

VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B Y SUS IMPLICACIONES

M.Sc. Marisol Devesa - Lic. Carmen Luisa Loureiro

Laboratorio Biología de Virus, Centro de Microbiología y Biología Celular
Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C.) Caracas, Venezuela

RESUMEN

El virus de la hepatitis B (VHB) presenta características únicas dentro del grupo de virus que poseen un genoma tipo ADN, entre ellas encontramos la de presentar un cierto grado de variabilidad genética atípica en este tipo de virus. Esta peculiaridad, se ha manifestado en la existencia de 7 genotipos (A-G) circulando a nivel mundial, los cuales son consecuencia de las mutaciones acumuladas a lo largo de la historia del VHB y cuyo estudio ha permitido el mejor entendimiento de la evolución y biología de este virus. Por otra parte, un evento frecuente durante la infección natural por el VHB es la generación y selección de mutantes del virus, principalmente como resultado de la presión ejercida por la respuesta inmunitaria del hospedero, así como la debida a la intervención de la vacunación y más recientemente de la terapia anti-viral. Hasta la fecha se han identificado mutaciones naturales en todos los genes virales y elementos regulatorios del VHB mediante técnicas moleculares. Sin embargo, la carencia de sistemas apropiados que permitan estudiar la influencia de estas mutantes sobre el ciclo de replicación del virus, la patogénesis de la enfermedad y su interacción con el sistema inmunitario del hospedero, impide un análisis funcional apropiado de estas mutantes. Por tal razón es poco lo que se sabe acerca de las posibles implicaciones de la variabilidad genética del VHB. A pesar de ello y después de haber sido consideradas como una mera curiosidad, estudios sobre la han permitido establecer las posibles consecuencias sobre el curso de la infección (mutaciones en el gen pre-cápside y en el gen de la cápside), sobre la eficacia de la vacuna actual (mutaciones en el gen S: mutantes de escape), los sistemas de diagnóstico (mutaciones en el gen S) y la terapia anti-viral (mutaciones en el gen P). En el presente artículo haremos una revisión acerca de cómo ocurren y cuales son las mutantes más frecuentes que se generan a lo largo del genoma del VHB. Así mismo, discutiremos sus posibles implicaciones en la evolución del virus, sobre la relación de éste con su hospedero, y sus posibles consecuencias en el diagnóstico, vacunación y terapia.

PALABRAS CLAVES: MUTANTES DEL VHB, BIOLOGÍA MOLECULAR, EPIDEMIOLOGÍA, IMPLICACIONES, DIAGNÓSTICO, VACUNA, TRATAMIENTO, EVOLUCIÓN.

SUMMARY

The Hepatitis B virus (HBV) is a DNA virus with unique features, displaying a degree of genetic variation higher than other DNA viruses. Seven genotypes (A-G) circulates around the world. The study of HBV genetic variability has led to a better understanding of the virus evolution and biology. In addition, the generation and selection of HBV variants is a frequent event during the natural course of HBV infection, mainly as a result of the host immune system pressure, and vaccine and anti-viral therapy interventions. So far, natural mutations have been identified in all HBV genes and regulatory elements by molecular techniques. However, until now there is no adequate system for studying their functional influence on the viral cycle, the pathogenesis, and the immune system. This fact had hampered the evaluation of the real implications of these mutants. Lately, after been considered as a fancy curiosity, epidemiological studies have given some clues about the possible influences of HBV mutants on the natural course of HBV infection (pre-core and core mutants), the vaccine efficacy (S mutants: escape mutants), the immune diagnosis systems (S mutants) and the anti-viral therapy (Polymerase mutants). In this article we review the most frequent HBV mutants along the viral genome, and how they are generated. Additionally, we discuss the possible implications of HBV genetic variation on viral evolution and host-virus relationship, as well as their consequences on diagnosis, vaccination and therapy.

KEY WORDS: MUTANTS OF THE HBV, MOLECULAR BIOLOGY, EPIDEMIOLOGY, IMPLICATIONS, DIAGNOSIS, IT VACCINATES, TREATMENT, EVOLUTION.

Act Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec 2000; 6 (1-2): 13-28

Aceptado para su publicación junio de 2000

INTRODUCCIÓN

Treinta y cinco años después del descubrimiento del "antígeno Australia" o antígeno de superficie del Virus de la Hepatitis B (AgSHB)¹, la hepatitis B sigue siendo un problema de salud pública a nivel mundial, estimándose que más de 2 billones de personas se han infectado hasta la fecha, y que existen cerca de 350 millones de portadores crónicos del AgSHB alrededor del mundo.

El Virus de la Hepatitis B (VHB) es el miembro prototipo de la familia *Hepadnaviridae*, la cual está conformada por virus envueltos que poseen un genoma de tipo ADN y que tienen un tropismo marcado por el hígado. La infección por el VHB o hepatitis B puede tomar diferentes cursos (hepatitis aguda, fulminante, crónica, silente), los cuales pueden ser serológica y molecularmente definidos, debido a la existencia de marcadores precisos de la infección. La infección aguda generalmente es auto limitante en adultos, sin embargo, entre un 5-10% de los individuos adultos infectados y hasta un 95% de los recién nacidos infectados perinatalmente, se convierten en portadores crónicos del virus. Las infecciones crónicas progresan a cirrosis en el 40% de los niños infectados al nacer y en el 5% de los individuos infectados en edad adulta. Estas cifras hacen que la hepatitis B sea la cuarta causa de muerte por enfermedades infecciosas a nivel mundial.

ESTRUCTURA DEL VIRIÓN Y GENOMA DEL VHB

El virión completo del VHB o partícula de Dane² presenta un diámetro de aproximadamente 42 nm y posee una envoltura lipoproteica externa formada por un bajo contenido de lípidos. La nucleocápside interna de 30-34 nm, está formada por 180 copias de la proteína de la cápside (también denominada antígeno de la cápside, AgcHB) que rodean el ADN genómico (Figura 1a). La nucleocápside también porta la

polimerasa viral (Pol), una proteína de shock térmico (Hsp90) y una proteína quinasa C capturada del citosol de las células infectadas³.

Protegido por la cápside viral se encuentra el genoma ADN de apenas 3,2 kb, en forma circular relajada, cuya circularidad está mantenida por puentes de hidrógeno entre los extremos cohesivos de aproximadamente 250 pb (Figura 1b). El genoma del VHB es parcialmente de doble cadena, formado por una cadena larga de polaridad negativa de 3,2 kb y una cadena corta positiva de longitud variable (20-80% la longitud de la cadena negativa), cuyo extremo 5' está covalentemente unido al extremo 5' de la cadena negativa. Los extremos terminales de ambas cadenas presentan unas secuencias de 11-12 nts directamente repetidas, conocidas como DR1 y DR2, que juegan un rol importante en dirigir la iniciación de la síntesis del ADN.

A pesar de su pequeño tamaño, el genoma de los hepadnavirus codifica para 7 proteínas estructurales a través de un extensivo solapamiento de sus genes y al uso de una estrategia de expresión que les permite la iniciación diferencial de la transcripción sin utilizar (en el caso de los hepadnavirus de mamíferos) procesamiento o "splicing" de sus ARNs (revisado en ref. 4). El genoma del VHB presenta cuatro marcos de lectura abiertos (ORF), los cuales codifican para las proteínas de la envoltura (ORF S), los antígenos de la cápside (ORF C), la ADN polimerasa (ORF P) y el producto del gen X (Figura 1b). El ORF S contiene tres codones de iniciación en el mismo marco de lectura, lo cual permite subdividirlo desde el extremo 5' al 3' en tres regiones: Pre-S1, Pre-S2 y S, a partir de las cuales se sintetizan las proteínas grandes (L), mediana (M) y pequeña o principal (S) que van a formar la envoltura del virus⁵. El ORF C contiene dos codones de iniciación lo cual le permite la síntesis de dos polipéptidos: una proteína no estructural que es secretada, el antígeno e (AgeHB)



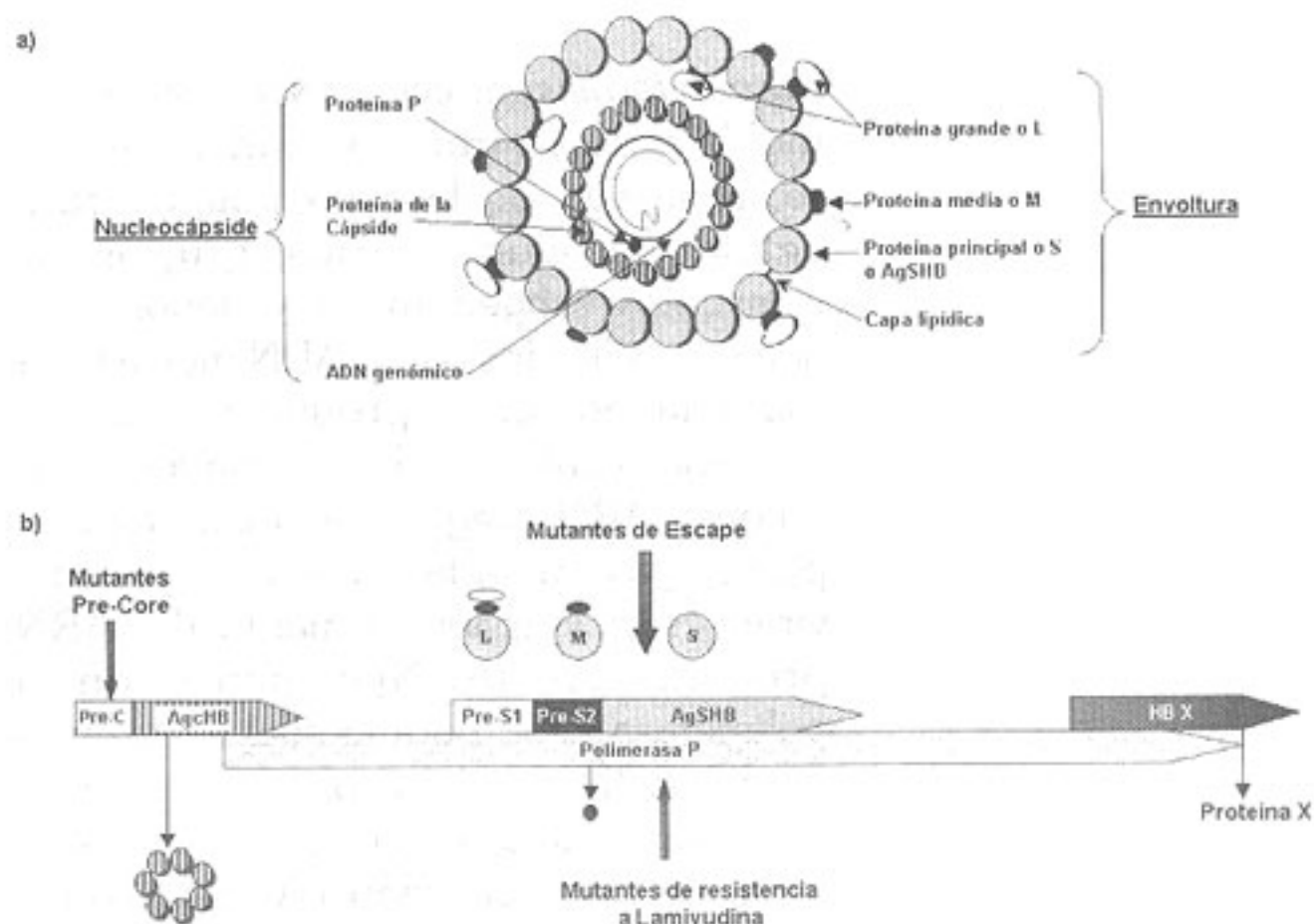
Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Variabilidad Genética
del Virus de la Hepatitis
B y sus implicaciones

de 18 kDa y el antígeno de la cápside o core (AgcHB) de 21 KDa. La síntesis del AgeHB resulta del procesamiento proteolítico de los extremos amino y carboxilo del producto del gen completo (precore/core). El AgeHB difiere de la proteína de la cápside por presentar una extensión de 10 aa's en el extremo amino y por la ausencia del extremo básico carboxilo. El ORF P cubre las tres cuartas partes del genoma solapándose con algunas partes del ORF S, el ORF C y el ORF X, y codifica para la polimerasa viral. La ADN polimerasa viral ejerce su función como un polipéptido con múltiples dominios: dominio de Proteína Terminal (PT) el cual está covalentemente unido a la hebra negativa del ADN, el dominio Transcriptasa Reversa y el dominio RnasaH⁶. La Polimerasa además de ser la enzima encargada de la transcripción reversa del ARN pregenómico, posee un rol importante en el ensamblaje de los dímeros de la cápside y es la responsable de la co-encapsidación de ambos componentes⁷, por lo cual la generación de mutaciones a lo largo de este gen puede tener graves consecuencias para la viabilidad del virus. El ORF X es el menor del genoma y fue identificado por Galibert y colaboradores en 1979⁸ y codifica para un polipéptido de 145-154 aa's (17 KDa) cuya función todavía no es muy clara.

CICLO DE INFECCIÓN VIRAL

Debido a que se carece de un sistema de infección apropiado para el VHB, poco es lo que se sabe acerca de las etapas tempranas de la infección, principalmente en lo que respecta a interacción con el receptor celular, y los pasos posteriores de penetración, decapsidación y transporte a núcleo del genoma viral. Sin embargo, la exitosa transfección de líneas celulares de hepatoblastoma humanas con dos tandas del genoma del virus clonado^{9,10} ha permitido el estudio más detallado de las etapas tardías de la infección (síntesis del cccADN, transcripción y traducción, encapsidación y morfogénesis) (Figura 2).



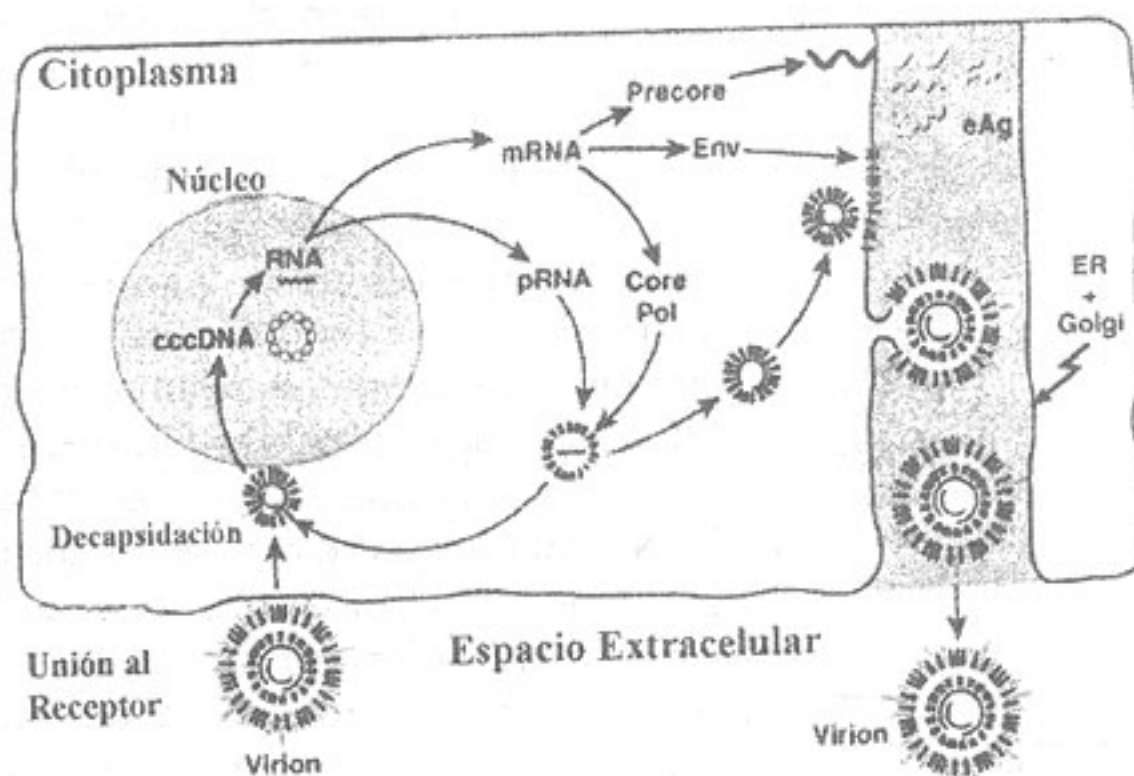
Etapas tempranas: el ciclo infeccioso de los hepadnavirus se inicia con la interacción selectiva de la proteína L de la envoltura viral con un receptor específico todavía no identificado, presente en la superficie de los hepatocitos de la especie apropiada. Posterior a la interacción con el receptor, el virus penetra al interior celular introduciendo la nucleocápside al citosol donde se cree ocurre la decapsidación, evento que permite la liberación del ADN genómico. Una vez liberado, el ADN genómico es dirigido al núcleo donde es reparada la hebra positiva incompleta del ADN genómico, para originar un ADN circular covalentemente cerrado (cccADN), intermediario de replicación que puede ser detectado en el hígado después de 6-16 horas de la infección con hepadnavirus de pato¹¹.

Figura 1.

- a) Esquema de una partícula viral infecciosa del VHB;
- b) Esquema lineal del genoma del VHB donde se muestra el solapamiento de los marcos de lectura abiertos, las proteínas que codifican los diferentes genes, y los sitios donde ocurren las mutaciones más relevantes.

Figura 2.

Esquema del ciclo de vida del VHB en el hepatocito. ER: retículo endoplasmático; mRNA: ARN mensajeros; pRNA: ARN pregenómico; eAg: antígeno e del VHB.



Etapas tardías: el cccADN constituye el molde para la transcripción viral, que se inicia cuando la ARN polimerasa II celular produce varios grupos de transcritos subgenómicos y genómicos, que son utilizados como ARN mensajeros (para la posterior producción de las proteínas virales en el citoplasma celular) y como ARN pregenómico (ARNpg). El primer paso para la síntesis del genoma viral, es el empaquetamiento del ARN pregenómico (ARNpg) junto con la polimerasa viral, para lo cual el extremo 5' del ARN pg debe plegarse en una estructura tallo-asa, que se conoce como señal de encapsidación (70 nts, 1846-1916 desde el sitio EcoRI) o secuencia épsilon e (revisado en la ref. 12). El ARN pg encapsidado junto con la polimerasa viral es transcrito reversamente iniciándose la síntesis continua del ADN (-). Al finalizar la transcripción reversa, el ARNpg es degradado hasta los últimos 18 nt por la actividad de Rnasa H de la polimerasa viral, los cuales van a servir posteriormente de cebadores para la síntesis de la hebra positiva del ADN genómico. El ribonucleótido de 18 nt es translocado al DR2 cerca del extremo 5' de la hebra (-) donde se inicia la síntesis de la hebra (+) para formar el ADN circular relajado.

Por otra parte, las proteínas de la envoltura recién sintetizadas son dirigidas al RE y gran parte de ellas son exportadas en forma de partículas subvirales (esferas y filamentos) a través de la vía secretoria constitutiva de la célula, gemando hacia el lumen de un compartimiento post-RE/pre-Golgi. En un proceso más lento, parte de las proteínas L insertadas en la membrana del RE, son translocadas hacia el lumen del RE, mientras otra parte permanecen en su localización citoplasmática, presumiblemente asociadas a la chaperona hsc70. Las nucleocápsides citoplasmáticas recién sintetizadas que contienen el ADN viral pueden reingresar al núcleo (aumentando el pool de cccADN) o en presencia de suficiente cantidad de proteína L en la membrana del RE, interactuar con las proteínas de la envol-

tura. Las nucleocápsides desnudas requieren recubrirse de las proteínas de la envoltura para poder ser exportadas, por lo cual son dirigidas hacia la membrana del RE que contienen las proteínas de la envoltura, por un mecanismo desconocido. Una vez que las nucleocápsides se cubren de la envoltura, ocurre la interrupción de la entrada de dNTP al interior de la nucleocápside, lo cual podría explicar el hecho de que la síntesis de la hebra positiva de ADN se detenga antes de completarse. Después de gemar hacia el lumen del RE o de un compartimiento intermediario, los viriones son secretados a través del transporte vesicular de la célula y eventualmente liberados al torrente sanguíneo.

VARIABILIDAD DEL VHB

Y SUS IMPLICACIONES

Restricciones y factores que favorecen la generación de variabilidad del VHB

El VHB presenta ciertas peculiaridades tanto en su genoma como en su ciclo de replicación, que lo hacen especialmente susceptible a la generación de variabilidad. Entre estas características especiales destacan el hecho de poseer un paso de transcripción reversa en su ciclo de replicación, hecho que diferencia los hepadnavirus del resto de los virus cuyo genoma está compuesto por una molécula de ADN, los cuales suelen ser por definición genéticamente más estables que los virus ARN. Por tal razón la heterogeneidad de las cepas del VHB que circulan en el mundo es 10^4 veces mayor que para cualquier genoma ADN.

La menor fidelidad de la transcripción reversa favorece por tanto la emergencia de mutaciones naturales, las cuales pueden generarse por sustituciones puntuales (transición, transversión), por reordenamientos de genes (debidos a delecciones o inserciones) o por cambios en los marcos de lectura. Recientemente, han surgido ciertas evidencias sobre la posibilidad de recombinación de diferentes genomas durante el paso



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Variabilidad Genética
del Virus de la Hepatitis
B y sus implicaciones

de transcripción reversa en pacientes coinfectados con diferentes variantes del virus, tema al que se hace referencia más adelante en este artículo ¹³.

Así como existen factores que favorecen la generación de variabilidad, el genoma del VHB también ofrece restricciones. Estas restricciones están dadas fundamentalmente por el fuerte solapamiento de los marcos de lectura, por lo cual mutaciones inocuas para un gen podrían afectar fatalmente a otro gen cuya secuencia se solape al primero, lo cual implica que la mayoría de las mutantes que se generan sean defectivas y no viables ¹⁴.

Las mutaciones ocurren al azar a lo largo de todo el genoma y en todos los genes del VHB, seleccionándose naturalmente aquellas mutantes que ofrezcan alguna ventaja selectiva sobre la cepa salvaje. Es así como al comparar las secuencias de nucleótidos de diferentes aislados se observa que la región pre-S es la región más variable del genoma (74,5-91,4% de similitud de secuencia entre las diferentes variantes a nivel de pre-S1 y 78,3-93,1% a nivel de pre-S2), la región precore y core presenta una variabilidad intermedia (69,6% de similitud de secuencia) y el gen-S es el más conservado especialmente en la parte del gen que se solapa con el gen P (81,9% de nucleótidos conservados) ¹⁵.

La variabilidad genética del VHB se manifiesta tanto a nivel molecular (*Genotipos*: variabilidad acumulada a lo largo de la vida del virus y *Mutantes*: generadas durante la infección con replicación continua de un paciente) como a nivel serológico (Variabilidad Serológica), por lo cual en el presente artículo consideramos relevante hacer una breve mención de ambas.

Variabilidad serológica del AgsHB:

La existencia de heterogeneidad entre los diferentes aislados del VHB se hizo manifiesta tempranamente en la historia del virus. En los años 70 se identificó la

existencia de dos pares de variaciones alélicas: *d/y*¹⁶ y *w/r*¹⁷ en base a ensayos de inmunodifusión, lo cual permitió la definición de los cuatro principales subtipos del antígeno de superficie del VHB (AgsHB) con el "determinante común *a*" (*adw*, *adr*, *ayw*, *ayr*). Posteriormente se identificaron cuatro subdeterminantes adicionales de *w*¹⁸ y el determinante *q*¹⁹, subdividiéndose el subtipo *adr* en *q*-positivos y *q*-negativos ²⁰, lo cual originó nueve subtipos diferentes (*adw2*, *adw4*, *adr*, *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayrq+*, *ayrq-*). Recientemente se ha descrito un par alélico adicional: los subtipos *i* y *t* que corresponden a un cambio de isoleucina en la posición 126 por treonina ²¹.

Esta clasificación serológica de los diferentes aislados prevaleció durante algunos años, hasta que a principios de los años 80 se definió la distribución mundial de estos subtipos ²² y se obtuvo la secuencia completa de los genomas de muchos de estos aislados ^{23, 24, 8, 25}, haciéndose evidente la existencia de numerosas sustituciones a lo largo del genoma.

El análisis de las sustituciones existentes en la secuencia de aminoácidos del antígeno de superficie entre los diferentes subtipos del VHB, permitió establecer las bases moleculares de la variabilidad a nivel del AgsHB y reveló la importancia de la Lys122 para la expresión del determinante *d* y de la Lys160 para el determinante *w*²⁶, observándose que el cambio de *d* por *y* y el cambio de *w* por *r* era mediado por la sustitución de Lis por Arg en las posiciones 122 y 160 respectivamente. Análisis posteriores mostraron que las sustituciones en el residuo 127 explicaban las variaciones *w2-w4*²⁷.

VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VHB

Genotipos del VHB

La emergencia de un número mayor de secuencias completas de aislados de los diferentes subtipos del VHB, ha permitido la clasificación genética de los

Geno tipo	Subtipo	Secuencia de aa 120/150	Distribución geográfica
A	adw2	PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNCTCI	Noroeste Europeo, USA
	ayw1		Africa Central
B	adw2	PCKTCTTPAQGTSMFPSCCCTKPTWNCTCI	Asia, Pacífico, Indonesia, China
	ayw1	R	Vietnam
C	adw2	PCKTCTTPAQGTSMFPSCCCTKPS DGNCTCI	Asia Oriental
	adrq+		Corea, China, Japan
	adrq-		Polinesia
	ayr		Vietnam
D	ayw2	PCRTCTTTAQGTSMYPSCCCTKPS DGNCTCI	Mundial, Area del Mediterráneo
	ayw3		India
E	ayw4	PCRTCTTLAQGTSMFPSCCCSKPS DGNCTCI	Africa Occidental
F	adw4q	PCKTCTTLAQGTSMFPSCCCSKPS DGNCTCI	Sur y Centro América
	ayw4*		Polinesia
	adw2*		
G**	adw2	ND	ND

Tabla N° 1

Correspondencia entre genotipos y subtipos del VHB y su distribución geográfica. (Tomado de 33,34*,32; ND: no determinado).

diferentes aislados del VHB definiéndose cuatro genotipos (A-D), basados en una divergencia del 8% o más entre las secuencias del genoma completo²⁵ y de 4% entre secuencias del gen S²⁸. La comparación de las secuencias del gen S de los diferentes subtipos, permitió por un lado, verificar que el patrón de clasificación en genotipos obtenido correspondía a la clasificación propuesta por Okamoto (1988)²⁵ y por otro lado permitió definir dos nuevos genotipos: E y F, correspondientes a los subtipos ayw4 y adw4 respectivamente^{29,30}, totalizando 6 los genotipos del VHB (Tabla 1). Recientemente se identificó un nuevo genotipo viral (Genotipo G) perteneciente al grupo serológico adw2³¹.

El genotipaje del VHB ha permitido un mejor entendimiento de la relación existente entre las diferentes cepas del virus, por lo que hoy en día la asignación de genotipos ha ganado mayor aceptación que la determinación de subtipos. El análisis de la distribución geográfica de los diferentes genotipos ha permitido observar que el genotipo D es el más disseminado a nivel mundial, ya que ha sido encontrado en muestras de pobladores aborígenes de Asia, en Indonesia, Papua y Alaska, predomi-

nando en el área del Mediterráneo y la India. Los genotipos B y C están confinados a poblaciones del Asia Sur-Oriental y lejano Oriente y el genotipo E a poblaciones de la parte sub-Sahara del Africa. Los genotipos A y D están distribuidos principalmente en el viejo mundo, mientras que el genotipo F es encontrado en poblaciones aborígenes de América del Sur (revisado por 32, 33) (Tabla 1), sugiriéndose que podría representar el genotipo autóctono del nuevo mundo, ya que es el más divergente de los VHB humanos^{30, 29}.

La importancia clínica y biológica de la existencia de diferentes genotipos y de la

generación de mutantes del VHB es todavía poco entendida, sin embargo existen algunos ejemplos que podrían reflejar diferencias biológicas y variaciones en el potencial replicativo de las diferentes cepas. Entre los ejemplos que comparan virus de diferentes genotipos tenemos la baja transmisibilidad vertical de madres portadoras sanas del virus a sus bebés en el Noroeste Europeo, donde circula principalmente el genotipo A^{34, 35} y la frecuente transmisión vertical de la infección en Asia del Este donde predominan los genotipos B y C³⁶ en comparación con Africa, donde la transmisión horizontal temprana parece ser más importante³⁷. Adicionalmente, existen variaciones considerables en las tasas de portadores del VHB en diferentes partes del mundo, lo cual en cierta medida se correlaciona con la distribución mundial de genotipos. Es así como los genotipos B y C predominan en áreas de alta prevalencia de portadores del VHB de Asia Oriental, mientras los genotipos A y D son las cepas del VHB dominantes en Africa y el área del Mediterráneo en donde las mujeres jóvenes en edad reproductiva portadoras del VHB es menos probable que sean AgeHB (+) debido a la temprana seroconversión a anti-AgeHB.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Variabilidad Genética
del Virus de la Hepatitis
B y sus implicaciones

Otro aspecto interesante sobre las implicaciones de la circulación de los diferentes genotipos del VHB, es su posible efecto sobre la eficiencia de la vacuna. Recordemos por ejemplo que los genotipos E y F muestran la mayor divergencia de la secuencia de aa's en el determinante a (presente en la vacuna recombinante actual que se corresponde con los genotipos A y B) se desconoce si estas sustituciones podrían proveer pobre protección en los individuos vacunados expuestos a la infección por cepas E y F. Es interesante recordar que en Senegal donde circula el genotipo E, se han reportado fallas frecuentes en la obtención de protección con la vacuna³⁸, en los cuales la sustitución de Thr por Ser en el residuo 140 del asa del determinante "a" podría tener alguna implicación.

Mutantes del VHB

Además de la variabilidad genética del VHB acumulada a lo largo de su historia, que ha permitido la generación de genotipos del VHB, la infección de un paciente por el VHB en continua replicación origina la producción de mutantes, principalmente como resultado de la presión ejercida por la respuesta inmunitaria del hospedero, así como la debida a la intervención de la vacunación y más recientemente de la terapia anti-viral (revisado en ref. 15).

El estudio de estas mutantes ha generado mucha controversia en el medio científico, llegando inclusive a ser consideradas como una mera curiosidad³⁹. Las primeras mutantes del VHB fueron descritas hace más de 10 años por un grupo de investigadores ingleses y las denominaron mutantes pre-core⁴⁰. Posterior a esto se han reportado gran número de mutaciones a todo lo largo del genoma (Tabla 2), sin embargo las más frecuentes e interesantes son: las mutantes pre-core, las mutantes de escape y las mutantes de resistencia a drogas anti-virales. Adicionalmente se han reportado mutaciones (sustituciones, deleciones e inserciones) en el ORF X

que involucran el locus Cp/ENI, las cuales podrían alterar significativamente la replicación viral, sin embargo en el presente artículo no nos referiremos a ellas.

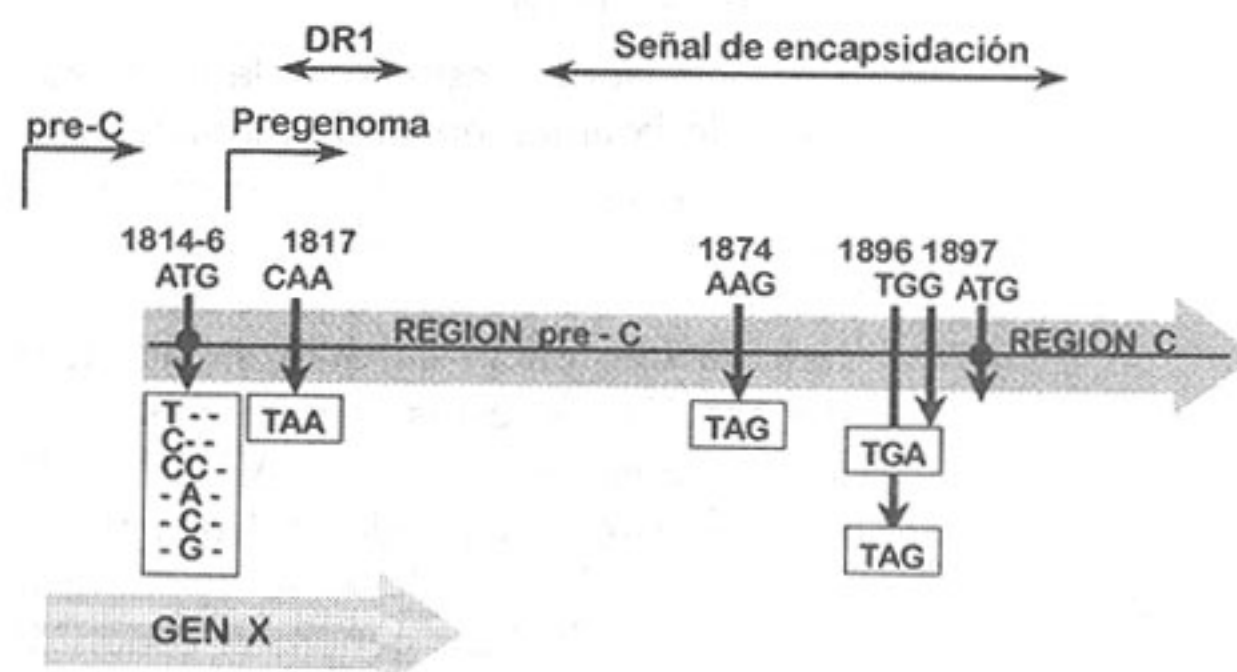
Mutantes pre-core:

Las mutantes pre-core son ocasionadas por la aparición de una mutación puntual de G a A en el nucleótido 1986 del gen pre-core/core, generando un cambio del codón 28 (TGG, Trp) a un codón de terminación o codón "stop" (TAG) (Figura 3). Este cambio previene la expresión del antígeno de excreción "e" (AgeHB), sin afectar la producción del antígeno de la cápside (AgcHB)⁴⁰. De esta manera, los pacientes que están infectados con estas mutantes, presentan altos niveles de ADN viral a pesar de la presencia de anticuerpos anti-AgeHB en el suero.

La región pre-core/core contiene dominios de gran importancia para la replicación del VHB: la secuencia DR1 necesaria para la transcripción reversa, la señal de encapsidación en el extremo 5', y el sitio de inicio del ARN pre-genómico. Si bien la traducción del gen pre-core no es requerida para la propagación del virus y no forma parte del virión, el AgeHB parece tener un rol en la progresión a la cronicidad de la infección (persistencia viral), modulando la respuesta inmunitaria. Esto es debido a que comparte epitopes T con el AgcHB y a que es expuesto en la superficie de los hepatocitos infectados siendo blanco de la respuesta de linfocitos T citotóxicos.

Figura 3.

Representación gráfica de las mutaciones Pre-Core que previenen la síntesis del AgeHB por modificación de los codones de iniciación o por generación de codones "stop". ATG: codón de iniciación; las flechas indican la posición nucleotídica donde ocurre la mutación.



El establecimiento de la importancia biológica y/o clínica de las mutantes pre-core es controversial, sin embargo en los años recientes ha surgido nueva evidencia que podría esclarecer sus posibles implicaciones. En este sentido recordemos que el AgeHB es un marcador establecido de replicación e infectividad, y la seroconversión a anti-eHB está en general asociada a la desaparición del ADN viral y remisión de la enfermedad hepática⁴¹. En el caso de las mutantes pre-core se observa que se mantiene la positividad del ADN viral a pesar de la seroconversión a anti-eHB, lo cual ha sido asociado a enfermedad hepática más severa y a hepatitis fulminante, sin embargo, se ha reportado que si una cepa tipo salvaje está presente después de la seroconversión a anti-eHB es más probable que la infección sea más suave^{42, 15}.

La descripción de un epítipo de células T citotóxicas (posición 11-27 de la proteína de la cápside), el cual presenta variaciones importantes en las mutantes pre-core favorece la hipótesis de que la selección de las mutantes pre-core que no expresan el AgeHB, podría ser un mecanismo de persistencia viral, debido a la pérdida de la modulación de la respuesta de células T contra los péptidos relacionados AgcHB/AgeHB. Adicionalmente, se ha propuesto que el antígeno e podría atravesar la placenta de madres portadoras del virus, e inducir tolerancia en las células T cooperadoras en el feto, de manera que cuando el bebé se infecte en el momento del nacimiento, los antígenos e y de la cápside no serán reconocidos como extraños, generando persistencia viral⁴².

Por otro lado, el estudio de la epidemiología de la emergencia de mutantes pre-core permitió observar diferencias en la distribución geográfica de estas variantes, al mismo tiempo que se ha reportado la existencia de diferencias en la generación de estas mutaciones entre los diferentes genotipos del VHB^{43, 44, 45}, lo cual parece depender del residuo en la posición 1858 la cual se opone a la posición 1896 (que genera el codón de

terminación) en el tallo de la señal de encapsidación del pregenoma. La secuencia de encapsidación ϵ está bastante conservada entre los diferentes genotipos, sin embargo el nt 1858 puede ser T o C (C en esa posición previene la formación del codón de terminación) dependiendo del genotipo. El nucleótido C1858 se encuentra principalmente en los genotipos A y se ha observado en 3 genotipos F^{29, 45} siendo poco frecuente en los genotipos C y D, mientras que T-1858 se encuentra siempre en los aislados genotipo B y E. Recientemente el análisis de un mayor número de secuencias permitió observar una T1858 en 17 aislados genotipo F provenientes de pacientes anti-AgeHB (+), 11 de los cuales también presentaban la mutación A1896 que previene la expresión del AgeHB, y en 5 aislados genotipo F de pacientes AgeHB (+), por lo cual sugieren que la T1858 parece ser la sustitución tipo salvaje del genotipo F de América Central⁴⁶. El hecho de que las mutaciones pre-core estén menos asociadas al genotipo A, ha sido interpretado como el resultado de un efecto desfavorable de la C1858 sobre la estructura de la señal de encapsidación ϵ , ya que se generaría una señal de encapsidación muy pobre, desestabilizándola⁴³. Además de la mutación A1896, se han reportado otras mutaciones en la región pre-core que previenen la expresión de AgeHB, sin embargo no son tan comunes (Tabla 2).

Mutantes de escape a la vacuna:

Se han descrito mutaciones asociadas al determinante neutralizante "a" del antígeno de superficie (AgS HB) (Tabla 2). En todos los subtipos conocidos, el determinante "a" está localizado entre los residuos 120-147, y se predice que posee una estructura de doble asa proyectándose en la superficie de la partícula del VHB, la cual es estabilizada por puentes disulfuro en donde existen epítipes dependientes de conformación. El dominio "a" está predominantemente localizado en la segunda asa entre los



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Variabilidad Genética
del Virus de la Hepatitis
B y sus implicaciones

residuos 139 y 147, la cual está bastante conservada o presenta sustituciones restringidas a aminoácidos similares. Los residuos 141-145 (KPTDG) son críticos para la unión de anticuerpos protectores evocados por la vacuna. Debido a que anticuerpos anti-"a" son capaces de proteger a los individuos de infecciones contra cualquiera de los subtipos del virus, mutaciones en este determinante originan la aparición de las denominadas mutantes de escape a la vacuna ⁴⁷.

Mutaciones en esta asa han sido reportadas en un niño vacunado en Italia ⁴⁸, y en 7 niños de Singapore ⁴⁹, del cual se aisló una variante del VHB que presentaban una mutación en el residuo 145 de Gly a Arg. Adicionalmente se ha observado la aparición de una mutación en el residuo 141 de Lys a Glu en el Oeste Africano originada por un cambio de A por G en el nt 421 ⁵⁰ (Tabla 2). Estas últimas mutantes de escape se han visto sólo en el subtipo *ayw4* en Gambia, que corresponde en esa región al genotipo E que posee una Ser140 en vez de una Thr, lo cual podría estar predisponiendo la aparición de la mutante 141. Interesantemente esta situación también se ve en los genotipos F, en los cuales no se ha investigado la aparición de mutantes 141. Adicionalmente se han reportado mutantes en la posición 126 en una familia Japonesa que parecen influir la unión de anticuerpos monoclonales y una alanina en el aa 144 en un paciente de Singapore (Revisado en ref. 51).

En general estas variantes presentan un interés epidemiológico y podrían representar dificultades para el diagnóstico con ensayos que utilizan anticuerpos monoclonales, y posiblemente para el diseño futuro de vacunas, sin embargo no representan un problema relevante inmediato para los programas de vacunación ⁵¹. Ejemplo de ello es que ni anti-

Tipo de Mutación	Tipo de Sustitución	Posición aa	Efecto
Transición	T - C	1815	Falla en la iniciación Pre-C
Transversión	G - T	1815	Falla en la iniciación Pre-C
Transición	G - A	1816	Falla en la iniciación Pre-C
Transición	C - T	1817	Eliminación de la síntesis Pre-C
Transición	T - C	1836	Mutación en el codón Stop
Transición	A - G	1838	Mutación en el codón Stop
Inserción	36 nt	1895 - 1896	Codon Stop pre-C en 3'
Transición	T - C	512	Resistencia a Lamivudina y famciclovir
Transición	G - C	519	Resistencia a famciclovir
Transición	C - T	523	Resistencia a famciclovir
Transversión	C - A	526	Resistencia a Lamivudina y famciclovir
Transición	A - G	550	Resistencia a Lamivudina (motivo YMDD)
Transversión	G - T	550	Resistencia a Lamivudina (motivo YMDD)
Transición	G - A	122	Conversion del determinante d a y
Transición	G - A	145	Mutante de escape a la vacunación
Transición	A - G	160	Conversion del determinante w a r

cuerpos monoclonales contra el asa 1 o el asa 2, ni sueros de vacunados o de pacientes convalecientes reconocieron una proteína recombinante producida en levadura que presentaba una arginina en el residuo 145. Sin embargo, es importante señalar que si estas mutantes que no son neutralizadas por la inmunidad inducida por la vacuna, comienzan a diseminarse podría afectar la campaña de vacunación contra la hepatitis B actualmente en curso.

Hasta los momentos no se han realizado estudios que evalúen la incidencia y prevalencia de estas mutantes a nivel mundial, para lo cual tendría que utilizarse ensayos que hagan uso de anticuerpos policlonales, sin embargo, es interesante recordar que en estudios realizados en Gambia alrededor de 10% de los vacunados seroconvirtieron a anti-HBc, lo cual sugiere que esos individuos se infectaron a pesar de estar vacunados (revisado en ref. 51). Sin embargo, un dato esperanzador es el hecho de que actualmente existen vacunas comerciales que incorporan las

Tabla N° 2

Mutaciones más frecuentes encontradas en el gen precore/core, polimerasa y superficie.

regiones pre-S1 y pre-S2, las cuales contienen epitopes neutralizantes y son altamente antigénicas, habiéndose observado que en ratones no respondedores a las vacunas de primera generación, estimulan la producción de anticuerpos anti-HBs.

Mutantes de resistencia a análogos de nucleósidos: Mutación YMDD

El desarrollo de nuevas estrategias antivirales permanece siendo de importancia primordial en el tratamiento de la hepatitis B crónica. La polimerasa del VHB, posee múltiples funciones entre las que incluye la transcripción reversa, esencial para la replicación del virus, lo que representa un blanco ideal para la terapia antiviral. Recientemente, se están empleando análogos de nucleósidos tales como lamivudina y famciclovir, en el tratamiento de la hepatitis B crónica, estos nuevos agentes inhiben la replicación del VHB, por acción directa en la ADN polimerasa dependiente de ARN, mostrando resultados promisorios en términos de efectos antivirales y tolerancia^{52,53}. Sin embargo, la monoterapia o uso de una sola droga por cortos periodos de tiempo no es suficiente para eliminar la infección viral, mientras que el tratamiento por largos periodos se ha asociado con la aparición de mutantes resistentes a la droga (Tabla 2).

El dominio catalítico de la transcriptasa reversa (TR) en la polimerasa del VHB (Fig. 4) comparte los residuos del motivo YMDD (Tyr-Met-Asp-Asp) con otras transcriptasas reversas descritas. La reactivación de la infección por el VHB, posterior al tratamiento con los análogos de nucleósidos, se encuentra asociado con el incremento de mutaciones en la proteína P, sin embargo, la consecuencia funcional de estas mutaciones genómicas no es clara.

La resistencia al tratamiento con lamivudina, se ha asociado con cambios en el motivo YMDD del dominio C⁵⁴, donde se localiza el sitio catalítico de la enzima TR (Fig. 4). Estas mutaciones se mani-

fiestan por la resistencia a lamivudina producto de la sustitución de una metionina (aa 550) por una isoleucina o valina^{55,56}. Posteriormente, análisis genéticos mostraron que las mutaciones asociadas a la resistencia por lamivudina, son mucho más complejas, pudiéndose clasificar en dos grupos, *Grupo 1*: mutaciones únicamente en el dominio C (M539I) y *Grupo 2*: mutaciones en el dominio C y B (M539V + L515M). La figura 4 muestra las principales mutaciones encontradas en asociación al tratamiento con lamivudina y famciclovir. A diferencia de lo que sucede con lamivudina, las mutaciones asociadas al tratamiento con famciclovir, no afectan al motivo YMDD de la polimerasa (dominio C), pero sí generan la aparición de mutaciones en el dominio B de la proteína (L526M, V519L).

Un estudio reciente indica, que la incapacidad de eliminar el VHB del suero durante la terapia con lamivudina, puede indicar que en algunos pacientes la selección de la mutante resistente al tratamiento, puede generarse tan rápidamente que impide observar la eliminación temporal del ADN viral en el suero.

Estudios realizados utilizando modelos *in vivo* e *in vitro* muestran, que la infección crónica se mantiene por la presencia en el núcleo del hepatocito de 30 a 40 copias del cccADN, que sirve como molde para la transcripción viral⁵⁷. La síntesis del nuevo cccADN puede ser bloqueada por un inhibidor de la transcripción reversa. Sin embargo, una terapia por corto tiempo no es capaz de eliminar el "pool" intracelular del cccADN, por lo que representa una fuente de producción de nuevos virus posterior al cese del tratamiento⁵⁸, a diferencia de un tratamiento por un largo período, donde es posible eliminar el cccADN almacenado en el hígado, siempre y cuando sea suficiente como para garantizar que los hepatocitos infectados, sean eliminados por muerte natural o por la respuesta inmunitaria. Esto sugiere, que el éxito o fracaso en



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Variabilidad Genética
del Virus de la Hepatitis
B y sus implicaciones

la eliminación de la infección depende de la erradicación del cccADN intracelular, del surgimiento de mutaciones y del número de hepatocitos infectados.

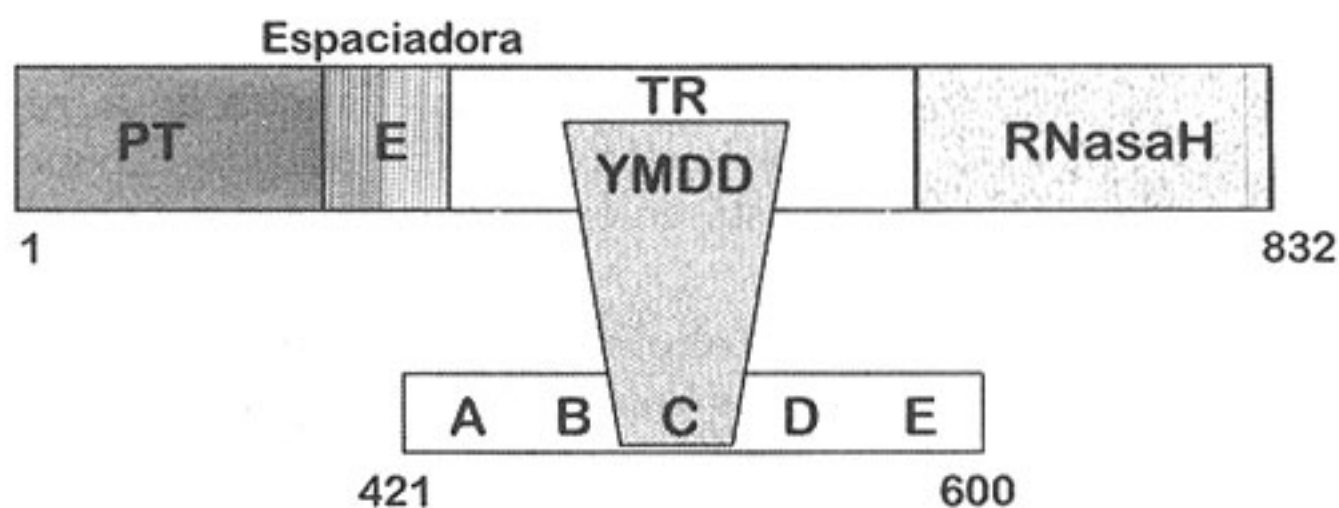
La identificación de otros blancos virales pueden ser de gran utilidad en el desarrollo de estrategias que inhiban la replicación del virus, como por ejemplo el bloqueo de la interacción del virus con el receptor y del transporte del genoma viral al núcleo⁵⁹ o de la encapsidación del pregenoma^{60, 61}.

Una de las propuestas en la utilización de antivirales, es la implementación de una terapia combinada con análogos de nucleósidos, que actúen inhibiendo de manera distinta a la polimerasa viral, a fin de obtener un efecto antiviral sinérgico, previniendo o retardando la aparición de mutantes resistentes.

Recombinación entre los aislados del VHB

Como ya hemos mencionado, la variación en la secuencia del VHB, se producen tanto por mutaciones puntuales como por recombinación de los fragmentos de ADN⁶². De estos mecanismos, la probabilidad de recombinación de las diferentes cepas del VHB dentro de un hospedador, que permite la producción de virus mosaico, parece ser baja. Recordemos que una condición necesaria para que ocurra un evento de recombinación, es la superinfección con diferentes variantes del VHB, hecho que se considera raro y restringido a individuos de alto riesgo.

Durante el ciclo de infección del VHB (Figura 2) existen ciertas etapas susceptibles a la recombinación. La más importante es la etapa de replicación del VHB, sin embargo, no es el único estado donde el VHB tiene la oportunidad de recombinar¹³. La iniciación de la infección y la replicación de los hepadnavirus involucran la conversión de un ADN genómico circular relajado, a un cccADN dentro del núcleo de la célula infectada, por un proceso poco conocido, en el cual se cree que intervienen enzimas



Famciclovir		Lamivudina	
R448Q	Dominio B	I338S	M539I
V508L		F501L	M539V
L515M		V508L	V542I
L515V		L515M	L564V
P512L		V515M	S588T
T519S		T519S	
I522L		A535V	
V524I			

celulares, que podrían ser las responsables de los cambios sufridos en el ADN episomal, que lo hacen un mejor sustrato para la integración⁶³. Por otra parte, se piensa que la integración del virus no sirve como molde para la replicación viral y no se tienen evidencias de la integración del genoma completo⁶⁴.

Existen varios reportes que describen eventos de recombinación entre diferentes cepas del VHB. Ejemplo de ello es el trabajo de Bollyky y colaboradores en 1996⁶⁵, quienes muestran una incongruencia en la asignación de genotipos para diferentes marcos de lectura abiertos en dos aislados provenientes de regiones geográficas donde co-circulan distintos genotipos, incongruencia que se atribuyó a un evento de recombinación. Estos hallazgos son muy significativos, porque describen una fuente de variabilidad genética del VHB que no era reconocida, además de facilitar una evidencia que pueda explicar el significado del cambio en la asociación entre un subtipo antigénico y un genotipo. El mecanismo preciso, por el cual la recombinación toma lugar, así como su frecuencia e implicación potencial, permanece sin respuesta.

Figura 4.

Organización estructural del gen de la polimerasa del VHB señalándose las mutaciones asociadas a la resistencia a drogas anti-virales. PT: proteína terminal; E: espaciador; TR: transcriptasa reversa.

Estudios futuros son necesarios para encontrar evidencias directas de la recombinación del VHB y dilucidar el papel de esta en la heterogeneidad del virus.

Influencia de la variabilidad en la evolución de los hepadnavirus

La evolución viral generalmente es analizada en base a la premisa de que el número sustituciones nucleotídicas o de aminoácidos, producidas durante un tiempo determinado son indicadores de la evolución viral. En este sentido, se ha calculado que la tasa de mutación de los genes celulares y virus ADN es aproximadamente de 10^{-9} sustituciones por sitio por año, mientras que la tasa de mutación de los virus ARN excede ese valor en un factor de alrededor de 10^6 , favorecido en parte por el hecho de que la polimerasa de estos virus carece de funciones correctoras o de edición ($10^{-2} - 10^{-3}$).

Un factor esencial utilizado para calcular la divergencia evolutiva de los hepadnavirus y retrovirus es la estimación de la tasa de mutación del genoma viral, la cual se define como el número de sustituciones de bases que ha ocurrido en el genoma por sitio por año de continua replicación de un virus en su hospedero. Estudios realizados en el modelo animal de hepadnavirus de marmotas (WHV) indican una tasa de mutación aproximadamente de 2.3×10^{-4} sustituciones por sitio por año, la cual es equivalente a la tasa de mutación del gen menos variable (cápside) de retrovirus ⁶⁶.

En los últimos años el uso de herramientas moleculares para el análisis de secuencias ha permitido a los evolucionistas especular acerca del origen y evolución de los hepadnavirus. Es así como, árboles filogenéticos basados en las secuencias de genomas completos revelaron que la primera división de linajes del VHB podría haberse originado entre los genomas F (genotipo autóctono del Nuevo Mundo) y los otros genomas, ocurriendo posteriormente una división entre las cepas B y C por un lado y

entre las cepas A, D y E por el otro. Si consideramos que se estima que el paso de los primeros pobladores del Nuevo Mundo a través del estrecho de Bering ocurrió hace 150.000 años, es posible que durante ese tiempo hayan emergido nuevos genotipos del VHB por divisiones de la cepa progenitora del actual genotipo F. Otro aspecto interesante, se refiere a que el origen de los genomas B y C parece estar en Asia, mientras que el genotipo D puede haber reemplazado al genotipo A en el área del Mediterráneo incluyendo el Norte de África ²⁹.

Recientemente, la identificación de un hepadnavirus en monos lanudos del nuevo mundo (Woolly Monkey Hepatitis B Virus, WMHBV) permitió observar su cercanía filogenética con un aislado de Colombia genotipo F ^{67,18}, por lo cual se ha sugerido que el WMHBV podría representar el progenitor de los hepadnavirus humanos y es compatible con la teoría de que el VHB es originario de América.

Finalmente recordemos que si bien estas teorías suenan tentadoras e interesantes, falta mucho por estudiar y sería de gran utilidad el análisis de un mayor número de secuencias completas de aislados del genotipo F, así como el aislamiento de hepadnavirus que infecten naturalmente a otros primates americanos, a fin de indagar acerca del origen de estos apasionantes virus.

CONCLUSIONES

- Los hepadnavirus son virus con características únicas en muchos aspectos, entre ellas está su capacidad de ser susceptibles a variabilidad genética a pesar de poseer un genoma extremadamente solapado.
- Las mutaciones que se acumulan a lo largo del genoma del VHB, podrían afectar el curso natural de la infección, la eliminación del virus y la respuesta a la terapia anti-viral, sin embargo la influencia exacta de una mutación específica en el diagnóstico, terapia



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Variabilidad Genética
del Virus de la Hepatitis
B y sus implicaciones

y prevención de la infección queda por establecerse.

- Mutaciones en el gen codificante para el AgsHB podrían generar una infección persistente aún en presencia de anticuerpos contra el AgsHB (mutantes de escape a la vacunación), sin embargo el uso masivo de vacunas que incluyan proteínas correspondientes a los dominios pre-S1 y pre-S2 representan una alternativa esperanzadora para el futuro de la vacuna.
- Las mutaciones en el gen S que originen cambios en la estructura antigénica del virus, podrían hacer fallar los sistemas de inmunodiagnóstico utilizados en la actualidad, por lo cual es importante la evaluación sistemática de los sistemas de diagnóstico comercial empleados hoy en día, principalmente en los bancos de sangre.
- La producción de drogas eficientes para el tratamiento de los más de 350 millones de personas infectadas crónicamente con el VHB alrededor del mundo, representa un reto inmediato para los científicos, quienes deben enfrentarse a las habilidosas estrategias de este virus para evadir los intentos de clarificación viral, entre ellas la generación de mutantes resistentes a los análogos de nucleósidos.
- La recombinación podría ser un mecanismo novedoso utilizado por el VHB para la generación de diversidad, en cuyo caso debe tomarse en cuenta a la hora de plantearse las posibles respuestas a los muchos enigmas que quedan por resolver, incluyendo las diferencias geográficas en la patología, mecanismos de evolución del VHB, así como, la variedad de las respuestas de los hospederos.
- En el futuro, estudios sistemáticos de epidemiología molecular permitirán establecer si existen diferencias geográficas en su distribución, así mismo nuevas asociaciones entre la generación de variantes del VHB con diferentes cursos de la enfermedad podría esclarecer nuevos mecanismos

de persistencia viral y proveer información útil para desarrollar nuevas estrategias para la erradicación del virus.

- Finalmente recordemos que la interacción y relación que establece un virus con su hospedero es un fenómeno complejo, donde el curso que tome esta interacción dependerá no sólo de los factores virales, sino también de factores que dependen del número de células infectadas, de la competencia del sistema inmunitario del paciente y de la magnitud de la respuesta inflamatoria generada por el individuo.

REFERENCIAS

1. Blumberg B.S., Alter H.J., Visnich, S.: "A new antigen in leukemia sera". *Jama*, 1965; 191: 541.
2. Dane D.S., Cameron C.H., Briggs M.: "Virus like particles in serum of patients with Australia antigen-associated hepatitis". *Lancet*, 1970; i, 695.
3. Nassal M., Schaller H.: "Hepatitis B virus replication". *Trends Microbiol.* 1993; 1, 221-228.
4. Shaller H., Fischer M.: "Transcriptional control of hepadnavirus gene expression"; in Mason WS, Seeger C (eds): *Current topics in Microbiology and Immunology. Hepadnaviruses. Molecular Biology and Pathogenesis*. Berlin, Springer, 1991; 41-60.
5. Raney A.K., McLachlan A.: "The biology of hepatitis B virus". In: McLachlan A, ed. *Molecular biology of hepatitis B viruses*. Boca Raton: CRC Press, 1992.
6. Radziwill G., Tucker W., Schaller H.: "Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: Domain structure and RNaseH activity". *J. Virol.* 1990; 64, 613-620.
7. Nassal M.: "Hepatitis B virus morphogenesis". *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 1996; 214, 297-337.
8. Galibert F., Mandart E., Fitoussi F., Tiollais P., Charnay P.: "Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*". *Nature*, 1979; 281 (5733), 646-650.
9. Acs G., Sells M.A., Purcell R.H., Price P., Engle R., y cols.: "Hepatitis B virus produced by transfected HepG2 cells causes hepatitis in chimpanzees". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1987; 84, 4641-4644.
10. Sells M.A., Chen M.L., Acs G.: "Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus

DNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987; 84, 1005-1009.

11. Mason W.S., Halpern M.S., England J.M., Seal G., Egan J., Coates L., y cols.: "Experimental transmission of duck hepatitis B virus". *Virology*, 1983; 131, 375-384.
12. Kramvis A., Kew M.C.: "Structure and function of the encapsidation signal of hepadnaviridae". *J. Viral Hepatitis*, 1998; 5: 357-367.
13. Bowyer S.M., Sim J.G.: "Relationships within and between genotypes of hepatitis B virus at points across the genome: footprints of recombination in certain isolates". *J Gen Virol*, 2000; 81 (2): 379-392.
14. Yang W.G., Summers J.: "Illegitimate replication of linear hepadnavirus DNA through non-homologous recombination". *J. Virol.*, 1995; 69, 4029-4036.
15. Gunther S., Fischer L., Pult I., Sterneck M., Will H.: "Naturally occurring variants of hepatitis B virus". *Advances in Virus Research*, 1999; 52, 25-137.
16. Le Bouvier G.L.: "The heterogeneity of Australia antigen" *J. Infect. Dis.*, 1971; 123, 671-675.
17. Bancroft W.H., Mundon F.K., Russell P.K.: "Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen". *J. Immunol.*, 1972; 109: 842-848.
18. Siddiqui A., Sattler F., Robinson W.: "Restriction endonuclease cleavage map and location of unique features of the DNA of hepatitis B virus, subtype adw2". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979; 76(9): 4664-4668.
19. Magnus L.O., Espmark J.A.: "Specificities in Australian antigen positive sera distinct from the LeBouvier determinants". *J. Immunol.*, 1972; 109, 1017-1021.
20. Couroucé-Pauty A.M., Lemaire J.M., Roux J.F.: "New hepatitis B surface antigen subtypes inside the ad category". *Vox. Sang.*, 1978; 35:304-308.
21. Ohnuma H., Machida A., Okamoto H., Tsuda F., Sakamoto M., Tanaka T. y cols. "Allelic subtypic determinants of hepatitis B surface antigen (i and t) that are distinct from d/y o w/r". *J. Virol.* 1993; 67: 927-932.
22. Couroucé-Pauty A.M., Plancon A., Soulier J.P.: "Distribution of HBsAg subtypes in the world". *Vox Sang.* 1983; 44: 197-211.
23. Valenzuela P., Quiroga M., Zaldivar J., Gray P., Rutter W.J.: "The nucleotide sequence of the hepatitis B viral genome and the identification of the major viral genes". En *Animal Virus Genetics*, Fields, B.N., Jaenisch, R. y Fox, C.F., (eds) Academic, New York, 1980; 55-77.
24. Ono Y., Onda H., Sasada R., Igarashi K., Sugino Y., Nishioka K.: "The complete nucleotide sequences of the clones Hepatitis B virus DNA; subtype adr and adw". *Nucleic. Acids. Res.*, 11, 1747-1757, 1983.
25. Okamoto H., Tsuda F., Sakugawa H., Sastrosoewignjo R., Imai M., Miyakawa, Y. y cols.: "Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes". *J. Gen. Virol.* 1988; 69: 2575-2583.
26. Okamoto H., Imai H., Miyakawa Y., Mayumi M.: "Site-directed mutagenesis of hepatitis B surface antigen sequence at codon 160 from arginine to lysine for conversion of subtypic determinant from r to w". *Byochem. Biophys Res Commun*, 1987; 148: 500-504.
27. Norder H., Hammas B., Lee S.-D., Bile K., Couroucé A.M., Mushahwar I.K. y cols. "Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen". *J. Gen. Virol.*, 1993; 74, 1341-1348.
28. Norder H., Couroucé A.M., Magnus L.O.: "Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes". *J. Gen. Virol.* 1992; 73: 3141-3145.
29. Norder H., Couroucé A.M., Magnus L.O.: "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.
30. Naumann H., Schaefer S., Yoshida C., Gaspar A.M., Repp R., Gerlich W.H.: "Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4". *J. Gen. Virol.*, 1993; 74: 1627-1632.
31. Stuyver L., De Gendt S., Van Geyt C., Zoulim F., Fried M., Schinazi F., Rossau R. "A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness". *Journal of General Virology*, 2000; 81:67-74.
32. Magnus L.O., Norder H.: "Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene". *Intervirology*, 1995; 38: 24-34.
33. Blitz L., Pujol F.H., Swenson P.D., Porto L., Atencio R., Araujo, M., y cols.: "Antigenic diversity of hepatitis B virus strains of genotype F in amerindians and other population group from Venezuela". *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36 (3): 648-651.
34. Skinhöj P., Olesen H., Cohn J., Mikkelsen M.: "Hepatitis-associated antigen in pregnant woman". *Acta Pathol. Microbiol. Scan (B)* 1972; 80, 362.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Variabilidad Genética
del Virus de la Hepatitis
B y sus implicaciones

35. Rosendahl C., Kochen N.M., Kretschmer R., Wegscheider K., Kaiser D.: "Avoidance of perinatal transmission of hepatitis B virus: is passive immunization always necessary?". *Lancet*, i 1983; 1127-1129.
36. Stevens C.E., Neurath R.A., Beasley R.P., Szmuness W.: "HBeAg and anti-HBe detection by radioimmunoassay. Correlation with vertical transmission of hepatitis B virus in Taiwan". *J Med Virol* 1979;3:237-241.
37. Tabor A., Baykley A.C., Cairns J., Peeleu L., Gerety R.J.: "Horizontal transmission of hepatitis B virus among children and adults in five rural villages in Zambia". *J. Med. Virol.* 1985; 15:113-120.
38. Coursaget P., Bourdil C., Adamowicz P., Chotard J., Diop Mar I., Yvonnet B. y cols. "HBsAg positive reactivity in man not due to hepatitis B virus". *Lancet*, ii, 1987; 1354-1358.
39. Baumert F., Rogers S.A., Hasegawa K., Liang T.J.: "Two core promotor mutations identified in a Hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis result in enhanced viral replication". *J. Clin. Invest.*, 1996; 98:2268-2276.
40. Carman W.F., Jacyma M.R., Hadziannis S., Karayiannis P., McGaverty M.J., Makris A.: "Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection". *Lancet*, ii, 1989; 588-591.
41. Carman W.F.: "Variation in the core and X genes of hepatitis B virus". *Intervirology*, 1995; 38:75-88.
42. Hoofnagle J.H., Dusheiko G.M., Seff L.B., Jones E.A., Waggoner J.G. y cols. "Seroconversion from Hepatitis B e antigen to antibody in chronic type B hepatitis". *Ann. Intern. Med.* 1981; 94: 744-748.
43. Li J.S., Tong S.P., Wen Y.M., Vitvitski L., Zhang Q., Trepo C.: "Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an HBe-minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the precore region". *J. Virol.* 1993; 67: 5402-5410.
44. Rodríguez-Frías 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; 22:1641-1647.
45. Lindh M., Andersson A.S., Gusdal A.: "Genotypes, nt 1858 variants and geographic origin of hepatitis B virus-Large-scale analysis using a new genotyping method". *J. Inf. Dis.* 1997; 175: 1285-1293.
46. Arauz-Ruiz P., Norder H., Visoná K.A., Magnus L.O.: "Genotype F prevails in HBV infected patients of hispanic origin in central America and may carry the precore stop mutant". *J. Med. Virol.* 1997; 51: 305-312.
47. Carman W.F., Zanetti A.R., Karayiannis P., Waters J., Manzanillo G., Tanzi E., y cols. "Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus". *Lancet*, 1991; 336: 325-329.
48. Harrison T.H., Hopes E.A., Oon C.J., Zanetti A.R., Zuckerman A.J.: "Independent emergence of a vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus". *Hepatology*, 1991;13 (Suppl 4): S105-107.
49. Karthugesu V., Allison L.M.C., Fortuin M., Mendy M., Whittle H.C., Howard C.R.: "A novel hepatitis B virus variant in the sera of immunized children". *J. Gen. Virol.*, 1994; 75: 443-448.
50. Carman W.F., Zanetti A.R., Karayiannis P., Walters J., Manzanillo G., Tanzi E., y cols. "Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus". *Lancet*, ii, 1990; 325-329.
51. Carman W.F.: "Vaccine-associated mutants of hepatitis B virus". En: *Viral hepatitis and liver disease*, Nishioka K., Suzuki H., Mishiro S., Oda T.(eds) Springer-Verlag, Hong Kong, 1994; 243-247.
52. Trepo C, Jezek P., Atkinson G., Boon R.: "Efficacy of famciclovir in chronic hepatitis B: results of a dose-finding study". *Hepatology*, 1996; 24: 188A.
53. Dienstag J., Perillo R., Schiff E., Bartholomew M., Vicary C., Rubin M.: "A preliminary trial of lamivudine for chronic hepatitis B infection". *N. Engl. J. Med.*, 333: 1657-1661.
54. Carman W., Hadziyannis S., McGarvey M.J., Jacyna M., Karayiannis P., Makris A. y cols. "Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection". *Lancet*, 1989; ii: 588-591.
55. Block T.M., Lu X., Mehta A.S., Blumberg B.S., Tennant B., Ebling M., y cols.: "Treatment of chronic hepatitis B virus infection in a woodchuck animal model with an inhibitor of protein folding and trafficking". *Nat. Med.* 1998; 4: 610-614.
56. Tassopoulos N.C., Volpes R., Pastore G., Heathcote J., Buti M., Goldin R., y cols.: "Lamivudine therapy in patients with anti-HBe positive chronic hepatitis B; end of treatment analysis". *J.Hepatol.* 1998; 28 (1): 43.
57. Mason W.: "The problem of antiviral therapy for chronic hepatitis B virus infection". *J. Hepatol.* 1993; 17(3): S137-S142.
58. Fourei I., Cullen J., Saputelli J., Aldrich C., Schaffer P., Averett D. y cols.: "Evidence that hepatocyte turnover is required for rapid clearance of duck hepatitis B virus during antiviral therapy of chronically infected ducks". *J. Virol.* 1994; 68: 8321-8330.

59. Hanz O., Borel C., Traub C., Zoulim F., Dessolin J., Camplo M., y cols.: "Selective inhibition of the duck hepatitis B virus by a new class of tetraazamacrocycles". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1997; 41: 2579-2581.
60. Bartenschlager R., Schaller H.: "Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome". *EMBO* 1992; 11: 3413-3420.
61. Hirsch R.C., Lpeb D.D., Pollack J.R., Ganem D.: "Cis-acting sequences required for encapsidation of duck hepatitis B virus pregenomic RNA". *J. Virol.* 1991; 65: 3309-3316.
62. Stephens J.C.: "Statistical methods for DNA sequences analysis: detection of intragenic recombination or gene conversion". *Molecular & Biological Evolution* 1995; 2: 539-556.
63. Schirmaker P., Wang W., Stahnke G., Will H., Rogler C.E.: "Sequences and structures at hepadnaviral integration: recombination sites implicates topoisomerase I in hepadnaviral DNA rearrangements and integration". *J Hepatol* 1995; 22: 21-23.
64. Buendia M.A., Paterlini P., Tiollas P., Brechot C.: "Hepatitis B virus: liver cancer". En Zuckerman A.J., Thomas H.C. (eds) *Viral Hepatitis*. Churchill Livingstone, Edinburgh 1993; 137-164.
65. Bollyky P.L., Rambaut A., Harvey P.H., Holmes E.: "Recombination between sequences of hepatitis B virus from different genotypes". *J. Mol. Evol.* 1996; 42: 97-102.
66. Girones R., Miller R.H.: "Mutation rate of hepadnaviruses". *Virology* 1990; 170: 595.
67. Lanford R.E., Chavez D., Brasky K.M., Burns III R.B., Rico-Hesse R.: "Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a new world primate". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 5757-5761.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Variabilidad Genética
del Virus de la Hepatitis
B y sus implicaciones