

## **DISCUSIÓN**

## **5. DISCUSIÓN.**

### **5.1. ESTUDIO DE LAS MUTACIONES DE LA REGIÓN DEL PROMOTOR BÁSICO DEL GEN PRECORE-CORE DEL VHB: RELACIÓN CON LAS MUTACIONES DE LA REGIÓN PRECORE Y LOS GENOTIPOS VIRALES.**

#### *5.1.1. ESTUDIO DE LAS MUTACIONES DE LA REGIÓN DEL PROMOTOR BÁSICO DEL GEN PRECORE-CORE DEL VHB.*

En la infección crónica por el VHB, la no detección de HBeAg en suero y la presencia de anticuerpos anti-HBe, se ha asociado con el aclaramiento de ADN-VHB del suero y con la mejoría de la lesión histológica hepática (Hoofnagle y col., 1987). Sin embargo, en áreas geográficas con una prevalencia media o alta de infección por el VHB, la replicación viral y la progresión de la enfermedad hepática persisten en más del 10% de los pacientes con hepatitis crónica anti-HBe positivo (Bonino y col., 1981; Brunetto y col., 1989; Hadziyannis y col., 1983). En estos casos se han aislado secuencias de ADN-VHB que tienen mutaciones en la región del precore que justifican la no expresión del HBeAg (Carman y col., 1989). La mayoría de las veces la mutación consiste en la sustitución de una G por una A en el nucleótido 1896, convirtiendo el codon 28 (TGG), que codifica para el Trp en un codon "stop" (TAG). De esta forma la traducción de la proteína precore, que comienza en el codon de iniciación del gen C (en la posición 1814), queda abortada en la posición 1896, no pudiéndose sintetizar el HBeAg.

Recientemente, se ha descrito que un número importante de pacientes anti-HBe positivo con hepatitis crónica presentan mutaciones en la secuencia del promotor básico del gen precore-core del VHB (PBC) (Okamoto y col., 1994; Kidd-Ljunggren y col., 1997; Kurosaki y col., 1996). En algunos pacientes estas mutaciones no están acompañadas por los cambios en la región del precore que impiden la expresión del HBeAg, lo que sugiere que los cambios en el PBC tienen también un papel importante en el aclaramiento del HBeAg (Okamoto y col., 1994). Las mutaciones del PBC más frecuentemente detectadas consisten en el cambio de una A por una T en la posición 1762 y el de una G por una A en la posición 1764. Sin embargo, y a diferencia de las mutaciones en el precore, las mutaciones en el PBC se han detectado en una proporción elevada de pacientes HBeAg positivo (Lindh y col., 1998; Okamoto y col., 1994), por lo que la relación entre los cambios de la secuencia del PBC y el estadio HBeAg necesita ser analizada más profundamente.

La mayoría de los trabajos que se han realizado para conocer el significado de las mutaciones en el PBC han sido efectuados en Asia (Chan y col., 1999; Honda y col., 1999; Kurosaki y col., 1996; Takahashi y col., 1999), existiendo pocos datos sobre la prevalencia de estas mutaciones en otras áreas geográficas.

El objetivo principal de este estudio ha sido conocer la prevalencia y significado clínico de las mutaciones en el PBC del VHB en pacientes HBeAg positivo de nuestra área geográfica, así como su relación con la detección de las mutaciones en la región del precore que impiden la expresión del HBeAg y el genotipo viral. Con esta finalidad se han analizado muestras de suero de 182 pacientes con infección por el VHB, de los que en 129 se obtuvieron secuencias correspondientes a la regiones del PBC (posiciones 1742-1849), y del precore (posiciones 1814-1900). Las variantes del PBC y de la región precore se han relacionado con la replicación del VHB y la lesión histológica hepática.

#### **5.1.1.1. Distribución de las mutaciones del promotor básico del gen precore-core del VHB.**

De las 129 secuencias analizadas se detectaron mutaciones en el fragmento del PBC en 106 (82%) casos. Al examinar las diferentes zonas funcionales: regiones TA1 (nucleótidos 1750-1755), TA2 (1758-1762), TA3 (1771-1775), TA4 (1788-1795), 5' ARNprecore (1782-1786) (1791-1796), 5' ARNpregenómico (1810-1820), Inr del ARNcore o ARNpregenómico (1817-1820) y el nucleótido en la posición 1764, se observaron cambios en las regiones TA1, TA2 y posiciones 1764 y 1810-1820. Las mutaciones

encontradas con mayor frecuencia estaban situadas en la posición 1764 (76% de las secuencias mutadas), en la región TA2 (68% de las secuencias mutadas), región TA1 (49% de las secuencias mutadas) y posiciones 1810-1820 (32% de las secuencias mutadas). En las demás regiones del PBC se ha observado un elevado grado de conservación, lo que parece indicar la importancia funcional de estas secuencias para la replicación del VHB.

Aunque las mutaciones del PBC han sido analizadas previamente en un número importante de estudios, existen escasos trabajos que realicen un reconocimiento minucioso de toda la secuencia, ya que algunos de ellos han utilizado métodos como la técnica de PCR-RFLP o PCR alelo específico que únicamente posibilitan detectar mutaciones puntuales y, por este motivo, se han limitado a examinar las sustituciones en las posiciones 1762 y 1764 (Lindh y col., 1998; Takahashi y col., 1995). En nuestro estudio se ha empleado una técnica de PCR y secuenciación con la que se ha analizado un fragmento de 107 pb del PBC. La importancia de estudiar la totalidad de la secuencia del PBC ha quedado manifiesta ya que nos ha permitido examinar en profundidad todas las regiones funcionales, relacionarlas entre sí, así como conocer las zonas mejor conservadas. Al correlacionar las diferentes regiones del PBC hemos visto que el 99% de pacientes con mutaciones en la región TA2 tenían siempre mutaciones en la posición 1762 y que los cambios en la posición 1764 precederían a los cambios de la 1762 y a los de la región TA1. Además, la mutación en 1762 se detectó siempre acompañada de la mutación 1764, con lo que esta última posición estaba afectada en todos los casos en que lo estaban las zonas más frecuentemente mutadas. Así mismo, en el presente trabajo, al analizar los cambios en la secuencia del PBC y relacionarlos con los del precore del VHB, se ha visto que las mutaciones de las posiciones 1810-1813 del PBC se encontraron en pacientes de genotipo A con mutaciones en TA2 que, mayoritariamente, no presentaban mutaciones en la región precore que impiden la expresión del HBeAg. En un trabajo realizado por Kozak en 1986 se describe que mutaciones en la región comprendida entre los 4-5 nucleótidos inmediatamente anteriores a un codón de inicio de un gen afectan al grado de traducción de éste por los ribosomas eucarióticos. De esta manera, los cambios en las posiciones 1810-1813, posiciones anteriores al codón de inicio del gen precore-core (1814-1816), afectarían negativamente a la traducción de la proteína precursora del HBeAg. Por ello hemos considerado las posiciones 1810-1813 más propias de la región del precore que de la región del PBC. Sin embargo, es importante destacar que los cambios en estas posiciones se han descrito y tan sólo se han detectado de forma importante en población de raza negra de Sudáfrica, donde se han considerado una variante genotípica (Baptista y col., 1999).

Estudios de secuenciación similares han sido realizados por Honda y col. en el año 1999 y por Okamoto y col. en 1994, en áreas geográficas en las que la infección hepática causada por el VHB tiene peculiaridades diferentes ligadas con la edad del paciente en el momento de la primera infección, la evolución de la enfermedad y las características inmunológicas del huésped. En un estudio realizado por Okamoto y col. en 1994 en Japón (donde los genotipos mayoritarios son B y C) para conocer si las mutaciones del PBC afectaban la expresión del HBeAg, se clonaron fragmentos del ADN-VHB obtenidos de 34 pacientes HBeAg negativo y que posteriormente se secuenciaron, observando, al igual que en nuestro estudio, que la región TA4 (denominada TA3 por Okamoto) estaba muy bien conservada en todos los clones que habían obtenido. Resultados parecidos han sido previamente reportados (Kramvis y Kew, 1999), sugiriendo que la región TA4 es un elemento imprescindible para el mantenimiento de la infección por el VHB. Esta hipótesis está avalada por estudios *in vitro* que demuestran que las mutaciones en la región TA4 disminuyen de forma considerable la síntesis de ARN pregenómico (Yu y col., 1996).

Como se ha indicado previamente, al analizar globalmente los cambios en el PBC, la mutación más frecuentemente detectada ha sido la sustitución de una G por una A en la posición 1764 (76% de los casos mutados). Esta mutación se acompañó en el 90% de los casos por la sustitución de una A por una T en la posición 1762. En ninguna secuencia se encontró la mutación 1762 de manera aislada. Las mutaciones 1762 y 1764 han resultado también ser las mayoritariamente observadas en estudios realizados en diferentes áreas geográficas (Erhardt y col., 2000; Honda y col., 1999; Nishizono y col., 1995; Okamoto y col., 1994; Kidd-Ljunggren y col., 1997), aunque con frecuencias diferentes en función de la población analizada. En nuestro estudio la prevalencia de la mutación en la posición 1764 sería todavía más importante (95%) si, como se ha explicado con anterioridad, consideramos los cambios en las posiciones 1810-1817 como alteraciones de la región precore. Este dato, y el hecho de que la posición 1764 está mutada siempre que lo están las otras regiones estudiadas del PBC, indicarían que el análisis de la posición 1764 es el más sensible para el estudio de las mutaciones en el PBC.

### **5.1.1.2. Relación de las mutaciones del promotor básico del gen precore-core con la expresión de HBeAg, la concentración de ADN-VHB, el genotipo viral y la lesión histológica hepática.**

Las mutaciones en las posiciones 1762-1764 del PBC se han asociado preferentemente con la hepatitis crónica HBeAg negativo, puesto que se han detectado en el 83% de los pacientes HBeAg negativo con ALT fluctuante y en el 69% de los HBeAg negativo con ALT elevada. Sin embargo, también se han detectado, mutaciones en los pacientes con hepatitis crónica HBeAg positivo con ALT elevada, y en los portadores asintomáticos (HBeAg negativo), aunque con una frecuencia menor (47% y 52%, respectivamente). La asociación entre las mutaciones del PBC y el fenotipo HBeAg negativo ha sido descrito ampliamente (Erhardt y col., 2000; Hou y col., 1999; Lindh y col., 1998).

El mecanismo de selección de las mutaciones 1762-1764 no está bien determinado; únicamente en un estudio experimental se ha encontrado una fuerte relación entre estas mutaciones y la transcripción del ARNprecore y en consecuencia la síntesis de HBeAg (Moriyama y col., 1996). Otros estudios han encontrado una relación moderada (Buckwold y col., 1996; Buckwold y col., 1997; Gunther y col., 1998), por lo que sugieren que modulan pero no suprimen la expresión del HBeAg. La implicación de los cambios 1762-1764 en la negativización del HBeAg ha sido examinado por Lindh y col. en un trabajo efectuado en el año 1998 en el que estudiaron las mutaciones 1762 y 1764 en un grupo de pacientes con hepatitis crónica antes y después de la seroconversión anti-HBe, observando que básicamente en la fase inicial de la hepatitis crónica la secuencia del PBC de la variante no mutada era la dominante y que las variantes mutadas eran seleccionadas (haciéndose predominantes) a lo largo de la evolución de la infección, como resultado de la inmuno activación durante la seroconversión. Los resultados de nuestro estudio están de acuerdo con esta última observación. Estos datos son de sumo interés ya que indicaría que el VHB puede eludir la respuesta inmune del individuo, mediante la reducción de la expresión del HBeAg por dos mecanismos: por medio de las mutaciones en el precore del VHB (actuando a nivel del mecanismo de traducción proteica) y también gracias a las mutaciones en el PBC (reduciendo la transcripción del ARNprecore). Sin embargo, no hay que descartar que las mutaciones en el PBC puedan tener otros efectos que no estén relacionados con la regulación de la transcripción. Hay que tener en cuenta, por ejemplo, que las mutaciones en las posiciones 1762 y 1764 son las responsables de los cambios de los aminoácidos lisina a valina y de metionina a isoleucina en las posiciones 130-131 de la proteína X, lo que puede tener influencia para la estructura de esta proteína viral cuya función no ha sido totalmente aclarada. Otros efectos de estas mutaciones podrían estar asociados con la alteración de la estructura del ARN (Kidd y col., 1996).

En nuestro estudio, y a diferencia de la mayoría de los previamente publicados, la modificación de la expresión del HBeAg ligada a los cambios en la secuencia del PBC se ha valorado mediante la determinación de las concentraciones séricas de HBeAg utilizando una técnica de RIA cuantitativo. Se ha observado que los pacientes que presentaban la variante normal, no mutada, en las posiciones 1762 y 1764 del PBC tenían una mediana de concentración de HBeAg (796 UPE/mL) muy superior a la detectada en los pacientes con variante mutada (53 UPE/mL). Las diferencias entre los dos grupos eran próximas a la significación estadística. Estos resultados confirman plenamente la observación de los análisis realizados *in vitro*, que las mutaciones 1762 y 1764 disminuyen de forma notoria la expresión del HBeAg, pero que no la anulan.

Es interesante comentar que la prevalencia de mutaciones en el PBC ha sido similar en los grupos de pacientes con hepatitis crónica HBeAg positivo y en el de portadores asintomáticos HBeAg negativo, a pesar de que estos dos grupos se pueden considerar que están en los extremos opuestos respecto a la evolución de la infección por el VHB. Los pacientes con hepatitis crónica HBeAg positivo presentaban en general replicación del VHB alta y un tiempo de infección corto, mientras que en los portadores asintomáticos ocurría lo opuesto, siendo además HBeAg negativo. En este momento no tenemos un razonamiento para explicar la concordancia en este porcentaje, que, por otra parte, hay que destacar que era significativamente inferior al observado en los pacientes con hepatitis crónica HBeAg negativo tanto con valores de ALT elevados como con valores de ALT fluctuante. Una menor proporción de mutaciones en portadores asintomáticos ha sido también descrita previamente en diferentes áreas geográficas, Asia y Africa (Baptista y col., 1999; Chan y col., 2000; Hou y col., 1999). En estos trabajos se observan diferencias en la prevalencia de mutaciones entre los portadores asintomáticos HBeAg positivo (mayoritarios en estas áreas) y los pacientes con hepatitis crónica HBeAg positivo. Dado que en nuestra población es poco frecuente la situación de portador asintomático HBeAg positivo, en el presente estudio no se ha podido confirmar los resultados observados por estos autores. Finalmente, a diferencia de las investigaciones que señalan que la presencia de mutaciones en el PBC están asociadas a la hepatitis

crónica, independientemente del carácter HBeAg (aunque predominan en pacientes HBeAg negativo) (Orito y col., 2001; Hou y col., 1999) nuestros resultados apuntan a que se ha de tener en cuenta este carácter para demostrar esta asociación dado que como se ha indicado anteriormente hemos encontrado una frecuencia similar de mutaciones en los portadores asintomáticos HBeAg negativo y en los pacientes con hepatitis crónica HBeAg positivo.

Al determinar las concentraciones de ADN-VHB mediante la técnica de PCR a tiempo real se observó que la mediana de la concentración era mayor en el grupo de pacientes con hepatitis crónica con valores elevados de ALT, tanto en los HBeAg positivo como en los HBeAg negativo ( $3.8 \times 10^8$  y  $6.6 \times 10^6$  copias/mL, respectivamente), mientras que era más baja en las hepatitis crónicas HBeAg negativo con valores de ALT fluctuantes ( $4.5 \times 10^4$  copias/mL) y en los portadores asintomáticos ( $1.1 \times 10^4$  copias/mL). Al relacionar las mutaciones en el PBC con la concentración de ADN-VHB no se observaron globalmente diferencias entre los pacientes que tenían la secuencia normal y los que tenían la secuencia mutada, en ninguno de los grupos estudiados. Un hallazgo interesante fue encontrar que en el grupo de pacientes HBeAg negativo con ALT elevada infectado por el VHB de genotipo A, la presencia de mutaciones estaba relacionada con una disminución de la concentración de ADN-VHB, que era significativa al analizar aisladamente la posición 1762.

Existen resultados discordantes en cuanto a la relación de las mutaciones del PBC con la replicación del VHB. Mientras que en algunos estudios *in vitro* se ha sugerido que estas mutaciones incrementan la producción de viriones hasta en dos o tres veces, lo que explican por un aumento en la transcripción del ARN pregenómico (Moriyama y col., 1996) o por un aumento en la encapsulación del genoma debido a una menor expresión del HBeAg (Buckwold y col., 1996; Scaglioni y col., 1997), este incremento no se ha confirmado en una investigación llevada a cabo posteriormente por Günther y col., en 1998. Además, al igual que en nuestro estudio, la mayoría de análisis realizados *in vivo* coinciden en que la variante del VHB normal y la mutada tienen una replicación viral similar (Baptista y col., 1999; Bozdayi y col., 2001; Chan y col., 2000) y únicamente en un ensayo llevado a cabo por Erhardt y col. en el año 2000 en pacientes con viremias elevadas candidatos a tratamiento con interferón se ha encontrado un discreto aumento de ADN-VHB en los pacientes que presentaban la mutación 1764. Por último, como se ha comentado previamente, de los resultados de nuestro estudio se desprenden datos que parecen relacionar la presencia de mutaciones en el PBC con una menor concentración de ADN-VHB, observación que también ha sido comentada por otros autores (Grandjacques y col., 2000; Chan y col., 2000). De todo lo anteriormente expuesto se deduce que, aunque los experimentos que se han realizado *in vitro* sugieren que las mutaciones en el PBC, a nivel molecular, pueden justificar el aumento de replicación viral, no existen resultados concluyentes a este respecto en los trabajos realizados *in vivo*. La discrepancia observada podría ser debida principalmente a que en la replicación del VHB *in vivo* están involucrados otros factores, que no intervienen en los estudios de laboratorio, especialmente la respuesta inmune del individuo. Aunque también se ha de tener en cuenta que la mayoría de los estudios que se han llevado a cabo han incluido grupos muy heterogéneos de pacientes con importantes diferencias en el tiempo de seguimiento, etnia, evolución de la hepatitis crónica, e incluso en la metodología empleada para la cuantificación de ADN-VHB; de esta manera los resultados presentados son conflictivos en cuanto al impacto de las mutaciones en la replicación viral.

Al realizar el genotipado de las secuencias de los 129 pacientes ADN-VHB positivo y analizar globalmente la prevalencia de los genotipos A y D, observamos que el genotipo D se encontraba en un porcentaje ligeramente superior al genotipo A (50% vs 43%). Al relacionar los genotipos virales con el estadio HBeAg, se vio que el genotipo A era el más frecuente en los pacientes HBeAg positivo (60% de los casos) mientras que el genotipo D lo era en los pacientes HBeAg negativo con ALT elevada (60%). La distribución de genotipos del VHB en nuestra área está en concordancia con un estudio realizado previamente en España (Rodríguez y col., 1995) y con otros llevados a cabo en el área Mediterránea donde se ha visto que el genotipo D es el mayoritario en los pacientes con hepatitis crónica HBeAg negativo (Grandjacques y col., 2000; Lindh y col., 1996). En el presente trabajo llama la atención que la frecuencia de pacientes con genotipo D observada en la población HBeAg negativo era inferior a la esperada por los resultados de estudios previos realizados en áreas geográficas próximas. Este hecho podría ser debido a que en nuestra población HBeAg negativo se han incluido dos grupos de pacientes con enfermedad hepática menos severa (HBeAg negativo con ALT fluctuante y portadores asintomáticos) en los cuales la distribución de los genotipos A y D del VHB era al 50% aproximadamente. Estos grupos de pacientes no se han tenido en cuenta en otros estudios (Grandjacques y col., 2000; Lindh y col., 1996). Estos datos sugieren la necesidad de un estudio epidemiológico a gran escala en el que se consideren las características clínicas de los pacientes.

Al estratificar los pacientes por el genotipo viral y relacionar la presencia de las mutaciones del PBC con los genotipos mayoritarios A y D, vimos que en general los pacientes infectados por el VHB de genotipo A tenían más mutaciones que los infectados por el genotipo D, sin embargo, esta asociación no era

significativa en ninguno de los grupos de pacientes estudiados, resultado que no nos permitiría descartar que la presencia de mutaciones del PBC sea dependiente del genotipo viral. Esta falta de correlación entre genotipos y mutaciones en el PBC se ha puesto también de manifiesto en un trabajo realizado por Grandjacques y col. en Francia, en el que observaron que las mutaciones en el PBC estaban distribuidas por igual en todos los genotipos. Sin embargo, en contraste, un estudio realizado por Chan y col. en China en 1999 apuntaba a que los cambios de las posiciones 1762-1764 estaban preferentemente seleccionadas en pacientes que no presentaban las mutaciones en la región del precore del VHB, en particular en los pacientes con genotipo C en los que es poco habitual la emergencia de la mutación en la posición 1896 del gen precore que crea un codón "stop" que impide la expresión del HBeAg. Los autores indican que en estos casos la mutación en el PBC sería un sistema alternativo para el aclaramiento del HBeAg. Sin embargo, en nuestro estudio, a diferencia de lo observado por Chan y col. hemos visto que muchos pacientes con mutaciones en el PBC también las tenían en la región precore. En cambio nuestra observación que pacientes con genotipo A presentaban mutaciones en el PBC y no en el precore, estaría de acuerdo con lo manifestado por Chan y col. de que en el caso del genotipo C se puede alcanzar el estadio HBeAg negativo mediante las mutaciones en el PBC. Finalmente, al estratificar los pacientes por genotipo viral y analizar las mutaciones en toda la secuencia del PBC, encontramos que los cambios en la posición 1752 parecen corresponder a una variedad del genotipo D ya que se han detectado en un 19% de las secuencias de genotipo D y únicamente en un 2% de las secuencias de genotipo A, y no se han asociado a ningún grupo de pacientes ni situación clínica, por lo que las sustituciones en esta posición no se considerarían mutaciones del PBC. El hecho de que algunas alteraciones en la secuencia del PBC reflejen características propias de algunos genotipos, ha sido sugerido por otros autores. Lindh y col. en 1998, en un estudio realizado en Asia (donde los genotipos mayoritarios son el B y el C) encontraron que las modificaciones en las posiciones 1726-1730 estaban asociados con el genotipo B mientras que las sustituciones de la posición 1802 del PBC lo estaban con el B y el C. En otro estudio desarrollado en África del Sur por Baptista y col. se observó que la sustitución en la posición 1812 correspondía a una variante genotípica propia de esta área geográfica. Por este motivo estos dos autores consideraron útil conocer estas variaciones en la secuencia de nucleótidos del PBC para distinguir los genotipos virales.

Al valorar la incidencia de las mutaciones en relación a la lesión histológica hepática se evidenció que los pacientes con CH tenían una mayor proporción de variantes del VHB mutadas en las posiciones 1762 y 1764 (especialmente en la 1762) que los pacientes con HCA. Resultados parecidos han sido encontrados en otros trabajos realizados en pacientes de diferentes áreas geográficas (Baumert y col., 1998; Chen y col., 1998; Hou y col., 1999; Laskus y col., 1995; Lindh y col., 1999; Paul y col., 1997; Tahahaski y col., 1995). La relación entre las mutaciones y la hepatitis crónica se ha visto también en estudios longitudinales realizados en pacientes HBeAg negativo, en los que se ha comprobado que las variantes mutadas emergen en la progresión a CH, por lo que ha considerado que su detección sería un marcador de pronóstico (Lindh y col., 1998; Takahashi y col., 1995). Sin embargo, y en contraste con los datos anteriores, en otras publicaciones no se ha visto esta asociación (Chan y col., 2000; Chun y col., 2000).

Existe la certeza de que la respuesta inmune del individuo, tanto celular como humoral, es la principal causa de la lesión hepática en la fase replicativa viral en la que los epítomos comunes al antígeno HBeAg (cuya expresión es controlada por el PBC) y al HBcAg se expresan en la membrana del hepatocito. Un estudio reciente realizado por Milich y col en 1997 en animales de experimentación ha demostrado que la respuesta inmune frente al HBcAg y HBeAg es diferente. Estos autores indican que el HBeAg estimula la respuesta inmunitaria de tipo TH<sub>2</sub> caracterizada por la producción, entre otras, de las interleukinas IL4 y IL10 que tienen un efecto antiinflamatorio. Mientras que, el HBcAg potencia la respuesta inmune de tipo TH<sub>1</sub> en la que se producen, entre otras interleukinas, la IL2 y el interferón gamma, factores necesarios para la expresión del MHC de clase I, que, como se sabe, son imprescindible para la respuesta citotóxica de los linfocitos T (CD8+/CTL), causa principal de la lesión hepática. Las respuestas TH<sub>1</sub> y TH<sub>2</sub> son mutuamente inhibitorias y, de esta manera, el HBeAg potenciaría la respuesta antiinflamatoria TH<sub>2</sub> y regularía negativamente la respuesta TH<sub>1</sub>, por lo que disminuiría la respuesta citotóxica y la eliminación viral. Apoyándonos en este hecho se puede suponer que la menor expresión del HBeAg, observada en los casos con mutaciones en el PBC, disminuiría la estimulación de la respuesta TH<sub>2</sub>, e incrementaría la respuesta TH<sub>1</sub> y la actividad citotóxica, y por lo tanto la severidad de la lesión hepática. No obstante, este mecanismo no explica todos los estadios clínicos relacionadas con la infección por el VHB, como es el caso de los portadores asintomáticos HBeAg negativo, en los que no hay afectación hepática a pesar de que la no expresión del HBeAg. Una posible explicación de este último fenómeno podría estar en la diferente distribución de las subclases de las IgGs que reflejaría una respuesta mediada por células T diferente a la observada en pacientes con hepatitis crónica (Milich y col., 1997). En el caso de las hepatitis crónicas HBeAg positivo con ALT elevada, la presencia del HBeAg no parece ser suficiente

para inhibir la respuesta citotóxica, probablemente debido al elevado nivel replicativo viral, que comporta la sobreexpresión del HBcAg y, en consecuencia, el aumento de esta respuesta.

Dado que los resultados de nuestro estudio indican que las mutaciones en el PBC no afectan a la replicación del VHB, ya que, como se ha comentado previamente, las concentraciones de ADN-VHB eran similares en los pacientes infectados por el VHB con secuencias mutadas y no mutadas, se podría pensar que el daño hepático estaría relacionado principalmente con la respuesta inmune del individuo. Probablemente, las mutaciones del PBC del VHB emergerían como resultado de la presión evolutiva ejercida por el sistema inmunológico, lo que representaría para el VHB mecanismo de escape de la respuesta inmune de forma que la infección perduraría en los hepatocitos infectados por las variantes mutadas.

Al estratificar los pacientes con hepatitis crónica por genotipos virales y estudiar la relación entre las mutaciones en el PBC y la lesión histológica, vimos que en el genotipo D los pacientes con CH tenían más mutaciones en el PBC que los pacientes con HCA, mientras que esta asociación no se observaba para el genotipo A. Finalmente, para un tiempo de infección conocido determinado (menor de 7.5 años) se observó que los pacientes de genotipo A presentaban una proporción tres veces mayor de casos con CH que los pacientes con genotipo D, lo que parece sugerir que el genotipo A está asociado a un desarrollo de lesión hepática grave. Este resultado se podría explicar si se tiene en cuenta el mayor nivel replicativo del genotipo A, que refleja la proporción superior de pacientes HBeAg positivo. Es interesante puntualizar que todos los trabajos que han analizado conjuntamente las mutaciones en el PBC, el genotipo viral y la lesión histológica han sido llevados a cabo en la población asiática (Lindh y col., 1998; Lindh y col., 1999; Orito y col., 2001), por lo que resultaría interesante que estos análisis se llevaran a cabo en otras áreas geográficas en la predominen las infecciones causadas por el VHB de otros genotipos. Resultados análogos en el sentido de que un genotipo determinado está ligado a lesión hepática más severa han sido obtenidos en un trabajo realizado por Orito y col. en el año 2001 en el que han analizado pacientes de genotipo B y C. Estos autores observaron que las mutaciones en el PBC eran más frecuentes en el genotipo C, encontrando una asociación entre las mutaciones en el PBC con el genotipo C y enfermedad hepática más severa. Estos datos estarían de acuerdo con los obtenidos en nuestro estudio para el genotipo A. Además estos autores encontraron que en la población HBeAg positiva, el genotipo C era el mayoritario, situación análoga a la de nuestro estudio en relación con el genotipo A.

Es importante tener en cuenta que a largo de todo este apartado únicamente hemos valorado las mutaciones del PBC por lo que no se han considerado las mutaciones en la región precore que, como se verá más adelante, se han relacionado con la replicación del VHB, el estadio HBeAg y el tipo de lesión histológica hepática.

### *5.1.2. ESTUDIO DE LAS MUTACIONES DE LA REGIÓN DEL PRECORE DEL VHB.*

Las mutaciones en la región del precore del VHB se detectan en una proporción significativa de pacientes con hepatitis crónica HBeAg negativo, en los que la seroconversión no se acompaña de la disminución de la replicación viral (Akarca y col., 1994; Lok. y col., 1994). La mutación más frecuentemente detectada ha sido el cambio de una G por una A en la posición 1896 de la secuencia del genoma del VHB. Esta mutación genera la aparición de una señal "stop" (TAG) en el codon 28 de la región precore, (Brown y col., 1992; Carman y col., 1989), que impide la expresión del HBeAg, proteína viral, que, aunque no es necesaria para la replicación del VHB o la transmisión de la infección, es la diana de los anticuerpos anti-HBe. Por esta razón, la variedad mutada HBeAg negativo puede eludir la respuesta inmune anti-HBe manteniéndose la replicación (Schlicht y col., 1987; Schlicht y col., 1991)

En este apartado las mutaciones de la secuencia del gen precore del VHB (posiciones 1814-1900) se han analizado en las muestras de suero de los 129 pacientes ADN-VHB positivo en los que también se han estudiado las mutaciones del PBC. Al igual que en el análisis efectuado en la región del PBC, las variantes mutadas se han relacionado con la detección de HBeAg, concentración de ADN-VHB, genotipo viral y lesión histológica hepática.

### **5.1.2.1. Distribución de las mutaciones de la región del precore del VHB.**

Al analizar la secuencia completa de la región precore se detectaron mutaciones que impedían la expresión del HBeAg en el 63% de las 129 secuencias incluidas en el estudio. Las mutaciones encontradas correspondían a: la posición 1896, en la que el cambio de una G por una A producía una señal “stop” en el codon 28; posiciones 1814-1816, que alteraban el codon de inicio de la proteína precursora del HBeAg; y a la posición 1817, en la que el cambio de una C por una T producía una señal “stop” en el codon 2. Otras mutaciones que también impedían la expresión del HBeAg correspondían a deleciones, inserciones y otros códones “stop”. Las mutaciones más frecuentemente detectadas estaban en la posición 1896 (73% de las secuencias mutadas) y en las posiciones 1814-1817 (23% de las secuencias mutadas). La mayor prevalencia de la mutación de la posición 1896 ha sido descrita ampliamente en las publicaciones que tratan de la epidemiología de las variantes del precore del VHB (Ballard y col., 2000; Knöll y col., 1999; Lok y col., 1994; Okamoto y col., 1990; Rodríguez y col., 1995). Además de estas mutaciones que impedían la expresión del HBeAg se detectaron otras (entre ellas las sustituciones en las posiciones 1858, C→T, y 1899, G→A) que no afectaban a la síntesis del HBeAg pero que se encontraron fuertemente asociadas con la mutación en la posición 1896. En estudios anteriores se ha descrito que las sustituciones en las posiciones 1858 y 1899, juegan un papel importante en la estabilización de la señal de encapsulación del ARN pregenómico y en consecuencia en la replicación del VHB (Rodríguez y col., 1995; Tong y col., 1993). En nuestro trabajo estas mutaciones se observaron en el 82% y el 46%, respectivamente, de los casos con mutaciones en la secuencia del precore. La mutación principal en la posición 1896 se acompañó en el 100% de los casos de una T en la posición 1858. Este hecho se justificaría debido a que los nucleótidos de las posiciones 1858 y 1896 se aparean en la estructura de encapsulación siendo la complementariedad de las bases (C1858/G1896 o T1858/A1896) lo que aumenta la estabilidad de esta señal. Al igual que para estas dos posiciones la mutación en la posición 1899 (G→A) también aumenta la estabilidad de la señal. (Laskus y col., 1994; Lok y col., 1994; Tong y col., 1992).

A pesar de la gran variedad de mutaciones que se detectan en la región precore del VHB, la mayoría de los trabajos publicados se han limitado solamente a seleccionar la mutación 1896 del precore para valorar los cambios en toda la región y estudiar su relación con la hepatitis crónica causada por el VHB. En el presente estudio, el examen de esta posición aislada habría supuesto una pérdida de sensibilidad del 27%. Por este motivo, la secuenciación de toda la región completa es importante para reconocer todas las posibles mutaciones. No obstante, si no se dispone de un método de secuenciación, con el análisis puntual de las dos mutaciones mayoritarias se tendría una sensibilidad que permitiría la detección del 90% de las secuencias mutadas.

### **5.1.2.2. Relación de las mutaciones de la región del precore con el HBeAg, la concentración de ADN-VHB, el genotipo viral y la lesión histológica hepática.**

Se han detectado sustituciones en la región del precore en el 77% de los pacientes HBeAg negativo con hepatitis crónica y en 65% de los portadores asintomáticos HBeAg negativo, por lo que las sustituciones en la región del precore se han asociado con éste estadio. La prevalencia de mutaciones en el grupo de hepatitis crónica es comparable a la observada en un estudio recientemente publicado en Francia con una casuística análoga (Grandjacques y col., 2000), y ligeramente superior al observado en dos recientes estudios en Alemania y Reino Unido (aproximadamente el 60%) (Ballard y col., 2000; Knöll y col., 1999). Por el contrario, es inferior a la detectada en un trabajo realizado por Brunetto y col. en 1991 en Italia donde el 95% de pacientes con hepatitis crónica HBeAg negativo presentaban mutaciones en esta región. En Asia se han realizado numerosos trabajos con resultados dispares en cuanto a la prevalencia de estas mutaciones, entre un 25% y un 90%, aproximadamente, en trabajos realizados en Japón (Nagasaka y col., 1998; Okamoto y col., 1994), o en torno al 50% en trabajos realizados en China (Hou y col., 1999; Chan y col., 2000). En general, los datos que existen en la literatura en relación con la epidemiología de las mutaciones en la región precore son difíciles de comparar debido a que en la mayoría de los estudios clínicos se han incluido pacientes con patología hepática variada y las mutaciones analizadas no han sido siempre las mismas en todos ellos; en algunos trabajos tan solo se ha valorado la mutación principal correspondiente a la posición 1896. Además, estos resultados reflejan una amplia diversidad en el origen



étnico y, por lo tanto, diferencia entre los genotipos del VHB, que en algunos de estos estudios no han sido determinados. Hay que tener también en cuenta que la tecnología empleada en los primeros estudios (Brunetto y col., 1991) requería trabajar con concentraciones altas de ADN-VHB, sesgándose la población y, por lo tanto, obteniéndose resultados que no reflejarían la prevalencia. En contraste, nuestro estudio incluye un número significativo de pacientes con homogeneidad étnica y geográfica, con un largo seguimiento y que no habían recibido previamente terapia antiviral o inmunosupresora, por lo que el estadio HBeAg negativo refleja la evolución natural de la infección por el VHB.

Es de destacar el hecho de que un 23% de nuestros pacientes HBeAg negativo no tenían mutaciones en la región del precore, y se podría especular sobre la causa por la cual en estos portadores ADN-VHB positivo no se detecta el HBeAg. Una razón posible podría ser la presencia de mutaciones en la secuencia del PBC como las correspondientes a las posiciones 1810-1813 que, como se ha comentado previamente, están situadas en las tres posiciones anteriores al codón de inicio del gen precore y afectarían negativamente la traducción de la proteína precursora del HBeAg (Kozak y col., 1986). No deben descartarse tampoco alteraciones en otras regiones funcionales reguladoras del HBeAg, aunque, y como se ha indicado con anterioridad (Estudio de las mutaciones en el PBC, apartado 5.1.2.1), los cambios en estas regiones serían responsables de una disminución de la transcripción, lo que provocaría una menor concentración de HBeAg suficiente para que fuese indetectable por los EIA convencionales pero no para impedir completamente su expresión. Otra posibilidad sería que la alteración de la secuencia de aminoácidos de la proteína precursora del HBeAg en zonas imprescindibles para su procesamiento intracelular impidieran el correcto desarrollo del proceso que da lugar a la secreción del HBeAg (Kramvis y col., 1997). Finalmente, hay que tener en cuenta que no siempre el estadio HBeAg negativo está asociado con mutaciones en el genoma, sino que, en algunos casos, podría ser debido a que el HBeAg no es detectable utilizando las técnicas convencionales debido a un exceso de anticuerpo anti-HBe y, de esta manera, el HBeAg producido se encontraría en forma de inmunocomplejos (Loriot y col., 1995).

En el grupo de pacientes con hepatitis crónica HBeAg positivo, únicamente el 17% de los casos presentaban mutaciones en la región del precore; todos ellos tenían una población viral mixta constituida por la variante mutada y no mutada. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos que han descrito en pacientes con hepatitis crónica HBeAg positivo una prevalencia de entre un 0% y un 34% de casos con mutaciones en el precore (Brunetto y col., 1991; Niitsuma y col., 1997; Cabrerizo y col., 1998; Nagasaka y col., 1998). La mediana de la concentración de HBeAg en los casos que presentaban la variante mutada era de 43 UPE/mL, mientras que en los casos con la variante normal era de 792 UPE/mL. Estos datos sugerían que aquellos pacientes con la variante mutada podrían estar en una fase próxima a la seroconversión. Aunque nuestro estudio no permite confirmarlo, esta hipótesis no resultaría sorprendente dado que se ha descrito que en la evolución natural de la infección crónica por el VHB hay un 3% anual, aproximadamente, de portadores HBeAg positivo que seroconvierten a anti-HBe de una manera espontánea (Hoofnagle, 1981; Viola y col., 1981).

Finalmente, llama la atención que la proporción y el tipo de sustituciones en la secuencia del precore encontradas en los portadores asintomáticos HBeAg negativo fueran similares a las observadas en las hepatitis crónicas HBeAg negativo, independientemente de la concentración de ADN-VHB, lo que indica que el análisis aislado de la región precore no permitiría diferenciar una hepatitis crónica HBeAg negativa de un portador asintomático HBeAg negativo. En este punto se ha de recordar que en la región del PBC, y a diferencia de lo observado en el precore, los portadores asintomáticos y las hepatitis crónica HBeAg positivo presentaban un porcentaje similar de mutaciones. Estos resultados sugieren que el análisis conjunto de las dos regiones permite distinguir a nivel de las características genómicas la hepatitis crónica del estadio de portador asintomático.

Como se ha comentado con anterioridad, al analizar la distribución de los genotipos mayoritarios A y D hemos observado que globalmente había una mayor prevalencia de pacientes infectados por el VHB de genotipo D. Estos datos están de acuerdo con un trabajo preliminar realizado por nuestro equipo en España (Rodríguez y col., 1995) y por otros investigadores en el área Mediterránea (Brunetto y col., 1991; Grandjacques y col., 2000; Lindh y col., 1996). Asimismo, encontramos que el genotipo A era el más frecuente entre los pacientes HBeAg positivo mientras que el genotipo D lo era entre los HBeAg negativo con ALT elevada. La distinta proporción de genotipos en relación al estadio HBeAg se ha descrito también en otros trabajos, tanto entre los genotipos A y D (Grandjaques y col., 2000) como entre los genotipos B y C (Lindh y col., 2000; Orito y col., 2001). Estos resultados se pueden justificar, como se verá más adelante, por el distinto mecanismo de selección de las mutantes en el precore en cada uno de los genotipos. Al estratificar los pacientes de acuerdo con el genotipo viral y examinar la relación con las mutaciones del precore, se apreció una clara asociación en el sentido de que un 80% de pacientes con genotipo D presentaban secuencias mutadas en el precore mientras que únicamente un 40% de genotipo A. El hecho de que la proporción de mutaciones en la posición 1896 (mayoritaria) sea superior en los pacientes con genotipo D que en los pacientes con genotipo A se explica, como se ha comentado con

anterioridad, por el apareamiento entre las posiciones 1858 y 1896 (complementariedad C/G o T/A). En el genotipo D es característica una T en la posición 1858, por lo que la emergencia de una A en la posición 1896 permite un correcto apareamiento. En el genotipo A, por lo contrario, en la posición 1858 es característica una C, por lo que la sustitución de una A en la posición 1896 rompería el apareamiento que ya existe. En el caso del genotipo A, para conseguir un nuevo apareamiento tendría que darse una segunda mutación que cambiaría una C por una T en la posición 1858, fenómeno que resulta más improbable (Lok y col., 1994; Tong y col., 1993).

Finalmente, las mutaciones de las posiciones 1814-1817 que también impiden la expresión del HBeAg eran más frecuentes en el genotipo A (aproximadamente el doble del genotipo D). Este resultado se podría explicar por la dificultad, comentada con anterioridad, que representa la emergencia de la variante mutada 1896 en el genotipo A, por lo que en este genotipo, las mutaciones en las posiciones 1814-1817 representarían un mecanismo alternativo a la mutación en la posición 1896 para no expresar el HBeAg. La baja proporción de las mutaciones en las posiciones 1814-1817, en comparación con las de la posición 1896, podría estar relacionado con el papel de éstas en la expresión del ARN pregenómico, ya que estas posiciones forman parte de la región de inicio de la transcripción de este ARN (Lindh y col., 1996). En contraste, la mutación en la posición 1899, que no impide la expresión del HBeAg, resultó también más frecuente en el genotipo D, lo que no era de extrañar debido a la asociación que existe entre las mutaciones de las posiciones 1896 y 1899. Ambas posiciones forman parte de la señal de encapsulación y el correcto apareamiento de las mismas incrementa la estabilidad de esta señal (Rodríguez y col., 1995; Tong y col., 1993).

El estudio de la concentración del ADN-VHB mostró diferencias significativas entre los cuatro grupos de pacientes, con una tendencia lineal decreciente en el sentido HBeAg positivo ALT elevada (mediana ADN-VHB  $3.8 \times 10^8$  copias/mL), HBeAg negativo con ALT elevada ( $6.6 \times 10^6$  copias/mL), HBeAg negativo con ALT fluctuante ( $4.5 \times 10^4$  copias/mL) y portadores asintomáticos ( $1.1 \times 10^4$  copias/mL). Al correlacionar las mutaciones en el precore con la replicación del VHB observamos que en el grupo HBeAg negativo con ALT elevada, las concentraciones más altas de ADN-VHB correspondían a los pacientes con mutaciones en la posición 1896 aisladamente o acompañada de cambios en la 1899. En este grupo, la mayor concentración de ADN-VHB relacionada con la posición 1896 se mostró claramente en los pacientes infectados por el genotipo D, explicándose por el correcto apareamiento de las posiciones 1858 y 1896 que aumenta la estabilidad de la señal de encapsulación del ARN pregenómico y en consecuencia la replicación del VHB. La elevación de los niveles de ADN-VHB relacionada con la posición 1899 se veía claramente en los pacientes con hepatitis crónica HBeAg negativo, tanto en los que tenían la ALT elevada como en los que presentaban valores de ALT fluctuantes. Este resultado era más evidente en el genotipo D que en el genotipo A. Finalmente, es de destacar la fuerte asociación entre la detección simultánea de las mutaciones 1896 y 1899 y el incremento significativo de la concentración del ADN-VHB en presencia de estas dos mutaciones, resultado observado principalmente en los casos HBeAg negativo con ALT elevada. La explicación de este aumento reside en una mejor estabilización de la señal de encapsulación por la presencia de mutaciones en las dos posiciones. En el genotipo A no se evidenció tan claramente este incremento debido, como se ha comentado previamente, al correcto acoplamiento que ya se da en las secuencias de las variantes del VHB no mutadas en el precore. La asociación entre mutaciones en la región del precore del VHB y el incremento en la concentración de ADN-VHB ha sido descrita en estudios *in vitro* que sugieren que la variante mutada replica mejor que la no mutada (Guidotti y col., 1996; Lamberts y col., 1993) y por estudios realizados *in vivo* (Tillmann y col., 1995). Sin embargo, es de destacar el hecho de que entre los grupos de pacientes HBeAg negativo, tanto hepatitis crónica como portadores asintomáticos, se observaron diferencias claramente significativas en la concentración del ADN-VHB y, no obstante, entre ellos no había suficientes diferencias en cuanto al número y tipo de mutaciones en la región precore que pudiesen justificar los distintos grados de replicación. Por lo tanto el análisis aislado de la región precore no permite explicar el distinto nivel de replicación del VHB en cada uno de estos grupos, por lo que se han de tener en cuenta otros factores tales como otras regiones del genoma de VHB o la respuesta inmune del individuo.

Al correlacionar variabilidad genómica y lesión histológica se vio que en el genotipo D la mutación en la posición 1896 podría estar relacionada con la CH. La asociación entre la severidad de la lesión hepática y la mutación precore ha sido expuesta también por otros autores (Carman y col., 1989; Tillmann y col., 1995). Sin embargo, existe confusión acerca del impacto de las mutaciones del precore ya que, por un lado, en nuestro estudio, al igual que en otras investigaciones, se han encontrado mutaciones en portadores asintomáticos con valores normales de ALT y concentraciones de ADN-VHB bajas o indetectables (Akarca y col., 1994; Fujiwara y col., 1998; Karayiannis y col., 1995; Karino y col., 2000). En segundo lugar, hemos observado que todos los análisis histológicos correspondientes a los pacientes HBeAg negativo con ALT fluctuante presentaban lesiones de HCA, lo que sugiere que en el desarrollo de la CH existen otros factores además de las mutaciones en la posición 1896.

Como se ha comentado previamente los resultados de los análisis efectuados *in vitro* (Guidotti y col., 1996; Lamberts y col., 1993) y alguno de los efectuados en pacientes con hepatitis crónica (Tillmann y col., 1995), como los obtenidos en el presente trabajo, demuestran que las mutaciones en el precore incrementan la multiplicación del VHB, justificándose la patogenicidad de las cepas mutadas (Brunetto y col., 1993). En nuestro trabajo se observó que los pacientes HBeAg negativo con ALT elevada, presentaban mayores concentraciones de ADN-VHB en presencia de las mutaciones en las posiciones 1896 y 1899. Por otro lado, se vio una relación entre las variantes mutadas para la posición 1899 y la CH, y que las posiciones 1896 y 1899 estaban relacionadas. La relación entre las aparición de la variante mutada en la posición 1899 y una enfermedad hepática severa también ha sido descrita por Chan y col. en el año 2000 y por Tillmann y col. en 1995. Estos resultados sugieren una asociación entre el nivel replicativo y la gravedad de la lesión hepática. En este punto, hay que tener en cuenta que las mutaciones en la región precore impiden la expresión del HBeAg, antígeno que, como se ha explicado previamente, modula negativamente la respuesta citotóxica responsable de la lesión hepática, por lo que la lesión hepática parece presentar una etiología multifactorial que incluye características del VHB y características propias del huésped.

También se observó que el tiempo conocido de infección de los pacientes HBeAg negativo con ALT fluctuante y portadores asintomáticos era superior al de los pacientes HBeAg negativos con ALT elevada y, sin embargo, la lesión hepática en este último grupo era más grave que en los primeros, a pesar de que los cambios observados en las posiciones 1896 y 1899 eran similares en los tres grupos. Esta situación se podría explicar si la gravedad de la lesión hepática se relacionara con la actividad replicativa del VHB, reflejada en las concentraciones del ADN-VHB, y en el tiempo en que el virus está replicando de manera continuada (presencia de valores elevados de ALT). De esta forma, se podría asumir que el VHB estaría activo permanentemente en los pacientes con ALT elevada, únicamente activo en los periodos con ALT elevada en los paciente con ALT fluctuante y no estaría activo en los pacientes con ALT normal, como es el caso de los portadores asintomáticos.

La explicación de los diferentes niveles de replicación así como el momento en que ocurren, podría venir determinada por la variabilidad de otras regiones del VHB no analizadas en este estudio, como por ejemplo la región del core, que codifica los epítomos que estimulan la respuesta citotóxica responsable del aclaramiento viral.

### ***5.1.3. RELACIÓN ENTRE LAS MUTACIONES DEL PROMOTOR BÁSICO DEL GEN PRECORE-CORE Y LAS DE LA REGIÓN PRECORE DEL VHB.***

En el grupo de pacientes con hepatitis crónica HBeAg positivo detectamos mutaciones en el PBC y/o precore del VHB en el 54% de los casos: 37% sólo en el PBC, 7% únicamente en la región del precore y 10% en las dos regiones. Al relacionar detección de mutaciones con la concentración del HBeAg se vio que la mediana de concentración de HBeAg era inferior en los pacientes con la variante mutada en el PBC. Estos resultados confirman la observación de los análisis realizados *in vitro*, que las mutaciones en el PBC disminuyen de forma notoria la expresión del HBeAg, pero que no la anulan. En relación con la detección de las mutaciones del precore que impiden la expresión del HBeAg hay que señalar que en todos los casos HBeAg positivo en los que se encontraron dichas mutaciones había una población viral mixta constituida por las variantes mutada y no mutada en esta región. La presencia de estas dos poblaciones estaría probablemente relacionada con el proceso de emergencia de la variante mutada, que no expresa el HBeAg, y la inmuno-eliminación de la variante del VHB no mutada HBeAg positiva. Un seguimiento longitudinal de estos casos permitiría confirmar la hipótesis de la selección y establecer la relación entre la presencia de mutaciones en la región del precore y el proceso de seroconversión a anti-HBe.

Al analizar globalmente las secuencias de ADN-VHB obtenidas de los pacientes con hepatitis crónica HBeAg negativo encontramos que el 96% de los casos presentaban mutaciones en el PBC y/o precore del VHB, de acuerdo con la siguiente distribución: el 24% tenían cambios únicamente en la región precore, 16% sólo en el PBC y el 56% restante presentaban cambios en las dos regiones. Nuestros resultados indican que la hepatitis crónica HBeAg negativo en nuestra área geográfica está asociada a nivel molecular con mutaciones en el PBC o en la región del precore del VHB. No obstante, tres pacientes HBeAg negativo con hepatitis crónica no presentaron mutaciones ni en el PBC ni en la región precore. Al especular sobre la causa por la cual en estos portadores ADN-VHB positivo no se detectaba el HBeAg se podría pensar, por ejemplo, en alteraciones en otras regiones funcionales reguladoras del HBeAg, tales

como la URR ("upper regulatory region") del promotor del gen precore-core o en zonas imprescindibles para el procesamiento intracelular de este antígeno tales como la secuencia de aminoácidos de la proteína precursora del HBeAg. Alteraciones en esta última región impedirían el correcto desarrollo del proceso que da lugar a la secreción del HBeAg (Kramvis y col., 1997). Finalmente, es importante tener en cuenta al interpretar un resultado HBeAg negativo en los casos con hepatitis crónica con mutaciones únicamente en el PBC, en los que sólo hay una disminución de la expresión del HBeAg, que la ausencia de este antígeno en suero podría ser debida a su baja concentración, por lo que un exceso de anticuerpo anti-HBe lo bloquearía en forma de inmunocomplejos, resultando indetectable por los métodos convencionales (Loriot y col., 1995).

En el estudio de la relación entre las variantes del PBC y del precore con los genotipos virales A y D de los pacientes HBeAg negativo con hepatitis crónica, se encontró que el 82% de pacientes infectados por el genotipo A presentaban mutaciones: el 8% sólo en el precore, el 38% sólo en el PBC y el 46% en ambas regiones; mientras que en el genotipo D todos los pacientes presentaban mutaciones bien en la región precore (27%), PBC (5%) o en ambas regiones (68%). De nuestros resultados se desprende que en las hepatitis crónicas con el carácter HBeAg negativo, las mutaciones del PBC son más frecuentes en los pacientes de genotipo A y que las mutaciones de la región precore son más frecuentes en el genotipo D. Hay que señalar que la diferencia en la proporción de mutaciones en el PBC entre estos dos genotipos es menos evidente que la diferencia en la proporción de mutaciones de la región del precore.

Las mutaciones en la secuencia de ADN-VHB de los portadores asintomáticos del HBsAg no han sido bien caracterizadas debido, en parte, a que en un número significativo de casos el ADN-VHB es indetectable o bien su concentración es muy baja, por lo que el proceso de caracterización mediante secuenciación es extremadamente laborioso y en ocasiones difícil de realizar. Este problema se ha evidenciado en nuestro estudio en el que tan sólo se han podido secuenciar un 35% de las muestras obtenidas de los portadores asintomáticos. En estos pacientes la mediana de la concentración de ADN-VHB observada fue de  $1 \times 10^4$  copias/mL, significativamente inferior a la detectada en los casos con hepatitis crónica. Al analizar las mutaciones en el PBC hemos visto que su prevalencia era similar en los portadores asintomáticos HBeAg negativo (57%) y en los pacientes con hepatitis crónica HBeAg positivo (47%), pero inferior a la proporción observada en los pacientes con hepatitis crónica HBeAg negativo (71%). Sin embargo, los pacientes con hepatitis crónica HBeAg positivo presentaban una replicación del VHB alta y un tiempo de infección corto, mientras que en los portadores asintomáticos ocurría lo opuesto, siendo además HBeAg negativo. Por el contrario, la proporción y el tipo de sustituciones en la secuencia del precore encontradas en estos pacientes fueron parecidas a las observadas en las hepatitis crónica HBeAg negativo, independientemente de la concentración de ADN-VHB. Estos resultados sugieren que el análisis conjunto de las dos regiones permite diferenciar a nivel molecular las infecciones por el VHB en el portador asintomático y el paciente con hepatitis crónica. En la práctica este estudio sería especialmente útil para establecer el diagnóstico diferencial entre portadores HBeAg negativo y hepatitis crónica HBeAg negativo con ALT fluctuante, que presentan una proporción semejante de mutaciones en el precore pero diferentes en el PBC (posiciones 1762-1764). En estos dos grupos el estudio de las posiciones 1762-1764 tendría una sensibilidad del 83% y un valor predictivo negativo del 78%. De esta manera se clasificarían correctamente la mayoría de pacientes con hepatitis crónica y ALT fluctuante, 83% aproximadamente (este porcentaje alcanzaría el 89% para el genotipo A). Por otro lado, la no detección de estas mutaciones indicaría en un 78% de los casos el estadio de portador asintomático.

Aunque la existencia de mutaciones en el PBC y en la región del precore en los portadores asintomáticos ha sido descrita previamente (Akarca y col., 1994; Baptista y col., 1999; Chan y col., 2000; Karino y col., 2000), el significado y la consecuencia de las mismas es de difícil interpretación. El portador asintomático HBeAg negativo representa la última etapa del curso natural favorable de la infección crónica por el VHB (Fujiwara y col., 1998), mientras que la presencia de mutaciones refleja la presión inmunológica y, en consecuencia, la selección de las variantes mejor adaptadas, que mantendrían la replicación al evadir la respuesta inmune. Por lo tanto, las mutaciones en este grupo de pacientes, con niveles replicativos tan bajos, no tendrían un significado claro, aunque se puede suponer que las mutaciones fueron seleccionadas en fases anteriores al estadio de portador asintomático (Fujiwara y col., 1998). Se ha de pensar también que probablemente existen otros factores ajenos a las regiones analizadas del virus y/o características inmunológicas propias de cada individuo que condicionan el estadio de portador asintomático y al mismo tiempo la detección de mutaciones.

El estudio de la región del ADN del VHB comprendida entre las posiciones 1742 y 1900 en todos los pacientes incluidos en este trabajo, nos ha permitido observar que en el genotipo A se encontraban pacientes HBeAg negativo con mutaciones en el PBC pero no en la posición 1896 del precore y que todos los pacientes con mutaciones en la posición 1896 del precore presentaban mutaciones en el PBC, mientras que en el genotipo D se encontraban pacientes HBeAg negativo con sólo mutaciones en la posición 1896. Estos resultados sugerirían que la aparición de mutaciones en la región del PBC y de la

posición 1896 mostraban un distinto comportamiento relacionado con el genotipo viral, de manera que en el genotipo A las mutaciones en el PBC emergerían antes que las mutaciones en el posición 1896 mientras que en el genotipo D se daría lo contrario. Estas conclusiones se han obtenido en base al análisis de las proporciones de mutaciones en las regiones del PBC y del precore, no obstante un estudio longitudinal permitiría confirmar estas observaciones.

Se ha descrito ampliamente que en los pacientes con hepatitis crónica la emergencia de mutaciones, en especial las de la región precore del VHB, ocurría durante o en torno al proceso de la seroconversión de HBeAg a anti-HBe, asumiéndose que este proceso refleja la presión inmunológica que selecciona la variante mutada del virus (Hamasaki y col., 1994; Okamoto y col., 1990). Sin embargo dos estudios más recientes no están de acuerdo con la suposición de que la conversión inmunológica y genómica sean tan cercanas en el tiempo. Maruyama y col. en un estudio realizado en el año 1998 en pacientes con hepatitis crónica con un periodo de seguimiento medio de 3 años observaron que aunque a menudo la seroconversión inmunológica era un fenómeno anterior a la conversión genómica (detección de variantes en la región precore que impiden la expresión de HBeAg) encuentran en un 14% de pacientes HBeAg positivo la presencia de variantes mutadas en el precore en forma mixta y concluyen que ambas conversiones son fenómenos independientes. Posteriormente Bläckberg y col. en una investigación llevada a cabo en el año 2000 en pacientes con hepatitis crónica en la que, a diferencia del trabajo anterior valoraban las mutaciones en las regiones del PBC y del precore tras la seroconversión, observaron que el patrón de detección variaba entre los diferentes genotipos, de manera que en los pacientes con genotipo A se detectaban en primer lugar las mutaciones en el PBC y después las del precore, mientras que en el genotipo D no se detectaban mutaciones en ninguna de las dos regiones a pesar de los 17 meses transcurridos desde el momento en que los anticuerpos anti-HBe eran positivos. Estos autores consideran que la falta de mutaciones en las muestras de suero de los pacientes infectados por el VHB de genotipo D pueda ser debida a que el tiempo de seguimiento haya sido demasiado corto como para permitir la emergencia de una cantidad suficiente de variantes mutadas que posibiliten su detección. Aunque en nuestro estudio la emergencia de mutaciones en relación a la seroconversión no ha sido analizada, de los resultados obtenidos en el grupo de pacientes HBeAg positivo se desprende que la seroconversión y la selección de mutaciones son fenómenos separados, puesto que en este grupo se identificaron variantes mutadas en el PBC y en el precore en el 47% y el 17% de los casos, respectivamente. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados por Maruyama. Sin embargo en los pacientes HBeAg negativo de nuestro estudio la proporción de casos con mutaciones en el precore era muy superior al observado por este autor, debido probablemente a que el tiempo transcurrido desde la seroconversión anti-HBe era mayor. Los resultados del presente trabajo corroboran la apreciación de Bläckberg de que en el genotipo A la aparición de mutaciones en el PBC es anterior a la aparición de mutaciones en el precore.

El análisis conjunto de las mutaciones en el PBC y en la región del precore y su relación con la concentración de ADN-VHB sólo se pudo realizar en las hepatitis crónicas HBeAg negativo con ALT elevada, debido a que en los demás grupos no había un número suficiente de pacientes para llevar a cabo el estudio. Se observó que el aumento de la replicación viral estaba asociado únicamente a la detección de la mutación en la posición 1896 de la región precore y era independiente de las mutaciones en el PBC. Así mismo, los casos con mutaciones en el PBC que no se acompañaban de la variante mutada en la posición 1896 eran los que tenían la concentración más baja de ADN-VHB. De todo ello se deduce que el análisis conjunto de ambas regiones permite una mejor valoración de los distintos grados de replicación viral. Por último, la relación entre la detección simultánea de las variantes del precore en las posiciones 1896 y 1899 y del PBC con la concentración de ADN-VHB no ha sido estudiada, debido al escaso número de pacientes. Sin embargo, al igual que en el análisis aislado de la región precore, es probable que también se hubiese observado la relación positiva entre los cambios en las posiciones 1896 y 1899 y el mayor incremento de la carga viral, que serían independientes de la presencia de mutaciones en el PBC, puesto que, como se ha indicado, las variantes en esta última región no afectan a la replicación del VHB. Al valorar conjuntamente las mutaciones en el PBC (posiciones 1762-1764) y en el precore (posiciones 1896 y 1899) y su relación con la lesión hepática, se observó que en general había una asociación entre la presencia de las mismas y el grado de lesión histológica. Esta relación aumentaba su significación cuando se analizaban las posiciones 1762 y 1899. De esta manera todos los casos con CH presentaban las variantes mutadas mientras que todos los casos con variantes normales para estas dos posiciones presentaban HCA. Aunque no tenemos una explicación para esta observación, probablemente esté relacionada con el hecho de que las variantes en las posiciones 1762 y 1899 están fuertemente asociadas a las variantes en 1764 y 1896, y aparecerían posteriormente a estas últimas. Así mismo, la mutación 1899 aumentaría la replicación viral al incrementar la estabilidad de la señal encapsulación del ARN pregenómico.

## **5.2. VALORACIÓN DE LA REPLICACIÓN DEL VHB Y VHC EN LA COINFECCIÓN POR EL VHB, VHC Y/O VHD. RELACIÓN CON LA DETECCIÓN DE MUTACIONES EN LAS REGIONES DEL PROMOTOR BÁSICO DEL GEN PRECORE-CORE Y DEL PRECORE DEL VHB.**

Los estudios que se han realizado sobre el modelo de replicación y las interferencias potenciales de los distintos virus en las coinfecciones por el VHB, VHC y/o VHD, no arrojan resultados concordantes o conclusivos para establecer cuáles son los factores que afectan al modelo de replicación viral o el papel que desempeña cada uno de los virus en su influencia sobre los demás. Al menos en parte, este hecho se podría explicar si se tiene en cuenta que en los primeros estudios sobre este tema la replicación viral se estimaba con determinaciones que no proporcionaban información real sobre la actividad de los diferentes virus, ya que se fundamentaban principalmente en la detección de antígenos virales y anticuerpos antivirales. En este sentido, en un trabajo realizado por Liaw y col. en el año 1992 a partir de la determinación de HBcAg y de HDAg en muestras de biopsia hepática y de anti-VHC en suero, estos autores sugerían que el VHC suprimía la replicación del VHB y del VHD. Estudios más recientes que analizan la relación entre los diferentes virus, han utilizado tecnologías basadas en el análisis del genoma viral; no obstante, la mayoría de estos estudios han empleado métodos cualitativos que no permiten evaluar correctamente distintos grados de replicación, o bien han utilizado métodos cuantitativos relativamente poco sensibles (Koike y col., 1995; Mathurin y col., 2000; Ohakawa y col., 1995; Shih y col., 1993). El método más ampliamente difundido está basado en la cuantificación de la concentración de ADN-VHB mediante la técnica de hibridación líquida con oligonucleótidos ramificados (branched DNA. Quantiplex, Chiron). Este método presenta una sensibilidad relativamente baja, ya que su límite inferior de detección es de  $7 \times 10^5$  copias ADN-VHB/mL. Actualmente, existen pocos estudios que utilicen técnicas de PCR cuantitativa, las cuales permiten límites de detección inferiores a las técnicas convencionales, lo que es esencial para establecer el grado de replicación del VHB y del VHC en pacientes coinfectados y, por lo tanto, tener un mejor conocimiento de la interacción entre estos virus.

En este trabajo se ha realizado un estudio del grado de replicación del VHB y del VHC en pacientes infectados con estos virus en el que, para la valoración de la replicación viral, se han utilizado métodos de PCR cuantitativa de las concentraciones de ADN-VHB y ARN-VHC. Estas técnicas han presentado unos límites inferiores de detección más bajos ( $1 \times 10^3$  copias /mL) que los utilizados en otros estudios descritos previamente (Mathurin y col., 2000), lo que nos ha permitido valorar más correctamente la interacción entre el VHB y el VHC, así como entre éstos y el VHD.

Los resultados de este estudio mostraron que en el grupo de pacientes coinfectados por el VHB y el VHC, ambos virus disminuían su replicación con respecto a la observada en pacientes con infección aislada por uno de ellos, lo que indicaba una clara interacción entre el VHB y el VHC. Además, se observó que la replicación del VHB disminuía en mayor grado que la del VHC, lo que parece indicar que el VHC actuaría como virus dominante. Estos resultados están de acuerdo con un estudio realizado *in vitro* por Shih y col. en 1993 donde observaron que en ausencia de factores del huésped, la proteína core del VHC podía unirse a los distintos ARN del VHB provocando un efecto supresor sobre la expresión y replicación del VHB. Al producirse esta unión a la señal de encapsulación del ARN pregenómico del VHB se impediría la síntesis de partículas del VHB. En este mismo estudio, los autores atribuían la habilidad y especificidad para esta unión a los residuos aminoácidos 122 N-terminales de la proteína core del VHC. En un estudio posterior llevado a cabo por Santolini y col. en 1994 se observó que en la proteína core del VHC se encontraban localizadas tres regiones ricas en aminoácidos básicos (aminoácidos 6-23, 39-74 y 101-122) que, junto con otras evidencias tales como la presencia de tres conocidas señales de localización nuclear en esta proteína (Chen y col., 1992) y la identificación de un motivo putativo de unión a ADN (Suzuki y col., 1989), indicarían la posibilidad de que la proteína core del VHC podría interactuar con otros genes. Por otro lado, en un estudio realizado por Birbaun y col. en 1990 se identificó la secuencia mínima requerida para la unión específica de la proteína core del VHB al ARN pregenómico (proceso imprescindible para la encapsulación y multiplicación del VHB) en un fragmento de 9 aminoácidos en la

proteína core del VHB (residuos 150 a 158) rica en argininas. Al analizar las homologías entre las proteínas del core del VHB y del VHC, Pontisso y col. en el año 1998 detectaron que la secuencia de la proteína core del VHB comprendida entre los residuos 150 a 158, y la secuencia de la proteína core del VHC de los genotipos 1 y 3 comprendida entre los residuos 113 a 120, presentaban una importante región, rica en residuos de arginina, en un orden secuencial similar. Sin embargo, para los otros genotipos del VHC estos mismos 8 aminoácidos no presentaban un motivo rico en argininas. Los autores sugerían que estos residuos de arginina son cruciales para conducir la unión y, por tanto, la encapsulación del ARN. El conjunto de estas observaciones podría explicar la acción inhibitoria observada para la proteína core del VHC sobre la replicación del VHB de forma que la replicación del VHB sería suprimida en el caso de los genotipos 1 y 3 del VHC, pero no el caso del genotipo 2, puesto que este último no muestra tal homología. En el presente trabajo no se pudo establecer esta diferencia en la replicación viral del VHB en función del genotipo del VHC debido a la baja prevalencia de pacientes infectados con genotipos del VHC diferentes al 1 ó 3.

En los estudios realizados hasta la actualidad no se ha encontrado ningún trabajo que valore la inhibición del VHC por el VHB, probablemente debido a la ausencia de modelos *in vitro* adecuados para el estudio de la replicación del VHC. Sin embargo, parece posible que la interacción entre la proteína core del VHB y el ARN del VHC ocurra mediante un mecanismo similar al descrito anteriormente, lo que explicaría la influencia recíproca en la replicación de ambos virus. Esta hipótesis se ve apoyada en nuestro trabajo por el hecho de que la concentración de ADN-VHB era significativamente inferior en los pacientes con mayores concentraciones de ARN-VHC que en los pacientes con concentraciones indetectables de ARN-VHC. En la concentración de ARN-VHC ocurría lo contrario, es decir, ésta era significativamente inferior en los pacientes con mayores concentraciones de ADN-VHB que en los pacientes con concentraciones indetectables de ADN-VHB.

Las concentraciones de ADN-VHB encontradas en los pacientes con coinfección por el VHB y el VHD eran inferiores a las concentraciones observadas en el grupo de pacientes con infección aislada por VHB. Este resultado está de acuerdo con la observación de que el VHD inhibe la replicación del VHB (Rizetto y col., 1988). Este efecto inhibitorio podría ser debido a la participación de la ARN polimerasa II ADN-dependiente del huésped en la replicación del VHB y del VHD, y la inhibición de este enzima por acción del antígeno delta de mayor peso molecular (Modahl y col., 2000).

En un estudio reciente Mathurin y col. en el año 2000, describieron que el VHD en la triple coinfección afectaba negativamente la replicación del VHB y del VHC, por lo que el VHD tendría un papel dominante. Sin embargo, estos resultados no están de acuerdo con los obtenidos por Liaw y col. en 1995, cuando describieron que en el curso progresivo de la triple coinfección el VHC era el dominante. Los motivos de estas discrepancias podrían ser debidas a la distinta localización geográfica en la que se realizaron dichos estudios: Europa y Asia. En estas áreas geográficas se han descrito diferencias en cuanto al momento de inicio y desarrollo de la infección por el VHB, las características inmunológicas del huésped, la severidad de la infección por el VHD y la distribución de genotipos virales. En este sentido es importante indicar que el genotipo I del VHD predomina en el área Mediterránea y se ha asociado a una evolución clínica menos favorable que el genotipo II, forma predominante en Asia (Cotrina y col., 1999). Nuestros resultados, de acuerdo con los obtenidos por Mathurin y col. en un área próxima a la nuestra, parecen indicar que el genotipo I del VHD es el más fuerte en términos de capacidad replicativa puesto que el ARN-VHD presentó un mayor índice de positividad (95%) que el ADN-VHB (64%) y el ARN-VHC (68%) en la infección por los tres virus. Además el VHD tenía un efecto supresor sobre los virus VHB y VHC. Es interesante señalar que en la triple coinfección el VHD parece ejercer una influencia más negativa sobre la replicación del VHC que sobre la del VHB, sin embargo en este momento no se dispone de datos que permitan explicar el mecanismo involucrado en este fenómeno.

Al analizar las variantes con mutaciones en la región del precore del VHB capaces de impedir la expresión del HBeAg se encontró que la frecuencia de estas variantes era menor en los grupos de pacientes con coinfección por el VHB y el VHC que en el grupo con infección aislada por el VHB (21% vs 53%). En cambio, este fenómeno no se observó en los pacientes coinfectados con el VHB y el VHD. Aunque no tenemos explicación para la incidencia similar de variantes mutadas entre los pacientes coinfectados por el VHB y VHD y los pacientes con infección aislada por el VHB, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Wu y col. en el año 1996, quienes encontraron que el 55% de los pacientes coinfectados por el VHD y el VHB presentaban este tipo de mutaciones en el precore. Los autores explican este fenómeno basándose en que sus pacientes eran antiguos portadores del VHB que ya habían desarrollado estas mutaciones antes de la superinfección con el VHD. En el presente trabajo no se disponía de datos suficientes para confirmar esta observación.

Hay pocos trabajos que estudien la presencia de mutaciones en la región del precore del VHB en los pacientes con coinfección dual o triple. En un estudio realizado por Yeh y col. en 1994, en clones del

ADN-VHB obtenidos de un pequeño grupo de pacientes (7 con coinfección por el VHB y el VHC, y 2 con triple coinfección por el VHB, el VHC, y el VHD) vieron que estas mutaciones no se encontraban en los pacientes con coinfección crónica por VHC y VHB o coinfección triple. Más recientemente, en un estudio multicéntrico con datos apareados realizado en Italia por Sagnelli y col. en el año 2000, en pacientes con coinfección triple o coinfectados con el VHB y el VHC, encontraron una frecuencia muy baja de mutaciones del precore (sólo un 10%). Ambos trabajos relacionan este hecho con el efecto inhibitor del VHC sobre la replicación del VHB, puesto que con una menor replicación del VHB disminuiría la posibilidad de aparición de mutantes. Sagnelli y col. proponen otras dos posibles hipótesis para explicar sus resultados; en primer lugar, un sistema inmunológico debilitado por la presencia de una infección vírica múltiple sería menos eficaz a la hora de ejercer una presión selectiva sobre las variantes del precore. En segundo lugar, argumentan que, el VHC podría realizar una mayor inhibición sobre las variantes del VHB con mutaciones en el precore que sobre las variantes no mutadas ya que las primeras pueden tener una menor capacidad de replicación. En relación con estos resultados se han de tener en cuenta dos consideraciones. Por un lado, en este trabajo no han considerado un grupo de pacientes con coinfección por el VHB y el VHD que, según nuestros resultados, a pesar de la inhibición en la replicación del VHB, presentan una proporción de mutantes del precore similar a la del grupo con infección aislada por el VHB. Por otro lado, el VHC, factor común en la coinfección triple y en la coinfección por el VHB y el VHC, podría estar relacionado con el origen de esta distinta prevalencia. En este sentido, un estudio inmunológico realizado por Tsai y col. en 1995 en el que se evaluaba la respuesta proliferativa de las células mononucleares de sangre periférica a distintos antígenos virales del VHB y del VHC, mostraba que en las hepatitis crónicas por el VHB y el VHC la respuesta inmune del huésped se dirigía preferentemente a los antígenos del VHC y ejercía una menor presión selectiva sobre el VHB; aunque en este estudio no se aclara cómo el sistema inmunitario realiza esta “selección”, señala que sería necesario investigar si este fenómeno se debe a mediadores inmunitarios inducidos por el VHC en el sistema inmune del huésped. De esta manera, las variantes con mutaciones del precore del VHB no llegarían a ser seleccionadas y la variante no mutada sería la mayoritaria. Con relación a las variantes en la región del PBC del VHB, y siguiendo con el razonamiento anterior, una menor presión selectiva tendría efectos análogos, es decir, se observaría preferentemente la variante no mutada. En nuestro estudio este fenómeno sólo se observó de manera significativa en pacientes coinfectados por el VHB de genotipo A, genotipo que en el grupo por infección aislada por el virus VHB presenta una mayor proporción de mutaciones en el PBC.

Actualmente se dispone de poca información del efecto biológico de los diferentes genotipos del VHB y la presencia de mutaciones en el precore y/o PBC sobre la replicación del VHB o su interacción con otros virus en pacientes coinfectados. Acerca de este particular, en el presente trabajo sólo se pudo observar que en los pacientes HBeAg negativo, tanto en los coinfectados como en los no coinfectados emparejados a los anteriores, las concentraciones de ADN-VHB se incrementaban con la presencia de mutaciones en el precore y el PBC, aunque esta asociación no era significativa en el caso de los pacientes coinfectados. En este punto hay que señalar que al analizar los grupos de pacientes HBeAg negativo pertenecientes a los estadios clínicos comentados en el apartado Discusión 5.1, no se observó relación entre las mutaciones del PBC y la replicación viral. Estos resultados discrepantes, también observados en experimentos *in vitro* (Buckwold y col 1996; Günther y col., 1998), se han comentado en el apartado Discusión 5.1. En relación con la carga viral del VHC, en nuestro estudio no se encontró asociación entre ésta y la presencia de mutaciones en el precore, el PBC y el genotipo del VHB. Este resultado apuntaría a que otros aspectos tales como factores relacionados con el huésped, el mecanismo específico de replicación viral, o el proceso de penetración del virus, podrían ser más importantes para esta interacción compleja que los factores inherentes al virus examinados en este estudio.

El estudio de la interacción viral mediante el análisis cuantitativo de las concentraciones de ARN-VHC y de ADN-VHB muestra que en la coinfección por el VHB y el VHC se produce una inhibición mutua entre el VHB y el VHC, con un mayor efecto inhibitor del VHC sobre la replicación del VHB. El VHD presenta un papel dominante tanto en la coinfección por el VHB y el VHD como en la coinfección por el VHB, el VHC y el VHD, afectando negativamente a la replicación del VHB y del VHC. En la triple coinfección el efecto dominante del VHD parece desarrollar una mayor inhibición en la replicación del VHC que en la del VHB. Desde un punto de vista clínico, todos estos datos podrían ser importantes en el momento de establecer una terapia antiviral en los pacientes coinfectados puesto que las estrategias de tratamiento antiviral son diferentes según se trate del VHB o del VHC. En este sentido, sería importante conocer antes del tratamiento los marcadores virales de infección presentes en los pacientes coinfectados y conocer los virus dominantes en dichos pacientes. Finalmente, la falta de asociación significativa encontrada entre las mutaciones del VHB estudiadas, su genotipo y las concentraciones de ARN-VHC, así como entre el genotipo del VHC y la concentración de ADN-VHB, parecen sugerir que en cuanto a la replicación, y por encima de las variantes genómicas estudiadas de cada uno de los virus, la compleja



relación entre ellos se relaciona con la naturaleza del propio virus (VHB, VHC y/o VHD). A pesar de todo ello sería interesante la realización de nuevos estudios a nivel molecular para identificar la causa de las interacciones virales.

## **CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES.

1. La secuenciación de la región del PBC del VHB ha permitido detectar la presencia de variantes mutadas en la mayoría (82%) de los pacientes ADN-VHB positivo. Las mutaciones encontradas con mayor frecuencia estaban situadas en las posiciones 1750-1755 (región TA1), 1762 (región TA2), 1764, 1810-1817. Se observó un elevado grado de conservación en las regiones TA3 y TA4 del PBC, lo que parece indicar la importancia funcional de las mismas.
2. La mutación mayoritaria en la región del PBC ha sido la sustitución de una G por una A en la posición 1764 (76% de las secuencias mutadas), por lo que el análisis de esta posición sería el más sensible para la identificación de las mutaciones en esta región. La mutación 1764 se acompañó en el 90% de los casos por la sustitución de una A por una T en la posición 1762.
3. Las mutaciones 1762-1764 del PBC se han asociado preferentemente con la hepatitis crónica HBeAg negativo, puesto que se han detectado en el 72% de los casos, aunque también se han detectado en menor proporción en portadores asintomáticos (52%) y en hepatitis crónica HBeAg positivo (47%). En este último grupo, la cuantificación del HBeAg mostró que los pacientes con la variante mutada tenían una mediana de concentración (53 UPE/mL) inferior a la detectada en los pacientes con variante no mutada (796 UPE/mL). Nuestros resultados confirman plenamente que las mutaciones en el PBC disminuyen pero no anulan la expresión del HBeAg. Sin embargo, en ninguno de los grupos estudiados se encontraron diferencias en la concentración de ADN-VHB entre los pacientes infectados por la variante mutada y no mutada en el PBC.
4. La distribución de los genotipos mayoritarios A y D resultó ser diferente en los grupos estudiados, de manera que el genotipo A era mayoritario en el grupo HBeAg positivo con ALT elevada (60%), el genotipo D lo era en el grupo HBeAg negativo con ALT elevada (60%) y la prevalencia de ambos genotipos era similar en los grupos HBeAg negativo con ALT fluctuante y portadores asintomáticos. En la población HBeAg negativa la frecuencia observada de genotipo D (55%) era inferior a la esperada por los resultados de estudios previos realizados en áreas geográficas próximas. Estos datos sugieren la necesidad de un estudio epidemiológico a gran escala.
5. Al analizar la lesión histológica hepática en relación a las variantes del PBC se observó una asociación entre la presencia de mutaciones y el daño hepático, ya que los pacientes con CH tenían una mayor proporción de variantes del VHB mutadas en las posiciones 1762 y 1764 que los pacientes que presentaban HCA. Así mismo, entre los pacientes infectados por el VHB de genotipo D, los que presentaban CH tenían más mutaciones en el PBC que los pacientes con HCA.
6. Las variantes de la región precore del VHB que impiden la expresión del HBeAg se detectaron en el 63% de los casos, siendo las más frecuentes las correspondientes a las posiciones 1896 (73% de las secuencias mutadas) y 1814-1817 (23% de las secuencias mutadas). Las mutaciones en la posición 1896 estaban fuertemente asociadas con cambios en las posiciones 1858 y 1899, los cuales no impiden la expresión del HBeAg. En el grupo de pacientes HBeAg positivo únicamente presentaban mutación el 17% de los casos y en todos ellos se detectaba la presencia simultánea de las variantes normal y mutada en el precore.
7. Al correlacionar las mutaciones en la región precore con la replicación del VHB, se observó una asociación significativa, de forma que, en los pacientes HBeAg negativo con ALT elevada, aquellos infectados por el VHB de genotipo D y con mutaciones en las posiciones 1896 y/o 1899 presentaron las concentraciones más altas de ADN-VHB. Así mismo, los pacientes HBeAg negativo con ALT elevada y con mutaciones en la posición 1899 tenían una mayor proporción de CH, independientemente del genotipo.
8. Del análisis conjunto de las secuencias del PBC y precore del VHB se desprende que el 96% de los casos con hepatitis crónica HBeAg negativo y ADN-VHB positivo, estaban asociados a nivel molecular con mutaciones en estas regiones, ya que el 56% de pacientes presentaban cambios en las dos regiones, el 24% tenían cambios únicamente en la región precore y el 16% restante tan sólo en el

PBC. El análisis molecular conjunto de las dos regiones permite caracterizar las infecciones por el VHB de los diferentes grupos estudiados, mostrando una especial utilidad para distinguir entre el portador asintomático y el paciente con hepatitis crónica HBeAg negativo con ALT fluctuante con un valor predictivo negativo del 78%.

9. El estudio conjunto de las secuencias del PBC y del precore permite también una mejor valoración de los distintos grados de replicación viral. El aumento de la concentración de ADN-VHB estaba asociado únicamente a la detección de mutaciones de la región precore y era independiente de las mutaciones en el PBC. Así mismo, los casos con mutaciones en el PBC que no se acompañaban de la variante mutada en el precore eran los que tenían la concentración más baja de ADN-VHB.
10. Al valorar conjuntamente las mutaciones en las posiciones 1762 del PBC y 1899 de la región precore y su relación con la lesión histológica hepática se observó que todos los casos con CH presentaban las variantes mutadas mientras que todos los casos con variantes normales para estas dos posiciones presentaban HCA.
11. Finalmente, el estudio de la interacción viral mediante el análisis cuantitativo de las concentraciones de ADN-VHB y ARN-VHC muestra que en la coinfección por el VHB y el VHC hay una inhibición mutua entre los dos virus, con un mayor efecto inhibitor del VHC sobre la replicación del VHB. En la triple infección el VHD actúa como dominante, afectando negativamente la replicación del VHB y del VHC, y su acción parece ser más intensa sobre la replicación del VHC que sobre la del VHB. La interacción entre los distintos virus no parece estar influida por los genotipos virales ni por las mutaciones de las regiones del PBC y del precore del VHB.

**PUBLICACIONES**

## **7. PUBLICACIONES.**

Parte de los resultados de esta tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Jardi R, Rodriguez F, Buti M, Costa X, Cotrina M, Valdes A, Galimany R, Esteban R, Guardia J. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in serum by a new rapid real-time fluorescence PCR assay. *J Viral Hepat.* 2001; 8: 465-71.

Jardi R, Rodriguez F, Buti M, Costa X, Cotrina M, Galimany R, Esteban R, Guardia J. Role of hepatitis B, C, and D viruses in dual and triple infection: influence of viral genotypes and hepatitis B precore and basal core promoter mutations on viral replicative interference. *Hepatology.* 2001; 34: 404-10.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## 8. BIBLIOGRAFIA.

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.

Akarca US, Greene S, Lok AS. Detection of precore hepatitis B virus mutants in asymptomatic HBsAg-positive family members. *Hepatology*. 1994;19: 1366-70.

Alestig E, Hannoun C, Horal P, Lindh M. Phylogenetic origin of hepatitis B virus strains with precore C-1858 variant. *J Clin Microbiol*. 2001;39: 3200-3.

Arii M, Takada S, Koike K. Identification of three essential regions of hepatitis B virus X protein for trans-activation function. *Oncogene*. 1992;7: 397-403.

Ballard AL, Boxall EH. Epidemiology of precore mutants of hepatitis B in the United Kingdom. *J Med Virol*. 2000;62: 463-70.

Baptista M, Kramvis A, Kew MC. High prevalence of 1762(T) 1764(A) mutations in the basic core promoter of hepatitis B virus isolated from black Africans with hepatocellular carcinoma compared with asymptomatic carriers. *Hepatology*. 1999; 29: 946-53.

Barnaba V, Balsano F. Immunologic and molecular basis of viral persistence. The hepatitis B virus model. *J Hepatol*. 1992;14: 391-400.

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.

Baumert TF, Liang TJ. Precore mutants revisited. *Hepatology*. 1996 Jan;23(1):184-6.

Baumert TF, Marrone A, Vergalla J, Liang TJ. Naturally occurring mutations define a novel function of the hepatitis B virus core promoter in core protein expression. *J Virol*. 1998; 72: 6785-95.

Birbaum F & Nassal M. Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein. *J Virol* 1990; 64: 3310-3330

Blackberg J, Kidd-Ljunggren K. Genotypic differences in the hepatitis B virus core promoter and precore sequences during seroconversion from HBeAg to anti-Hbe. *J Med Virol*. 2000; 60: 107-12.

Blumberg BS, Alter HJ and Visnisch S. A new antigen in leukemia sera. *JAMA*. 1965; 191: 541-546.

Bonino F, Hoyer B, Nelson J, Engle R, Verme G, Gerin J. Hepatitis B virus DNA in the sera of HBsAg carriers: a marker of active hepatitis B virus replication in the liver. *Hepatology*. 1981; 1: 386-91.

Bonino F, Brunetto MR. Hepatitis B virus heterogeneity, one of many factors influencing the severity of hepatitis B. *J Hepatol*. 1993; 18: 5-8.

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.

Bottcher B, Wynne SA, Crowther RA. Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature*. 1997; 386: 88-91.

Bozdayi AM, Bozkaya H, Turkyilmaz AR, Saryodlu M, Cetinkaya H, Karayalcin S, Yurdaydin C, Uzunlimoglu O. Nucleotide divergences in the core promoter and precore region of genotype D hepatitis B virus in patients with persistently elevated or normal ALT levels. *J Clin Virol*. 2001; 21: 91-101.



- Brown JL, Carman WF, Thomas HC. The clinical significance of molecular variation within the hepatitis B virus genome. *Hepatology*. 1992;15: 144-8.
- Brunetto MR, Oliveri F, Rocca G, Criscuolo D, Chiaberge E, Capalbo M, David E, Verme G, Bonino F. Natural course and response to interferon of chronic hepatitis B accompanied by antibody to hepatitis B e antigen. *Hepatology*. 1989;10: 198-202.
- Brunetto MR, Giarin MM, Oliveri F, Chiaberge E, Baldi M, Alfarano A, Serra A, Saracco G, Verme G, Will H, et al. Wild-type and e antigen-minus hepatitis B viruses and course of chronic hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88: 4186-90.
- Brunetto MR, Rodriguez UA, Bonino F. Hepatitis B virus mutants. *Intervirology*. 1999; 42: 69-80.
- Bruss V, Gerhardt E, Vieluf K, Wunderlich G. Functions of the large hepatitis B virus surface protein in viral particle morphogenesis. *Intervirology*. 1996;39: 23-31.
- Buckwold VE, Xu Z, Chen M, Yen TS, Ou JH. Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J Virol*. 1996; 70: 5845-51.
- Buckwold VE, Xu Z, Yen TS, Ou JH. Effects of a frequent double-nucleotide basal core promoter mutation and its putative single-nucleotide precursor mutations on hepatitis B virus gene expression and replication. *J Gen Virol*. 1997;78: 2055-65.
- Buratowski S. The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell*. 1994; 77: 1-3.
- Cabrerizo M, Bartolome J, Inigo ER, Lopez-Alcorocho JM, Cotonat T, Carreno V. Analysis of the hepatitis B virus precore and ORF-X sequences in patients with antibody to hepatitis B e antigen with and without normal ALT levels. *J Med Virol*. 1998; 56: 294-9.
- Cattaneo R, Will H, Hernandez N, Schaller H. Signals regulating hepatitis B surface antigen transcription. *Nature*. 1983; 305: 336-8.
- Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, Thomas HC. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet*. 1989; 2: 588-91.
- Carman W, Thomas H, Domingo E. Viral genetic variation: hepatitis B virus as a clinical example. *Lancet*. 1993; 341: 349-53.
- Conway JF, Cheng N, Zlotnick A, Wingfield PT, Stahl SJ, Steven AC. Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy. *Nature*. 1997; 386: 91-4.
- Cotrina M, Buti M, Jardi R, Quer J, Rodriguez F, Pascual C, Esteban R, Guardia J. Hepatitis delta genotypes in chronic delta infection in the northeast of Spain (Catalonia). *J Hepatol*. 1998; 28: 971-7.
- Crespo J, Lozano JL, Carte B, Heras B, Cruz F, Pons Romero F. Viral replication in patients with concomitant hepatitis B and C virus infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16:445-451.
- Crowther RA, Kiselev NA, Bottcher B, Berriman JA, Borisova GP, Ose V, Pumpens P. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell*. 1994; 77: 943-50.
- Chan HL, Hussain M, Lok AS. Different hepatitis B virus genotypes are associated with different mutations in the core promoter and precore regions during hepatitis B e antigen seroconversion. *Hepatology*. 1999; 29: 976-84.

Chan HL, Leung NW, Hussain M, Wong ML, Lok AS. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B in Hong Kong. *Hepatology*. 2000; 31: 763-8.

Chang C, Enders G, Sprengel R, Peters N, Varmus HE, Ganem D. Expression of the precore region of an avian hepatitis B virus is not required for viral replication. *J Virol*. 1987; 61: 3322-5.

Chang MH, Hsu HY, Ni YH, Tsai KS, Lee PI, Chen PJ, Hsu YL, Chen DS. Precore stop codon mutant in chronic hepatitis B virus infection in children: its relation to hepatitis B seroconversion and maternal hepatitis B surface antigen. *J Hepatol*. 1998; 28: 915-22.

Chen IH, Huang CJ, Ting LP. Overlapping initiator and TATA box functions in the basal core promoter of hepatitis B virus. *J Virol*. 1995; 69: 3647-57.

Chen PJ, Lin MH, Tai KF, Liu PC, Lin CJ & Chen CS. The Taiwanese hepatitis C virus genome: sequence determination and mapping the 5' terminal of viral genomic and antigenomic RNA. *Virology* 1992; 188: 102-113.

Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol*. 1995;13: 29-60.

Chisari FV. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest*. 1997; 99: 1472-7.

Chisari FV. Rous-Whipple Award Lecture. Viruses, immunity, and cancer: lessons from hepatitis B. *Am J Pathol*. 2000; 156: 1117-32.

Chun YK, Kim JY, Woo HJ, Oh SM, Kang I, Ha J, Kim SS. No significant correlation exists between core promoter mutations, viral replication, and liver damage in chronic hepatitis B infection. *Hepatology*. 2000; 32: 1154-62.

Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*. 1970; 1: 695-8.

Domingo E, Martinez-Salas E, Sobrino F, de la Torre JC, Portela A, Ortin J, Lopez-Galindez C, Perez-Brena P, Villanueva N, Najera R, et al. The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance-a review. *Gene*. 1985; 40: 1-8.

Domingo E and Holland JJ. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. In *Evolutionary Biology of Viruses*. Edited by S.S. Morse. New York: Raven Press.

Erhardt A, Reineke U, Blondin D, Gerlich WH, Adams O, Heintges T, Niederau C, Haussinger D. Mutations of the core promoter and response to interferon treatment in chronic replicative hepatitis B. *Hepatology*. 2000; 31: 716-25.

Eyster ME, Sanders JC, Battegay M, Di Bisceglie AM. Suppression of hepatitis C virus replication by hepatitis D virus in HIV infected hemophiliacs with chronic hepatitis B and C. *Dig Dis Sci* 1995; 40:1583-1588.

Feitelson MA, Marion PL, Robinson WS. Core particles of hepatitis B virus and ground squirrel hepatitis virus. II. Characterization of the protein kinase reaction associated with ground squirrel hepatitis virus and hepatitis B virus. *J Virol*. 1982; 43: 741-8.

Fiordalisi G, Cariani E, Mantero G, Zanetti A, Tanzi E, Chiaramonte M, Primi D. High genomic variability in the pre-C region of hepatitis B virus in anti-HBe, HBV DNA-positive chronic hepatitis. *J Med Virol*. 1990; 31: 297-300.

Fouillot N, Rossignol JM. Translational stop codons in the precore sequence of hepatitis B virus pre-C RNA allow translation reinitiation at downstream AUGs. *J Gen Virol*. 1996; 77: 1123-7.

Fujiwara K, Yokosuka O, Ehata T, Chuang WL, Imazeki F, Saisho H, Omata M. The two different states of hepatitis B virus DNA in asymptomatic carriers: HBe-antigen-positive versus anti-HBe-positive asymptomatic carriers. *Dig Dis Sci.* 1998; 43: 368-76.

Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem.* 1987; 56: 651-93.

Garcia PD, Ou JH, Rutter WJ, Walter P. Targeting of the hepatitis B virus precore protein to the endoplasmic reticulum membrane: after signal peptide cleavage translocation can be aborted and the product released into the cytoplasm. *J Cell Biol.* 1988; 106: 1093-104.

Gerlach KK, Schloemer RH. Hepatitis B virus C gene promoter is under negative regulation. *Virology.* 1992; 189: 59-66.

Gerlich WH, Robinson WS. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell.* 1980; 21: 801-9.

Grandjacques C, Pradat P, Stuyver L, Chevallier M, Chevallier P, Pichoud C, Maisonnas M, Trepo C, Zoulim F. Rapid detection of genotypes and mutations in the pre-core promoter and the pre-core region of hepatitis B virus genome: correlation with viral persistence and disease severity. *J Hepatol.* 2000; 33: 430-9.

Guidotti LG, Matzke B, Pasquinelli C, Shoenberger JM, Rogler CE, Chisari FV. The hepatitis B virus (HBV) precore protein inhibits HBV replication in transgenic mice. *J Virol.* 1996; 70: 7056-61.

Günther S, Piwon N, Iwanska A, Schilling R, Meisel H, Will H. Type, prevalence, and significance of core promoter/enhancer II mutations in hepatitis B viruses from immunosuppressed patients with severe liver disease. *J Virol.* 1996; 70: 8318-31.

Günther S, Piwon N, Will H. Wild-type levels of pregenomic RNA and replication but reduced pre-C RNA and e-antigen synthesis of hepatitis B virus with C(1653)→T, A(1762)→T and G(1764)→A mutations in the core promoter. *J Gen Virol* 1998; 79: 375-380.

Günther S, Fischer T, Pult T, Sterneck M, Will H. Naturally occurring variants of hepatitis B virus. *Adv Virus Res* 1999; 52: 25-137.

Guo WT, Bell KD, Ou JH. Characterization of the hepatitis B virus EnhI enhancer and X promoter J *Virol.* 1991; 65: 6686-92.

Guo WT, Bell KD, Ou JH. Characterization of the hepatitis B virus EnhI enhancer and X promoter complex. *J Virol.* 1991; 65: 6686-92.

Guo W, Chen M, Yen TS, Ou JH. Hepatocyte-specific expression of the hepatitis B virus core promoter depends on both positive and negative regulation. *Mol Cell Biol.* 1993; 13: 443-8.

Gust ID, Burrell CJ, Coulepis AG, Robinson WS, Zuckerman AJ. Taxonomic classification of human hepatitis B virus. *Intervirology.* 1986; 25: 14-29.

Hadziyannis SJ, Lieberman HM, Karvountzis GG, Shafritz DA. Analysis of liver disease, nuclear HBeAg, viral replication, and hepatitis B virus DNA in liver and serum of HBeAg Vs. anti-HBe positive carriers of hepatitis B virus. *Hepatology.* 1983; 3: 656-62.

Hamasaki K, Nakata K, Nagayama Y, Ohtsuru A, Daikoku M, Taniguchi K, Tsutsumi T, Sato Y, Kato Y, Nagataki S. Changes in the prevalence of HBeAg-negative mutant hepatitis B virus during the course of chronic hepatitis B. *Hepatology.* 1994; 20: 8-14.

Haruna Y, Hayashi N, Katayama K, Yuki N, Kasahara A, Sasaki Y, Fusamoto H, Kamada T. Expression of X protein and hepatitis B virus replication in chronic hepatitis. *Hepatology.* 1991; 13: 417-21.

- Hasegawa K, Huang JK, Wands JR, Obata H, Liang TJ. Association of hepatitis B viral precore mutations with fulminant hepatitis B in Japan. *Virology*. 1991; 185: 460-3.
- Hasegawa K, Huang J, Rogers SA, Blum HE, Liang TJ. Enhanced replication of a hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *J Virol*. 1994; 68: 1651-9.
- Hiraga M, Nishizono A, Mifune K, Esumi M, Shikata T. Analysis of upstream region of hepatitis B virus core gene using in vitro transcription system. *J Med Virol*. 1994; 43: 404-11.
- Honda A, Yokosuka O, Ehata T, Tagawa M, Imazeki F, Saisho H. Detection of mutations in the enhancer 2/core promoter region of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection: comparison with mutations in precore and core regions in relation to clinical status. *J Med Virol*. 1999; 57: 337-44.
- Honigwachs J, Faktor O, Dikstein R, Shaul Y, Laub O. Liver-specific expression of hepatitis B virus is determined by the combined action of the core gene promoter and the enhancer. *J Virol*. 1989; 63: 919-24.
- Hoofnagle JH. Type B hepatitis: virology, serology and clinical course. *Semin Liver Dis*. 1981; 1: 7-14.
- Hoofnagle JH, Shafritz DA, Popper H. Chronic type B hepatitis and the "healthy" HBsAg carrier state. *Hepatology*. 1987; 7: 758-63.
- Hou J, Lau GK, Cheng J, Cheng CC, Luo K, Carman WF. T1762/A1764 variants of the basal core promoter of hepatitis B virus; serological and clinical correlations in Chinese patients. *Liver*. 1999; 19: 411-7.
- Huan B, Siddiqui A. Regulation of hepatitis B virus gene expression. *J Hepatol*. 1993;17 Suppl 3:S20-3.
- Hunt CM, McGill JM, Allen MI, Condreay LD. Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. *Hepatology*. 2000; 31: 1037-44.
- Jardi R, Rodriguez F, Buti M, Costa X, Cotrina M, Valdes A, Galimany R, Esteban R, Guardia J. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in serum by a new rapid real-time fluorescence PCR assay. *J Viral Hepat*. 2001; 8: 465-71.
- Jean-Jean O, Weimer T, de Recondo AM, Will H, Rossignol JM. Internal entry of ribosomes and ribosomal scanning involved in hepatitis B virus P gene expression. *J Virol*. 1989; 63: 5451-4.
- Junker-Niepmann M, Bartenschlager R, Schaller H. A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J*. 1990; 9: 3389-96.
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*. 2000; 118: 554
- Karayiannis P, Alexopoulou A, Hadziyannis S, Thursz M, Watts R, Seito S, Thomas HC. Fulminant hepatitis associated with hepatitis B virus e antigen-negative infection: importance of host factors. *Hepatology*. 1995; 22: 1628-34.
- Karino Y, Toyota J, Sato T, Ohmura T, Yamazaki K, Suga T, Nakamura K, Sugawara M, Matsushima T, Hino K. Early mutation of precore (A1896) region prior to core promoter region mutation leads to decrease of HBV replication and remission of hepatic inflammation. *Dig Dis Sci*. 2000; 45: 2207-13.
- Kidd AH, Kidd-Ljunggren K. A revised secondary structure model for the 3'-end of hepatitis B virus pregenomic RNA. *Nucleic Acids Res*. 1996; 24: 3295-301.
- Kidd-Ljunggren K, Oberg M, Kidd AH. Hepatitis B virus X gene 1751 to 1764 mutations: implications for HBeAg status and disease. *J Gen Virol*. 1997; 78: 1469-78.

- Kim CM, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature*. 1991; 351: 317-20.
- Knoll A, Rohrhofer A, Kochanowski B, Wurm EM, Jilg W. Prevalence of precore mutants in anti-HBe-positive hepatitis B virus carriers in Germany. *J Med Virol*. 1999; 59: 14-8.
- Koike K, Takada S. Biochemistry and functions of hepatitis B virus X protein. *Intervirol*. 1995;38: 89-99.
- Koike K, Yasuda K, Yotsuyanagi H, Moriya K, Hino K, Kurokawa K, et al. Dominant replication of either virus in dual infection with hepatitis viruses B and C. *J. Med Virol* 1995b; 45:236-239.
- Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*. 1986; 44: 283-92.
- Kozak M. Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 8301-8305.
- Kozak M. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO J* 1997; 16: 2482-2492.
- Kramvis A, Bukofzer S, Kew MC, Song E. Nucleic acid sequence analysis of the precore region of hepatitis B virus from sera of southern African black adult carriers of the virus. *Hepatology*. 1997; 25: 235-40.
- Kramvis A, Kew MC. The core promoter of hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 1999; 6: 415-427.
- Kraus RJ, Murray EE, Wiley SR, Zink NM, Loritz K, Gelembiuk GW, Mertz JE. Experimentally determined weight matrix definitions of the initiator and TBP binding site elements of promoters. *Nucleic Acids Res*. 1996; 24: 1531-9.
- Kurosaki M, Enomoto N, Asahina Y, Sakuma I, Ikeda T, Tozuka S, Izumi N, Marumo F, Sato C. Mutations in the core promoter region of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol*. 1996; 49: 115-23.
- Lamberts C, Nassal M, Velhagen I, Zentgraf H, Schroder CH. Precore-mediated inhibition of hepatitis B virus progeny DNA synthesis. *J Virol*. 1993; 67: 3756-62.
- Laras A, Koskinas J, Avgidis K, Hadziyannis SJ. Incidence and clinical significance of hepatitis B virus precore gene translation initiation mutations in e antigen-negative patients. *J Viral Hepat*. 1998; 5: 241-8.
- Laskus T, Persing DH, Nowicki MJ, Mosley JW, Rakela J. Nucleotide sequence analysis of the precore region in patients with fulminant hepatitis B in the United States. *Gastroenterology*. 1993; 105: 1173-8.
- Laskus T, Rakela J, Persing DH. The stem-loop structure of the cis-encapsidation signal is highly conserved in naturally occurring hepatitis B virus variants. *Virology*. 1994; 200: 809-12.
- Laskus T, Rakela J, Nowicki MJ, Persing DH. Hepatitis B virus core promoter sequence analysis in fulminant and chronic hepatitis B. *Gastroenterology*. 1995; 109: 1618-23.
- Le Bouvier GL. The heterogeneity of Australia antigen. *J Infect Dis*. 1971; 123: 671-5.
- Lever AM. Mechanisms of virally induced liver damage. *J Hepatol*. 1987; 4: 399-403.
- Li J, Buckwold E, Hon M-W, Ou J. Mechanism of Suppression of hepatitis B virus precore RNA transcription by a frequent double mutation. *J Virol* 1999; 73: 1239-1244.

Liaw YF, Chien RN, Chen TJ, Sheen IS, Chu CM. Concurrent hepatitis C virus and hepatitis delta virus superinfection in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Med Virol* 1992; 37:294-297.

Liaw YF, Tsai SL, Sheen IS, Chao M, Yeh CHT, Hsieh SY, et al. Clinical and virological course of chronic hepatitis B virus infection with hepatitis C and D virus markers. *Am J Gastroenterol* 1998; 3:354-359.

Liaw YF. Role of hepatitis C virus in dual and triple hepatitis virus infection. *Hepatology* 1995; 22: 1101-1107.

Lindh M, Furuta Y, Ljunggren KK, Norkrans G, Horal P. Detection of hepatitis B virus precore TAG mutant by an amplification-created restriction site method. *J Infect Dis.* 1995; 171: 194-7.

Lindh M, Furuta Y, Vahlne A, Norkrans G, Horal P. Emergence of precore TAG mutation during hepatitis B e seroconversion and its dependence on pregenomic base pairing between nucleotides 1858 of 1896. *J Infect Dis.* 1995b; 172(5):1343-7.

Lindh M, Horal P, Dhillon AP, Furuta Y, Norkrans G. Hepatitis B virus carriers without precore mutations in hepatitis B e antigen-negative stage show more severe liver damage. *Hepatology.* 1996; 24: 494-501.

Lindh M. HBV precore mutants and response to interferon. *Hepatology.* 1997; 25: 1547-8.

Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus--large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis.* 1997b; 175: 1285-93.

Lindh M, Gustavson C, Mardberg K, Norkrans G, Dhillon AP, Horal P. Mutation of nucleotide 1,762 in the core promoter region during hepatitis B e seroconversion and its relation to liver damage in hepatitis B e antigen carriers. *J Med Virol.* 1998; 55: 185-90.

Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G, Horal P. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis.* 1999; 179: 775-82.

Lindh M, Horal P, Dhillon AP, Norkrans G. Hepatitis B virus DNA levels, precore mutations, genotypes and histological activity in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat.* 2000; 7: 258-67.

Lindh M, Hannoun C, Horal P, Krogsgaard K. Virological response to interferon therapy of chronic hepatitis B as measured by a highly sensitive assay. *J Viral Hepat.* 2001; 8: 349-57.

Lok AS, Karayiannis P, Jowett TP, Fowler MJ, Farci P, Monjardino J, Thomas HC. Studies of HBV replication during acute hepatitis followed by recovery and acute hepatitis progressing to chronic disease. *J Hepatol.* 1985; 1: 671-9.

Lok AS, Akarca U, Greene S. Mutations in the pre-core region of hepatitis B virus serve to enhance the stability of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91: 4077-81.

Lopez-Cabrera M, Letovsky J, Hu KQ, Siddiqui A. Multiple liver-specific factors bind to the hepatitis B virus core/pregenomic promoter: trans-activation and repression by CCAAT/enhancer binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87: 5069-73.

Lopez-Cabrera M, Letovsky J, Hu KQ, Siddiqui A. Transcriptional factor C/EBP binds to and transactivates the enhancer element II of the hepatitis B virus. *Virology.* 1991; 183: 825-9.

Lo WY, Ting LP. Repression of enhancer II activity by a negative regulatory element in the hepatitis B virus genome. *J Virol.* 1994; 68: 1758-64.

Loriot MA, Marcellin P, Talbodec N, Guignon V, Gigou M, Boyer N, Bezeaud A, Erlinger S, Benhamou JP. Low frequency of precore hepatitis B virus mutants in anti-hepatitis B e-positive reactivation after loss of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*. 1995; 21: 627-31.

Magnius LO, Espmark JA. New specificities in Australia antigen positive sera distinct from the Le Bouvier determinants. *J Immunol*. 1972; 109: 1017-21.

Maruyama T, Kuwata S, Koike K, Iino S, Yasuda K, Yotsuyanagi H, Moriya K, Maekawa H, Yamada H, Shibata Y, Milich DR. Precore wild-type DNA and immune complexes persist in chronic hepatitis B after seroconversion: no association between genome conversion and seroconversion. *Hepatology*. 1998; 27: 245-53.

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 U S A*. 1980; 77: 2941-5.

Mason WS, Seal G, Summers J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol*. 1980; 36: 829-836.

Mathurin P, Thibault V, Kadidja K, Ganne-Carrié N, Moussalli J, El Younsi M, et al. Replication status and histological features of patients with triple (B,C,D) and dual (B,C) hepatic infections. *J. Viral Hep* 2000, 7:15-22.

Milich DR, Jones JE, Hughes JL, Price J, Raney AK, McLachlan A. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87: 6599-603.

Milich DR, Jones J, Hughes J, Maruyama T. Role of T-cell tolerance in the persistence of hepatitis B virus infection. *J Immunother*. 1993; 14: 226-33.

Milich DR. Influence of T-helper cell subsets and crossregulation in hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat*. 1997;4 Suppl 2: 48-59.

Miller RH, Robinson WS. Common evolutionary origin of hepatitis B virus and retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986; 83: 2531-5.

Miller RH, Kaneko S, Chung CT, Girones R, Purcell RH. Compact organization of the hepatitis B virus genome. *Hepatology*. 1989; 9: 322-7.

Miska S, Will H. Hepatitis B virus C-gene variants. *Arch Virol Suppl*. 1993;8:155-69.

Modahl LE, Lai MM. The large delta antigen of hepatitis delta virus potently inhibits genomic but not antigenomic RNA synthesis: a mechanism enabling initiation of viral replication. *J Virol* 2000; 74:7375-7380.

Molnar-Kimber KL, Summers J, Taylor JM, Mason WS. Protein covalently bound to minus-strand DNA intermediates of duck hepatitis B virus. *J Virol*. 1983; 45: 165-72.

Moreno R, Garcia L, Garcia C. Immune response to hepatitis B virus. In *Viral Hepatitis*. Editors. Buti M, Esteban R, Guardia J. (Schering-Plough, SA), 2000.

Moriarty AM, Alexander H, Lerner RA, Thornton GB. Antibodies to peptides detect new hepatitis B antigen: serological correlation with hepatocellular carcinoma. *Science*. 1985 25; 227: 429-33.

Moriyama K, Okamoto H, Tsuda F, Mayumi M. Reduced precore transcription and enhanced core-pregenome transcription of hepatitis B virus DNA after replacement of the precore-core promoter with sequences associated with e antigen-seronegative persistent infections. *Virology*. 1996; 226: 269-80.

Murakami S. Hepatitis B virus X protein: structure, function and biology. *Intervirology*. 1999; 42: 81-99.

Nagafuchi Y, Scheuer PJ. Expression of beta 2-microglobulin on hepatocytes in acute and chronic type B hepatitis. *Hepatology*. 1986; 6: 20-3.

Nagasaka A, Hige S, Marutani M, Tsunematsu I, Saito M, Yamamoto Y, Konishi S, Asaka M. Prevalence of mutations in core promoter/precure region in Japanese patients with chronic hepatitis B virus infection. *Dig Dis Sci*. 1998; 43: 2473-8.

Nassal M. The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J Virol*. 1992; 66: 4107-16.

Nassal M. Hepatitis B virus replication: novel roles for virus-host interactions. *Intervirology* 1999; 42: 100-116  
Nishizono A, Hiraga M, Kohno K, Sonoda YT, Terao H, Fujioka T, Nasu M, Mifune K. Mutations in the core promoter/enhancer II regions of naturally occurring hepatitis B virus variants and analysis of the effects on transcription activities. *Intervirology*. 1995; 38: 290-4.

Nassal M, Schaller H. Hepatitis B virus replication--an update. *J Viral Hepat*. 1996; 3: 217-26.

Nassal M. Hepatitis B virus replication: novel roles for virus-host interactions. *Intervirology*. 1999; 42: 100-16.

Nishizono A, Hiraga M, Kohno K, Sonoda YT, Terao H, Fujioka T, Nasu M, Mifune K. Mutations in the core promoter/enhancer II regions of naturally occurring hepatitis B virus variants and analysis of the effects on transcription activities. *Intervirology*. 1995; 38: 290-4.

Norder H, Hammas B, Lofdahl S, Courouce AM, Magnius LO. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol*. 1992; 73: 1201-8.

Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology*. 1994; 198: 489-503.

Ohkawa K, Hayashi N, Yuki N, Masuzawa M, Kato M, Yamamoto H, et al. Long term follow up of hepatitis B virus and hepatitis C virus replicative levels in chronic hepatitis patients coinfecting with both viruses. *J Med Virol* 1995; 46:258-264.

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

Okamoto H, Yotsumoto S, Akahane Y, Yamanaka T, Miyazaki Y, Sugai Y, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis B viruses with precure region defects prevail in persistently infected hosts along with seroconversion to the antibody against e antigen. *J Virol*. 1990; 64: 1298-303.

Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y. 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: 8102-8110.

Ono Y, Onda H, Sasada R, Igarashi K, Sugino Y, Nishioka K. The complete nucleotide sequences of the cloned hepatitis B virus DNA; subtype adr and adw. *Nucleic Acids Res*. 1983;11: 1747-57.

Orito E, Mizokami M, Ina Y, Moriyama EN, Kameshima N, Yamamoto M, Gojobori T. Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86: 7059-62.



Orito E, Mizokami M, Sakugawa H, Michitaka K, Ishikawa K, Ichida T, Okanoue T, Yotsuyanagi H, Iino S. A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. Japan HBV Genotype Research Group. *Hepatology*. 2001; 33: 218-23.

Ou J. Molecular biology of hepatitis B virus e antigen. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 1997; 12: S178-S187.

Parvez MK, Thakur V, Kazim SN, Guptan RC, Hasnain SE, Sarin SK. Base-pair alterations in the epsilon-lower stem due to a novel double substitution in the precore gene of HBV-e negative variant were recovered by secondary mutations. *Virus Genes*. 2001; 23: 315-20.

Pignatelli M, Waters J, Brown D, Lever A, Iwarson S, Schaff Z, Gerety R, Thomas HC. HLA class I antigens on the hepatocyte membrane during recovery from acute hepatitis B virus infection and during interferon therapy in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 1986; 6: 349-53.

Pignatelli M, Waters J, Lever A, Iwarson S, Gerety R, Thomas HC. Cytotoxic T-cell responses to the nucleocapsid proteins of HBV in chronic hepatitis. Evidence that antibody modulation may cause protracted infection. *J Hepatol*. 1987; 4: 15-21.

Pollack JR, Ganem D. An RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsidation. *J Virol*. 1993; 67: 3254-63.

Pontisso P, Gerotto M, Ruvoletto MG, Fattovich G, Chemello L, Tisminetzky S, et al. Hepatitis C genotypes in patients with dual hepatitis B and C virus infection. *J Med Virol* 1996; 48:157-160.

Pontisso P, Gerotto M, Benvegnu L, Chemello L, Alberti A. Coinfection by hepatitis B virus and hepatitis C. *Antiviral Therapy* 1998; 3:137-142.

Pult I, Chouard T, Wieland S, Klemenz R, Yaniv M, Blum HE. A hepatitis B virus mutant with a new hepatocyte nuclear factor 1 binding site emerging in transplant-transmitted fulminant hepatitis B. *Hepatology*. 1997; 25: 1507-15.

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.

Raney AK, Johnson JL, Palmer CN, McLachlan A. Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *J Virol*. 1997; 71: 1058-71.

Rizetto M, Bonino F, Verme G. Hepatitis delta virus infection of the liver: progress in virology, pathology, and diagnosis. *Semin Liver Dis* 1988; 8:350-360.

Robinson WS, Greenman RL. DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate. *J Virol*. 1974; 13: 1231-6.

Rodriguez-Frias F, Buti M, Jardi R, Cotrina M, Viladomiu L, Esteban R, Guardia J. Hepatitis B virus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. *Hepatology*. 1995; 22: 1641-7.

Sagnelli E, Coppola N, Scolastico C, Filippini P, Santantonio T, Stroffolini T, et al. Virologic and clinical expressions of reciprocal inhibitory effect of hepatitis B, C, and delta viruses in patients with chronic hepatitis. *Hepatology* 2000; 32:1106-110.

Salfeld J, Pfaff E, Noah M, Schaller H. Antigenic determinants and functional domains in core antigen and e antigen from hepatitis B virus. *J Virol*. 1989; 63: 798-808.

- Sattler F, Robinson WS. Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends. *J Virol.* 1979; 32: 226-33.
- Sanchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Pares A, Bruguera M, Rodes J. Analysis of factors predicting early seroconversion to anti-HBe in HBeAg-positive chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 1988; 6: 15-22.
- Santantonio T, Jung MC, Miska S, Pastore G, Pape GR, Will H. Prevalence and type of pre-C HBV mutants in anti-HBe positive carriers with chronic liver disease in a highly endemic area. *Virology.* 1991; 183: 840-4.
- Santolini E, Migliaccio G & La Monica N. Biosynthesis and biochemical properties of hepatitis C virus core protein in Hu-7 cells. *J Virol* 1994; 68: 3631-3641.
- Scaglioni PP, Melegari M, Wands JR. Biologic properties of hepatitis B viral genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame. *Virology.* 1997; 233: 374-81.
- Scaglioni PP, Melegari M, Wands JR. Posttranscriptional regulation of hepatitis B virus replication by the precore protein. *J Virol.* 1997b; 71: 345-53.
- Schlicht HJ, Salfeld J, Schaller H. The duck hepatitis B virus pre-C region encodes a signal sequence which is essential for synthesis and secretion of processed core proteins but not for virus formation. *J Virol.* 1987; 61: 3701-9.
- Schlicht HJ, von Brunn A, Theilmann L. Antibodies in anti-HBe-positive patient sera bind to an HBe protein expressed on the cell surface of human hepatoma cells: implications for virus clearance. *Hepatology.* 1991; 13: 57-61.
- Seifer M, Standing DN. A protease-sensitive hinge linking the two domains of the hepatitis B virus core protein is exposed on the viral capsid surface. *J Virol.* 1994; 68: 5548-55.
- Seeger C, Ganem D, Varmus HE. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science.* 1986; 232: 477-84.
- Shakil AO, Hadziyannis S, Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM, Gerin JL, Casey JL. Geographic distribution and genetic variability of hepatitis delta virus genotype I. *Virology* 1997; 234:160-167.
- Shaul Y, Rutter WJ, Laub O. A human hepatitis B viral enhancer element. *EMBO J.* 1985; 4: 427-30.
- Sheen IS, Liaw YF, Lin DY, Chu CM. Role of hepatitis C and Delta viruses in the termination of chronic hepatitis B surface antigen carrier state: a multivariable analysis in a longitudinal follow-up study. *J Infect Dis* 1994; 170:358-361.
- Shih CM, Lo SJ, Myamura T, Chen SY, Lee YH. Suppression of HBV expression and replication by HCV protein in HU-7 cells. *J Virol* 1993; 67:5823-5832.
- Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol.* 2000; 81: 67-74.
- Su H, Yee JK. Regulation of hepatitis B virus gene expression by its two enhancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89: 2708-12.
- 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 U S A.* 1978; 75: 4533-7.
- Summers J, Mason WS. Replication of the genome of hepatitis B-like virus by reverse transcription of a RNA intermediate. *Cell* 1982; 29: 403-415.

- Suzuki R. SPXX, a frequent sequence motif in gene regulatory proteins. *Journal of Molecular Biology* 1989; 207: 61-84.
- Szmunn W. Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: evidence for causal association. *Prog Med Virol* 1978; 47:40.
- Tagariello G, Pontisso P, Davoli PG, Ruvoletto MG, Traldi A, Alberti A. Hepatitis C virus genotypes and severity of chronic liver disease in haemophiliacs. *Br J Haematol* 1995; 91:708-713.
- Takahashi K, Imai M, Gotanda T, Sano T, Oinuma A, Mishiro S, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis B e antigen polypeptides isolated from sera of individuals infected with hepatitis B virus: comparison with HBeAg polypeptide derived from Dane particles. *J Gen Virol*. 1980; 50: 49-57.
- Takahashi K, Aoyama K, Ohno N, Iwata K, Akahane Y, Baba K, Yoshizawa H, Mishiro S. The precore/core promoter mutant (T1762A1764) of hepatitis B virus: clinical significance and an easy method for detection. *J Gen Virol*. 1995; 76: 3159-64.
- Takahashi K, Ohta Y, Kanai K, Akahane Y, Iwasa Y, Hino K, Ohno N, Yoshizawa H, Mishiro S. Clinical implications of mutations C-to-T1653 and T-to-C/A/G1753 of hepatitis B virus genotype C genome in chronic liver disease. *Arch Virol*. 1999;144: 1299-308.
- Thomas HC, Jacyna M, Waters J, Main J. Virus-host interaction in chronic hepatitis B virus infection. *Semin Liver Dis*. 1988; 8: 342-9.
- Tillmann H, Trautwein C, Walker D, Michitaka K, Kubicka S, Boker K, Manns M. Clinical relevance of mutations in the precore genome of the hepatitis B virus. *Gut*. 1995; 37: 568-73.
- Tong SP, Li JS, Vitvitski L, Trepo C. Replication capacities of natural and artificial precore stop codon mutants of hepatitis B virus relevance of pregenome encapsidation signal. *Virology*. 1992; 191: 237-45.
- Tong SP, Li JS, Vitvitski L, Kay A, Trepo C. Evidence for a base-paired region of hepatitis B virus pregenome encapsidation signal which influences the patterns of precore mutations abolishing HBe protein expression. *J Virol*. 1993; 67: 5651-5.
- Trujillo MA, Letovsky J, Maguire HF, Lopez-Cabrera M, Siddiqui A. Functional analysis of a liver-specific enhancer of the hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88: 3797-801.
- Tsai SL, Liaw YF, Yeh CHT, Chu CHM, Kuo GC. Cellular immune responses in patients with dual infection of hepatitis B and C viruses: Dominant role of hepatitis C virus. *Hepatology*1995; 21:908-912.
- Tur-Kaspa R, Burk RD, Shaul Y, Shafritz DA. Hepatitis B virus DNA contains a glucocorticoid-responsive element. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986; 83: 1627-31.
- Tur-Kaspa R, Klein A, Aharonson S. Hepatitis B virus precore mutants are identical in carriers from various ethnic origins and are associated with a range of liver disease severity. *Hepatology*. 1992; 16: 1338-42.
- Ulrich PP, Bhat RA, Kelly I, Brunetto MR, Bonino F, Vyas GN. A precore-defective mutant of hepatitis B virus associated with e antigen-negative chronic liver disease. *J Med Virol*. 1990; 32: 109-18.
- Vento S, Rondanelli EG, Ranieri S, O'Brien CJ, Williams R, Eddleston AL. Prospective study of cellular immunity to hepatitis-B-virus antigens from the early incubation phase of acute hepatitis B. *Lancet*. 1987; 2: 119-22.
- Wang J, Lee AS, Ou JH. Proteolytic conversion of hepatitis B virus e antigen precursor to end product occurs in a postendoplasmic reticulum compartment. *J Virol*. 1991; 65: 5080-3.
- Wang Y, Chen P, Wu X, Sun AL, Wang H, Zhu YA, Li ZP. A new enhancer element, ENII, identified in the X gene of hepatitis B virus *J Virol*. 1990; 64: 3977-81.

- Wang YM, Chit W, Lo SK. Suppression of hepatitis C virus by hepatitis B virus in coinfecting patients at the National University Hospital of Singapore. *J Gastroenterol* 1999; 34:481-485.
- Wen-Lin H, Tsung-Sheng S. The encapsidation signal of hepatitis B virus facilitates preC AUG recognition resulting in inefficient translation of the downstream genes. *Journal of General Virology* 1999; 80: 1769-1776.
- Werner T. Models for prediction and recognition of eukaryotic promoters. *Mamm Genome*. 1999;10:168-75.
- Wu JCh, Chen ChM, Chen TZ, Lee SD, Yen FS, Choo KB. Prevalence and type of precore hepatitis B virus mutants in hepatitis D virus superinfection and its clinical implications. *J Infect Dis* 1996; 173: 457-459.
- Yaginuma K, Shirakata Y, Kobayashi M, Koike K. Hepatitis B virus (HBV) particles are produced in a cell culture system by transient expression of transfected HBV DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84: 2678-82.
- Yeh CHT, Chiu CHT, Tsa SL, Hong ST, Chu CHM, Liaw YF. Absence of precore mutant in dual (B and C) and triple (B, C, D) hepatitis virus infection. *J Infect Dis* 1994; 170:1582-1585.
- Yeh CT, Liaw YF, Ou JH. The arginine-rich domain of hepatitis B virus precore and core proteins contains a signal for nuclear transport. *J Virol*. 1990; 64: 6141-7.
- Yeh CT, Ou JH. Phosphorylation of hepatitis B virus precore and core proteins. *J Virol*. 1991; 65: 2327-31.
- Yeh CT, Wong SW, Fung YK, Ou JH. Cell cycle regulation of nuclear localization of hepatitis B virus core protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90: 6459-63.
- Yu X, Mertz JE. Promoters for synthesis of the Pre-C and Pregenomic mRNAs of human hepatitis B virus are genetically distinct and differentially regulated. *J Virol* 1996; 70: 8719-8726.
- Yu X, Mertz JE. Differential regulation of the pre-C and pregenomic promoters of human hepatitis B virus by members of the nuclear receptor superfamily. *J Virol*. 1997; 71: 9366-74.
- Yuh CH, Ting LP. C/EBP-like proteins binding to the functional box-alpha and box-beta of the second enhancer of hepatitis B virus. *Mol Cell Biol*. 1991; 11: 5044-52.
- Yuh CH, Chang YL, Ting LP. Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNAs of hepatitis B virus. *J Virol*. 1992; 66: 4073-84.
- Yuh CH, Ting LP. Differentiated liver cell specificity of the second enhancer of hepatitis B virus. *J Virol*. 1993; 67: 142-9.
- Zarski JP, Bohn B, Bastie A, Pawlotsky JM, Baud M, Bost-Bezeaux F, et al. Characteristics of patients with dual infection by hepatitis B and C viruses. *J Hepatol* 1998; 28:27-33.
- Zhang P, Raney AK, McLachlan A. Characterization of functional Sp1 transcription factor binding sites in the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *J Virol*. 1993; 67: 1472-81.
- Zhang P, McLachlan A. Differentiation-specific transcriptional regulation of the hepatitis B virus nucleocapsid gene in human hepatoma cell lines. *Virology*. 1994; 202: 430-40.
- Zhou S, Standring DN. Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89: 10046-50.

Zlotnick A, Cheng N, Stahl SJ, Conway JF, Steven AC, Wingfield PT. Localization of the C terminus of the assembly domain of hepatitis B virus capsid protein: implications for morphogenesis and organization of encapsidated RNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94: 9556-61.

## **LISTA ALFABÉTICA DE ABREVIATURAS**

# INDICE DE ABREVIATURAS

**A:** Adenina.  
**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.  
**ADN-VHB:** ADN del virus de la hepatitis B.  
**ADNccc:** ADN circular y cerrado covalentemente.  
**Ala:** Alanina.  
**ALT:** Alanina aminotransferasa.  
**Anti-HBc:** Anticuerpo frente al antígeno core del virus de la hepatitis B.  
**Anti-HBe:** Anticuerpo frente al antígeno e del virus de la hepatitis B.  
**Anti-HBs:** Anticuerpo frente al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.  
**Anti-VHC:** Anticuerpo frente al virus de la hepatitis C.  
**Anti-HD:** Anticuerpo frente al virus de la hepatitis delta.  
**Anti-VIH:** Anticuerpo frente al virus de la inmunodeficiencia humana.  
**Anti-IgG:** Anticuerpo frente a la inmonoglobulina G.  
**ARN:** Ácido ribonucleico.  
**ARN-VHC:** ARN del virus de la hepatitis C.  
**ARN-VHD:** ARN del virus de la hepatitis delta.  
**ARNm:** ARN mensajero.  
**Asn:** Asparragina.  
**C:** Citosina.  
**cADN:** ADN complementario.  
**C/EBP:** “CCAAT/enhancer binding protein”  
**CH:** Cirrosis hepática.  
**CTL:** Linfocito T citotóxico.  
**COUP-TF1:** “Chicken ovoalbumin upstream promoter transcription factor 1”.  
**CURS:** “Core upstream regulatory sequence”.  
**DEIA:** ADN enzima inmunoensayo.  
**Delec:** Delección.  
**DR:** Repetición directa corta de una secuencia nucleotídica.  
**EIA:** Enzima inmunoensayo.  
**G:** Guanina.  
**Gly:** Glicina.  
**Gln:** Glutamina.  
**HBcAg:** Antígeno del core del virus de la hepatitis B.  
**HBeAg:** Antígeno e del virus de la hepatitis B.  
**HBsAg:** Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.  
**HC:** Hepatitis crónica.  
**HCA:** Hepatitis crónica activa.  
**HCC:** Hepatocarcinoma.  
**HDAg:** Antígeno delta.  
**HLA:** Antígeno leucocitario humano.  
**HNF:** Factor nuclear del hepatocito.  
**HRP:anti-IgG:** Anti-IgG humana marcada con peroxidasa de rábano.  
**IgG:** Inmunoglobulina G.  
**IgM:** Inmunoglobulina M.  
**IL:** Interleuquina.  
**Ile:** Isoleucina.  
**Inr:** Región de inicio.  
**Inserc:** Insección.  
**K:** Guanina y timina.  
**Kd:** Kilodalton.  
**LEF:** “Liver-enriched factor”.  
**Leu:** Leucina.  
**Lys:** Lisina.  
**M:** Adenina y citosina.  
**Met:** Metionina.  
**nm:** Nanómetro.  
**NRE:** Elemento regulador negativo.  
**n.s.:** No significativo.

**nt:** nucleótido.  
**ORF:** Marco de lectura abierto (“open reading frame”).  
**pb:** pares de bases.  
**PBC:** Promotor básico del gen precore-core.  
**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.  
**Phe:** Fenil-alanina.  
**Pro:** Prolina.  
**R:** Adenina y guanina.  
**RIA:** Radio inmunoensayo.  
**RNLE:** “Rat nuclear liver extract”.  
**rpm:** Revoluciones por minuto.  
**RT-PCR:** Retrotranscripción y doble PCR.  
**S:** Citosina y guanina.  
**Sp1:** Proteína Spl humana.  
**T:** Timina.  
**TA:** Caja “TATA-like”.  
**TBP:** “TATA binding protein”.  
**Th:** T colaboradora (“T helper”).  
**Trp:** Triptófano.  
**UI:** Unidades internacionales.  
**UPE:** Unidades Paul Enrich.  
**URR:** “Upper regulatory region”.  
**Val:** Valina.  
**VHB:** Virus de la hepatitis B.  
**VHC:** Virus de la hepatitis C.  
**VHD:** Virus de la hepatitis D.  
**VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana.  
**W:** Adenina y timina.  
**Y:** Citosina y timina.