

Variabilidad genética del virus hepatitis B y su significado clínico

Mauricio Venegas S.⁽¹⁾, Rodrigo A Villanueva A.⁽²⁾, Javier Brahm B.⁽¹⁾

⁽¹⁾Sección de Gastroenterología, Departamento de Medicina, HCUCh.

⁽²⁾Programa de Virología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, U. de Chile.

SUMMARY

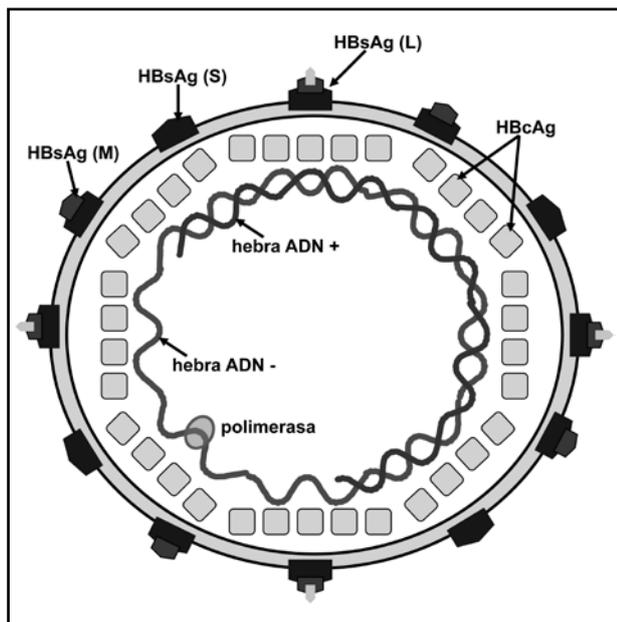
The Hepatitis B virus (HBV) is the prototype member of the Hepadnaviridae family, which can cause acute or chronic hepatic illness. The virus has a partially double-stranded DNA genome of 3.2 kb. Molecular variations and change in the genome over time have resulted in the emergence of at least eight genotypes and multiple subgenotypes. The distribution of HBV genotypes varies widely across geographic regions, been the genotype F the most prevalent in Chile. In recent years, substantial progress has been made toward understanding the epidemiology and virologic significance of HBV variants. Actually, accumulating evidence suggests that hepatitis B genotypes and subgenotypes can influence the severity, course and likelihood of complications, and response to treatment of HBV infection and possibly vaccination against the virus.

La infección por el virus hepatitis B (VHB) representa un importante problema de salud pública. Se estima que en todo el mundo existen alrededor de 400 millones de individuos que presentan una hepatitis crónica por este agente⁽¹⁾. En Chile, la portación de VHB llega hasta el 0,3% en adultos, lo que permite predecir que aproximadamente 34.000 personas mayores de 15 años se encuentran infectadas⁽²⁾.

El VHB se transmite principalmente por tres vías: parenteral, sexual y vertical, siendo las dos últimas, las de mayor relevancia en la actualidad⁽³⁾. Después del contacto de una persona con una fuente de contagio, existe un período de incubación que oscila entre los 45 y 180 días. Posterior a esto, el espectro clínico que puede resultar de la infección

por VHB es amplio. En adultos, entre el 90 y el 95% de los casos ocurre una hepatitis aguda, que con frecuencia es asintomática y que evoluciona hacia una resolución espontánea. En casos excepcionales puede evolucionar hasta una insuficiencia hepática fulminante. Por el contrario, solamente entre el 5 y el 10% de los adultos inmunocompetentes que tiene una infección aguda por VHB evolucionará a hepatitis crónica, con distintos grados de enfermedad hepática y progresión, dentro de los cuales destacan la hepatitis crónica inactiva (asintomática), la hepatitis crónica activa, la cirrosis y el desarrollo de carcinoma hepatocelular⁽⁴⁾. En los recién nacidos, en cambio, el 90% de los infectados evolucionará a un infección crónica, la que en general es poco sintomática y de lenta progresión⁽⁵⁾.

Figura 1. Modelo de la estructura del VHB



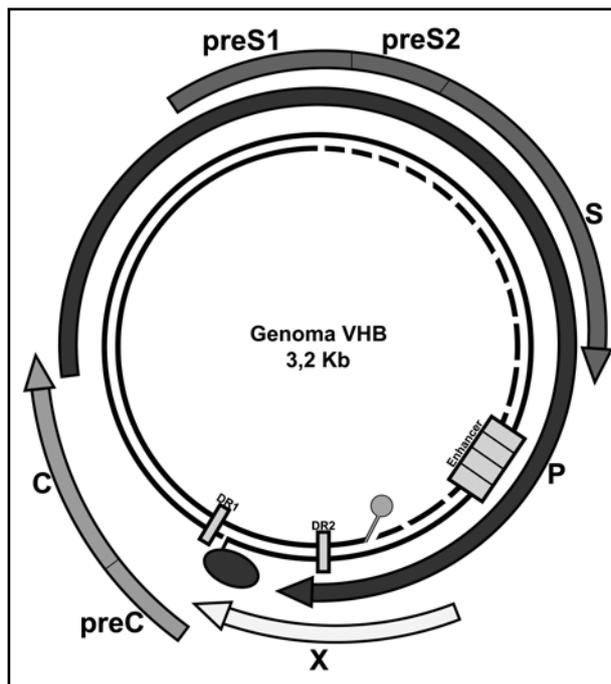
El virus completo (partícula de Dane) consiste de una envoltura lipídica que contiene al HBsAg en sus tres formas: proteínas S (*small*), M (*middle*) y L (*large*). En el interior se encuentra la nucleocápside formada por el HBcAg, el DNA y la polimerasa viral.

ESTRUCTURA VIRAL Y GENOMA

El VHB ha sido clasificado dentro de la familia *Hepadnaviridae*, género *orthohepadnavirus*, y estructuralmente el virión está formado por una partícula esférica de 42 nm de diámetro (partícula de Dane), rodeada de una envoltura lipoproteica de unos 7 nm de espesor, la que contiene las proteínas virales de superficie (HBsAg). En el interior del virión se encuentra la nucleocápside icosaédrica, compuesta por el antígeno core (HBcAg), el cual rodea al ADN genómico que en el extremo 5' de la hebra negativa lleva unida covalentemente a la polimerasa viral (Figura 1). Además del virus completo, las células infectadas secretan grandes cantidades de partículas lipoproteicas subvirales de 20 nm (esferas) y de hasta 200 nm (filamentos) formadas sólo por el HBsAg y lípidos derivados del huésped, las cuales estarían implicadas en la evasión de la respuesta inmune. El genoma viral

es un ADN circular, parcialmente de doble hebra, y de una longitud aproximada de 3200 pares de bases nucleotídicas. El ADN de VHB es el genoma viral más pequeño conocido. Funcionalmente presenta cinco promotores transcripcionales, dos regiones potenciadoras (*enhancers*), y cuatro marcos de lectura abiertos, designados S, C, P, y X, los que se encuentran parcialmente superpuestos (Figura 2). El marco de lectura S codifica las 3 proteínas virales de superficie, HBsAg: L (*large*, LHBsAg), M (*middle*, MHBsAg), y S (*small*, SHBsAg), las que comparten idénticos extremos C-terminales en sus secuencias primarias. El gen C (o Core) incluye las regiones precore y core. El marco de

Figura 2. Esquema del genoma del VHB



En el centro se muestran las hebras positiva incompleta (punteada) y la negativa (continua) del DNA circular y parcialmente de doble hebra (■). Los marcos de lectura abiertos S, C, P, y X se muestran superpuestos y están orientados en el sentido del reloj. El marco de lectura S (■) codifica para los 3 tipos de HBsAg; el marco de lectura P (■) codifica para la polimerasa viral; el marco de lectura X (□) para la proteína transactivadora HBx y el marco pre-C/C (■) codifica para HBcAg y HBeAg. En el genoma viral se muestran además una región *Enhancer* (región potenciadora) y los 2 DR (directos repetidos), ambos en tono □.

lectura C codifica para la proteína core o HBcAg, unidad estructural de la cápside, y también para el HBeAg, dependiendo de la región en donde se inicie la traducción. La polimerasa viral es una proteína codificada por el marco de lectura P, y está funcionalmente dividida en 3 regiones: en el extremo aminoterminal se encuentra el dominio denominado proteína terminal (PT), el cual está involucrado en encapsidación e iniciación de la síntesis de la cadena negativa de DNA; en el medio de la proteína, el dominio transcriptasa reversa (TR), el que cataliza la síntesis del genoma viral; y en el extremo carboxiterminal, el dominio RNasa H, que degrada el RNA pregenómico en el intermediario híbrido RNA/DNA y facilita la replicación del genoma viral. El marco de lectura X codifica una pequeña proteína viral de aproximadamente 16.5kDa (proteína X o HBx) que posee múltiples funciones, incluyendo transducción intracelular de señales, activación transcripcional, reparación del ADN e inhibición de la degradación proteica. Los mecanismos moleculares detallados de estas actividades, y la función biológica de la proteína HBx durante el ciclo viral son desconocidos. Sin embargo, se ha establecido que esta proteína es necesaria para una infección productiva por VHB *in vivo* y que puede contribuir al potencial oncogénico del VHB⁽⁶⁾.

GENOTIPOS DEL VHB

Desde el punto de vista genético, la heterogeneidad de secuencias es una característica de las infecciones por el VHB, debido a que la polimerasa viral, una enzima viral con función de transcriptasa reversa, carece de actividad correctora durante la síntesis del ADN viral. Si bien este agente es un virus DNA, se comporta intracelularmente como un retrovirus, con una tasa de mutación que oscila entre 1.4×10^{-5} y 5×10^{-5} sustituciones/sitio/año, aproximadamente 10^4 veces mayor que los virus DNA⁽⁷⁾.

La clasificación genética del VHB, basada en el alineamiento y comparación de secuencias de genomas completos, ha identificado 8 genotipos, denominados desde la A hasta la H. Las diferencias están dadas sobre una divergencia intergrupo de al menos 8% en la secuencia nucleotídica completa. Los análisis filogenéticos más detallados han mostrado además que la mayoría de estos genotipos pueden ser subdivididos en subgenotipos, los cuales difieren entre sí en no más de un 4% en sus secuencias completas, lo que muestra la alta variabilidad de este agente viral⁽⁸⁾.

Los 8 genotipos muestran diferente distribución geográfica a nivel global. El genotipo A es más prevalente en el noroeste de Europa, Norte América, India y África sub Sahara, aunque también ha sido detectado en algunos países de Sudamérica. Los genotipos B y C son característicos de poblaciones asiáticas. El genotipo D tiene una distribución mundial, pero predomina en la región mediterránea. El genotipo E está principalmente restringido a África Occidental, mientras que los genotipos F y H han sido frecuentemente detectados en América del Sur y Central, respectivamente. Finalmente, el genotipo G ha sido identificado en Francia, Alemania, México y Estados Unidos⁽⁸⁻¹¹⁾.

En América Central y Sudamérica, el genotipo más prevalente es el F, genotipo que se considera autóctono en esta región, seguido por los genotipos A y D⁽¹¹⁾. En Chile, nuestro grupo publicó recientemente un estudio de prevalencia de los genotipos de VHB en pacientes con infección crónica, donde el genotipo F fue encontrado en el 84 % de un total de 131 muestras analizadas⁽¹²⁾.

Otros estudios realizados en Latinoamérica han mostrado la existencia de 4 subgenotipos para el genotipo F cuya distribución es la siguiente: subgenotipo F1 en Argentina, Perú, y países de Centroamérica; F2 en Brasil y Venezuela; F3 en Colombia y Venezuela y F4 en Argentina y Bolivia⁽¹¹⁾.

Además para el subgenotipo F1, se han identificado cuatro clados: F1a en Centroamérica, F1b en Argentina, F1c en Perú y F1d en Japón^(11,13,14). En Chile, estudios de identificación de subgenotipos virales circulantes no han sido realizados hasta la fecha.

GENOTIPOS DE VHB Y CURSO CLÍNICO DE LA INFECCIÓN

Existe cada vez más evidencia respecto a la influencia de los distintos genotipos de VHB sobre la enfermedad hepática^(15,16), tanto en infecciones agudas como en crónicas. Sin embargo, los análisis comparativos hasta ahora reportados han estado restringidos a estudios con los genotipos predominantes en algunas regiones, como son los genotipos B v/s C en algunos países asiáticos⁽¹⁵⁾, y los genotipos A v/s D en Europa e India⁽¹⁶⁾. En estudios de cohortes asiáticos, el genotipo C ha sido asociado a una mayor frecuencia de desarrollo de cirrosis, y hepatocarcinoma, comparado con el genotipo B⁽¹⁷⁾. Similarmente, estudios de seguimiento a largo plazo de pacientes con infección crónica por VHB, infectados con los genotipos A, D o F han mostrado importantes diferencias. Por ejemplo, la tasa de remisión bioquímica sostenida y la desaparición del HBsAg y del DNA viral fueron significativamente más altas en los pacientes infectados con el genotipo A que aquéllos infectados con los genotipos D o F. En este mismo estudio, se encontró además que la frecuencia de muerte relacionada a la enfermedad hepática fue mayor en pacientes con genotipo F que en aquéllos infectados con genotipos A o D⁽¹⁸⁾.

Sumado a lo anterior, existen unos pocos trabajos en los que se ha podido estudiar simultáneamente un mayor número de genotipos. Al respecto, se ha descrito que la erradicación del HBeAg desde suero de pacientes con infección crónica, es menos frecuente en el genotipo C que para los genotipos A, B, D y F⁽¹⁹⁾. Otro estudio realizado por el mismo grupo, asoció al genotipo F con una mayor

frecuencia de desarrollo de hepatocarcinoma, cuando se comparó con los genotipos A, B, C, y D⁽²⁰⁾.

GENOTIPOS DE VHB Y RESPUESTA A TRATAMIENTO

La importancia clínica de los diferentes genotipos del VHB también se ha estudiado en el ámbito del tratamiento antiviral. Cuando la terapia está basada en interferón- α , los estudios comparativos entre los genotipos A v/s D o B v/s C muestran una mayor respuesta sostenida en pacientes infectados con los genotipos A y B, respectivamente^(18,21,22). En una evaluación del tratamiento con Peg-interferón α -2b, en que se consideró la eliminación del HBsAg, la respuesta del genotipo A fue mayor (14%) que los genotipos B (9%), C (3%) y D (2%)⁽²³⁾.

GENOTIPOS DE VHB Y VARIANTES GENÉTICAS

Estudios moleculares han demostrado que como resultado de una infección por VHB pueden ocurrir alteraciones genéticas en el genoma viral en replicación, vale decir, mutaciones puntuales, deleciones e inserciones. Estas alteraciones se generan durante el curso natural de la infección crónica y en respuesta a la presión que ejerce el sistema inmune del huésped, o bien, a presiones exógenas tales como la vacunación, el tratamiento con inmunoglobulina anti-HBs o la terapia con agentes antivirales⁽²⁴⁾.

En la región precore, la variante más frecuente es la mutación puntual G1896A, que produce un codón de término en el marco de lectura, con la consiguiente pérdida de la expresión del HBeAg⁽²⁵⁾. Esta mutación parece ser genotipo-dependiente y es más probable que ocurra en cepas que contienen una timina en la posición 1858 (T1858), como son los genotipos B, D, E, G, y subgenotipo C1^(24, 26).

En la región promotora basal del core (PBC), se han descrito con frecuencia las mutaciones A1762T

y G1764A, sustituciones que provocan una disminución de la expresión del HBeAg y que han sido asociadas a un aumento de la replicación viral y a una progresión de la enfermedad hepática a formas más graves^(27,28,29).

La detección simultánea de las variantes G1896A en la región precore y aquéllas de la región PBC es muy frecuente en hepatitis crónica, sugiriéndose que primero aparecen las variantes del PBC y posteriormente, tras la seroconversión del HBeAg a AntiHBe, la variante de precore⁽²⁴⁾.

Los estudios sobre estas mutaciones en los distintos subgenotipos F de VHB, sugieren que las variantes F1 y F4 son más susceptibles a la ocurrencia de la mutación G1896A en la región pre-core/core, y de la doble mutación A1762T/G1764A en la región promotora basal del core^(30,31). Estos cambios puntuales en la secuencia del virus han sido observados en aislados de VHB provenientes de casos con hepatitis crónica, hepatocarcinoma y hepatitis fulminante⁽³²⁾.

Relacionado a lo anterior, y como se sabe que la región PBC se sobrepone con la región X del genoma de VHB (Figura 2), cuando ocurren mutaciones éstas provocan la sustitución de los aminoácidos 130 y 131 de la proteína X, situación que también ha sido propuesta como marcador pronóstico para el desarrollo de cáncer hepático⁽³³⁾.

Otra región de interés en el genoma de VHB es la S, que codifica para el antígeno de superficie (HBsAg), donde se encuentra el determinante “a”, epítotope para el cual van dirigidos los anticuerpos neutralizantes y que es el principal blanco de los *test* diagnósticos. Las sustituciones de aminoácidos dentro y en las cercanías del determinante “a”, pueden afectar la unión de los anticuerpos neutralizantes, generando mutantes denominadas “de escape”. Estudios realizados en Argentina, donde existen los subgenotipos F1 y F4, han demostrado la presencia de múltiples mutaciones en la región que codifica para el determinante “a”, muchas de las cuales corresponden a mutantes de escape⁽³⁴⁾.

PROYECCIONES FUTURAS

En el último tiempo, nuestro grupo ha estado dedicado a estudiar la prevalencia de los genotipos del VHB circulantes en nuestro país. Como resultado de nuestros análisis, hemos determinado recientemente que el genotipo viral predominante en muestras de pacientes crónicos es el genotipo F⁽¹²⁾. Dados los diversos antecedentes reportados respecto a la patogenicidad de las variantes de este genotipo, nos resulta relevante continuar nuestra investigación con la secuenciación completa de un número representativo de genomas virales para determinar por estudios de filogenética, el o los subgenotipos de estos aislados virales. La caracterización epidemiológica molecular del VHB podría contribuir al pronóstico precoz y manejo clínico de pacientes con infección crónica.

REFERENCIAS

1. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat* 2004;11:97-107.
2. Pereira SA, Valenzuela BMT, Mora J, Vera L. Situación actual de la hepatitis B en Chile. *Rev Med Chi* 2008;136:725-32.
3. Shepard CW, Simard EP, Finelli L, Fiore AE, Bell BP. Hepatitis B Virus Infection: Epidemiology and Vaccination. *Epidemiol Rev* 2006;28:112-25.
4. McMahon BJ. The Natural History of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Hepatology* 2009;49:S45-S55.
5. Chang MH. Natural history of hepatitis B virus infection in children. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:11-9.
6. Liang TJ. Hepatitis B: The Virus and Disease. *Hepatology* 2009;49:S13-21.
7. Locarnini S. Molecular Virology of Hepatitis B Virus. *Semin Liver Dis* 2004;24 Suppl1:3-10.
8. Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol* 2007;13:14-21.
9. Lai CL, Ratziu V, Yuen MF, Poynard T. Viral hepatitis B. *Lancet* 2003;362:2089-94.
10. Wai CT, Fontana RJ. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes, variants and mutants. *Clin Liver Dis* 2004;8:321-52.
11. Devesa M, Pujol FH. Hepatitis B virus genetic diversity in Latin America. *Virus Res* 2007;127:177-84.
12. Venegas M, Muñoz G, Hurtado C, Alvarez L, Velasco M, Villanueva RA *et al.* Prevalence of hepatitis B virus genotypes in chronic carriers in Santiago, Chile. *Arch Virol* 2008;153:2129-32.
13. Huy TT, Ushijima H, Sata T, Abe K. Genomic characterization of HBV genotype F in Bolivia: genotype F subgenotypes correlate with geographic distribution and T(1858) variant. *Arch Virol* 2006;151:589-97.
14. Von Meltzer M, Vásquez S, Sun J, Wendt UC, May A, Gerlich WH *et al.* A new clade of hepatitis B virus subgenotype F1 from Peru with unusual properties. *Virus Genes* 2008;37:225-30.
15. Orito E, Mizokami M, Sakugawa H, Michitaka K, Ishikawa K, Ichida T *et al.* 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.
16. Thakur V, Guptan RC, Kazim SN, Malhotra V, Sarin SK. Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:165-70.
17. Kao JH, Wu NH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J Hepatol* 2000;33:998-1002.
18. Sanchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodes J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in Western patients. *Gastroenterology* 2002;123:1848-56.

19. Livingston SE, Simonetti JP, Bulkow LR, Homan CE, Snowball MM, Cagle HH *et al.* Clearance of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B and genotypes A, B, C, D, and F. *Gastroenterology* 2007;133:1452-7.
20. Livingston SE, Simonetti JP, McMahon BJ, Bulkow LR, Hurlburt KJ, Homan CE *et al.* Hepatitis B virus genotypes in Alaska Native people with hepatocellular carcinoma: preponderance of genotype F. *J Infect Dis* 2007;195:5-11.
21. Wai CT, Chu CJ, Hussain M, Lok AS. HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. *Hepatology* 2002;36:1425-30.
22. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000;118:554-9.
23. Janssen HL, Flink HJ, Zonneveld MV, Niesters HG, Man RAD, Schalm SW *et al.* HBsAg seroconversion in chronic HBV patients treated with pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine: the role of HBV genotype. *Hepatology* 2004;40:660A.
24. Kaya A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res* 2007;127:164-76.
25. Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey M, Makris A *et al.* Mutation preventing formation of e antigen in patients with chronic HBV infection. *Lancet* 1989;2:588-91.
26. Rodriguez-Frias F, Buti M, Jardi R, Cotrina M, Viladomiu L, Esteban R *et al.* Hepatitis B virus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. *Hepatology* 1995;22:1641-7.
27. Jardi R, Rodríguez F, Buti M, Costa X, Valdes X, Allende H *et al.* Mutations in the basic core promoter region of hepatitis B virus. Relationship with precore variants and HBV genotypes in a Spanish population of HBV carriers. *J Hepatol* 2004;40:507-14.
28. Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, Sugai Y, Yoshida M, Moriyama K *et al.* Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. *J Virol* 1994;68:8102-10.
29. Dal Molin G, Poli A, Croce LS, D'Agaro P, Biagi C, Comar M *et al.* Hepatitis B virus genotypes, core promoter variants, and precore stop codon variants in patients infected chronically in North-Eastern Italy. *J Med Virol* 2006;78:734-40.
30. Huy TT, Ushijima H, Sata T, Abe K. Genomic characterization of HBV genotype F in Bolivia: genotype F subgenotypes correlate with geographic distribution and T(1858) variant. *Arch Virol* 2006;151:589-97.
31. Franca PH, Gonzalez JE, Munne MS, Brandao LH, Gouvea VS, Sablon E *et al.* Strong association between genotype F and hepatitis B virus (HBV) e antigen-negative variants among HBV-infected Argentinean blood donors. *J Clin Microbiol* 2004;42:5015-21.

32. Chan HL, Sung JJ. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. *Semin Liver Dis* 2006;26:153-61.
33. Kuang SY, Jackson PE, Wang JB, Lu PX, Muñoz A, Qian GS *et al.* Specific mutations of hepatitis B virus in plasma predict liver cancer development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:3575-80.
34. Piñeiro Y, Leone FG, Pezzano SC, Torres C, Rodríguez CE, Eugenia Garay M *et al.* Hepatitis B virus genetic diversity in Argentina: dissimilar genotype distribution in two different geographical regions; description of hepatitis B surface antigen variants. *J Clin Virol* 2008;42:381-8.

CORRESPONDENCIA

BQ Mauricio Venegas Santos
Sección de Gastroenterología
Departamento de Medicina
Hospital Clínico Universidad de Chile
Santos Dumont 999, Independencia, Santiago
Fono: 56 2 9788348
E-mail: mvenegas@redclinicauchile.cl

