factors de l'hoste com el consum d'alcohol i obesitat (484). La infecció per VHB dona lloc a entre al 5% i el 10% dels trasplantaments hepàtics (485,486,493).

2.4.3. Història natural de la hepatitis B crònica:

La infecció crònica per VHB és un procés dinàmic que pot ser dividit en cinc fases diferents que no succeeixen necessàriament de manera seqüencial.

Fase de tolerància immune: Aquesta fase es caracteritza per la positivitat de HBeAg, nivells de replicació viral alts [títols sèrics d'ADN-VHB (càrrega viral) elevats], nivells normals o baixos d'ALT, necroinflamació hepàtica lleu o inexistent i progressió de la fibrosi lenta o absent (485,487,489). Aquesta fase és més freqüent i prolongada en individus amb infecció perinatal i durant aquesta, la taxa de pèrdua espontània del HBeAg és baixa. A causa dels seus elevats títols sèrics d'ADN-VHB aquests pacients són molt contagiosos.

Fase d'activitat immune: En aquesta fase el HBeAg continua sent positiu, però la càrrega viral és més baixa que en la fase de tolerància immune i els valors d'ALT més elevats o fluctuants. La fibrosi també progressa més ràpidament que en la fase de tolerància immune (485,487–489). Aquesta fase succeeix en paral·lel a la maduració de la immunitat contra el VHB, per tant pot tenir lloc després de varis anys de tolerància immune i s'assoleix de manera més freqüent i amb més rapidesa en pacients infectats en edat adulta. L'activitat immune pot durar des de varies setmanes a varis anys i aquesta activitat potencia la taxa de pèrdua espontània de HBeAg, de manera que la fase d'activitat immune finalitza amb la seroconversió de HBeAg als seus anticossos específics, anti-HBe.

Fase de portador inactiu: Després de la seroconversió a anti-HBe durant la fase d'activitat immune l'HBe pot evolucionar cap a dos estats o fases diferents: portador inactiu i HBeAg negativa. La fase de portador inactiu es caracteritza per títols sèrics d'ADN-VHB molt baixos o inclús indetectables i nivells normals d'ALT. L'entrada de la infecció crònica en aquesta fase es confirma amb un seguiment de com a mínim un any, amb nivells d'ALT persistentment normals i d'ADN-VHB < 2000 unitats internacionals per mL (UI/mL) determinats cada 3-4 mesos. En alguns casos, alguns portadors inactius poden tenir nivells d'ADN-VHB entre 2000 i 20.000 UI/mL (484,494–496). Durant aquesta fase hi ha un control de la infecció per VHB per part del sistema immunitari, per tant l'estat de portador inactiu confereix un bon

pronòstic de la infecció a llarg termini, amb un risc molt baix de desenvolupar cirrosi o HCC en la majoria de pacients (497). En aquesta fase es pot arribar a perdre el HBsAg i assolir la seroconversió als seus anticossos específics anti-HBs espontàniament entre l'1% i el 3% dels casos anualment, normalment després de varis anys d'ADN-VHB persistentment indetectable (497). Els pacients en fase de portador inactiu també poden progressar a l'altra fase de l'HBC després de seroconvertir a anti-HBe, la fase HBeAg negativa (498).

Fase d'hepatitis crònica HBeAg negativa: Aquesta fase representa una fase d'activitat immune més tardana de la infecció crònica per VHB. Aquesta etapa de la HBC es caracteritza per reactivacions periòdiques amb patrons de nivells d'ADN-VHB i ALT fluctuants i hepatitis activa: s'observen episodis d'exacerbacions amb un augment dels valors d'ALT precedits per una elevació de la càrrega viral, que es segueixen de períodes de remissió de duració variable, en els que els valors d'ADN-VHB poden ser <2000 UI/mL i els d'ALT normals (499). Durant els períodes d'exacerbació hi ha una progressió de la fibrosi hepàtica (499). En aquests pacients es solen detectar partícules virals amb substitucions de nt a la regió PC o al BCP del promotor PC/Core, per això no expressen HBeAg o ho fan a nivells molt baixos (488,500) [veure 2.3.3.1. Variants genètiques de l'ORF PC/Core i el promotor bàsic del core (BCP)]. Les característiques d'aquests pacients fan que a vegades sigui difícil distingir-los dels que estan en fase de portador inactiu, però la distinció entre aquestes dues fases de l'HBC és important, ja que mentre els pacients en fase de portadors inactius tenen baix risc d'experimentar complicacions, els pacients amb HBC HBeAg negativa tenen una malaltia hepàtica activa que pot donar lloc a posteriors complicacions, com cirrosi descompensada i HCC. Per aquest motiu és important fer el seguiment descrit a l'apartat anterior (Fase de portador inactiu). Aquesta forma de la HBC és la més freqüent a Espanya (499).

Fase de remissió: Aquesta fase es defineix per la pèrdua del HBsAg amb o sense seroconversió a anti-HBs. També es caracteritza per valors normals d'ALT i càrregues virals indetectables o baixes. Tot i això, poden persistir nivells detectables d'ADN-VHB al fetge. Aquesta situació de la infecció per VHB es coneix com infecció "oculta" i la seva rellevància clínica encara no està clara (501). La pèrdua de HBsAg abans de desenvolupar cirrosi s'associa a una millora del pronòstic, amb risc reduït de progressió de la malaltia hepàtica a cirrosi, descompensació i HCC, tot i que si els pacients desenvolupen abans cirrosi encara estaran en risc de progressar a HCC (502). En aquests pacients la immunosupressió pot donar lloc a la reactivació de la replicació viral (503).

2.5. TRACTAMENTS CONTRA LA HEPATITIS B:

Com s'ha vist a l'apartat 2.4.2. Patogenicitat, el VHB dona lloc a dos tipus d'infeccions, agudes o cròniques. En el cas de les infeccions agudes, com que normalment són patologies auto-limitades no hi ha un tractament específic. Es tracten els símptomes derivats d'aquesta malaltia hepàtica per tal de mantenir el confort i un balanç nutricional adequat dels pacients, com per exemple reemplaçar els fluids perduts per vòmits i diarees (1).

L'HBC és una infecció persistent i existeixen fàrmacs per tractar-la. L'objectiu del tractament contra l'HBC és evitar o reduir la progressió de la malaltia hepàtica a cirrosi, ESLD i HCC, amb la finalitat de reduir la mortalitat per causa hepàtica i millorar la qualitat de vida dels pacients (484). Aquests objectius són a llarg termini, ja que habitualment la progressió de la malaltia hepàtica és lenta i pot tardar varis anys a donar lloc aquestes complicacions (485). Així doncs, per tal de valorar l'eficàcia del tractament cal fixar objectius a més curt termini que assegurin l'aturada de la progressió de la malaltia hepàtica. Varis estudis han demostrat que el risc de progressió de la malaltia hepàtica es redueix per mitjà de la supressió la replicació del VHB de manera sostinguda [el que es denomina resposta virològica sostinguda (RVS)], que produeix una reducció de l'activitat histològica de la HBC i disminueix el risc de HCC, sobretot en pacients no cirròtics (504,505). La RVS també augmenta les probabilitats d'aclariment del HBsAg i per tant d'entrar en la fase de remissió de la HBC, que és l'objectiu ideal del tractament antiviral perquè s'associa a un bon pronòstic de la malaltia hepàtica a llarg termini (veure 2.4.3. Història natural de la hepatitis B crònica). Tot i això, la pèrdua del HBsAg és infreqüent amb els tractaments antivirals actuals (412,506,507). A més, inclús si aquesta arriba a tenir lloc el VHB no pot ser completament eradicat degut a la presència del cccADN en el nucli dels hepatòcits infectats, que els tractaments antivirals no eliminen o eliminen amb una taxa molt baixa (506,508,509) (figura 33), cosa que pot explicar les reactivacions de la replicació que tenen lloc inclús en la fase de remissió (501,503). Així i tot, recentment s'ha observat en models "in vitro" que l'IFN α (utilitzat com a tractament antiviral contra la HBC com s'explicarà a continuació) pot induir la degradació específica del cccADN de les cèl·lules en cultiu sense efectes hepatotòxics (510).

Donada la baixa freqüència amb la que es perd el HBsAg durant el tractament antiviral, les guies clíniques pel tractament de la HBC recomanen altres objectius més realistes que també poden millorar el pronòstic de la HBC a llarg termini. Per exemple, l'associació europea per l'estudi del fetge (EASL) recomana com a objectius del tractament, a més de la pèrdua del HBsAg, la inducció de RVS amb normalització dels nivells d'ALT (resposta bioquímica) després de retirar el tractament antiviral en pacients amb HBeAg negatiu (tant si ho eren des del

principi del tractament com si l'han seroconvertit de manera sostinguda durant aquest), o amb tractament antiviral a llarg termini en pacients amb HBeAg positiu que no assoleixen seroconversió a anti-HBe i en pacients amb HBeAg negatiu (484). En qualsevol cas, la RVS s'avalua a través del manteniment dels nivells indetectables d'ADN-VHB, mesurats per tècniques de PCR a temps real el més sensibles possible (484).

Hi ha dos grans estratègies per tractar la HBC:

Augmentar la pressió del sistema immunitari sobre la infecció: aquesta és l'estratègia en la que es basen les formulacions d'interferó injectables, l'interferó α estàndard o IFN α i el pegilat (PEG-IFN α), unes citocines amb activitat antiviral (dèbil) i immunomoduladora (429,511): inhibeixen la replicació viral i promouen l'eliminació d'hepatòcits infectats per part del sistema immunitari (figura 33). IFN α va ser el primer tractament disponible contra la HBC a principis de la dècada de 1990. Tanmateix avui en dia ha estat reemplaçat majoritàriament pel PEG-IFN α , que es va començar a utilitzar a mitjans de la dècada del 2000 (511,512).

El tractament amb PEG-IFN α és un opció de tractament atractiva perquè és la que pot assolir taxes més elevades de control immunitari de la infecció després de retirar el tractament, inclús d'aclariment del HBsAg: En un estudi amb pacients HBeAg positius tractats amb PEG-IFN α 2a en monoteràpia, combinat amb LAM i LAM en monoteràpia, es va assolir un control immunitari sostingut de la infecció en els dos primers grups, amb una taxa de seroconversió del HBeAg sis mesos després de parar el tractament del 32% i el 27% respectivament, mentre que en els tractats amb LAM en monoteràpia la taxa va ser del 19% (513). En pacients amb HBeAg negatiu també es van obtenir bons resultats amb PEG-IFN α 2a amb un 31% dels pacients amb nivells d'ADN-VHB < 2000 UI/mL (el nivell per sota del qual es considera que estan en fase de portador inactiu) i un 28% va aconseguir l'aclariment del HBsAg cinc anys després del tractament (514). A aquesta eficàcia relativament elevada es suma el fet que són tractaments amb una durada finita en el temps i que no presenten problemes de resistència a la seva acció per part del VHB, ja que la seva activitat principal és sobre el sistema immunitari (484) (figura 33). Tanmateix, PEG-IFN α només és efectiu en una minoria de pacients (20-30%) (511). Per altra banda la seva via d'administració injectable resulta incòmoda pels pacients i sol donar lloc a efectes secundaris: per exemple amb PEG-IFN α 2b s'han descrit entre altres, símptomes generals, fatiga, neutropènia, trombocitopènia i depressió (515). A més està contraindicat en alguns grups de pacients com els pacients amb cirrosi descompensada, malalties auto-immunes, pacients amb depressió severa i psicosis, pacients en teràpia immunosupressora o quimioteràpia i en dones embarassades (484). Degut a tots els inconvenients que presenta el tractament amb PEG-IFN α , avui en dia és poc utilitzat en el tractament contra la HBC en front d'altres opcions

més ben tolerades. Així, per exemple, l'ús d'interferons no representa més del 10% de totes les prescripcions pel tractament de HBC als Estats Units (516).

Reduir la càrrega viral: aquesta és l'estratègia en la que es basen els tractaments de la família dels anàlegs de nucleòtids o nucleòsids o NUCs, els quals inhibeixen la transcripció reversa del pgARN a rcADN actuant directament sobre la polimerasa viral, per tant són uns tractaments antivirals d'acció directa (429,511) (figura 33). Aquests tractaments tenen un efecte antiviral potent i en general són ben tolerats i no tenen contraindicacions com els interferons. A més la seva via d'administració és oral, molt més còmoda pel pacient que només ha de prendre un comprimit al dia (484,511). Per aquests motius actualment els NUCs són l'opció de tractament contra l'HBC més àmpliament utilitzada.

En inhibir el pas de pgARN a rcADN els NUCs impedeixen la formació de partícules virals, però no eviten la formació del cccADN (300,301). Això fa que l'aclariment del cccADN durant el tractament amb NUCs succeeixi de manera lenta i per tant pot persistir durant dècades en el nucli dels hepatòcits infectats (506,517). A causa d'això hi ha una alta probabilitat de reactivació de la replicació viral en retirar el tractament i en la majoria de pacients s'han d'administrar durant un període de temps llarg, potencialment tota la seva vida, per mantenir la RVS. Actualment, només es recomana finalitzar el tractament amb NUCs en pacients amb HBeAg positiu que han seroconvertit a anti-HBe durant el tractament després d'avaluar la seva evolució durant al menys un any (484). El tractament a llarg termini amb NUCs té desavantatges associats, per una banda encara es desconeixen els seus efectes acumulatius sobre la salut dels pacients (484) i per altra, en actuar directament sobre el VHB, pot causar la selecció a la quasiespècies del VHB de variants genètiques resistents a la seva acció (430,484). Com s'ha comentat en l'apartat anterior, tot i l'efecte inhibitori dels NUCs sobre la replicació viral, aquests en general tenen taxes de serconversió del HBeAg i HBsAg més baixes que els interferons.

Actualment hi ha cinc tractaments de la família dels NUCs aprovats contra l'HBC, caracteritzats per diferents potències antivirals i patrons de resistència a la seva acció: LAM va ser el primer anàleg de nucleòsid aprovat pel tractament contra l'HBC a finals de la dècada de 1990 i al llarg de la dècada del 2000 van ser aprovats dos anàlegs de nucleòsids més, telbivudina (LdT) i entecavir (ETV) i dos anàlegs de nucleòtid, adefovir (ADV) i tenofovir (TDF) (511).

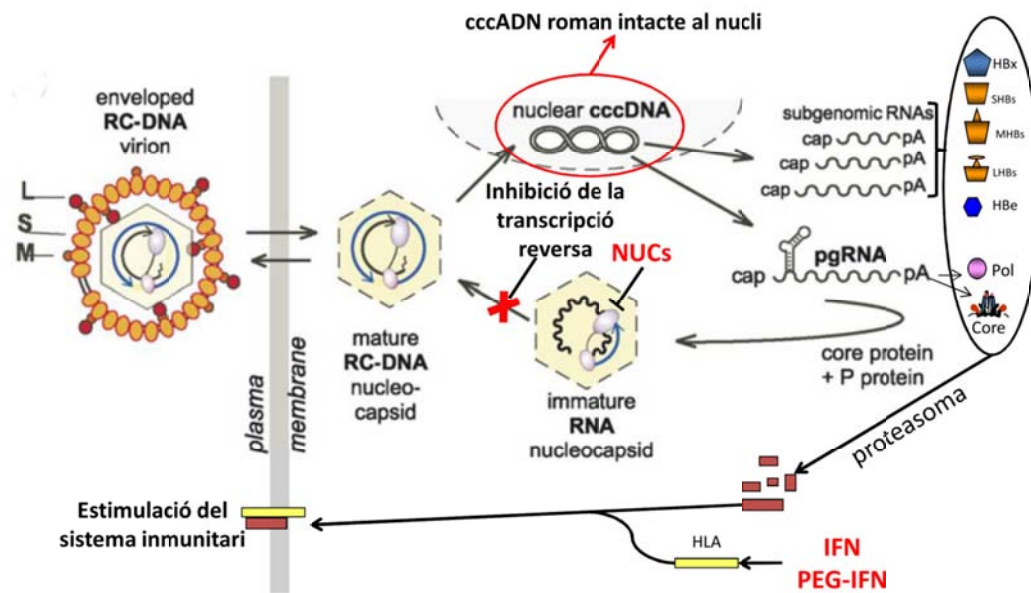


Figura 33: Mecanismes d'acció dels dos grups principals de tractaments antivirals contra la hepatitis B crònica. Mentre que els interferons (IFN i PEG-IFN) actuen principalment estímulant el sistema immunitari de l'hoste, els anàlegs de nucleòsids i nucleòtids (NUCs), actuen directament sobre el virus inhibint-ne la transcripció reversa. Per aquest motiu el VHB desenvolupa resistències contra els NUCs però no contra els interferons. Modificat de (17).

2.5.1. Resistència al tractament antiviral amb anàlegs de nucleòsids i nucleòtids (NUCs):

La resistència al tractament antiviral es defineix com la susceptibilitat reduïda d'un virus a l'efecte inhibitori d'un fàrmac, i té lloc per un procés de selecció de variants amb mutacions adaptatives a la pressió selectiva exercida pel tractament antiviral (459). Els motius de la susceptibilitat reduïda d'aquestes variants al tractament antiviral s'han comentat breument a 2.3.3.2. Variants genètiques de l'ORF P. La selecció d'aquestes variants impedeix assolir o mantenir la RVS amb el tractament amb NUCs. Tanmateix aquests fàrmacs poden fallar en la seva funció per altres causes, que cal distingir de la selecció de variants resistents al tractament. Així l'EASL defineix diferents tipus de fallada del tractament amb NUCs (484):

- La no resposta primària es defineix com la baixada dels títols sèrics d'ADN-VHB inferior a 10 vegades des dels nivells basals (un logaritme de UI/mL) durant els tres primers mesos de tractament. Aquest tipus de resposta sol associar-se a la falta d'adherència al tractament antiviral per part del pacient o a la baixa activitat del fàrmac administrat més que a la selecció de variants amb resistències al tractament antiviral. Per exemple amb ADV aquest tipus de resposta es dona en un 10-20% dels casos, probablement degut a les baixes dosis a les que s'administra [10 mil·ligrams (mg)/dia] per evitar la seva nefrotoxicitat (512,518).
- La resposta virològica parcial es defineix com a nivells sèrics d'ADN-VHB detectables sis mesos després d'iniciar el tractament antiviral (mesurats per tècniques de PCR a temps real el més sensibles possible) tot i la baixada dels nivells d'ADN-VHB superior a un logaritme

d'UI/mL. Aquest fenomen és residual en pacients que no han rebut cap tractament de la família dels NUCs prèviament (pacients naïve). No obstant, en pacients que sí que han rebut tractament previ i han seleccionat variants resistents contra aquest, l'eficàcia d'altres tractaments de la família dels NUCs pot veure's compromesa degut al fenomen de les resistències creuades, és a dir, la selecció de variants resistents a un determinat tractament encara que la quasiespècie del VHB no hagi estat exposada abans a ell (veure 2.5.1.4. Resistències creuades). Aquest fenomen pot afectar fins i tot als tractaments de primera línia més potents (519).

- El rebot virològic o “viral breakthrough” (VBK) es defineix com un augment dels nivells d'ADN-VHB ≥ 1 logaritme de UI/mL comparat amb el valor més baix assolit durant el tractament antiviral (Nadir). En aquest cas, els principals causants d'aquest tipus de no resposta al tractament antiviral poden ser la manca d'adherència al tractament antiviral per part del pacient i/o la selecció de variants resistents al tractament antiviral.

En les variants resistents al tractament antiviral s'han identificat dos tipus de mutacions o canvis d'aa (459): les mutacions de resistència primàries són directament responsables de la resistència al tractament antiviral. Les variants amb aquestes mutacions en presència de NUCs són capaces de replicar-se millor que la “wild-type”, però sovint ho fan amb una eficiència més baixa que aquesta en absència de tractament (117,520–522). No obstant, la selecció de mutacions secundàries o compensatòries pot compensar la pèrdua d'activitat replicativa de les variants amb canvis d'aa que provoquen la resistència primària a un tractament. Per tant aquestes variants donaran lloc a càrregues virals del VHB més elevades i tindran encara menys sensibilitat pel tractament antiviral que s'estigui administrant, a més poden donar lloc a exacerbacions de la malaltia hepàtica (523–527). Cal tenir en compte que la selecció d'aquestes mutacions té lloc al domini RT de l'ORF P, la diana terapèutica dels NUCs, que esta solapat a la regió S de l'ORF S. Per tant com a conseqüència de la selecció al domini RT de variants relacionades amb la resistència a NUCs també es poden seleccionar variants amb canvis d'aa a la regió S, tal com s'ha comentat a 2.3.3.3. Variants genètiques de l'ORF S.

El fenomen de la resistència a NUCs és essencialment depenent de l'estructura química d'aquests fàrmacs. Els cinc de la família dels NUCs es poden agrupar en tres grups estructurals principals (430,528), tal com mostra la figura 34.

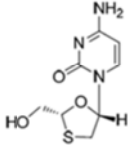
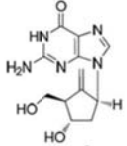
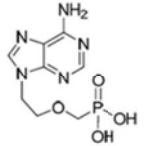
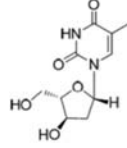
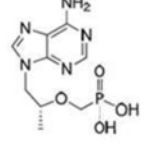
L-Nucleòsids	D-Ciclopentà	Fosfonats acíclics (Anàlegs de nucleòtids)
 <p>Zeffix, Heptovir, Epivir, and Epivir-HBV</p> <p>LAM (aprovada el 1998)</p>	 <p>Baraclude</p> <p>ETV (aprovat el 2005)</p>	 <p>Preveon and Hepsera</p> <p>ADV (aprovat el 2002)</p>
 <p>Sebivo (Europe) Tyzeka (US)</p> <p>LdT (aprovada el 2006)</p>		 <p>Viread</p> <p>TDF (aprovat el 2008)</p>

Figura 34: Tractaments anàlegs de nucleòsids o nucleòtids agrupats segons la seva estructura química (430,528). La figura inclou l'any d'aprovació de cada un d'ells pel tractament de la HBC i els seus diferents noms comercials. LAM=lamivudina, LdT=telbivudina, ETV=entecavir, ADV=adefovir, TDF=tenofovir.

Aquests grups marquen els perfils de mutacions de resistència primàries i compensatòries que disminueixen la sensibilitat al tractament antiviral, com es veurà en els apartats que venen a continuació. També marquen la probabilitat de seleccionar variants resistents a un determinat NUC, que està relacionada tant amb el tipus com amb el nombre de cavis d'aa que s'haurien d'acumular en les variants per ser-hi resistents. Aquesta probabilitat s'anomena barrera genètica (figura 35).

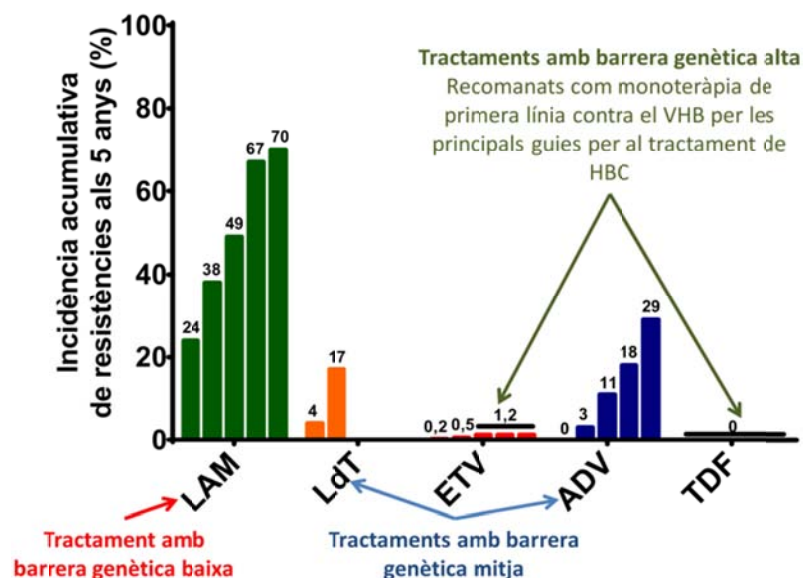


Figura 35: Barrera genètica dels tractaments anàlegs de nucleòsids o nucleòtids. Lamivudina (LAM) té una elevada probabilitat de seleccionar variants resistents al llarg de cinc anys de seguiment en tenir una barrera genètica baixa. Telbivudina (LdT) i adefovir (ADV), tenen probabilitats mitjanes i entecavir (ETV) i tenofovir (TDF) tenen probabilitats molt baixes o nul·les de seleccionar variants amb resistència a la seva acció, per això són els tractaments recomanats com a monoteràpia de primera línia contra l'hepatitis B crònica (HBC). Modificat de (484).

2.5.1.1. Resistències a L-Nucleòsids:

Els tractaments del grup dels L-Nucleòsids són LAM i LdT. Avui en dia aquests tractaments no es recomanen com a tractament de primera línia contra la HBC degut a la seva barrera genètica baixa-mitja (484) (figura 35). Tanmateix, LAM va ser el primer tractament de la família dels NUCs utilitzat contra la HBC (figura 34) i molts pacients han estat tractats amb aquest fàrmac, amb la qual cosa augmenta la possibilitat que experimentin resposta virològica parcial o VBK a tractaments antivirals amb una barrera genètica més alta, com per exemple ETV (529), aquest fenomen serà comentat a l'apartat 2.5.1.4. Resistències creuades. A més, pel seu baix cost econòmic encara s'utilitza en algunes regions del món (530). Estudis clínics han demostrat que un any de tractament amb 100 mg/dia de LAM s'associa a una taxa de seroconversió del HBeAg entre el 15-20% al cap d'un any i augmenta fins al 50% al cap de cinc (531). En pacients HBeAg positiu LAM aconsegueix taxes de supressió de la replicació viral (ADN-VHB<300 còpies/mL, aproximadament 50 UI/mL) entre del 40-36% mentre que amb HBeAg negatiu, aconsegueix taxes del 65-70% (532). Per la seva banda LdT a una dosi de 600 mg/dia ha mostrat una taxa de seroconversió del HBeAg del 22% al cap d'un any de tractament que augmenta al 30% al cap de 2. Per altra banda al cap d'un any de tractament LdT mostra uns nivells de supressió de la replicació viral del 60% en pacients HBeAg positius i del 88% en pacients HBeAg negatius (533,534). Així doncs LdT és més potent que LAM.

En quant a la resistència antiviral, les dos principals mutacions associades a la resistència primària a LAM són rtM204V/I del motiu YMDD situat en el domini funcional C del domini RT de la polimerasa viral (veure 2.1.2.1.2. ORF P i la polimerasa) (figura 36). Cal tenir en compte que la numeració d'aquesta posició no és la que li correspon dins la seqüència d'aa de la polimerasa viral. Per referir de manera inequívoca les mutacions associades a resistència als NUCs s'ha assumit una numeració per convenció de les posicions del domini RT (105), tal com s'explica a 2.1.2.1.2. ORF P i la polimerasa. LAM s'uneix a una estructura en forma de butxaca a la superfície de la polimerasa (regió del palmell) de la qual forma part la posició rt204 (108). S'ha predit que les mutacions rtM204V/I redueixen l'àrea de la superfície accessible entre la polimerasa i LAM cosa que causa un impediment estèric per disminuir la unió de LAM a la polimerasa i la reducció de l'activitat catalítica per incorporar la forma trifosfat de LAM a la nova cadena d'ADN viral (103,108,535). Per altra banda la mutació rtL180M en el domini funcional B (figura 36), que es troba sobretot en combinació amb rtM204V (536), restaura la capacitat replicativa de les variants amb alteracions a rtM204 fins a nivells similars a les "wild-type" i augmenta encara més la resistència a LAM. Sembla ser que rtL180M està col·locada

molt a prop de l'espai de rtM204 i pot contribuir a interferir encara més en la unió a LAM (103). A la combinació rtL180M/rtM204V se li poden afegir mutacions compensatòries addicionals com rtV173L i rtL80I/V als dominis funcionals B i A respectivament (figura 36). Aquestes mutacions no augmenten la resistència a LAM però incrementen encara més l'eficiència replicativa de la polimerasa viral (537). Per altra banda, la mutació rtA181T/V al domini funcional B (figura 36), també donen lloc a la resistència primària a LAM (521,538), tot i que amb aquest tractament es seleccionen amb una freqüència molt baixa (438). Les mutacions a rtA181 alteren l'estructura en hèlix α del domini funcional B, cosa que altera el posicionament del substrat respecte la regió catalítica (104). En quant a LdT, com a L-nucleòsid hauria de tenir el mateix perfil de resistències que LAM, però en assaigs clínics només s'ha detectat la mutació rtM204I, possiblement degut a la potència més elevada d'aquest fàrmac (537). Les mutacions rtA181T/V també han estat associades a la resistència primària a LdT (430).

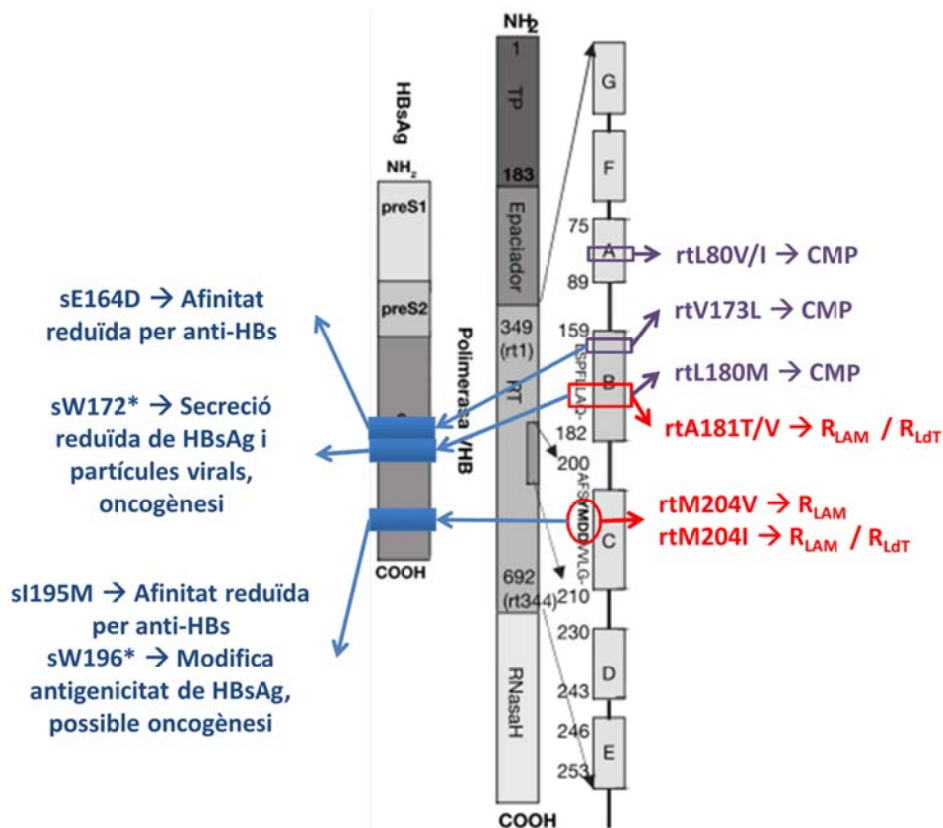


Figura 36: Principals mutacions de resistència als L-nucleòsids juntament amb les mutacions que provoquen a la regió S de la pauta oberta de lectura de superfcie (ORF S), la informació sobre les mutacions de l'ORF S s'ha extret de (430,437,438,440). CMP=Mutació de resistència secundària o compensatòria. Aquestes mutacions no causen resistència al tractament per si soles, però augmenten la capacitat resplicativa i/o la resistència al tractament antiviral en presència de les mutacions de resistència primària. R_{LAM}=Mutació de resistència primària a lamivudina (LAM), R_{LdT}=Mutació de resistència primària a telbivudina (LdT). Els codons stop s'han marcat amb el símbol *. Modificat de (539).

2.5.1.2. Resistències a D-Ciclopentans:

En aquest grup només es troba ETV, un tractament antiviral potent i d'alta barrera genètica que avui en dia és recomanat com a tractament de primera línia contra la HBC per les principals guies clíniques (484) (figura 35). En un estudi d'eficàcia a llarg termini (cinc anys) d'ETV a dosis de 0,5 a 1 mg/dia va mostrar unes taxes de seroconversió del HBeAg relativament baixes (23%) (540), tanmateix és molt eficaç en la supressió de la replicació viral, ja que aconseguix nivells d'ADN-VHB < 300 còpies/mL al cap d'un any de tractament en el 67% dels pacients HBeAg positiu i en el 90% dels pacients HBeAg negatiu (532).

A diferència dels altres NUCs ETV no només inhibeix la transcripció reversa, sinó també l'encebament de la síntesi de la nova cadena i l'elongació de l'ADN (541). Per la resistència a ETV és necessària la preselecció de la combinació resistent a LAM rtL180M+rtM204V, juntament amb mutacions en alguna d'aquestes posicions addicionals: rtT184, rtS202, rtM250 i rtI169 (542) (figura 37). Probablement l'elevada barrera genètica d'ETV es degui a la necessitat d'acumular varies mutacions en una mateixa variant perquè aquesta hi sigui resistent, juntament amb la seva elevada potència per suprimir la replicació viral (537). A pesar d'això, ETV és menys efectiu en pacients que prèviament hagin seleccionat resistències a LAM, ja que poden tenir variants amb la combinació rtL180M+rtM204V, i se'n desaconsella l'ús en aquest grup (529). Les mutacions rtI169T (domini funcional B) i rtM250V (domini funcional E) (figura 37) impacten la regió d'unió a l'encebador ("primer") de la transcriptasa reversa, que interacciona amb l'extrem 3' del motlle d'ADN. Aquestes mutacions poden tenir un efecte sobre l'allargament de la nova cadena d'ADN (537). Per altra banda les mutacions rtT184S/A/I/L/G/C/M (entre els dominis B i C) i rtS202C/G/I (domini C) (figura 37) poden interaccionar i afectar la geometria del centre catalític de l'enzim, entre l'helix α del domini d'unió del motlle d'ADN i la fulla β on es troben els dos aspartats catalítics del domini funcional C (rtD205 i rtD206) (537).

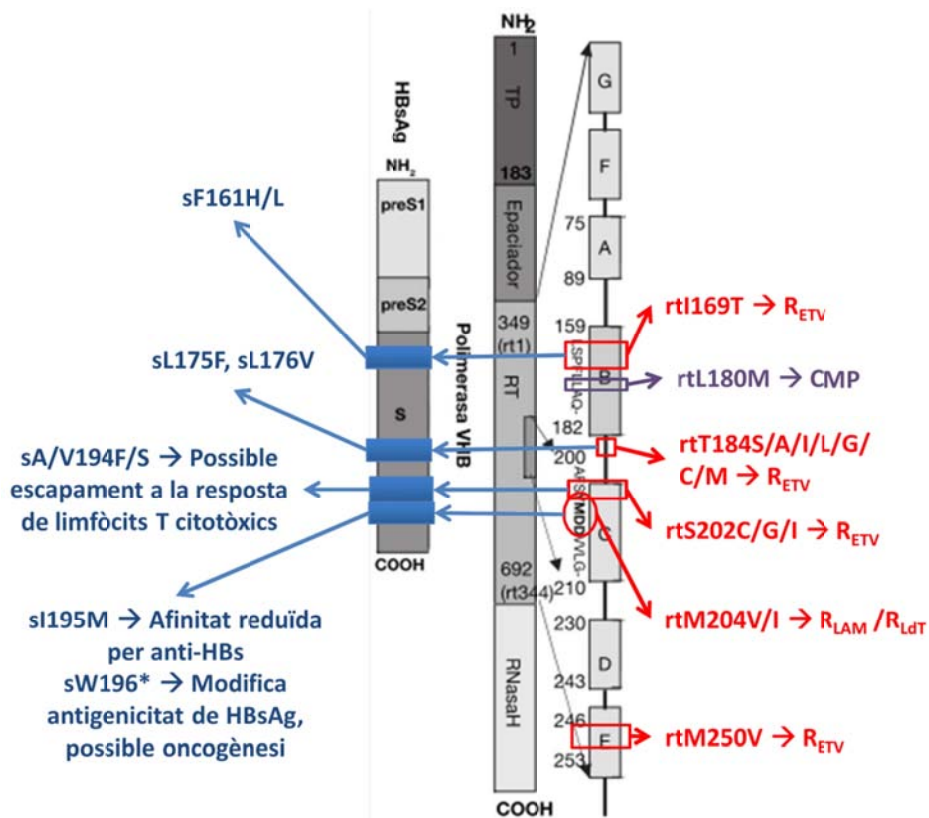


Figura 37: Principals mutacions de resistència als D-ciclopentans juntament amb les mutacions que provoquen a la regió S de la pauta oberta de lectura de superfície (ORF S), la informació sobre les mutacions de l'ORF S s'ha extret de (430,437,440,543). CMP=Mutació de resistència secundària o compensatòria. Aquestes mutacions no causen resistència al tractament per si soles, però augmenten la capacitat resplicativa i/o la resistència al tractament antiviral en presència de les mutacions de resistència primària. R_{LAM}/R_{LdT} =Mutació de resistència primària a lamivudina (LAM) i telbivudina (LdT). R_{ETV} =Mutació de resistència a ETV sempre que vagi acompanyada de la combinació $rtL180M+rtM204V$. Modificat de (539).

2.5.1.3. Resistències a Fosfonats acíclics:

Els tractaments d'aquest grup són ADV i TDF, que a diferència dels L-nucleòsids i D-ciclopentà són anàlegs de nucleòtid i per tant tenen un fosfat α (figura 34). Tot i que es tracta de dues molècules estructuralment molt semblants (figura 34), TDF ha demostrat tenir una barrera genètica molt més elevada que ADV (figura 35) i una potència superior, possiblement perquè pot administrar-se amb seguretat a dosis 30 vegades més elevades que ADV (10 mg/dia ADV en front de 300 mg/dia TDF) (531,537). Així, les dades després d'un any de seguiment de l'estudi de registre de TDF (en el que es compara amb ADV) (544) revelen que les taxes de seroconversió de HBeAg són similars amb els dos tractaments (21% amb TDF i 18% amb ADV), però TDF és molt més potent suprimint la replicació viral: 93% dels pacients HBeAg negatius tractats amb TDF amb nivells d'ADN-VHB < 400 copies/mL (unes 68 UI/mL) al cap d'un any contra 63% dels tractats amb ADV, i en HBeAg positius 76% dels tractats amb TDF amb d'ADN-VHB < 400 copies/mL en el mateix temps mentre que només un 13% dels tractats

amb ADV. Per aquests motius TDF és aconsellat com a tractament de primera línia contra la HBC per les principals guies clíniques, però no ADV (484).

La similitud estructural d'ADV i TDF al substrat natural del que són anàlegs, ATP, juntament amb una unió petita i flexible enloc d'un anell com els L-Nucleòtids o el D-ciclopentà els permeten una accessibilitat més gran a la polimerasa (537). S'associa a la resistència primària a ADV les mutacions rtA181T/V i rtN236T (figura 38). Les implicacions estructurals dels canvis a la posició rtA181 s'han comentat a 2.5.1.1. Resistències a L-Nucleòsids. La posició rtN236 està situada al domini funcional D i pot interaccionar a través d'un pont d'hidrogen amb la posició del domini funcional A rtS85 i a més interacciona directament amb el fosfat γ d'ADV difosfat. La mutació rtN236T pot trencar el pont d'hidrogen entre rtN236 i rtS85 i canvia la forma del lloc d'unió d'ADV difosfat, per tant disminueix l'afinitat per aquest fàrmac (104). Pel que fa a TDF, en el moment d'escriure aquesta memòria no s'ha reportat la selecció de variants resistents durant el tractament amb aquest fàrmac (no hi ha fenòmens de VBK). Tanmateix, estudis "in vitro" han apuntat que la mutació rtA194T podria estar relacionada amb la resistència a TDF (522). Pel que fa a les mutacions associades a la resistència a ADV, tot i que no causen resistència a TDF sí que hi tenen una sensibilitat reduïda i la seva selecció prèvia al tractament antiviral amb TDF podria donar lloc a resposta virològica parcial (545).

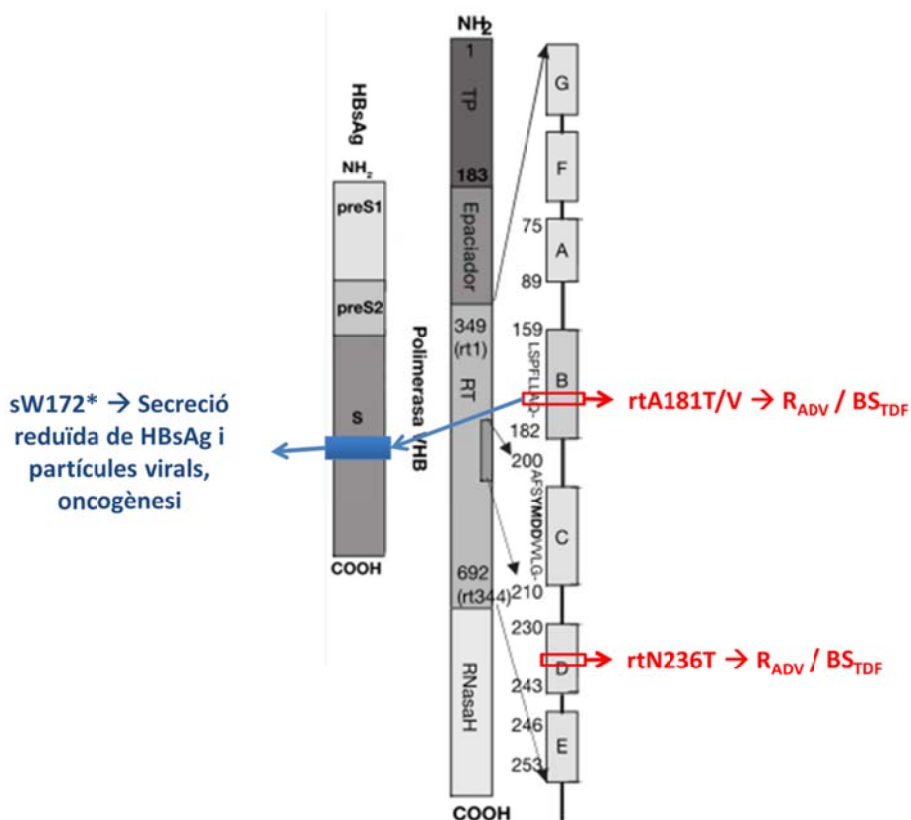


Figura 38: Principals mutacions de resistència als fosfonats acíclics juntament amb les mutacions que provoquen a la regió S de la pauta oberta de lectura de superfcie (ORF S), la informació sobre les

mutacions de l'ORF S s'ha extret de (438,440). R_{ADV}/BS_{TDF} =Mutació de resistència primària a adefovir (ADV) i amb sensibilitat baixa o reduïda a TDF, tot i que el tractament pot seguir suprimint la replicació amb eficàcia reduïda. Els codons stop s'han marcat amb el símbol *. Modificat de (539).

2.5.1.4. Resistències creuades:

Com s'ha anat veient als apartats anteriors, hi ha mutacions associades a la resistència a diferents tractaments de la família dels NUCs, inclús a membres d'aquesta família amb estructures químiques diferents: per exemple, s'ha comentat que la mutació rtM204I dona lloc a la resistència primària als L-Nucleòsids (LAM i LdT) (537) i la mutació rtM204V en combinació amb el seu principal canvi compensatori rtL180M no només dona un grau elevat de resistència a LAM i restaura la capacitat replicativa de les variants resistents a aquest tractament (103) sinó que també és un pre-requisit per desenvolupar resistència a ETV, un D-ciclopentà (542). Per altra banda les mutacions relacionades amb la resistència a ADV rtA181T/V i rtN236T donen lloc a baixa sensibilitat a TDF (545), un fàrmac estructuralment molt similar a ADV, i rtA181T/V també pot causar resistència primària als L-Nucleòsids (430).

La replicació de les variants genètiques amb aquests canvis d'aa durant el tractament amb els NUCs pels que són resistents fa que aquestes infectin noves cèl·lules i s'emmagatzemin en el seu nucli mitjançant el cccADN (546,547). En administrar un nou tractament amb NUCs per recuperar la RVS (tractament de rescat) aquestes variants es poden seleccionar de nou ràpidament si, degut al seu perfil de mutacions de resistència al tractament antiviral, tenen sensibilitat reduïda al tractament de rescat, inclús després que la variant "wild-type" torni a ser la dominant a la quasiespècies. Aquest fenomen pel que una quasiespècies presenta variants resistents a un determinat tractament antiviral encara que no hi hagi estat mai exposada es coneix com a resistència creuada, i complica el tractament dels pacients amb HBC. A la figura 39 es mostra la susceptibilitat pels diferents NUCs de les mutacions de resistència al tractament antiviral comentades als apartats anteriors.

	LAM	LdT	ETV	ADV	TDF
rtL80V/I	CMP	CMP	S	S	S
rtI169T	S*	S*	R**	S	S
rtV173L	CMP	CMP	S	S	S
rtL180M	CMP	CMP	CMP	S	S
rtA181T/V	R	R	S	R	BS
rtT184S/A/I/ L/G/C/M	S*	S*	R**	S	S
rtS202C/G/I	S*	S*	R**	S	S
rtM204V	R	S	BS	S	S
rtM204I	R	R	BS	S	S
rtN236T	S	S	S	R	BS
rtM250V	S	S	R**	S	S

Figura 39: Resistències creuades de les principals mutacions del domini transcriptasa reversa (RT) de la polimerasa viral relacionades amb la resistència al tractament antiviral. S=Sensible al tractament. Les mutacions on s'ha posat * al costat de S són sensibles al tractament per si soles però poden tenir un paper compensatori de la mutació rtM204V/I (430). R=Resistència primària al tractament. Les mutacions on s'ha posat ** al costat de R estan relacionades amb la resistència primària a ETV sempre que vagin acompanyades de la combinació rtL180M+rtM204V, per si soles el nivell de resistència a ETV és molt baix (430). BS=Mutació amb sensibilitat baixa o reduïda al tractament: tot i que el tractament pot seguir suprimint la replicació, ho fa amb eficàcia reduïda.

2.5.2. Trasplantament hepàtic:

Un tractament antiviral efectiu pot retardar o revertir les complicacions de la HBC, no obstant, els pacients amb cirrosi descompensada haurien de ser posats en llista d'espera pel trasplantament hepàtic (548). En aquest cas, cal tenir en compte que els pacients amb ADN-VHB detectable en el moment del trasplantament tenen elevades taxes de recurrència de la infecció viral després del trasplantament (549), per tant és molt important administrar-los tractament antiviral mentre estiguin esperant el trasplantament i durant aquest temps monitoritzar al menys cada tres mesos la resposta a aquesta teràpia, amb un assaig de PCR a temps real el més sensible possible (484). Un tractament antiviral efectiu durant aquest període pot inclús millorar la funció hepàtica d'aquests pacients i permetre retirar-los de les llistes de trasplantament (550,551). Les opcions preferides pel tractament d'aquests pacients amb cirrosi descompensada, igual que la resta de pacients amb HBC, serien ETV i TDF per la seva potència antiviral i elevada barrera genètica (552). Per altra banda, LdT també pot ser una opció a tenir en compte en pacients amb cirrosi descompensada i disfunció renal, ja que té efectes potencialment favorables en el filtrat glomerular (553).

Després del trasplantament hepàtic, la infecció per VHB pot presentar recurrència, caracteritzada normalment per la detecció altra vegada de HBsAg i/o ADN-VHB al sèrum dels pacients, freqüentment acompanyada d'evidències clíniques o bioquímiques de la recurrència de la malaltia hepàtica (548). Aquesta recurrència és possible perquè el VHB pot persistir a l'hoste després d'extreure el fetge infectat gràcies als seus reservoris extrahepàtics, entre els que destaca el sistema limfoide (554,555). La recurrència de la infecció per VHB després del trasplantament hepàtic és alta sense profilaxi antiviral (80% o superior), amb el conseqüent augment de la mortalitat i la pèrdua de l'òrgan trasplantat per part dels pacients (556–558). Així doncs, la profilaxi contra el VHB després del trasplantament hepàtic és indispensable per evitar la recurrència de la infecció.

A principis de la dècada de 1990 es va introduir la immunoprofilaxi passiva amb immunoglobulines contra el VHB (HBIg), cosa que va permetre reduir les taxes de recurrència post-trasplantament del VHB (434). Les HBIg són anticossos anti-HBs policlonals derivats d'un pool de plasma humà (559). El seu mecanisme d'acció no està del tot clar, però es creu que pot actuar unint-se a partícules virals circulants per evitar que infectin els hepatòcits, i també podrien ser endocitades pels hepatòcits per disminuir la secreció de HBsAg (559). Les desavantatges del tractament amb HBIg són els seus elevats costos econòmics (560), el fet que provinguin de donants, per tant el subministre no és del tot fiable, la seva administració per via parenteral, els seus efectes secundaris locals o sistèmics i el risc d'infecció amb mutants de VHB que escapin de la neutralització (559).

Degut a les desavantatges de la immunoprofilaxi amb HBIg, aquest tractament avui en dia s'ha abandonat, i el més utilitzat és la combinació d'un tractament de la família dels NUCs amb dosis baixes de HBIg (552). Així en dos meta-anàlisis que comparen els efectes de la combinació de HBIg+LAM amb LAM sola s'ha observat, per una banda, la recurrència del VHB i la mort post-trasplantament associada tant al VHB com altres causes eren inferiors amb la combinació de HBIg+LAM que amb HBIg sola (561). Per altra banda, el segon meta-anàlisi va mostrar que la combinació de HBIg+LAM semblava ser superior a LAM en monoteràpia per evitar només la re-aparició del HBsAg en sèrum (433). Tanmateix LAM no es considera la millor opció de tractament de primera línia degut a la seva baixa barrera genètica (552). ADV tampoc és un tractament ideal per la profilaxi post-trasplantament, ja que té un elevat cost econòmic, una potència relativament baixa per les baixes dosis a les que s'administra (10 mg/dia), barrera genètica relativament baixa (figura 35) i sobretot la seva nefrotoxicitat (552), que pot ser un problema degut als tractaments immunosupressors dels trasplantats hepàtics que també poden ser nefrotòxics. Actualment s'estan utilitzant amb èxit els tractaments antivirals de primera línia, ETV i TDF, amb bons resultats: en una revisió sistemàtica de varis estudis s'ha

observat que pacients tractats amb combinació de HBIg+LAM presentaven recurrència amb més freqüència que els pacients amb HBIg+ETV o TDF (que tenen eficàcies similars), tot i sotmetre els primers a un protocol més intens de HBIg (562).

A part de la combinació de HBIg+NUCs, també s'ha provat amb bons resultats la profilaxi amb tractament amb HBIg post-trasplantament per un període de temps curt i limitat, seguit de tractament a llarg termini amb NUCs (548). No obstant, aquests resultats no són tan bons quan HBIg s'elimina totalment del tractament profilàctic i només s'administra un tractament de la família dels NUCs. Els tractaments profilàctics exclusivament amb LAM donen lloc a taxes de recurrència i mort post-trasplantament molt elevades (563–565). Aquests resultats milloren quan s'utilitzen ETV i TDF com a monoprofilaxis, però tot i així la recurrència amb HBsAg positiu és més elevada amb aquests tractaments que amb HBIg+LAM. En canvi, les taxes de detecció d'ADN-VHB en sèrum són similars entre els dos tipus de profilaxi (562). Així doncs, pel plantejament d'una profilaxi sense HBIg, ETV i TDF haurien de ser les primeres opcions, tot i que fins que no es dissenyin pautes de tractament òptimes sense HBIg, la combinació de HBIg (com a mínim durant un període curt de temps després del trasplantament) i un tractament de la família dels NUCs sembla ser el tractament profilàctic post-trasplantament més raonable.

2.5.3. Nous tractaments per eliminar la infecció per VHB:

Els tractaments antivirals actuals són molt efectius per assolir la supressió la replicació del VHB de manera sostinguda, és a dir la RVS, però no eliminen el cccADN nucli dels hepatòcits infectats (506,508) i la replicació viral moltes vegades torna a detectar-se després de parar el tractament. Actualment, els avanços en el coneixement dels mecanismes de persistència del VHB estan sent utilitzats per desenvolupar noves estratègies que permetin una cura funcional de la infecció del VHB, ja sigui evitant la formació del cccADN, eliminant-lo o silenciant-ne la transcripció (566). Aquestes estratègies poden anar dirigides tant al virus com a l'hoste.

Els nous fàrmacs dirigits contra el virus interaccionen directament amb aquest i interfereixen en punts clau del seu cicle replicatiu. Per començar existeixen diferents famílies de fàrmacs que inhibeixen l'acoblament del HBcAg per formar la càpsida durant la replicació viral, com per exemple les substàncies derivades de les fenilpropenamides. Aquestes substàncies interfereixen amb l'empaquetament del complex ribonucleoproteic format per polimerasa, xaperones i pgARN i donen lloc a la formació de càpsides buides. Per exemple AT-130, que tot just està entrant en fase clínica (566), s'uneix a la butxaca en la interfície entre els dímers de HBcAg i fa que la càpsida no es formi en el moment oportú, per tant dona lloc a càpsides morfològicament

normals però buides (567). Una altra família d'aquest grup són les heteroarildihidropirimidines, que s'uneixen a les nucleocàpsides i n'indueixen el desacoblament o el potencien per afavorir la formació de partícules aberrants (568,569), i també podrien afectar l'estabilitat del cccADN (570). En el moment de redactar aquesta memòria s'estan duent a terme assaigs clínics en fase I i II d'un membre d'aquesta família denominat GLS4 (566).

Altres tractaments actuen específicament sobre el cccADN, com en el cas de les sulfonamides disubstituïdes que semblen inhibir la conversió de rcADN a cccADN. Dos compostos d'aquesta família anomenats CCC-0975 i CCC-0346 s'ha confirmat que són inhibidors de la producció de cccADN "in vitro" (571). També s'ha provat la degradació del cccADN per mitjà de nucleases específiques d'aquesta molècula com per exemple les nucleases de dits de zinc (572), les "transcription activator-like effector nucleases" (TALENs) (573), etc. Aquests enzims poden administrar-se específicament als hepatòcits a través de les seqüències d'ADN que els codifiquen clonades en vectors virals, per tant formen part d'una estratègia per l'eliminació del cccADN basada en teràpia gènica. L'expressió del cccADN pot ser silenciada per mitjà de petites molècules que inhibeixen enzims remodeladors de cromatina, de manera similar al silenciament epigenètic induït per IFN α (312,574). Una altra estratègia per silenciar l'expressió del cccADN consisteix en l'ús d'ARN interferents en forma de formulacions de polímers que permeten dirigir-los específicament als hepatòcits (575). Actualment s'està avaluant en assaigs clínics de fase II una combinació de ARN interferents petits (ARC-520) dirigida contra seqüències conservades dels mARN virals que redueix eficientment els nivells d'ARN, ADN i proteïnes virals (566).

Per altra banda, els futurs tractaments contra la HBC també poden interferir en el cicle replicatiu del VHB a través de la interacció en components de la cèl·lula hoste i/o també a través de restaurar la resposta immunitària contra el VHB. Un d'aquests casos és el Myrcludex-B, un lipopèptid sintètic derivat de la regió preS1 de les proteïnes de superfície que s'uneix específicament al receptor específic per l'entrada del VHB i VHD, NTCP (265), i bloqueja eficientment la infecció per VHB en models de ratolí transgènic amb el fetge reconstituït amb hepatòcits humans (576). Actualment aquest tractament està en curs un assaig clínic en fase II d'aquest fàrmac (566). Altres fàrmacs que s'uneixen al NTCP com la ciclosporina A i ezetimib també inhibeixen l'entrada del VHB i el VHD a la cèl·lula hoste en models "in vitro". No obstant cap d'aquestes molècules ha estat testada "in vivo" contra el VHB (577,578).

La via secretora del VHB és una altra via potencial sobre la que poden actuar els nous tractaments antivirals. La inhibició de la gemmació de les nucleocàpsides i la seva secreció podria disminuir els nivells d'ADN-VHB i també de HBsAg en inhibir l'alliberament tant de les

partícules subvirals o SVP com de les virals. Les proteïnes de superfície que formen el HBsAg es produeixen en grans quantitats i es creu que poden tenir un important paper immunosupressor de la resposta immunitària específica contra el VHB (179,180), per tant la disminució dels seus nivells podria restaurar la resposta immunitària. En aquest sentit s'han descrit alguns inhibidors de la secreció de partícules virals i HBsAg com per exemple iminosucres inhibidors de α -glucosidasa, derivats de triazol-o-pirimidina (579,580), i el compost de benzimidazol en fase preclínica BM601 (581). Per altra banda, la secreció de HBsAg també pot ser inhibida per polímers amfipàtics d'ADN, com per exemple REP 9 AC, que està en assaigs clínics de fase II (566,582).

També s'estan investigant compostos capaços de donar lloc a una resposta immunitària intrahepàtica sense els efectes secundaris que limiten la utilització d'IFN α . Així, recentment s'ha descrit un mecanisme per activar les respostes immunitàries antivirals utilitzant anticossos dirigits contra el receptor de limfotoxina β , que s'ha demostrat que redueixen els nivells d'ADN-VHB, HBsAg i cccADN sense produir hepatotoxicitat detectable "in vitro" (510). Altres compostos immunomoduladors que indueixen la producció d'IFN i/o l'activació de limfòcits B i T estan actualment en assaigs clínics en diferents fases, com per exemple l'agonista de "Toll-like receptor 7" o TLR7 GS-9620 (583), timosina $\alpha 1$ (584) i l'antimicrobià nitazoxanida i el seu metabòlit actiu tizoxanida (585). La immunitat específica contra VHB també podria estar potenciada per la citocina IL-7 i interferó- λ recombinants, que també estan en assaigs clínics de fases I i II (566). Finalment, les vacunes terapèutiques poden induir una potent resposta de limfòcits T CD4⁺ o Th, contrarestar la tolerància immunitària, activar la resposta immunitària humoral i estimular els limfòcits T CD8⁺ o CTL dirigits contra antígens virals (586). Actualment n'hi ha varies en avaluació en diferents assaigs clínics en fases I i II (587–589).

2.6. HIPÒTESIS I OBJECTIUS:

L'anàlisi de la composició de les variants genètiques en la quasiespècies del VHB per tècniques de seqüenciació massiva basades en UDPS és capaç de quantificar-ne les proporcions, inclús d'aquelles variants minoritàries en freqüències extremadament baixes (inferiors al 1% de la quasiespècies), com s'ha demostrat a estudis previs als inclosos en aquesta tesi (424,590–593).

Els determinants virals del genoma del VHB rellevants pel desenvolupament de resistències a NUCs es troben en una regió del seu genoma que codifica la diana dels tractaments antivirals basats en la família dels anàlegs de nucleòtids o nucleòsids (NUCs). en NUCs, el centre actiu del domini RT de la polimerasa viral (P) i les seqüències adjacents que codifiquen els seus

motius/dominis funcionals. A més, en aquesta regió l'ORF P es solapa amb la regió de l'ORF S que codifica la regió hidrofílica principal de les proteïnes de superfície. Aquesta regió S conté el bucle antigènic, entre els dominis transmembrana TM2 i TM3. Així la UDPS pot ser aplicada per estudiar les dinàmiques de variants a la quasiespècies viral que porten a desenvolupar resistències al tractament antiviral amb NUCs, les quals també podrien escapar-se del sistema immunitari o la immunoprofilaxi mitjançant immunoglobulines (HBIg) o la vacunació contra el VHB. La comprensió de les dinàmiques de variants en aquesta regió pot ajudar a predir l'evolució de la quasiespècies viral durant el transcurs del tractament antiviral abans de començar a rebre'l, i per tant es podria optimitzar la seva eficàcia segons la quasiespècies de cada pacient.

Per aquest motiu, en aquesta tesi es plantejen els següents objectius:

1. Desenvolupar metodologies basades en UDPS que permetin explotar la seva capacitat per seqüenciar clonalment i en paral·lel milers de molècules d'ADN per analitzar en profunditat la quasiespècies del VHB per tal de detectar variants genètiques en proporcions per sota dels límits de detecció de les tècniques convencionals d'anàlisi de la quasiespècies viral: seqüenciació directa pel mètode de Sanger, que detecta substitucions de nucleòtids (no variants genètiques individuals) presents a partir del 20% de la quasiespècies viral; hibridació reversa, que detecta canvis d'aa predeterminats (no variants genètiques individuals) presents a partir del 5-10% de la quasiespècies del VHB; i el clonatge molecular acoblat a la seqüenciació directa, que és capaç de detectar variants genètiques individuals amb uns nivells de sensibilitat que depenen del nombre de clons analitzat (430), però que difícilment poden arribar per sota del 1% de la quasiespècies, per l'elevat nombre de clons que seria necessari seqüenciar.
2. Estudiar la quasiespècies del VHB abans d'un determinat tractament antiviral i després d'aquest, en els casos en que això sigui possible, mitjançant les metodologies desenvolupades. L'anàlisi de les dades obtingudes permetrà:
 - a. Valorar les proporcions a la quasiespècies de les variants resistents al tractament antiviral amb NUCs, per tal d'establir el llindar a partir del que poden ser seleccionades per aquest tractament.
 - b. Estudiar dinàmiques que s'estableixen entre les variants que formen les quasiespècies virals, com mecanismes de competència o col·laboració entre elles, i finalment la selecció d'una variant determinada o un petit grup de variants com les dominants a la quasiespècies del VHB.