

La present tesi doctoral titulada “Analysis of the natural evolution of the hepatitis B virus quasispecies in the preCore/Core regions and treatment effects using conventional techniques and ultra-deep pyrosequencing” constitueix la línia de recerca de l'estudi de la variabilitat de la *quasispecies* del Virus de la Hepatitis B (VHB). En concret s'han estudiat les regions preCore/Core del VHB ja que són les menys solapades del genoma i estan relacionades amb la resposta immunitària: el preCore codifica l'antigen immunomodulador “e” (HBeAg) i el gen Core codifica la nucleocàpside que té capacitat d'estimular el sistema immunitari de l'hoste.

La tesi doctoral està constituïda per tres estudis. En el primer treball es va analitzar per seqüenciació convencional el gen del Core de 185 mostres de sèrum. Concretament, es van estudiar quatre regions del Core: la regió entre els aminoàcids 1 al 11, l'epítot minoritari Th28-47 i els dos epítots principals el Th50-69 i el B74-84. Es van incloure malalts amb hepatitis crònica pel VHB i portadors asimptomàtics del virus. Les mostres es van agrupar segons absència de tractament, administració d'interferó, lamivudina o adefovir. Els resultats obtinguts van confirmar l'efecte immunoestimulador de l'interferó en concret, en els epítots Th50-69 i B74-84. En canvi, l'administració de lamivudina o adefovir va induir certa variabilitat en l'epítot minoritari Th28-47, indicant un possible efecte immunoestimulador d'aquests tractaments, alternatiu a l'interferó. Finalment, es van observar diferències entre els malalts crònics i els portadors asimptomàtics, suggerint diferències en els mecanismes d'evasió al sistema immunitari.

En el segon estudi es va aplicar la tecnologia de seqüenciació massiva per ultraseqüenciació per analitzar la *quasispecies* en la regió del preCore, a més es va dissenyar una tècnica per analitzar el motiu YMDD de la polimerasa del mateix genoma viral. La metodologia dissenyada en aquest treball va permetre establir l'error de seqüenciació (0.03%), ja que es va incloure una seqüència control interna (també necessària per fusionar el preCore i la polimerasa). Es va confirmar la possible simultaneïtat de mutacions en el preCore i el motiu YMDD d'un mateix genoma viral. En mostres basals en absència de tractament es van detectar genomes amb mutacions de resistència al tractament en proporcions molt baixes. A més, en mostres HBeAg (+) es van detectar genomes amb mutacions al preCore i codificants de variants HBeAg (-) també en percentatges molt baixos. A més, es van descriure posicions molt conservades, indicat possibles funcions essencials per la replicació. Finalment es va observar que l'estabilitat de l'estructura secundària adoptada per la regió del preCore al ARN pregenòmic limita la seva variabilitat nucleotídica.

El tercer estudi es va centrar en l'anàlisi dels epítots Th 50-69 i el B 74-84 del Core, mitjançant la metodologia d'ultraseqüenciació. Per la complexitat i el cost de la tècnica, tan sols es van poder incloure 4 mostres basals i 2 més corresponents a un mateix pacient (per completar un estudi seqüencial). No obstant les més de 200,000 seqüències obtingudes van permetre suggerir mecanismes de variabilitat en el Core dependents del genotip viral. Es van detectar posicions molt conservades, algunes d'elles descrites com essencials per a la interacció de la nucleocàpside amb els antígens de l'envolta del virus. L'estudi seqüencial d'un pacient va demostrar que una variant present en proporcions molt baixes (1,3%) a la població basal, se seleccionava com a població majoritària després d'un període de no tractament i es mantenia durant l'administració de lamivudina.

Els resultats de la tesi concorden amb l'elevada variabilitat del VHB. L'aplicació de tècniques de seqüenciació massiva ha demostrat l'elevada complexitat de la quasispecies, a més de possibles posicions essencials o possibles mecanismes específics de la replicació del VHB.