

Virología molecular del virus de la hepatitis B

Francisco Rodríguez-Frias y Rosendo Jardi

Servicio de Bioquímica. Unidad de Hepatología. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona. España.

El virus de la hepatitis B (VHB) pertenece a la familia de los hepadnavirus. El genoma del virus, formado por una pequeña molécula de ADN de 3.200 pares de bases, consta de 4 regiones codificantes de proteínas (ORF) fuertemente solapadas: ORF preS/S, correspondiente a las proteínas de la envuelta que constituyen el antígeno de superficie del VHB (HBsAg); ORF preC/C, que codifica el componente de la cápside viral (antígeno *core* o HBcAg) y una proteína no estructural que tras su modificación postraduccional es secretada y constituye el denominado antígeno «e» (HBeAg); ORF P, que codifica la polimerasa viral (poliproteína con actividad ADN polimerasa, transcriptasa reversa y ARN-asa) y la ORF X, que codifica una proteína que actúa como regulador multifuncional, tanto para el ciclo viral como para el celular. El VHB presenta una tasa de mutación de $1,4\text{-}3,2 \times 10^5$ sustituciones/nucleótido/año. Como consecuencia de esta variabilidad, el virus circula como una mezcla compleja de variantes genéticas, constituyendo una quasispecie, que evoluciona a lo largo de la infección dependiendo de la presión evolutiva de factores como la respuesta inmunológica y los tratamientos antivirales. Sobre la base de esta variabilidad, el VHB se ha clasificado en 8 genotipos (A-H) definidos por una diferencia > 8% en las secuencias del genoma viral completo. Esta variabilidad es, además, la causante de la resistencia del VHB a los tratamientos antivirales con análogos de nucleótidos y nucleósidos. El diagnóstico de la infección por VHB incluye la determinación de marcadores virológicos: antígenos víricos (HBsAg, HBeAg), anticuerpos específicos (anti-HBc, anti-HBe, anti-HBs) y el estudio del ADN-VHB para su detección, cuantificación y determinación de genotipos y variantes víricas.

Palabras clave: Virus de la hepatitis B. ADN-VHB. Genotipos VHB. Resistencia antivirales. Variabilidad VHB. Replicación viral.

Molecular virology of the hepatitis B virus

The hepatitis B virus (HBV) belongs to the hepadnavirus family. The genome of the virus, formed by a small DNA

molecule with 3,200 base pairs, has 4 strongly overlapping protein coding regions: ORF preS/S, corresponding to the envelope proteins that constitute the HBV surface antigen (HBsAg); ORF preC/C, which encodes the viral capsid component (core antigen or HBcAg) and a non-structural protein that, after postranslation modification, is secreted and constitutes the «e» antigen (HBeAg); ORF P, which encodes the viral polymerase (polyprotein with DNA polymerase activity, reverse transcriptase and RNAase), and ORF X, which encodes a protein that acts as a multifunctional regulator for both the viral and cell cycles. HBV has a mutation rate of $1.4\text{-}3.2 \times 10^5$ substitutions/nucleotide/year. As a result of this variability, the virus circulates as a complex mixture of genetic variants, constituting a semi-species, that evolves throughout the infection depending on the evolutionary pressure of factors such as the immune response and antiviral treatments. Based on this variability, HBV has been classified into 8 genotypes (A-H) defined by a difference of more than 8% in the sequences of the complete viral genome. This variability is also responsible for HBV resistance to antiviral treatments with nucleotide and nucleoside analogs. Diagnosis of HBV infection includes determination of virological markers: viral antigens (HBsAg, HBeAg), specific antibodies (anti-HBc, anti-HBe, anti-HBs) and study of HBV-DNA for its detection and quantification and determination of genotypes and viral variants.

Key words: Hepatitis B virus. HBV-DNA. HBV genotypes. Antiviral resistance. HBV variability. Viral replication.

Virus de la hepatitis B

El virus de la hepatitis B (VHB) está formado por una partícula esférica de 42 nm de diámetro, rodeada de una envuelta proteolipídica de 7 nm de espesor que contiene el antígeno de superficie (HBsAg) frente al que está dirigido el anticuerpo neutralizante anti-HBs^{1,2}. En el interior de las partículas se encuentra un núcleo esférico, electron-denso, de 22-25 nm de diámetro que contiene el antígeno *core* (HBcAg), el ADN viral, una proteína con actividad ADN polimerasa (proteína P) y proteínas del huésped^{3,4}. Hay otro antígeno viral, denominado antígeno «e» (HBeAg), que no forma parte de la estructura del VHB, pero que se sintetiza a partir del gen que codifica la proteína del *core*. El HBeAg es secretado en forma soluble, se detecta en el suero y parece tener una función inmunorreguladora⁵.

Correspondencia: Dr. R. Jardi.
Servicio de Bioquímica. Hospital Vall d'Hebron.
Passeig Vall d'Hebron, s/n. 08035 Barcelona. España.
Correo electrónico: rjardi@vhebron.net

La concentración de partículas virales en el suero de pacientes infectados por el VHB puede exceder las 10^9 partículas/ml. Además de estas partículas se encuentran en el suero otras formas virales (esféricas de 16-25 nm de diámetro y filamentosas de 22 nm de espesor y longitud variable), llamadas partículas S, compuestas únicamente por el HBsAg, sin componentes del núcleo del virus^{1,6,7}.

Estructura del genoma viral

El genoma del VHB está constituido por una molécula de ADN circular de pequeño tamaño, parcialmente de doble cadena, que consta de una cadena larga de unas 3.200 bases (la cadena negativa) y una cadena corta, o positiva, de 1.700 a 2.800 bases^{8,9}. El genoma se mantiene en conformación circular a pesar de no estar cerrado covalentemente (ADNrc) debido a una pequeña región cohesiva que solapa la región situada entre los extremos 5' de ambas cadenas.

En el núcleo del hepatocito, el ADN viral pasa de la conformación ADNrc a ser circular y cerrado covalentemente (ADNccc) por acción de la polimerasa viral, así como por otras actividades enzimáticas de la célula huésped^{10,11}. El ADNccc permanece en el hepatocito durante toda la vida de éste y sirve como molde para la síntesis de los diferentes transcritos de ARN del VHB, mediante la acción de la ARN polimerasa II del huésped¹². Los hepatocitos infectados de forma natural pueden contener hasta 50 moléculas de ADNccc que se estructuran como minicromosomas con proteínas histonas y no histonas¹³⁻¹⁵.

El genoma del VHB contiene 4 marcos de lectura abierta (ORF) (C, P, S y X) fuertemente solapados (67%) que se transcriben en 5 ARN mensajeros (ARNpre-core, ARNcore, ARNpreS1, ARNpreS2/S y ARNX) para formar las 7 proteínas del VHB (pre-core, C, P, preS1, preS2, S y proteína X). Los ARNpre-core y ARNcore tienen una longitud mayor que el propio genoma (3,5 kb), con una redundancia en el extremo 3'. La traducción del ARNpre-core da lugar a la proteína pre-core, precursora del HBeAg. El ARNcore expresa las proteínas C y P; además, tiene una función como ARN pregenómico y sirve de molde para la síntesis del ADN genómico mediante un proceso de retrotranscripción catalizado por la proteína P. Los demás ARN mensajeros (ARNm) expresan la proteína que su propio nombre indica. Los distintos ARNm difieren en su extremo 5' (en función de los promotores correspondientes), pero el extremo 3' es una señal poliadenilada (TATAAA) común. Tanto el ARNcore como el ARNpre-core presentan en su extremo 3' redundante una repetición del fragmento que va desde el lugar de inicio de la transcripción (5') hasta la señal de poliadenilación. En este fragmento, la secuencia correspondiente a la región pre-core presenta una estructura secundaria característica (tallo-jorobabucle, que constituye la llamada «señal de encapsulación» o señal ϵ que, es esencial en la replicación del virus. Debido a la redundancia de secuencia, hay 2 copias de esta señal (una en 5' y otra en 3') en los ARN pre-core y core¹⁶⁻¹⁸.

El fuerte solapamiento de los 4 ORF del genoma del VHB hace que toda la secuencia del genoma sea codificante, además de incluir los elementos reguladores, con lo que la capacidad codificante del VHB es 1,5 veces superior

a la que tendría de no existir el solapamiento de genes¹⁹. La organización del genoma del VHB se muestra en la figura 1.

El gen C o precore-core del VHB (posiciones 1814 a 2458)

El gen C presenta 2 codones de iniciación (ATG) en fase, que codifican 2 proteínas. Cuando la traducción se produce a partir del primer codón (posición 1814), codifica un péptido de 25.000 daltons que por proteólisis da lugar a una proteína de 16.000 daltons, el HBeAg. Cuando se traduce a partir del segundo codón (posición 1901) codifica el HBcAg, de 21.000 daltons, componente de la cápsida viral. El HBeAg, presumiblemente cruza la placenta y actúa como inmunotolerógeno al activar una respuesta antiinflamatoria, lo que facilita el establecimiento de una infección persistente⁵. La secuencia corta situada entre los 2 codones de iniciación se denomina preC o pre-core.

El gen S del VHB (posiciones 2854 a 833)

El gen S presenta 3 codones de iniciación en fase (posiciones 2854, 3211 y 155) que definen 3 regiones denominadas preS1, preS2 y S. El gen S codifica las proteínas de la envuelta del VHB completo y de las partículas no infectivas, compuestas por las formas glucosiladas y no glucosiladas de 3 polipéptidos diferentes de 24.000, 33.000 y 39.000 daltons que son codificados, respectivamente, por la región S (proteína S), la unión preS2-S (proteína preS2) y la unión de las 3 regiones preS1-pre S2-S (proteína preS1). La proteína S es la más abundante y su secuencia está presente en todas las demás. En ella se encuentra el denominado *loop* antigénico «a», que incluye los aminoácidos 124 a 147, frente al que se produce la respuesta primaria de anticuerpos neutralizantes anti-HBs. La proteína preS1 parece reconocer los receptores de la superficie celular, colaborando en la especificidad de virus por un huésped determinado.

El gen P del VHB (posiciones 2307 a 1623)

El gen P cubre las tres cuartas partes del genoma y solapa la porción carboxi-terminal del gen C, la totalidad del gen S y la porción amino-terminal del gen X. Codifica un polipéptido básico de unos 90.000 daltons que tiene asociadas las actividades de ADN polimerasa/transcriptasa inversa (dominio RT) y ARN-asa (dominio RH en el extremo carboxi-terminal)^{20,21}. También codifica, en su dominio amino-terminal, la denominada proteína terminal (PT), que actúa como cebador proteínico para la síntesis de la cadena de ADN negativa a la que permanece unida covalentemente^{22,23} (fig. 1). La estructura tridimensional de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa no está establecida y los modelos publicados se han basado en la similitud funcional y de secuencia con la transcriptasa reversa del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)²⁴⁻²⁶.

El gen X del VHB (posiciones 1374 a 1838)

El gen X codifica un polipéptido de 145-154 aminoácidos (HBx) con actividad multirreguladora, tanto del ciclo viral como de la célula huésped²⁷. En relación con la actividad viral, en estudios in vitro se ha mostrado que el HBx incrementa la replicación del VHB²⁸. La proteína HBx se ha asociado también con el desarrollo del carcinoma hepatocelular^{27,29}.

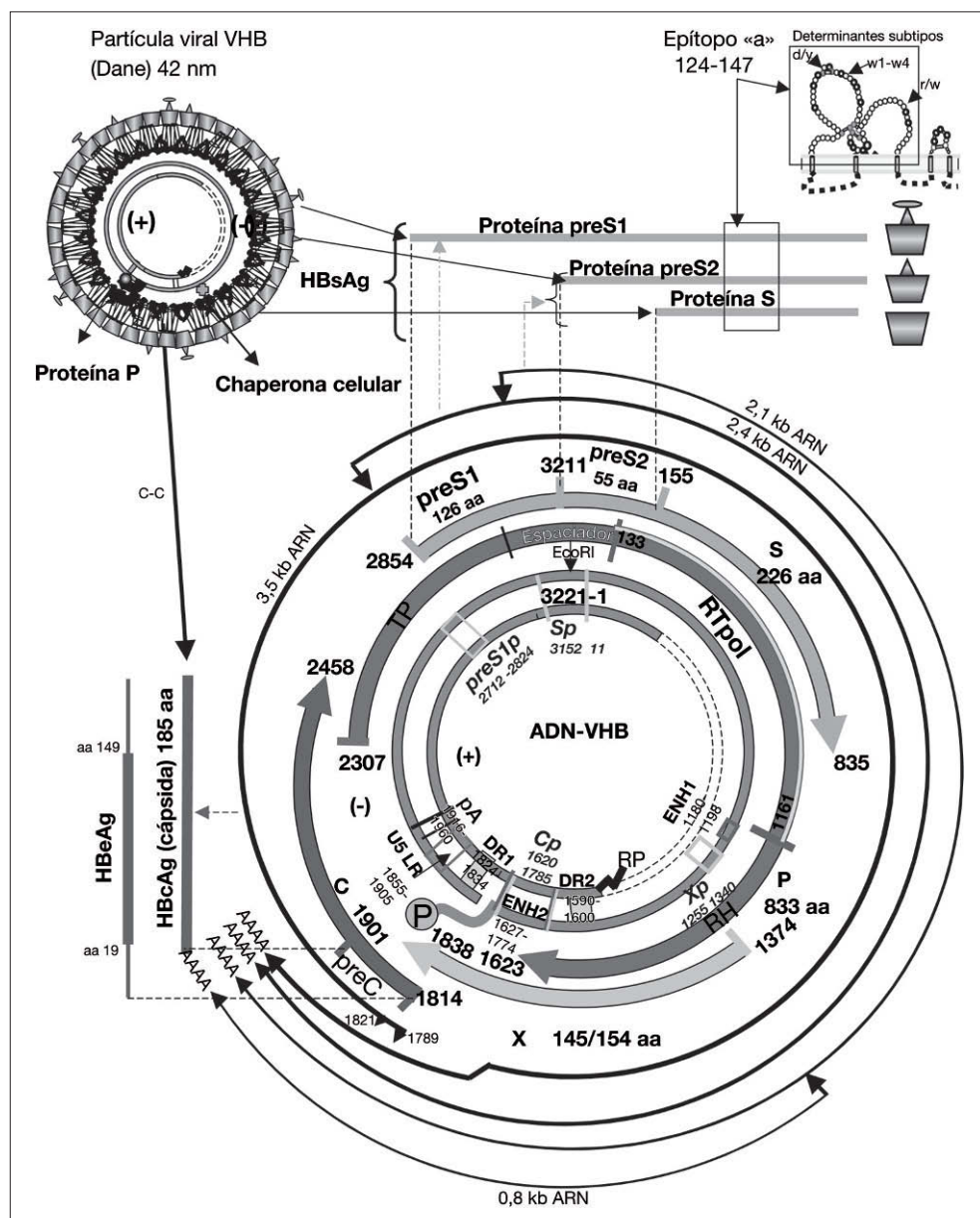
Otros elementos genómicos del ADN del virus VHB

El genoma del VHB contiene 4 regiones promotoras para la transcripción de los 5 ARNm y dos regiones incrementadoras o *enhancer* de la transcripción, situadas en ORF P y ORF C, respectivamente (fig. 1). De las regiones promotoras cabe destacar la correspondiente al gen C (posiciones 1620 a 1814), que incluye el promotor básico del *core* (PBC), cuya secuencia situada entre las posiciones 1744 a 1804 es suficiente para iniciar la transcripción. El PBC contiene también secuencias que actúan como lugares de unión de los factores incrementadores de la transcripción. Hay 2 secuencias cortas idénticas, la DR1 (posiciones 1824-1834) y la DR2 (posiciones 1590-1600), que son esenciales en el proceso de replicación del VHB. Otras secuencias necesarias para la replicación viral son las correspondientes a la señal de encapsulación, a la cual se unen la polimerasa viral y las moléculas de HBcAg, lo que permite la encapsulación del ARN prege-

nómico en una etapa esencial del ciclo replicativo viral (fig. 2). En la joroba de esta señal hay 4 nucleótidos que actúan como molde para la síntesis del fragmento inicial de la cadena negativa del ADN viral, que permanecerá unida covalentemente a un grupo OH del aminoácido Tyr 63 de la PT¹⁶⁻¹⁸.

Ciclo biológico y replicación del VHB

La infección de la célula hepática se inicia con la interacción del VHB con un receptor, todavía desconocido, de la membrana del hepatocito. La interacción depende del dominio preS1³⁰. Posteriormente, la envoltura viral se rompe, libera la nucleocápside al citoplasma, y ésta se dirige al núcleo conducida por la señal de localización nuclear presente en la proteína del *core*³¹⁻³³. La nucleocápside interacciona con los poros nucleares y se disocia liberando el



ros de proteína C, formándose las cápsides. Además, se sintetiza un pequeño oligonucleótido de ADN de 3-4 bases complementario a una parte de la joroba de la señal ϵ . Este pequeño oligonucleótido, que está unido covalentemente a la PT, actuará de «cebador» en la síntesis de la cadena complementaria de ADN³⁶ y será su extremo 5'. Posteriormente, se sintetiza la cadena complementaria a esta primera cadena de ADN. El proceso completo de replicación del ADN viral requiere varios cambios de posición de las cadenas cebadoras, que parecen estar en el origen de las frecuentes delecciones observadas en los diferentes genotipos del VHB. Las nucleocápsides, que contienen el nuevo ADN viral sintetizado, pueden ser conducidas de nuevo al núcleo, en un proceso de realimentación que aumenta el reservorio de ADNccc nuclear o bien se recubren en el retículo endoplasmático con una envuelta lipídico-proteínica que contiene el HBsAg, son transportadas al aparato de Golgi y desde allí son liberadas al espacio extracelular, en forma de nuevos viriones.

Las proteínas de la envuelta insertadas en la membrana del retículo endoplasmático que no recubren los nuevos viriones se autoensamblan y dan lugar a partículas S no infecciosas, que son exportadas al exterior por el mismo mecanismo que las partículas infecciosas. Las diferentes etapas del ciclo biológico del VHB se representan en la figura 2.

Variabilidad genómica del VHB. Genotipos del VHB

La evolución genética ocurre en todos los virus, aunque los virus ADN son relativamente más estables (10^{-9} sustituciones/sitio/año) que los virus ARN (10^{-4} - 10^{-5} sustituciones/sitio/año). En este sentido, hay que tener en cuenta que el VHB, a pesar de ser un virus ADN, se comporta intracelularmente como un retrovirus (virus ARN), con una tasa de mutación del orden de los virus ARN ($1,4 \cdot 10^{-5}$ sustituciones/sitio/año)^{9,37-39}. Esta tasa es el resultado de 2 tendencias evolutivas opuestas: la primera es debida a la presencia de una etapa de retrotranscripción en su ciclo replicativo que tiende a mantener una elevada tasa de mutación, y la segunda, al solapamiento de genes del VHB, que restringe de forma importante la variabilidad⁴⁰. Como consecuencia de esta variabilidad, el virus circula como una mezcla compleja de variantes genéticas, constituyendo una quasiespecie que evoluciona a lo largo de la infección según la presión evolutiva de factores como la respuesta inmunológica y los tratamientos antivirales.

Serotipos y genotipos del VHB

Las primeras indicaciones de la heterogeneidad de la secuencia del VHB se basaron en la presencia de diferentes determinantes antigénicos del HBsAg. Además del determinante «a», común a todos los tipos de HBsAg, se conocen los determinantes mutuamente exclusivos d/y (Lys/Arg 122) y w/r (Lys/Arg 160), con las subespecificidades w1/w2, w3 o w4 (Pro/Thr/Leu 127 con 134F y/o 159A para w2) y la especificidad q (177V/178Q para q+ y 177A o 178Q para q-). De esta manera, el VHB se clasifica en 10 serotipos o subtipos (ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw3, adw4q-, adrq+, y adrq-).

La clasificación genética basada en la comparación de genomas completos cataloga todas las variantes del VHB en 8 grupos o genotipos (A-H), con una distribución geográfica característica. Las diferencias en la secuencia nucleotídica de los diferentes genotipos son superiores a un 8%⁴⁰⁻⁴³. El VHB también se puede clasificar en 24 subgenotipos (con diferencias del 4-8%) con propiedades virológicas y epidemiológicas características^{42,44}.

Los genotipos A y D son ubicuos y son mayoritarios en Europa y en poblaciones de este origen (A en el norte de Europa y el D en la zona mediterránea). En la población española, los genotipos A y D representan conjuntamente en torno al 90% de los casos estudiados y se encuentran en proporciones muy análogas, seguidos del genotipo F, que es frecuente en poblaciones de Sudamérica⁴⁵. Los genotipos B y C parecen ser endémicos de poblaciones asiáticas. El genotipo E se detecta en África oriental. Aunque no hay suficientes datos epidemiológicos, parece ser que el genotipo G es ubicuo y que el genotipo H se encuentra en América central y del sur. Los subgenotipos del VHB también parecen presentar una distribución geográfica característica: el subgenotipo A1 se encuentra principalmente en África y el A2 es característico de Europa y Norte América, mientras que el subgenotipo B1 es frecuente en Japón y el B2 lo es en el resto de Asia^{42,44}.

Cada vez se dispone de más pruebas científicas que indican que el genotipo del VHB se correlaciona con el curso clínico de la infección por VHB y la respuesta al tratamiento⁴⁶⁻⁴⁷. Las pruebas científicas más claras se han obtenido de estudios realizados en Asia, que indican que el genotipo C se asocia con una enfermedad más avanzada y peor respuesta al tratamiento con interferón que el genotipo B⁴⁸⁻⁵¹. En España, el genotipo A parece asociarse con un mejor pronóstico que el genotipo D (mayores proporciones de aclaración del HBsAg y de remisión sostenida tras la seroconversión a anti-HBe)⁴⁶. En relación con el tratamiento antiviral, en pacientes tratados con interferón se ha observado que la tasa de seroconversión a anti-HBe es del 47% para el genotipo A, del 44% para el B, del 28% para el C y del 25% para el D, lo que indica que el genotipo del VHB puede ser un importante predictor de la respuesta al tratamiento con este fármaco⁴⁷. En relación con el tratamiento con análogos de nucleósidos o nucleótidos, aunque no hay datos concluyentes, se ha notificado que las variantes resistentes a la lamivudina emergen de manera más precoz en el genotipo A que en el D, aunque sin correlación con la respuesta⁵²⁻⁵³. En relación con el tratamiento con adefovir, se ha señalado que el genotipo A presenta peor respuesta que el D⁵⁴.

Variantes en los diferentes genes del VHB

Además de los genotipos, se han descrito otras variantes genéticas; entre ellas, son de especial interés en el curso de la infección por el VHB las observadas en la región pre-core-core, la polimerasa viral y la región S.

Variantes de la región pre-core

Las variantes de la región pre-core impiden o disminuyen la expresión del HBsAg, asociándose con la infección por VHB, HBeAg negativo. La más frecuente corresponde al cambio G1896A, que produce una señal stop (TGG pasa a TAG) en el codón 28 de esta región. En menor proporción y en las posiciones 1814-1816 se detecta otras variantes

caracterizadas por la destrucción del codón de iniciación^{55,56}. Estos 2 tipos de variantes son muy comunes en el área mediterránea, donde se detectan en todo el espectro de formas de la infección por VHB. Su transmisión se ha asociado con el desarrollo de hepatitis fulminante⁵⁷. Hay una asociación entre estas variantes y el genotipo viral; así, la G1896A se detecta con frecuencia en cepas VHB de genotipos diferentes al A y F, en especial en el D, en los cuales estabiliza la señal ϵ ⁵⁷.

Las variantes del VHB que disminuyen la expresión del HBeAg presentan en su mayoría cambios en la región del PBC, principalmente A1762T y G1764A^{56,58}, sustituciones que se han asociado con el aumento de la replicación viral y la progresión a formas graves de la enfermedad⁵⁹. La detección simultánea de las variantes de PBC y la del pre-core G1896A es muy frecuente en la hepatitis crónica B, suponiéndose que aparecen en primer lugar las variantes del PBC y más tarde, tras la seroconversión a anti-HBe, las variantes del pre-core⁴⁴.

Variantes de la polimerasa viral

Las variantes de la polimerasa viral son las causantes de las resistencias a tratamientos con inhibidores de dicha enzima (análogos de nucleótidos/nucleósidos) (fig. 3). Estas variantes presentan sustituciones de aminoácidos en los diferentes dominios catalíticos de la retrotranscriptasa viral (A-G), y son seleccionadas durante la terapia antiviral a partir de secuencias minoritarias presentes en la compleja quasiespecie que constituye el VHB. Si el análogo de nucleótido/nucleótido no es reconocido correctamente por la polimerasa debido a un cambio de aminoácido (formas «mutantes»), este análogo no inhibirá su actividad catalítica, por lo que la cepa variante se replicará, mientras que las cepas cuyas polimerasas, si reconocen al análogo (formas *wild type* mayoritarias) se inhibirán, observándose un descenso en la carga viral sérica. El que el análogo no sea reconocido hace que aumenten la proporción relativa de las cepas con variantes mutantes, hasta ser mayoritarias, lo que se evidenciará como un incremento de la carga viral, y posterior-

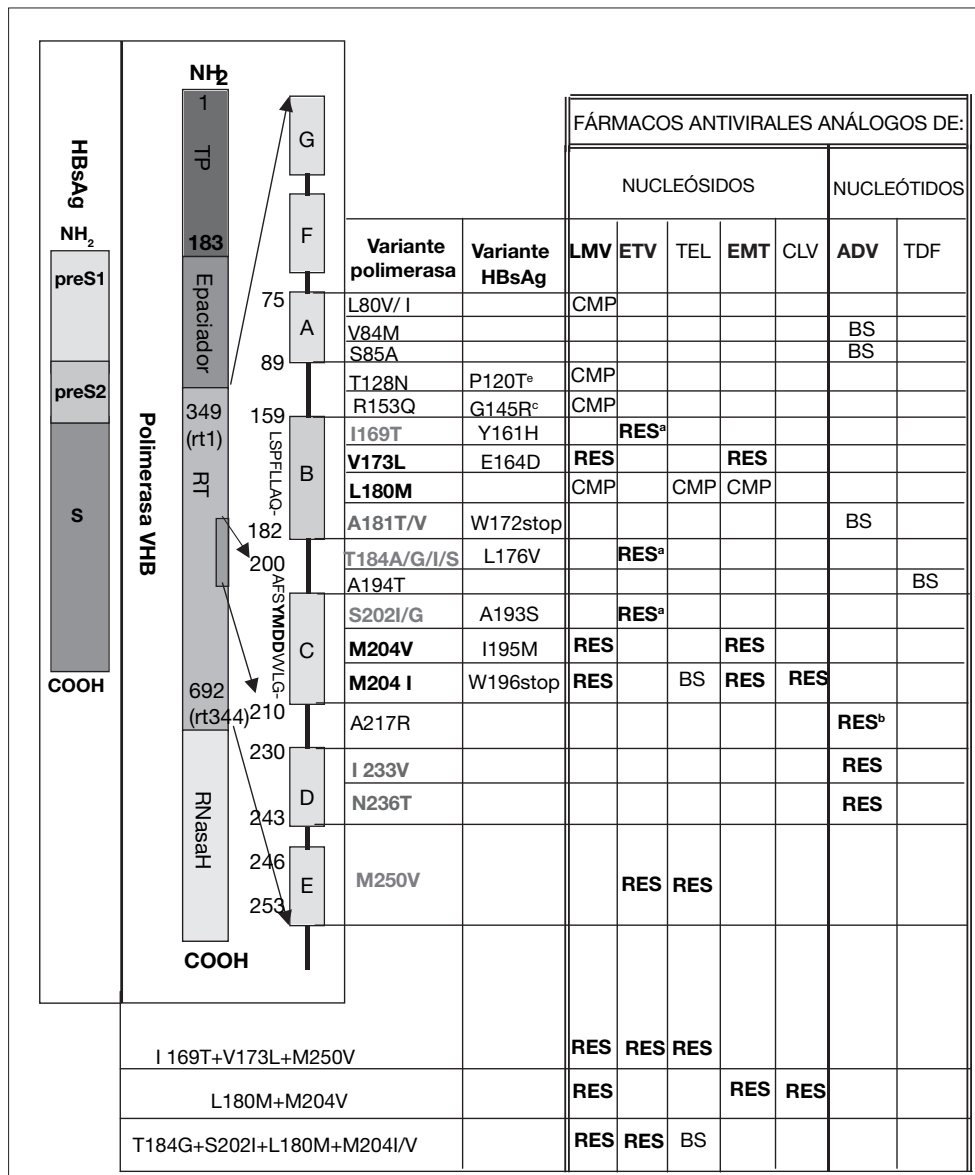


Figura 3. Esquema de la polimerasa viral, incluidas las diferentes regiones catalíticas de la retrotranscriptasa y las variantes de esta proteína asociadas con la resistencia a tratamientos antivirales con lamivudina (LMV), entecavir (ETV), telbivudina (TEL), entricitabina (EMT), clevudina (CLV), adefovir dipivoxil (ADV) y tenofovir (TDF). Se indican las variantes del HBsAg asociadas con las variantes de la polimerasa. BS: variante con baja resistencia al tratamiento; CMP: variantes compensatorias (en presencia de variantes resistentes); RES: variante resistente al tratamiento; VHB: virus de la hepatitis B.

^aVariante resistente en presencia de otras variantes; véanse las combinaciones de variantes en las últimas filas de la figura.

^bResistencia primaria; falta confirmación fenotípica.

^cVariante HBsAg no sensible a la vacuna o HBIG.

mente, de las concentraciones de alanina-aminotransferasa (ALT). Este fenómeno se denomina «emergencia de resistencias al tratamiento antiviral». De hecho, pueden transcurrir meses desde la detección de las variantes mutadas (resistencia genotípica) hasta el «rebrote» de ADN-VHB y/o de concentraciones de ALT (resistencia fenotípica).

La mayor parte de los datos de emergencia de resistencia a tratamientos antivirales proviene de los estudios efectuados con lamivudina; no obstante, aunque con menor frecuencia y variantes diferentes, este fenómeno está relacionado con otros tratamientos con análogos de nucleótidos/nucleósidos, adefovir-dipivoxil, entecavir, telbivudina, tenofovir, etc.^{44,60}. La más común de estas variantes es la que está asociada con la resistencia al tratamiento con lamivudina que presenta la sustitución rtM204I o rtM204V situada en el motivo YMDD (tirosina, metionina, aspártico) del dominio C de la polimerasa viral y que con frecuencia se acompaña de otras mutaciones compensatorias (principalmente rt180M y/o rtV173L) que restauran la capacidad replicativa del VHB mutado. Las cepas virales resistentes a lamivudina son sensibles al adefovir-dipivoxil, y viceversa, las cepas resistentes al adefovir (mutaciones rtN236T y rtA181V) son sensibles a lamivudina. Este hecho permite el rescate de pacientes resistentes a una u otra terapia. El entecavir presenta actividad frente a las variantes resistentes a lamivudina, y hasta el momento únicamente se han observado cepas resistentes al tratamiento con entecavir (rtI169T, rtT184S, rtS202I, rtM250V) en pacientes que presentaban también mutaciones relacionadas con resistencia a lamivudina^{44,60}.

Variantes de la envuelta viral, gen S

La proteína S es la principal diana de los anticuerpos neutralizantes anti-HBs, por lo que los cambios de aminoácidos en ella pueden evitar la neutralización del virus por estos anticuerpos. Se han detectado variantes de esta región con cambios en el determinante «a» del HBsAg (epítipo inmunodominante, residuos 124 a 147) (fig. 1) que escapan a la vacunación y a la acción protectora del tratamiento con inmunoglobulinas específicas, HBIG. La primera de estas variantes descrita fue la G145R, que de hecho es la más común⁵⁵ (fig. 3). Los programas de vacunación universal frente al VHB han actuado como factor selectivo de estas variantes, lo que ha provocado un incremento importante en su prevalencia. En este sentido, en Taiwan, tras 10 años de vacunación, la prevalencia global de la positividad para ADN-VHB en niños descendió del 8,6 al 2,1%, mientras que la de las mutaciones del determinante «a» pasó del 7,8% al 28,1%⁶¹.

Aspectos de laboratorio para el tratamiento de la infección

Antígenos virales, anticuerpos y ADN-VHB

HBsAg

El HBsAg es el marcador de laboratorio más importante en el diagnóstico de las infecciones aguda y crónica por el VHB, y habitualmente es detectable a las 6-10 semanas de la exposición al virus. Su presencia es un signo de producción de la envuelta viral, pero no de replicación viral, al ser positivo en todos los portadores crónicos de la in-

fección, con independencia de la actividad replicativa. Si embargo, hay que tener en cuenta que entre los casos con HBsAg negativo y anti-HBc positivo, el 0,5-1% presenta positividad para el ADN-VHB en concentraciones bajas, y constituyen una infección «oculta» por VHB⁶².

HBeAg y anti-HBe

Es producido en hepatocitos durante la replicación viral y, por este motivo, su presencia puede ser indicativa de replicación viral activa. La pérdida del HBeAg con la concomitante aparición de anti-HBe usualmente se asocia con la remisión bioquímica e histológica, y con una significativa supresión de la replicación viral. Sin embargo, es importante la prevalencia de pacientes con HBeAg negativo que en su mayoría presentan ALT normal y ADN-VHB indetectable por técnicas de hibridación, pero que mediante técnicas de PCR son positivos para ADN-VHB⁵⁶. En estos casos, la secuenciación del genoma del VHB ha permitido detectar la presencia de variantes *pre-core* del VHB que impiden o disminuyen la expresión del HBeAg.

Anti-HBc e inmunoglobulina M anti-HBc

Estos anticuerpos están dirigidos contra epítopos del antígeno *core* de VHB. Los anticuerpos anti-HBc aparecen muy precozmente durante la infección y son detectables de por vida, cualquiera que sea el curso de la infección. El anticuerpo anti-HBc puede detectarse en presencia o ausencia de HBsAg o anti-HBs, durante el período de recuperación de una infección aguda por VHB antes de la aparición de anti-HBs, o en pacientes en los que la infección se resuelve pero no muestran concentraciones detectables de anti-HBs. Por este motivo, su detección es indicativa de contacto previo o actual con VHB. Los anti-HBc de tipo inmunoglobulina M (IgM) se utilizan para el diagnóstico de infección aguda por VHB y son detectables hasta aproximadamente 6 meses después de la infección.

Anti-HBs

Un título de este anticuerpo ≥ 10 mU/ml se asocia con inmunidad frente al VHB, con un valor predictivo del 97,6%⁶². La detección aislada de este anticuerpo es indicativa de inmunidad adquirida por vacunación, mientras que su detección conjuntamente con anti-HBc es indicativa de inmunidad natural tras la resolución de la infección.

ADN-VHB

La cuantificación del ADN-VHB es la técnica de referencia para controlar la actividad replicativa del VHB y es la determinación más útil para el seguimiento de los pacientes con hepatitis crónica en los que, en general, hay una correlación entre las concentraciones de ADN-VHB y los marcadores serológicos y bioquímicos de actividad de la enfermedad hepática. La cuantificación de ADN-VHB en sangre periférica no es necesaria para el diagnóstico de la infección aguda por el VHB, que se basa únicamente en métodos serológicos. El ADN-VHB es el marcador más precoz de la infección; se detecta a los pocos días de su inicio, con un pico en la fase aguda y un descenso al resolverse la infección. Se mantiene detectable en pacientes que progresan a infección crónica, con valores que dependen de la fase de la enfermedad: elevados durante las fases de

inmunotolerancia e infección activa, y generalmente más bajos y a menudo fluctuantes durante la inmunoeeliminación⁶³. Los ensayos recomendados para la cuantificación de ADN-VHB son los basados en la PCR a tiempo real⁶⁴, cuyo intervalo de linealidad ($50\text{-}10^8$ U/ml) cubre mejor que cualquier otra metodología el intervalo de valores observados en la infección por el VHB⁶⁵. Su sensibilidad permite detectar las infecciones ocultas por VHB con concentraciones de ADN-VHB < 500 U/ml⁶⁶. En la práctica, unas diferencias en los resultados obtenidos $< 0,5$ logaritmos₁₀ no son valorables, y pueden ser intrínsecas a la variabilidad intrapaciente y/o a las propias técnicas. Este comportamiento oscilatorio podría explicarse por la evolución del VHB para escapar de los efectos de la respuesta inmunológica. El valor de 10^5 copias/ml (UI = 5,7 copias) se ha utilizado de forma arbitraria para diferenciar los distintos estadios de la infección por VHB y controlar a los pacientes con hepatitis crónica⁶⁷. No obstante, pueden observarse casos de enfermedad hepática avanzada con valores de ADN viral $< 10^5$ copias/ml. Se ha señalado un valor de ADN viral del orden de 5×10^3 U/ml para distinguir entre casos de hepatitis crónica y portadores inactivos, con una especificidad y una sensibilidad del orden del 90%⁶⁸. La Asociación Americana para el Estudio de Enfermedades Hepáticas recomienda un valor $\geq 10^5$ copias/ml como umbral razonable para determinar los candidatos al tratamiento antiviral⁶⁷, recomendación también asumida por las conferencias de consenso europeas⁶⁸. En el caso de pacientes HBeAg negativo, este umbral se reduce a 10^4 copias/ml debido al mayor riesgo de desarrollo de cirrosis si se dejan a su evolución espontánea⁶⁴. Teniendo en cuenta el perfil fluctuante de las concentraciones de ADN-VHB observado sobre todo en la hepatitis crónica HBeAg negativo, el estudio de los valores de ADN viral para la valoración de la situación clínica o la infectividad debe basarse en determinaciones seriadas.

Ensayos de resistencia a los antivirales frente al VHB

El descubrimiento y la utilización clínica de agentes antivirales que actúan sobre la polimerasa viral han revolucionado el tratamiento de los pacientes infectados crónicamente por el VHB. Sin embargo, el beneficio clínico de estos tratamientos está comprometido por la emergencia de variantes virales resistentes con mutaciones específicas en el gen de la polimerasa. La resistencia a tratamientos antivirales puede ser considerada desde el punto de vista fenotípico y genotípico. La resistencia fenotípica se refiere a la pérdida de supresión de la replicación viral a pesar de continuar la administración del tratamiento, y se demuestra por un incremento de la actividad viral evidenciada por un aumento de 1 logaritmo o más en los valores de ADN-VHB a partir del valor más bajo obtenido durante la terapia. Las cepas virales resistentes son las que tienen mutaciones que confieren la resistencia fenotípica a un tratamiento determinado. Para su detección se han desarrollado ensayos genotípicos que identifican una o varias de las mutaciones en la polimerasa viral que le confieren poca o nula sensibilidad al tratamiento⁶⁹. En general, en muestras preterapéuticas, estas mutaciones no son detectables en la población mayoritaria, aunque pueden estar presentes en poblaciones residuales⁶⁹. Sin embargo, estas formas serán las predominantes en la cuasiespecie tras las reactivaciones virales.

Los ensayos genotípicos incluyen básicamente 2 tipos de tecnología: la secuenciación directa de productos de amplificación de la región catalítica de la retrotranscriptasa viral y las técnicas de hibridación inversa sobre tiras de papel (INNOLIPA). La secuenciación directa permite valorar en una única determinación la totalidad de las posibles mutaciones asociadas con resistencias a tratamientos, debido a que se analiza la secuencia completa de la polimerasa viral. En el caso de una variante resistente nueva, la confirmación de que la resistencia al tratamiento antiviral es realmente debida al cambio de aminoácido observado en los ensayos genotípicos requiere la aplicación de ensayos *in vitro* para medir la capacidad replicativa de la variante viral en presencia del fármaco correspondiente (ensayos fenotípicos). Estos ensayos sólo están disponibles en laboratorios muy especializados^{44,70}.

BIBLIOGRAFÍA

- Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*. 1970;1:695-8.
- Mason WS, Seal G, Summers J. Virus of Peking ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol*. 1980;36:829-36.
- Robinson WS, Greenman RL. DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate. *J Virol*. 1974;13:1231-6.
- Hu J, Toft DO, Seeger ST. Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex, which is incorporated into nucleocapsids. *EMBO J*. 1997;16:59-68.
- Yang CH, Kuo TH, Ting LP. Human hepatitis viral e antigen interacts with cellular interleukin 1 receptor accessory protein and triggers interleukin 1 response. *J Biol Chem*. 2006;281:34525-36.
- Summers J, Smolec JM, Snyder R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978;75:4533-7.
- Marion PL, Oshiro LS, Regnery DC, Scullard GH, Robinson WS. A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980;77:2941-5.
- Sattler F, Robinson WS. Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends. *J Virol*. 1979;32:226-33.
- Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol*. 1988;69:2575-83.
- Moraleda G, Saputelli J, Aldrich CE, Averett D, Condreay L, Mason WS. Lack of effect of antiviral therapy in non-dividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of woodchuck hepatitis virus. *J Virol*. 1997;71:9392-9.
- Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol*. 2007;13:48-64.
- Nassal M, Schaller H. Hepatitis B virus replication: an update. *J Viral Hepatol*. 1996;3:217-26.
- Bock CT, Schwinn S, Locarnini S, Fyfe J, Manns MP, Trautwein C, et al. Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J Mol Biol*. 2001;307:183-6.
- Belloni L, Pollicino T, De Nicola F, Raffa G, Squadrito G, Fanciulli M, et al. Epigenetic regulation of HBV ccc-DNA function. *J Hepatol*. 2007;46 Suppl 1:s3.
- Pollicino T, Belloni L, Raffa G, Pediconi N, Squadrito G, Raimondo G, et al. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones. *Gastroenterol*. 2006;130:823-37.
- Junker-Niepmann M, Bartenschlager R, Schaller H. A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenomic encapsulation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J*. 1990;9:3389-96.
- Pollack JR, Ganem D. An RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsulation. *J Virol*. 1993;67:3254-63.
- Kidd AH, Kidd-Ljunggren. A revised secondary structure model for the 3'-end of hepatitis B virus pregenomic RNA. *Nucleic Acids Res*. 1996;24:3295-301.
- Miller RH, Kaneko S, Chung CT, Girones R, Purcell RH. Compact organization of the hepatitis B virus genome. *Hepatology*. 1989;9:322-7.
- Miller RH, Robinson WS. Common evolutionary origin of hepatitis B virus and retroviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83:2531-5.
- Radziwill G, Tucker W, Schaller H. Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J Virol*. 1990;64:613-20.

22. Bartenschlager R, Schaller H. The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. *EMBO J*. 1988;7:4185-92.
23. Bosch V, Bartenschlager R, Radziwill G, Schaller H. The duck hepatitis B virus P-gene codes for protein strongly associated with the 5'-end of the viral DNA minus strand. *Virology*. 1988;166:475-85.
24. Das K, Xiong X, Yang H, Westland CE, Gibbs C, Sarafianos SG, et al. Molecular modeling and biochemical characterization reveal the mechanism of hepatitis B virus polymerase resistance to lamivudine (3TC) and Emtricitabine (FTC). *J Virol*. 2001;75:4771-9.
25. Bartholomeusz A, Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev Med Virol*. 2004;14:3-16.
26. Langley DR, Walsh AW, Baldick CJ, Eggers BJ, Rose RE, Levine SM, et al. Inhibition of hepatitis B virus polymerase by entecavir. *J Virol*. 2007;81:3992-4001.
27. Tang H, Oishi N, Kaneko S, Murakami S. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer Sci*. 2006;97:977-83.
28. Bouchard MJ, Wang LH, Schneider RJ. Calcium signalling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication. *Science*. 2001;294:2376-8.
29. Song CZ, Bai ZL, Song CC, Wang QW. Aggregate formation of hepatitis B virus X protein affects cell cycle and apoptosis. *World J Gastroenterol*. 2003;9:1521-4.
30. Glebe D, Urban S. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol*. 2007;13:22-38.
31. Stoeckl L, Funk A, Kopitzki A, Brandenburg B, Oess S, Will H, et al. Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis B viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:6730-4.
32. Yeh CT, Wong SW, Fung YK, Ou JH. Cell cycle regulation of nuclear localization of hepatitis B virus core protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:6459-63.
33. Aiba N, McGarvey MJ, Waters J, Hadziyannis SJ, Thomas HC, Karayiannis P. The precore sequence of hepatitis B virus is required for nuclear localization of the core protein. *Hepatology*. 1997;26:1311-7.
34. Zhu Y, Yamamoto T, Cullen J, Saputelli J, Aldrich CE, Miller DS, et al. Kinetics of hepadnavirus loss from the liver during inhibition of viral DNA synthesis. *J Virol*. 2001;75:311-22.
35. Nassal M. Hepatitis B virus replication: novel roles for virus-host interactions. *Intervirology*. 1999;42:100-16.
36. Mangus DA, Evans MC, Jacobson A. Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol*. 2003;4:223.
37. Orito E, Mizokami M, Ina Y, Moriyama EN, Kameshima N, Yama-moto M, et al. Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:7059-62.
38. Fares MA, Holmes EC. Revised evolutionary history of hepatitis B virus (HBV). *J Mol Evol*. 2002;54:807-14.
39. Osioy C, Giles E, Tanaka Y, Mizokami M, Minuk GY. Molecular evolution of hepatitis B virus over 25 years. *J Virol*. 2006;80:10307-14.
40. Simmonds P, Midgley S. Recombination in the genesis and evolution of hepatitis B virus genotypes. *J Virol*. 2005;79:15467-76.
41. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Freid M, Schinazi RF, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol*. 2000;81:67-74.
42. Norder H, Courouce AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes and HBsAg subtypes. *Intervirology*. 2004;47:289-309.
43. Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnus LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol*. 2002;83:2059-73.
44. Kay A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res*. 2007;127:164-76.
45. Rodríguez-Frias F, Jardi R, Buti M, Schaper M, Hermosilla E, Valdes A, et al. Hepatitis B virus genotypes and G1896A precore mutation in 486 Spanish patients with acute and chronic HBV infection. *J Viral Hepat*. 2006;13:343-50.
46. Sanchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodes J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic B in western patients. *Gastroenterol*. 2002;123:1848-56.
47. Janssen HLA, Van Zonneveld M, Senturk H, Zeuzem S, Akarca US, Cakaloglu Y, et al. (for the HBV 99-01 Study Group). Pegylated interferon alfa 2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet*. 2005;365:123-9.
48. Yuen MF, Wong DK, Zheng BJ, Chan CC, Yuen JC, Wong BC, et al. Difference in T helper responses during hepatitis flares in hepatitis B e antigen (HBeAg)-positive patients with genotypes B and C: implication for early HBeAg seroconversion. *J Viral Hepat*. 2007;14:269-75.
49. Sumi H, Yokosuka O, Seki N. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology*. 2003;37:19-26.
50. Chu CJ, Hussain M, Lok AS. Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier HBeAg seroconversion compared with hepatitis B virus genotype C. *Gastroenterol*. 2002;122:1756-62.
51. Wai CT, Fontana RJ. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes, variants and mutants. *Clin Liver Dis*. 2004;8:321-52.
52. Zollner B, Petersen J, Puchhammer-Stockl E, Kletzmayr J, Sternecki M, Fischer L, et al. Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. *Hepatology*. 2004;39:42-50.
53. Chien RN, Yeh CT, Tsai DL, Chu CM, Liaw YF. Determinants for sustained HBeAg response to lamivudine therapy. *Hepatology*. 2003;38:1267-73.
54. Buti M, Elefsiniotis I, Jardi R, Vargas V, Rodríguez-Frias F, Schapper M, et al. Viral genotype and baseline load predict the response to adefovir treatment in lamivudine resistant chronic hepatitis B patients. *J Hepatol*. 2007;47:366-72.
55. Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey M, Makris A, et al. Mutation preventing formation of e antigen in patients with chronic HBV infection. *Lancet*. 1989;2:588-91.
56. Jardi R, Rodríguez F, Buti M, Costa X, Valdes A, Allende H, et al. Mutations in the basic core promoter region of hepatitis B virus. Relationship with precore variants and HBV genotypes in a Spanish population of HBV carriers. *J Hepatol*. 2004;40:507-14.
57. Rodríguez-Frias F, Buti M, Jardi R, Cotrina M, Viladomiu L, Esteban R, et al. Hepatitis B virus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. *Hepatology*. 1995;22:1641-7.
58. Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, Sugai Y, Yoshida M, Moriyama K, et al. Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. *J Virol*. 1994;68:8102-10.
59. Dal Molin G, Poli A, Croce LS, D'Agaro P, Biagi C, Comar M, et al. Hepatitis B virus genotypes, core promoter variants, and precore stop codon variants in patients infected chronically in North-Eastern Italy. *J Med Virol*. 2006;78:734-40.
60. Durantel D, Brunelle MN, Gros E, Carrouee-Durantel S, Pichoud C, Villet S, et al. Resistance of human hepatitis B virus to reverse transcriptase inhibitors: from genotypic to phenotypic testing. *J Clin Virol*. 2005;34 Suppl 1:S34-43.
61. Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Chen HL. Survey of hepatitis B surface variants infection in children after a nationwide vaccination programme in Taiwan. *Gut*. 2004;53:1499-03.
62. Hatzakis A, Magiorkinis E, Haida C. HBV virological assessment. *J Hepatol*. 2006;44:S71-6.
63. McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Semin Liv Dis*. 2004;24 Suppl 1:17-21.
64. Bruguera M, Bañares F, Cordoba J, Jardi R, Gonzalez J, Ladero J, et al. Documento de consenso de la AEEH sobre el tratamiento de las infecciones por los virus de las hepatitis B y C. *Gastroenterol Hepatol*. 2006;29: 216-30.
65. Hochberger S, Althof D, De Schrott RG, Nachbaur N, Rock H, Leying H. Fully automated quantitation of hepatitis B virus (HBV) DNA in human plasma by COBAS® Ampliprep (COBAS® Taq Man® System). *J Clin Virol*. 2006;35:373-80.
66. Allain JP. Occult hepatitis B infection: implication in transfusion. *Vox Sanguinis*. 2004;86:83-1.
67. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic Hepatitis B: Update of recommendations. *Hepatology* 2004; 857-61.
68. EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. *J Hepatol*. 2003;39:S3-S25.
69. Jardi R, Rodríguez-Frias F, Schaeper M, Ruiz G, Elefsiniotis I, Esteban R, et al. HBV polymerase variants associated with entecavir drug resistance in treatment naïve patients. *J Viral Hepatitis*. 2007. En prensa.
70. Zoulim F. In vitro models for studying hepatitis B virus drug resistance. *Semin Liv Dis*. 2006;26:171-80.