

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



ANÁLISIS DE LOS MUTANTES DE LA REGIÓN PRE-CORE
DEL VIRUS B DE LA HEPATITIS

TESIS DOCTORAL

Vº Bº
El Director

Fdo: Dr. Vicente Carreño García



ARCHIVO

Fdo: Juan Manuel López-Alcorocho Sánchez

JUAN MANUEL LOPEZ-ALCOROCHO SANCHEZ

MADRID, 1998



Fundación Jiménez Díaz

CLINICA DE NUESTRA SEÑORA DE LA CONCEPCION

Avda. de los Reyes Católicos, 2 (Ciudad Universitaria)
28040 - MADRID

TELEFONOS:
544 18 00 - 544 01 00
549 10 07 - 549 11 00

**DON VICENTE CARREÑO GARCIA, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGIA, JEFE
DEL DEPARTAMENTO DE HEPATOLOGIA DE LA FUNDACION JIMENEZ DIAZ**

CERTIFICA: Que Don Juan Manuel López-Alcorocho Sánchez, licenciado en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo mi dirección y supervisión la Tesis Doctoral titulada: "Análisis de los mutantes de la región pre-core del virus B de hepatitis".

Para que así conste y surta los efectos oportunos firmo el presente certificado en Madrid a Catorce de Abril de Mil novecientos noventa y ocho.



Fdo: Dr. Vicente Carreño García



Fdo: Juan Manuel López-Alcorocho Sánchez

A mis padres y mi hermana

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Dr. Vicente Carreño la oportunidad que me ha proporcionado para realizar esta Tesis. Gracias también por su confianza en mi trabajo y por su apoyo, sin los cuales no lo habría conseguido.

Mi más sincero reconocimiento a Javier, Macu y Juan Antonio por la ayuda que me han prestado en todo momento. Gracias también a Ana por ser mi amiga.

Gracias a todos mis compañeros del laboratorio: Elena, Antonio, Julio, Sonia, María, Mario, Pepa, Marta, Rosa y Toya, por su amistad y comprensión. Tampoco me olvido de las nuevas adquisiciones: Susana, Merce, Africa, Luisa, Luz, Isabel, Esteban y Miguel.

También quiero dar las gracias a mis compañeros de la policlínica, sin cuya colaboración y su trabajo con los pacientes no hubiera sido posible la realización de esta Tesis.

Gracias a mi amigo Jose por haberme ayudado con las figuras del trabajo.

También quiero dar las gracias a Gema por su paciencia, por su cariño y por haber aguantado mis cambios de humor durante los meses que ha durado la preparación de este trabajo.

INDICE DE LAS ABREVIATURAS MAS UTILIZADAS

AgHBc	antígeno del core del virus B de la hepatitis
AgHBe	antígeno e del virus B de la hepatitis
AgHBs	antígeno de superficie del virus B de la hepatitis
ALT	alanina aminotransferasa
anti-HBc	anticuerpo frente al antígeno del core del virus B de la hepatitis
anti-HBe	anticuerpo frente al antígeno e del virus B de la hepatitis
anti-HBs	anticuerpo frente al antígeno de superficie del virus B de la hepatitis
HLA	complejo mayor de histocompatibilidad
HNF	factor hepático nuclear
IFN	interferón
IgG	inmunoglobulina de clase G
IgM	inmunoglobulina de clase M
MU	megaunidades
ORF	región de lectura abierta
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
UI	unidades internacionales
VBH	virus B de la hepatitis
VCH	virus C de la hepatitis
VIH-1	virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

INDICE

	<u>Página</u>
<u>I- INTRODUCCION</u>	6
1- ANTECEDENTES HISTORICOS	7
2- PARTICULAS ASOCIADAS AL VBH	8
3- GENOMA DEL VBH	11
4- ORGANIZACION GENOMICA DEL VBH	13
5- TRANSCRIPCION DEL VBH ADN	15
5.1. Promotores	16
<u>5.1.1. Promotores S</u>	16
<u>5.1.2. Promotor C</u>	17
<u>5.1.3. Promotor X</u>	18
5.2. Activadores o "enhancers"	18
5.3. Elemento respondedor a glucocorticoides (GRE)	18
5.4. Señal de terminación	18
5.5. Señal de encapsidación	19
6- CICLO REPLICATIVO DEL VBH	21
6.1. Unión del virión a los hepatocitos	21
6.2. Penetración del virus en la célula	21
6.3. Síntesis del ADN episómico	21
6.4. Encapsidación del ARN pregenómico	23
6.5. Síntesis de la cadena (-)	23

6.6. Degradación del ARN pregenómico y síntesis de la cadena (+)	25
6.7. Secreción de los viriones	25
7- MECANISMO CITOPATOGENICO DEL VBH	27
8- CARACTERISTICAS CLINICAS DE LA INFECCION POR VBH	28
8.1. Infección aguda por VBH	29
8.2. Historia natural de la infección crónica	29
<u>8.2.1. Fase de alto nivel de replicación</u>	30
<u>8.2.2. Fase de bajo nivel de replicación</u>	30
9- TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS CRONICA POR VBH	31
10- MUTANTES DEL VBH EN LA REGION PRE-CORE	32
<u>II- OBJETIVOS</u>	35
<u>III- PACIENTES Y METODOS</u>	37
1- PACIENTES	38
1.1. Pacientes no tratados	38
1.2. Pacientes asintomáticos	39
1.3. Pacientes tratados con interferón	40
1.4. Pacientes con prednisona e interferón	41
2- OBTENCION DE LAS BIOPSIAS HEPATICAS	42

3- ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO DE LAS	
BIOPSIAS HEPATICAS	42
4- METODOS	42
4.1. Prueba de función hepática	42
4.2. Detección de los marcadores	
inmunológicos víricos	43
4.3. Aislamiento del VBH ADN de suero	43
4.4. Aislamiento del VBH ADN de tejido hepático	43
4.5. Detección del VBH ADN de suero y	
biopsia hepática	44
4.6. Detección de las variantes del VBH	
en la región pre-core	47
4.7. Secuenciación	50
5- ANALISIS ESTADISTICO	50
<u>IV- RESULTADOS</u>	52
1- DESARROLLO Y ESPECIFICIDAD DE LA TECNICA	
DE HIBRIDACION PARA LA DETECCION DE LAS	
VARIANTES DEL VBH EN LA REGION PRE-CORE	53
2- DISTRIBUCION DE LAS VARIANTES DEL VBH EN	
LA REGION PRE-CORE EN SUERO Y BIOPSIA	
HEPATIC A DE PACIENTES NO TRATADOS	60

	<u>Página</u>
2.1. Distribución de las variantes pre-core en suer	61
2.2. Distribución de las variantes pre-core en biopsia hepática	63
2.3. Concordancia entre suero y biopsia hepática	65
3- DISTRIBUCION DE LAS VARIANTES DEL VBH EN LA REGION PRE-CORE EN PACIENTES ASINTOMATICOS	68
4- DISTRIBUCION DE LAS VARIANTES DEL VBH EN LA REGION PRE-CORE EN PACIENTES TRATADOS CON INTERFERON	73
5- DISTRIBUCION DE LAS VARIANTES DEL VBH EN LA REGION PRE-CORE EN PACIENTES TRATADOS CON PREDNISONA E INTERFERON	76
<u>V- DISCUSION</u>	79
<u>VI- CONCLUSIONES</u>	92
<u>VII- REFERENCIAS</u>	94
<u>VIII- ANEXO</u>	116

I-INTRODUCCION

1- ANTECEDENTES HISTORICOS

Antes de la identificación de los virus hepatotrópicos se diferenciaban dos tipos de hepatitis en función de la vía de transmisión: hepatitis de tipo A, de transmisión oral-fecal y hepatitis de tipo B, cuya vía de transmisión era parenteral (Krugman y col., 1967). Blumberg y col. (1963), mientras realizaban experimentos de inmunodifusión enfrentando sueros de pacientes transfundidos con sueros de donantes para obtener precipitinas contra lipoproteínas heterólogas, descubrieron un antígeno desconocido hasta entonces, al que denominaron "antígeno Australia" por haber sido aislado de un aborigen australiano. En los años siguientes se comprobó que la presencia de este antígeno se relacionaba con la hepatitis de tipo B (Gerlich, 1993). Este antígeno fue posteriormente identificado como el antígeno de superficie del virus B de la hepatitis (AgHBs).

Dane y col. (1970), utilizando una combinación de técnicas inmunológicas y de microscopía electrónica, observaron unas partículas esféricas de 42 nm de diámetro, que presentaban en su superficie el "antígeno Australia". Almeida y col. (1971), tratando la partícula de Dane con el detergente Tween 80, lograron exponer la nucleocápside del virus. Tras diversos estudios, demostraron que existía otro sistema antigénico, asociado a la nucleocápside, al que denominaron antígeno del "core" (AgHBc). En 1972, Magnius y Espmark detectaron un tercer sistema antigénico, asociado también a la nucleocápside del virus, denominado antígeno "e" (AgHBe).

Kaplan y col. (1973) pusieron de manifiesto la existencia de una actividad ADN polimerasa asociada con la partícula de Dane. Finalmente, se caracterizó el genoma del virus B de la hepatitis (VBH) como una molécula de ADN de pequeño tamaño,

circular y parcialmente bicatenario (Robinson y Greenman, 1974; Robinson y col., 1974).

En años posteriores, se identificaron diversos virus semejantes al VBH, que infectaban animales. Así, se descubrieron virus causantes de hepatitis en marmotas (Summers y col., 1978), perros de las praderas (Marion y col., 1980), patos de Pekin (Mason y col., 1980) y garzas (Sprengel y col., 1988). Todos estos virus se clasifican dentro de la familia "Hepadnaviridae" (Hepatitis DNA viruses), nombre que hace alusión a su carácter hepatotrópico (Gust y col., 1986). Puesto que uno de los pasos cruciales en la replicación de estos virus es la transcripción inversa de un ARN pregenómico a ADN genómico, también se les denomina Pararetrovirus, para diferenciarlos de los Orthoretrovirus, cuyo genoma es una molécula de ARN.

Los Hepadnavirus son capaces de inducir el desarrollo de hepatitis aguda, que en el caso del VBH puede llegar a cronificar en un 5-10% de los casos (Hyams y col., 1995). Además, se ha demostrado que su presencia está relacionada con el desarrollo de carcinoma hepatocelular (Beasley, 1982; Feitelson, 1992; Henkler y Koshy, 1996).

2- PARTICULAS ASOCIADAS AL VBH

En la sangre de los pacientes infectados por VBH se pueden detectar diferentes partículas asociadas al virus (Figura 1). En primer lugar, la partícula de Dane o virión completo del VBH, de forma esférica con un diámetro de 42 nm (Figura 1a). La partícula vírica presenta una envuelta externa formada por AgHBs, dentro de la cual se encuentra la nucleocápside o "core", compuesto por AgHBc. En el interior de

la nucleocápside se localizan el genoma y la polimerasa del virus.

Junto con la partícula de Dane se detectan otras partículas esféricas de 17-25 nm de diámetro y unos filamentos de 20 nm de diámetro y longitud variable (Hess y col., 1979), compuestos únicamente por AgHBs (**Figura 1b**).

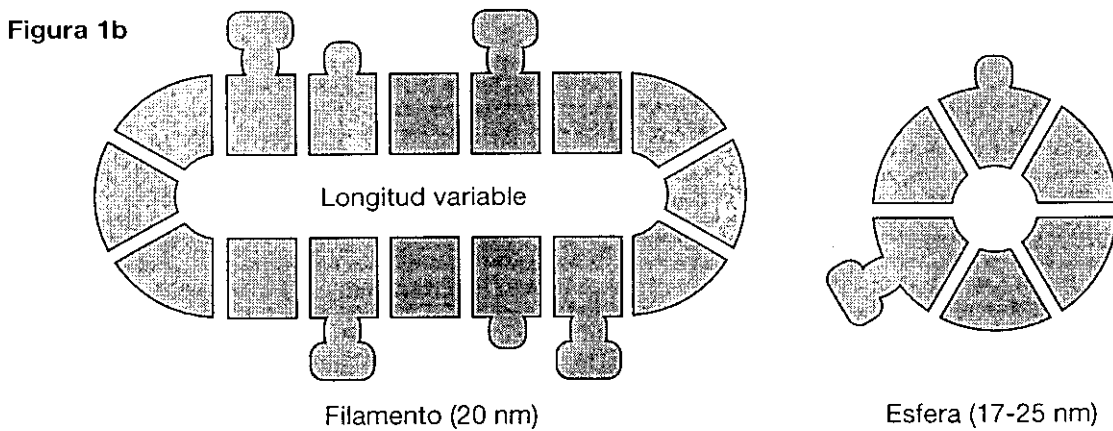
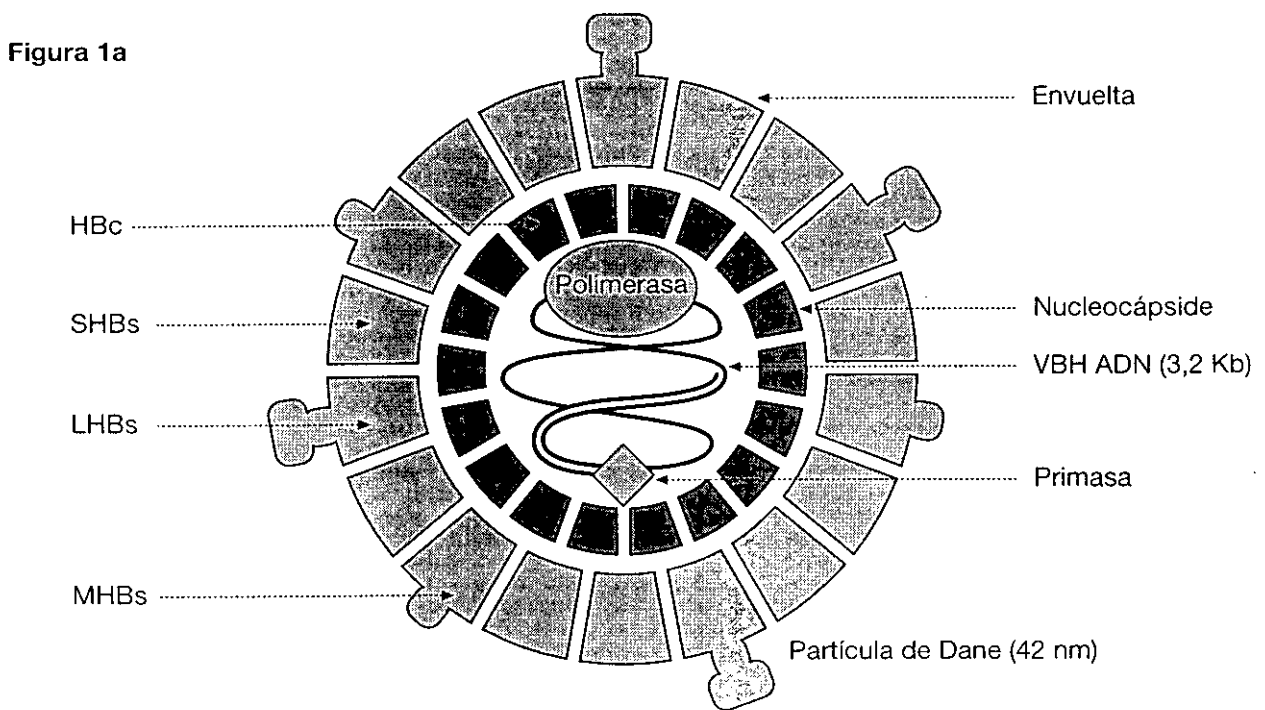


Figura 1. Partículas detectadas en el suero de los pacientes infectados con el VBH. **Figura 1a:** Partícula de Dane o virión completo del VBH, de 42 nm de diámetro. Consta de una envuelta formada por AgHBs, que rodea la nucleocápside compuesta por AgHBc, dentro de la cual se encuentra el VBH ADN y la ADN polimerasa viral. **Figura 1b:** Filamentos de 20 nm y longitud variable y esferas de 17-25 nm de diámetro, compuestos por AgHBs.

3- GENOMA DEL VBH

En la **figura 2** se representa un esquema del genoma del VBH. Está formado por una molécula de ADN parcialmente bicatenaria, de aproximadamente 3,2 Kb de longitud, con un peso molecular de $1,6 \times 10^4$ dalton (Robinson y col., 1974). Una de las cadenas posee la longitud completa de 3,2 Kb, actúa como molde en la síntesis de los ARN mensajeros (ARNm) víricos y se la designa por convención como cadena negativa (-). En la otra cadena, de polaridad positiva, denominada cadena (+), el extremo 5' es fijo mientras que el extremo 3' es variable, por lo que posee una longitud menor de 3,2 Kb. Por tanto, la molécula de ADN parcialmente bicatenario, presenta una región monocatenaria que oscila entre 20%-80% de la longitud de la cadena (-) (Tiollais y col., 1981). Se ha demostrado que la región monocatenaria del genoma se puede completar "in vitro" por acción de la polimerasa viral en presencia de deoxinucleótidos añadidos al medio (Landers y col., 1977; Miller y col., 1984). La estructura circular abierta del genoma se mantiene gracias a que en los extremos 5' de ambas cadenas existe una zona cohesiva de 224 nucleótidos (Sattler y Robinson, 1979). Por otro lado, los extremos 5' y 3' de la cadena (-) tienen una repetición de 9 nucleótidos, por lo que existe una pequeña región donde el genoma es tricatenario (Gerlich, 1993).

El extremo 5' de la cadena (-) se encuentra unido por medio de un enlace fosfodiéster a un dominio de la polimerasa llamado primasa, a través de un residuo de tirosina (Gerlich y Robinson, 1980). En cambio, el extremo 5' de la cadena (+) está formado por un oligorribonucleótido de 18 bases de longitud, semejante al extremo CAP de los ARNm eucarióticos (Gerlich, 1993). Ambas estructuras derivan del

mecanismo de replicación del virus. En el genoma del VBH se localizan dos secuencias directamente repetidas de 11 pares de bases, llamadas DR1 y DR2 (Dejean y col., 1984), que juegan un papel primordial en la replicación del VBH ADN.

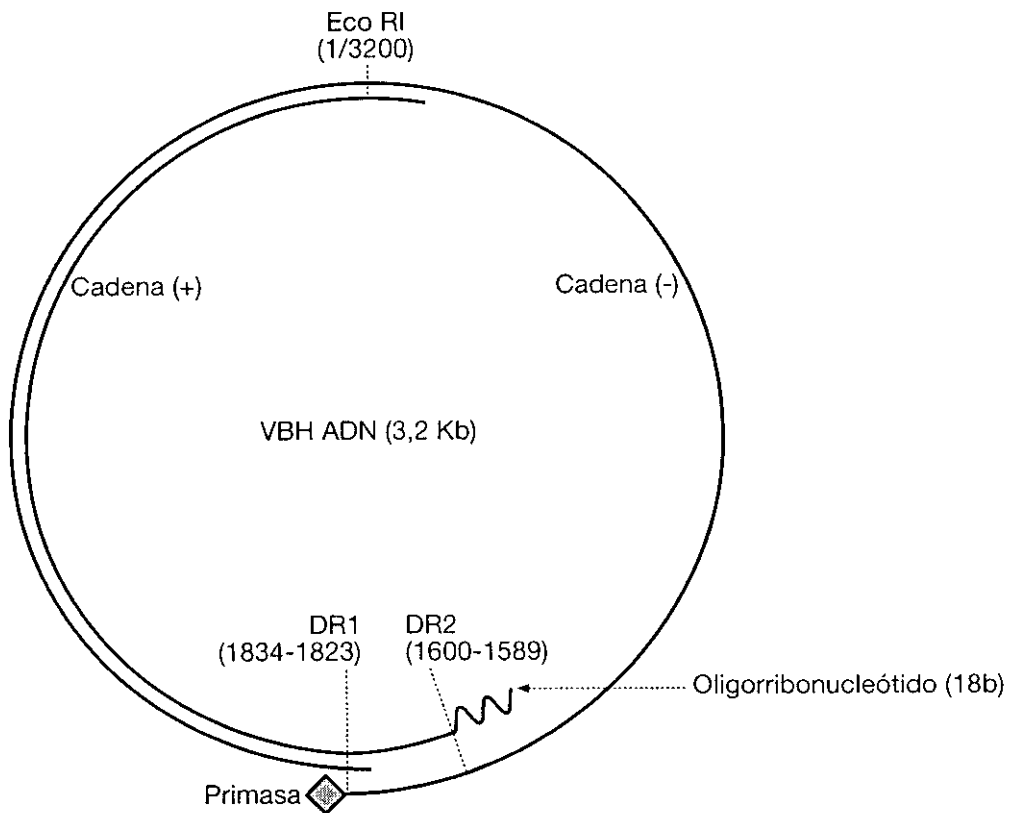


Figura 2. Esquema del genoma del VBH. Está formado por una molécula de ADN parcialmente bicatenario de 3,2 Kb de longitud. Una de las cadenas, denominada cadena (-), posee la longitud completa de 3,2 Kb, mientras que la otra, llamada cadena (+), tiene una longitud que oscila entre el 20 y el 80% de la longitud de la primera.

4- ORGANIZACION GENOMICA DEL VBH

En la cadena (-) del ADN vírico se pueden distinguir cuatro regiones de lectura abierta (open reading frames, ORFs) que solapan entre si y codifican para las proteínas del virus (Valenzuela y col., 1979; Galibert y col., 1979) (Figura 3). La ORF S que codifica para las proteínas de la envuelta, que constituyen el AgHBs (Peterson, 1981). En esta región existen tres codones de iniciación, que dividen la ORF en tres regiones conocidas con los nombres de pre-S1, pre-S2 y S (Stibbe y Gerlich, 1982). Si la lectura comienza en pre-S1 se produce la proteína larga del AgHBs, llamada LHBs. Cuando la lectura comienza en pre-S2 se sintetiza la proteína mediana llamada MHBs. Si la lectura comienza en el tercer codon de iniciación, se produce la proteína corta (SHBs). Estas proteínas pueden estar en una forma glicosilada o no glicosilada (Peterson, 1981).

La ORF C, en la que también se pueden distinguir dos codones de iniciación, que dividen la ORF en las regiones pre-core y core, codifica para las proteínas de la nucleocápside (Ou y col., 1986). La lectura desde el segundo codon de iniciación da lugar a la síntesis del AgHBc, mientras que la lectura desde el primero produce la síntesis de AgHBe.

La ORF P codifica para la enzima ADN polimerasa viral. Esta enzima presenta una actividad ADN polimerasa-ARN dependiente o transcriptasa inversa y también posee una actividad RNAsa H, encargada de hidrolizar el ARN en los híbridos ADN/ARN formados durante la replicación del VBH ADN (Tiollais, 1981). Esta proteína también tiene un dominio denominado primasa, que actúa como cebador en la síntesis de la cadena (-) durante la replicación del VBH ADN (Gerlich y Robinson,

1980; Wang y Seeger, 1992). La ORF X codifica para una proteína llamada HBx, con capacidad transactivadora (Spandau y Lee, 1988), aunque no parece ser esencial para el ciclo vital del virus (Blum y col., 1992).

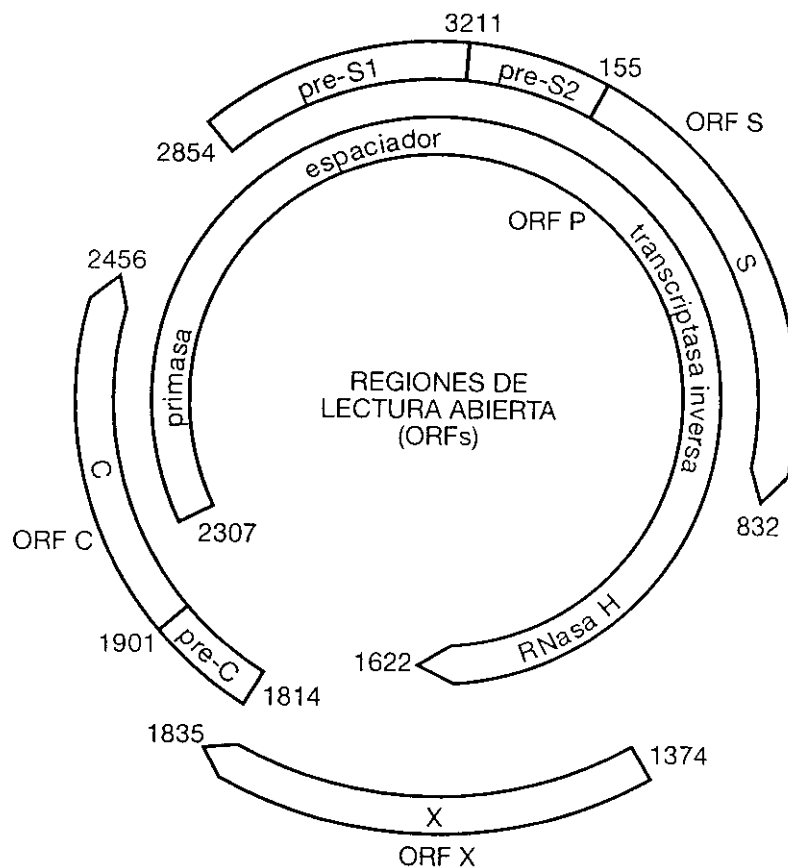


Figura 3. Regiones de lectura abierta (open reading frames: ORFs) del VBH ADN. Se distinguen 4 ORFs: ORF S, ORF C, ORF P y ORF X que codifican para las proteínas de la envuelta, de la nucleocápside, para la polimerasa y para la proteína X, respectivamente.

5- TRANSCRIPCIÓN DEL VBH ADN

En las células infectadas se pueden detectar cuatro tipos de ARN de origen vírico, sintetizados a partir de la transcripción de la cadena (-) del VBH ADN por medio de una ARN polimerasa II de origen celular (Figura 4). Estos ARN son coterminales, están poliadenilados en su extremo 3' y poseen la estructura "CAP" en el extremo 5'. Existe una familia de moléculas de ARN de aproximadamente 3,5 Kb, entre las que figura el ARN pregenómico, que es un intermediario replicativo del VBH y actúa como molde de la cadena (-) (Summers y Mason, 1982). En esta familia de transcritos también se encuentran los ARNm para las proteínas HBc/e (Ganem y Varmus, 1987), así como para la polimerasa (Hirsch y col., 1990; Nassal y col., 1990). El caso de los ARNm que codifican para las proteínas M/SHBs que forman parte de la envuelta, es semejante al de los ARNm de las proteínas de la nucleocápside. Así, estas dos proteínas están codificadas por una familia de ARNm de 2,1 Kb de longitud. Por otra parte, el ARNm que codifica para la otra proteína de la envuelta, LHBs, es una molécula única de una longitud de 2,4 Kb. Por último, se desconoce si existe una familia de ARNm que codifiquen para la proteína HBx, aunque si se sabe que existen moléculas de 0,8 Kb que codifican para esta proteína (Ganem y Varmus, 1987).

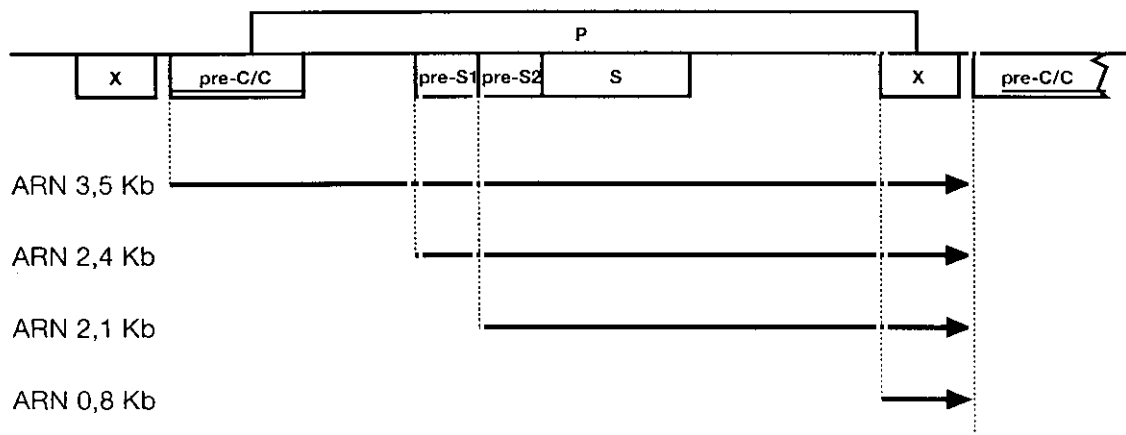


Figura 4. Productos de la transcripción del VBH ADN. A partir de la cadena (-) del VBH ADN se sintetizan por medio de una ARN polimerasa II celular, 4 especies de ARN coterminales y con estructura "CAP" en el extremo 5', que tienen unas longitudes de 3,5 Kb, 2,4 Kb, 2,1 Kb y 0,8 Kb.

La transcripción del VBH ADN está regulada por una serie de elementos genéticos, localizados a lo largo del genoma del virus. Estos elementos son los siguientes (Figura 5):

5.1. Promotores

Hasta el momento se han identificado cuatro promotores que dirigen la síntesis de los ARNm del VBH:

5.1.1. Promotores S

Existen 2 promotores conocidos como SPI y SPII que controlan la síntesis de las proteínas LHBs y M/SHBs, respectivamente (Chang y col., 1989; Raney y col., 1992). SPI es el único promotor del VBH que contiene una "caja" TATA típica por lo que la síntesis del ARNm controlada por este promotor comienza en un solo punto, dando lugar a moléculas de ARNm de la misma longitud, que es de 2,4 Kb. En el caso de SPII, al no poseer "caja" TATA, la transcripción puede comenzar en 5 ó más sitios, dando lugar a transcritos de diferente longitud. El más largo de ellos codifica para MHBs y SHBs, mientras que el resto codifican únicamente para SHBs (Gerlich, 1993). Parece ser que mientras que el promotor SPII es activo en todas las líneas celulares de mamíferos, el promotor SPI solamente es activo en los hepatocitos. Así, se ha demostrado que el factor de transcripción Sp1, presente en numerosas líneas celulares mamíferos, es capaz de activar a SPII (Raney y col., 1992), mientras que para activar el promotor SPI, se requieren otros factores específicos de hígado como el factor hepático nuclear I ó HNF-I (Chang y col., 1989).

5.1.2. Promotor C

Denominado CP, tampoco posee "caja" TATA, por lo que dirige la síntesis de una familia de transcritos de 3,5 Kb, pudiendo comenzar la síntesis en dos sitios separados por 4 nucleótidos (Yuh y col., 1992). El más largo de los transcritos sirve como molde para la síntesis de HBe, mientras que el más corto codifica para la proteína HBc y la polimerasa además de actuar como ARN pregenómico (Yuh y col., 1992). Se ha demostrado que este promotor solamente es activo en células hepáticas, requiriéndose para su activación factores de transcripción específicos de hígado como HNF-III y C/EBP (Yuh y col., 1992).

5.1.3. Promotor X

Conocido como XP, dirige la síntesis del ARN de 0,8 Kb que codifica para la proteína X (Treinin y Laub., 1987). Al igual que el promotor SPII, no requiere factores de transcripción específicos de hígado para su actividad.

5.2. Activadores o "enhancers"

Se conocen dos "enhancers" en el genoma del VBH que activan en gran medida la síntesis de los ARNm víricos. El "enhancer" I (EnI), que puede activar en uno o dos órdenes de magnitud los cuatro promotores (Hu y Siddiqui, 1991) y el "enhancer" II (EnII) que activa los promotores S en aproximadamente un orden de magnitud (Cheng y col., 1993). Mientras que EnI parece que no es estrictamente específico de hígado (Gerlich, 1993), EnII es más específico de hepatocitos, siendo activado por la unión de factores de transcripción como C/EBP y HNF-III (Yuh y col., 1989).

5.3. Elemento respondedor a glucocorticoides (GRE)

Tur-Kaspa y col. (1986) demostraron la existencia de una secuencia dentro del genoma del VBH, que podía actuar como GRE, activando "in vitro" los 4 promotores unas 5 veces. Sin embargo, se desconoce la posible funcionalidad "in vivo" de este GRE.

5.4. Señal de terminación

En la región del genoma del VBH que codifica para el AgHBc, existe un

hexanucleótido, conservado en todos los hepadnavirus, cuya secuencia es TATAAA y que está situada inmediatamente después del comienzo del gen HBc. Esta señal actúa en "cis" y es activa cuando se encuentra a más de 400 bases del promotor (Cherrington y col., 1992). En el caso del promotor CP, que dirige la síntesis del ARN pregenómico y de las proteínas HBc/e, al estar situado a una distancia menor de 400 bases, la señal de terminación se ignora después del primer paso de la ARN polimerasa II. De este modo, el ARN sintetizado a partir de este promotor contiene unos extremos 5' y 3' redundantes. Así, en el extremo 5' del ARN pregenómico se localizan la secuencia DR1 y la secuencia "epsilon" o señal de encapsidación de la que se hablará en el siguiente apartado. Estas secuencias están repetidas en el extremo 3', donde reciben el nombre de DR1* y "épsilon"*. Además, esta señal es esencial para el procesamiento correcto y poliadenilación de los ARNm víricos (Cherrington y col., 1992).

5.5. Señal de encapsidación

En el extremo 5' del ARN pregenómico existe una secuencia de 61 nucleótidos denominada "epsilon", que dirige la encapsidación de éste junto con las proteínas del core y la polimerasa viral para formar la nucleocápside (Junker-Niepmann y col., 1990). Dicha secuencia presenta una estructura secundaria característica muy conservada en todos los hepadnavirus.

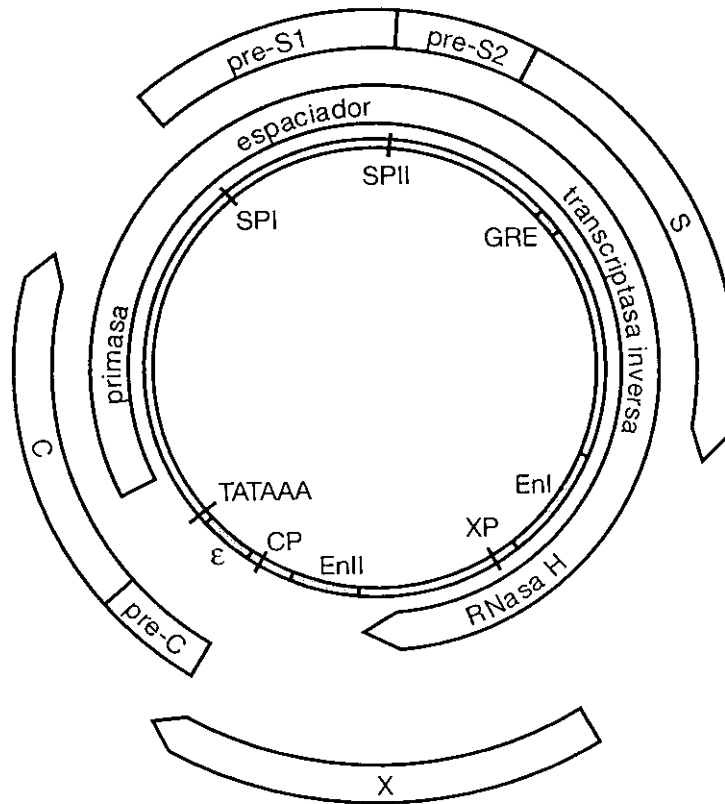


Figura 5. Elementos reguladores de la transcripción localizados en el genoma del VBH. SPI y SPII: promotores S, CP: promotor C, XP: promotor X, EnI y EnII: activadores o "enhancers" I y II, GRE: elemento respondedor a glucocorticoides, TATAAA: señal de terminación de la transcripción y "epsilon": señal de encapsidación.

6- CICLO REPLICATIVO DEL VBH

En el ciclo vital del VBH se pueden distinguir varias fases (Figura 6):

6.1. Unión del virión a los hepatocitos

Por el momento se desconoce el mecanismo que emplea el VBH para unirse a los hepatocitos y comenzar la infección.

6.2. Penetración del virus en la célula

El mecanismo por el cual el virus penetra en las células se ha estudiado sobre todo en el hepadnavirus que infecta a los patos de Pekin. Se piensa que la penetración podría ocurrir por un mecanismo de endocitosis mediada por receptor, formándose un endosoma, que posteriormente se acidificaría, liberándose la nucleocápside al citoplasma (Offensperger y col., 1991).

6.3. Síntesis de ADN episómico

Una vez que el virus ha penetrado en los hepatocitos, lo primero que ocurre es la síntesis del resto de la cadena (+) en el núcleo de las células, por medio de una ADN polimerasa celular. De este modo se genera un ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc) (Nassal y Schaller, 1996).

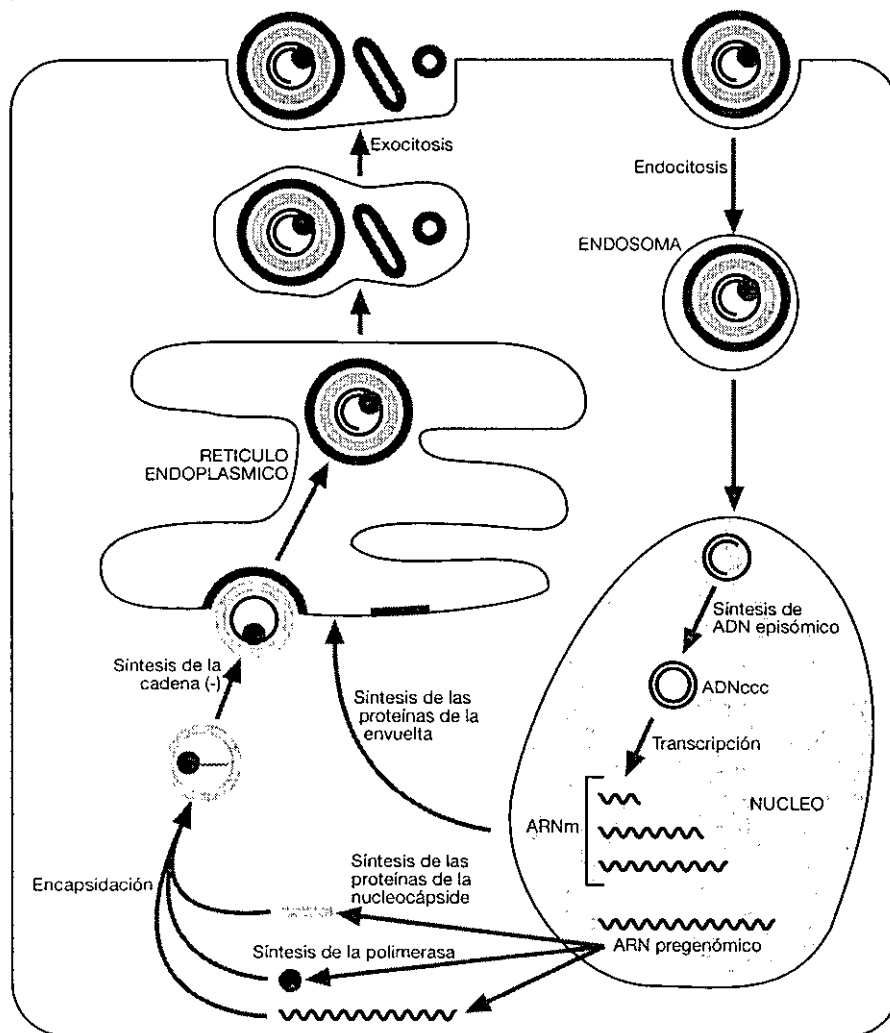


Figura 6. Ciclo replicativo del VBH. El virus penetra en el hepatocito a través de un mecanismo de endocitosis. En el núcleo de la célula, se completa la síntesis de la cadena (+) del VBH ADN dando lugar a un ADN circular cerrado covalentemente (ADNccc). La transcripción del ADNccc genera por un lado los ARNm y el ARN pregenómico. El ARN pregenómico va a servir como molde para la síntesis de las proteínas de la nucleocápside y para la polimerasa vírica. El ARN pregenómico interacciona con la polimerasa y con las proteínas de la nucleocápside, se produce la encapsidación del primero y comienza la síntesis de la cadena (-) del ADN viral. La nucleocápside migra hasta el retículo endoplásmico donde las proteínas de la envuelta la recubren dando lugar a un virión completo de VBH y comenzando la síntesis de la cadena (+). La partícula vírica llega a la membrana plasmática, donde se secreta por un mecanismo de exocitosis antes de concluir la síntesis de la cadena (+).

6.4. Encapsidación del ARN pregenómico

La cadena (-) del ADNccc sirve como molde para la síntesis de los ARNm y del ARN pregenómico, llevándose a cabo el proceso de transcripción por medio de una ARN polimerasa II de origen celular (Nassal y Schaller, 1996). Por otra parte, en el citoplasma de los hepatocitos se produce la traducción del ARNm de la proteína HBc y de la ADN polimerasa-ARN dependiente. Las proteínas HBc tienen la capacidad de autoensamblarse formando partículas icosaédricas y además el extremo C-terminal de esta proteína presenta un dominio de unión a ácidos nucleicos. La interacción de la polimerasa vírica con la señal de encapsidación "epsilon" presente en el extremo 5' del ARN pregenómico (Junker Niepmann y col., 1990), activa la unión de dímeros formados por proteínas HBc, produciéndose el autoensamblaje de todas estas moléculas para dar lugar a la nucleocápside viral.

6.5. Síntesis de la cadena (-)

Después de la encapsidación del ARN pregenómico tiene lugar la síntesis de cadena (-) del VBH ADN llevada a cabo por la polimerasa viral (Figura 7). La síntesis comienza en la secuencia "epsilon" situada en el extremo 5' del ARN pregenómico y tras copiar 4 bases, el complejo de la polimerasa y el ADN que se está sintetizando se translocan al sitio DR1*, localizado en el extremo 3' de la molécula (Rieger y Nassal, 1996). Aunque no se sabe con detalle, presumiblemente los dos extremos del ARN pregenómico se encuentran situados espacialmente muy próximos dentro de la nucleocápside, de modo que tanto "epsilon" como DR1* están lo suficientemente cerca como para que se produzca dicha translocación. En este proceso de síntesis de ADN, el dominio conocido con el nombre de "primasa" de la propia polimerasa

vírica actúa como cebador, generándose una molécula de ADN monocatenario con una repetición de 9 nucleótidos en ambos extremos de la cadena (Wang y Seeger, 1992).

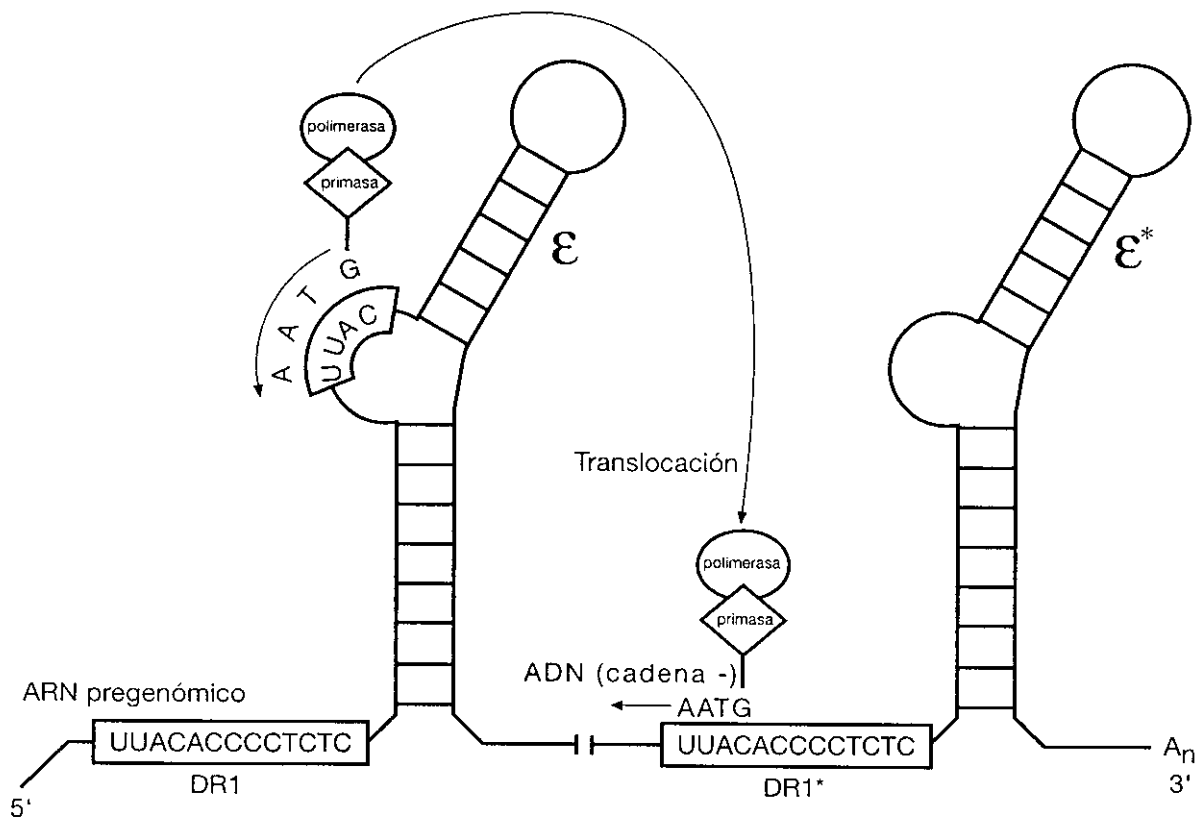


Figura 7. Mecanismo de síntesis de la cadena (-) del VBH ADN a partir del ARN pregenómico. El complejo polimerasa-primasa se une a una secuencia específica dentro de la región "epsilon" del extremo 5'. Tras la síntesis de un oligodeoxinucleótido complementario de 4 bases en la que el dominio "primasa" actúa como cebador, el complejo se transloca a la región DR1* situada en el extremo 3' del ARN pregenómico e hibrida con una secuencia complementaria a las 4 bases recién sintetizadas, donde continúa la síntesis de la cadena (-).

6.6. Degradación del ARN pregenómico y síntesis de la cadena (+)

Una vez sintetizada la cadena (-), la formación del híbrido compuesto por el ARN pregenómico y la cadena (-) provoca la activación del dominio RNasa H de la ADN polimerasa viral (Cheng y col., 1994). El resultado es la degradación del ARN pregenómico a oligorribonucleótidos. Uno de éstos, correspondiente al extremo 5' del ARN pregenómico, de 18 bases de longitud y con la estructura "CAP", actúa como cebador para la síntesis de la cadena (+), disociándose de la secuencia DR1 de la cadena (-) y translocándose al sitio DR2 de la misma cadena, comenzando la síntesis de la cadena (+) desde la última base de DR2 (Gerlich, 1993) (Figura 8).

6.7. Secreción de los viriones

Al mismo tiempo que se produce la replicación y encapsidación del genoma vírico, tiene lugar la síntesis de las proteínas de la envuelta en el retículo endoplásmico rugoso, insertándose en la membrana del mismo (Eble y col., 1990; Gallina y col., 1992). Las proteínas de la envuelta emergerían hacia la luz del retículo endoplásmico y una zona rica en estas proteínas recubriría la nucleocápside antes de terminar la síntesis de la cadena (-), produciéndose el autoensamblaje de la partícula vírica (Bruss y Ganem, 1991). Los viriones se transportan a través de las cisternas del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi hasta la membrana plasmática, donde se secretan por medio de un mecanismo de exocitosis (Ganem, 1991).

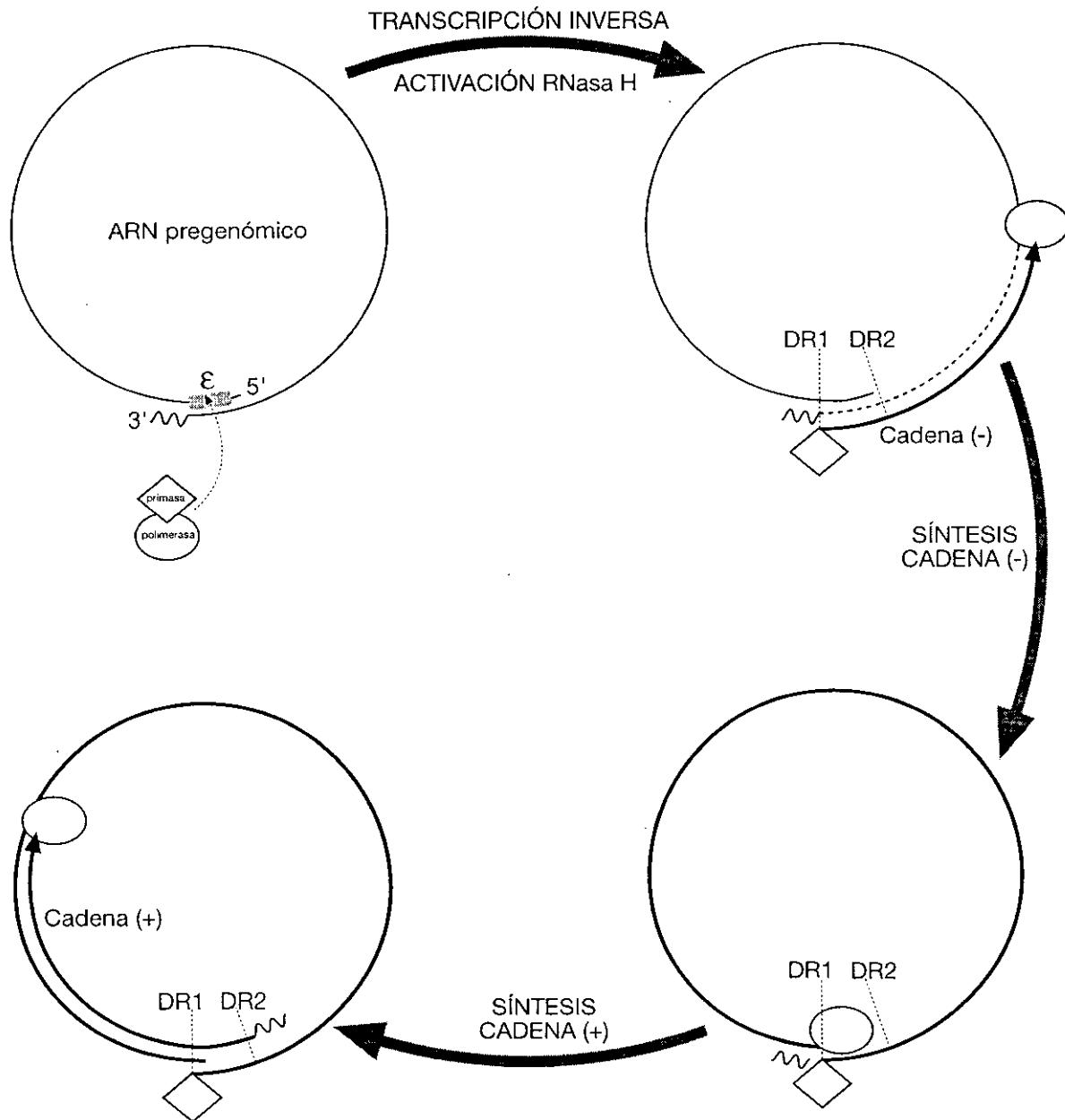


Figura 8. Síntesis de la cadena (+) del VBH ADN. A medida que se va sintetizando la cadena (-), el híbrido que se va formando entre el ARN pregenómico y el ADN que se está sintetizando, activa el dominio Rnasa H de la polimerasa, produciéndose la degradación del primero. El fragmento 3' del ARN pregenómico, de 18 bases de longitud, se transloca a la región DR2 donde va a actuar como cebador en la síntesis de la cadena (+). La síntesis continúa hasta que el virus es secretado de la célula.

7- MECANISMO CITOPATOGENICO DEL VBH

Se ha demostrado que el VBH no es un virus citopático por si mismo, sino que el daño celular que se produce durante la infección es debido al propio sistema inmunitario del huésped. Mientras que la respuesta inmunitaria humoral es la encargada del aclaramiento de los viriones circulantes, la respuesta de tipo celular es la responsable de la eliminación de las células infectadas y también de la lesión hepática asociada a la infección (Chisari y Ferrari, 1995).

El mecanismo principal de eliminación de las células infectadas tiene lugar a través del reconocimiento de los hepatocitos infectados por parte de linfocitos T CD8+ citotóxicos. Este reconocimiento se produce a través de péptidos derivados principalmente del AgHBc y del AgHBe, unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (HLA) de clase I, expuestos en la membrana de los hepatocitos infectados (Fowler y col., 1994). Los linfocitos T citotóxicos activados pueden ejercer una acción citotóxica directa, induciendo la apoptosis de los hepatocitos infectados (Chisari y Ferrari, 1995). En segundo lugar, se ha descrito que en ratones transgénicos, los linfocitos T citotóxicos activados secretan una serie de citoquinas como interferón gamma (Guidotti y col., 1994a), factor de necrosis tumoral alfa (Guilles y col., 1992; Guidotti y col., 1994a) e interleuquina-2 (Guidotti y col., 1994b) que inhiben la replicación del VBH por un mecanismo no citolítico.

Otro mecanismo adicional de aclaramiento del VBH está mediado por linfocitos T CD4+. En este caso, los hepatocitos exponen en su membrana péptidos derivados también principalmente del AgHBc y del AgHBe, unidos a moléculas de HLA de clase II. La función reguladora de los linfocitos CD4+ se lleva a cabo por medio de la

secreción de linfoquinas que median la respuesta de linfocitos B y linfocitos T CD8+ específicos de antígeno y de otros linfocitos CD4+ (Maruyama y col., 1993). Por tanto, en la lesión hepática producida por la infección por el VBH, el sistema de los linfocitos T CD8+ restringidos por HLA de clase I ejercería una acción directa, mientras que los linfocitos T CD4+ restringidos por HLA de clase II jugarían un papel primordial en la regulación de la lesión hepática (Chisari y Ferrari, 1995).

En estudios clínicos recientes realizados en pacientes con infección por VBH se ha comprobado que durante el aclaramiento del virus se produce una respuesta de células T específicas del AgHBc y AgHBe, con aumento en la producción de interferón gamma, interleuquina 2 e interleuquina 12 (Rossol y col., 1997), así como un aumento en la frecuencia y el vigor de la actividad en las células T CD8+ (Rehermann y col., 1996).

8- CARACTERISTICAS CLINICAS DE LA INFECCION POR EL VBH

Cuando el virus entra en contacto con el organismo, pueden darse dos situaciones. En primer lugar, si el individuo ha tenido contacto previo con el virus o ha sido vacunado previamente y posee por tanto anticuerpos frente al antígeno de superficie (anti-HBs) a nivel circulante, se produciría una respuesta secundaria de anticuerpos, bloqueándose el VBH antes de la infección de los hepatocitos (Kennedy, 1983). En segundo lugar, si el individuo no posee anti-HBs circulante, en algunos casos se podría producir una respuesta primaria de anticuerpos que bloquearía el virus antes de producirse la infección. Sin embargo, si la carga viral inoculada es superior a la capacidad de reacción del huésped o si el sistema inmunitario no actúa

con la suficiente actividad, el VBH penetra en los hepatocitos y comienza la enfermedad.

Este patrón de infección aguda se produce en aproximadamente un 90% de los casos y generalmente termina por resolverse favorablemente. Sin embargo, en el 10% de pacientes con hepatitis aguda, la infección evoluciona hacia la cronicidad (Hyams, 1995).

8.1. Infección aguda por VBH

Entre 3 y 11 semanas después del contacto con el VBH, aparece en el suero el AgHBs y posteriormente el AgHBe, AgHBc y el VBH ADN. Este período coincide con un aumento en el nivel de alanina aminotransferasa (ALT), alcanzando un máximo aproximadamente a los 3 meses. Al comienzo de la fase clínica aparece el anticuerpo frente al AgHBc (anti-HBc) de clase IgM, que posteriormente es reemplazado por el anti-HBc de clase IgG, que puede permanecer positivo indefinidamente (Mora y col., 1984). Al comenzar los síntomas clínicos suelen desaparecer primero el AgHBe y el VBH ADN y por último el AgHBs. Hay un intervalo denominado período de ventana en el que sólo se detecta el anti-HBc. Posteriormente aparece el anti-HBe, que puede permanecer detectable durante años (Carreño y col., 1984) y el último anticuerpo que aparece es el anti-HBs, que permanece positivo por tiempo indefinido (Carreño y col., 1981).

8.2. Historia natural de la infección crónica

A partir de los 6 meses del comienzo de la enfermedad, si se sigue detectando

el AgHBs, hay que considerar que el paciente ha pasado a ser un portador crónico del VBH. En la infección crónica por VBH se pueden distinguir dos fases:

8.2.1. Fase de alto nivel de replicación

Durante esta fase se pueden detectar en el suero de los pacientes el AgHBs, AgHBe y el VBH ADN por métodos como la hibridación molecular. Estos pacientes presentan un alto nivel de infectividad y por lo general en este período la lesión hepática es importante.

8.2.2. Fase de bajo nivel de replicación

En esta fase ya no se detecta el AgHBe en el suero de los pacientes y en su lugar se detecta el anti-HBe. Todos los demás marcadores de replicación vírica desaparecen y en circunstancias normales, la lesión hepática mejora y los niveles de ALT se normalizan.

El paso de la fase de alto a la de bajo nivel de replicación se denomina seroconversión y se puede producir de forma espontánea (Realdi y col., 1980; Hoofnagle y col., 1981) o puede ser inducida por tratamiento con agentes antivíricos (Hoofnagle y col., 1988; Carreño y col., 1994). Estos pacientes reciben el nombre de portadores sanos o asintomáticos del VBH, poseyendo AgHBs detectable en suero y niveles normales de ALT. Sin embargo, se ha comprobado que más de un 50% de los portadores asintomáticos de VBH poseen lesión hepática demostrada histológicamente (De Franchis y col., 1980). Además, como se ha comentado anteriormente, la presencia del VBH está relacionada con el desarrollo de carcinoma hepatocelular, poseyendo estos pacientes un mayor riesgo de desarrollarlo que la población general (Beasley, 1982; Feitelson, 1992; Henkler y Koshy, 1996).

Por último, existen portadores crónicos del VBH que a pesar de haber sufrido la seroconversión a anti-HBe, continúan con los niveles alterados de transaminasas y lesión hepática demostrada histológicamente. En el suero de estos pacientes se puede detectar el genoma del VBH por métodos convencionales de hibridación molecular, lo cual indica que en ellos existe un alto nivel de replicación del VBH.

9- TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS CRONICA POR VBH

Para tratar la hepatitis crónica causada por el VBH se han ensayado diversos compuestos con actividad antivírica o inmunomoduladora (Bassendine y col., 1981; Price y col., 1986; Scully y col., 1987; Janssen y col., 1993; Bosch y col., 1993; Martín y col., 1993; Fried y col., 1994). Entre estos compuestos, el interferón alfa, que tiene tanto actividad antivírica como inmunomoduladora, es el que ha proporcionado los mejores resultados. Así, aproximadamente del 35 al 50% de los pacientes AgHBe positivos tratados con interferón alfa responden al tratamiento, con normalización de los niveles de transaminasas, negativización del VBH ADN sérico y seroconversión a anti-HBe (Perrillo, 1993). La respuesta es por lo general muy estable, de modo que la enfermedad no suele reactivarse posteriormente. En cuanto a los pacientes anti-HBe positivos tratados con interferón alfa, entre un 57 y un 100% de éstos responden con normalización de los niveles de transaminasas y negativización del VBH ADN del suero (Hadziyannis y col., 1990; Fattovich y col., 1992; Pastore y col., 1992). Sin embargo, la respuesta al tratamiento en estos pacientes es en muchos casos transitoria, puesto que en aproximadamente el 90% de los casos se produce la reactivación de la enfermedad después de finalizar la terapia.

Debido al papel tan importante que ejerce el sistema inmunitario en el aclaramiento del virus, otro tratamiento de la enfermedad ha sido la administración de sustancias inmunomoduladoras. Entre dichas sustancias se encuentran los esteroides solos o en combinación con interferón (Perrillo y col., 1988; Reichen y col., 1994; Liaw y col., 1994). Cuando se utilizan los esteroides en combinación con interferón, el paciente pasa en primer lugar por una fase de inmunosupresión seguida de una fase de inmunoestimulación en la cual se produce una gran activación del sistema inmunitario que en teoría provoca el aclaramiento del VBH.

10- MUTANTES DEL VBH EN LA REGION PRE-CORE

Como se ha comentado en un apartado anterior, existen portadores crónicos del VBH que a pesar de haber sufrido la seroconversión a anti-HBe, continúan con los niveles alterados de transaminasas, tienen VBH ADN detectable en suero por métodos convencionales de hibridación molecular y lesión hepática demostrada histológicamente. Estudiando el suero de estos pacientes, Carman y col. (1989) descubrieron que estaban infectados por una variante del VBH que presentaba una mutación en la región pre-core, que consistía en una transición de G a A en la posición 1896. Esta mutación da lugar al cambio del codon 28 TGG que codifica para el aminoácido triptófano por un codon de terminación TAG, que impide la síntesis del AgHBe (Carman y col. 1989). Posteriormente, el aislamiento de este mismo mutante por parte de otros grupos de investigadores de otros países demostró que esta variante está ampliamente distribuida en todo el mundo (Bhat y col., 1989; Brunetto y col., 1989; Tong y col., 1990; Brunetto y col., 1990; Okamoto y col., 1990; Raimondo

y col., 1990; Brunetto y col., 1991). Con cierta frecuencia, esta variante se encuentra acompañada de otra que presenta una mutación adicional en la región pre-core, que consiste en la transición de G a A, cambiando el codon 29 de GGC que codifica para el aminoácido glicina por GAC que codifica para ácido aspártico (Carman y col., 1989).

Se ha demostrado que la aparición de estos mutantes está condicionada por la secuencia en la posición del nucleótido 1858. La estructura secundaria que adopta la molécula de ARN pregenómico en la señal de encapsidación "epsilon" está estabilizada por apareamiento intracatenario de bases. Uno de estos apareamientos se produce entre las bases de las posiciones 1858 y 1896 (Tong y col., 1993; Lok y col., 1994; Lindh y col., 1995). En algunos aislados de VBH el nucleótido de la posición 1858 es timina (T-1858), mientras que en otros es citosina (C-1858). Por tanto, en los pacientes infectados con la variante T-1858 la aparición del mutante estaría favorecida, mientras que no lo estaría en los infectados por la variante C-1858 porque se destabilizaría la estructura secundaria de la señal de encapsidación.

Estos mutantes del VBH se aislaron por primera vez en pacientes con hepatitis fulminante (Omata y col., 1991; Carman y col., 1991), por lo que se pensó que estaban asociadas con un agravamiento de la enfermedad hepática. Por otro lado, se conocían pocos datos acerca de la influencia de estos mutantes en la respuesta al tratamiento con interferón, aunque se apuntaba la posibilidad de que su presencia condicionaba negativamente la respuesta al tratamiento (Hadziyannis y col., 1990; Fattovich y col., 1992; Pastore y col., 1992; Xu y col., 1992). Puesto que el curso de la infección y la respuesta al tratamiento parecen estar condicionados por la presencia

de una u otra variante en los pacientes, es necesario el desarrollo de una técnica rápida de detección, ya que los métodos convencionales de secuenciación no se pueden aplicar como rutina diagnóstica para la detección de estas variantes. Además, cabe la posibilidad de que lo que realmente influya en el agravamiento de la enfermedad y la ausencia de respuesta al interferón no sea la presencia de estos mutantes sino la proporción en que se encuentran con respecto al tipo salvaje. Así, en los primeros trabajos realizados acerca del aislamiento y caracterización de las variantes del VBH en la región pre-core se aplicó la técnica de secuenciación, tanto directamente de los productos de amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como después de la clonación de dichos productos de PCR. Dicha técnica sólo permite conocer si dichas variantes de la región pre-core están presentes en una muestra determinada, pero no la proporción relativa de cada una de ellas en dicha muestra. Por último, cuando se comenzó a realizar este estudio, no se conocía si estos mutantes eran detectables en tejido hepático y tampoco cual era la relación entre las variantes detectadas en suero y en hígado.

II- OBJETIVOS

- 1- Desarrollar una técnica sencilla basada en la hibridación con oligonucleótidos que permita la detección y cuantificación del VBH de tipo salvaje y de las variantes del VBH en la región pre-core.
- 2- Analizar la distribución y proporción relativa de cada una de las variantes del VBH en la región pre-core en suero y tejido hepático de pacientes anti-HBe positivos.
- 3- Comparar la población de las variantes pre-core del VBH en pacientes anti-HBe positivos con o sin alteración de los parámetros de la función hepática.
- 4- Determinar si la presencia de las variantes del VBH de tipo mutante afecta a la respuesta al tratamiento con interferón.
- 5- Estudiar las variantes del VBH en la región pre-core en pacientes anti-HBe positivos tratados con la terapia combinada de prednisona e interferón.

III- PACIENTES Y METODOS

1- PACIENTES

En la presente tesis doctoral se han estudiado 125 pacientes con hepatitis crónica B probada histológicamente según criterios internacionales (Bianchi y col., 1977). Los pacientes se dividieron en cuatro grupos de estudio para facilitar el desarrollo de los objetivos planteados.

1.1. Pacientes no tratados

Se incluyeron 49 pacientes en los cuales se estudió la distribución en suero y biopsia hepática de las variantes del VBH en la región pre-core. Todos ellos eran anti-HBe positivos y tenían niveles alterados de alanina aminotransferasa (ALT) [media \pm desviación típica: $112,5 \pm 114,3$ unidades internacionales (UI)/L; límite superior de normalidad: 45 UI/l]. Once pacientes presentaban anticuerpos frente al virus C de la hepatitis (anti-VCH), 20 frente al virus delta de la hepatitis (anti-VDH) y 5 eran portadores asintomáticos del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1). Ningún paciente había recibido terapia antivírica o inmunomoduladora.

Las características basales de estos pacientes se resumen en la **tabla 1**.

Tabla 1. Características de los pacientes no tratados.

Edad ^a (años)	36, 5 \pm 14,2
Sexo (hombres/mujeres)	37/15
Tiempo de portador de AgHBs ^a (meses)	60 \pm 48

^aExpresado como la media \pm desviación típica.

1.2. Pacientes asintomáticos

Se determinó la distribución de las variantes del VBH en la región pre-core en 29 portadores asintomáticos de VBH, anti-HBe positivos, con niveles de ALT normales (límite superior de normalidad: 45 UI/L). Para ser incluidos en este estudio los pacientes debían poseer VBH ADN en suero detectable por PCR y presentar daño hepático probado en una biopsia tomada dentro de los 6 meses anteriores al inicio del estudio. Los pacientes fueron incluidos aleatoriamente en dos grupos:

- Grupo A1, formado por 14 pacientes tratados con 9 megaunidades (MU) de IFN-alfa 2a recombinante, tres veces por semana durante 6 meses.
- Grupo A2, compuesto por 15 pacientes sin tratar que sirvieron como controles y que fueron estudiados bajo las mismas condiciones que los pacientes tratados.

Las características basales de los pacientes incluidos en este estudio se encuentran recogidas en la tabla 2.

Tabla 2. Características basales de los pacientes asintomáticos.

	Grupo A1 (n=14)	Grupo A2 (n=15)
Edad ^a (años)	39,6 ± 12,0	39,4 ± 11,5
Sexo (hombres/mujeres)	10/4	6/9
Tiempo con niveles normales de ALT ^{a,b} (meses)	49,0 ± 38,7	82,2 ± 51,1

^aExpresado como la media ± desviación típica.

^bTiempo transcurrido desde la detección del AgHBs en cada caso.

1.3. Pacientes tratados con interferón

Se estudió la distribución de las variantes del VBH en la región pre-core en 38 pacientes anti-HBe positivos, con VBH ADN en suero detectable por PCR y niveles alterados de ALT. Los pacientes habían sido tratados con IFN-alfa 2b recombinante según dos pautas diferentes:

- Grupo S1, formado por 19 pacientes tratados con 10 MU de IFN-alfa 2b recombinante tres veces por semana durante 2 meses, 5 MU tres veces por semana durante 2 meses y 3 MU tres veces por semana durante 2 meses.
- Grupo S2, compuesto por 19 pacientes que recibieron 10 MU de IFN-alfa 2b recombinante tres veces por semana durante 2 meses, 5 MU tres veces por semana durante 2 meses y 3 MU tres veces por semana durante 8 meses.

Las características basales de los pacientes incluidos en cada grupo de tratamiento se esquematizan en la tabla 3.

Tabla 3. Características basales de los pacientes tratados con interferón.

	Grupo S1 (n=19)	Grupo S2 (n=19)
Edad ^a (años)	37,3 ± 11,4	31,2 ± 14,0
Sexo (hombres/mujeres)	17/2	16/3
Tiempo de portador de AgHBs ^a (meses)	67,8 ± 55,5	61,6 ± 47,7

^aExpresado como la media ± desviación típica.

1.4. Pacientes tratados con prednisona e interferón

Se determinó la distribución de las variantes del VBH en la región pre-core en 9 pacientes que habían sido incluidos en un estudio de tratamiento con prednisona e interferón (IFN)-alfa 2b recombinante, según la siguiente pauta: 30 mg de prednisona diariamente durante el primer mes, 20 mg diarios durante dos semanas y 10 mg la última semana. Seguidamente, los pacientes recibieron 15 MU de IFN, tres veces por semana durante 6 meses, empezando el último día del tratamiento con prednisona. Todos ellos eran anti-HBe positivos y tenían niveles alterados de ALT (media \pm desviación típica: 116,7 \pm 61,0 UI/L). Las características basales de estos pacientes se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Características basales de los pacientes tratados con prednisona e interferón.

Edad ^a (años)	31 \pm 12
Sexo (hombres/mujeres)	8/1
Tiempo de portador de AgHBs ^a (meses)	81,9 \pm 67,4

^aExpresado como la media \pm desviación típica.

2- OBTENCION DE LAS BIOPSIAS HEPATICAS

Las muestras de tejido hepático se obtuvieron mediante biopsia hepática ciega realizada con aguja Tru-cut bajo anestesia local. Un tercio de la muestra obtenida se procesó para el estudio anatomopatológico y el resto se congeló inmediatamente (en un tiempo inferior a 5 minutos) en nitrógeno líquido, hasta el momento de su utilización para la detección del VBH ADN.

Todos los estudios realizados fueron aprobados por el Comité de Ensayos Clínicos de la Fundación Jiménez Díaz. Además, en todos los casos se obtuvo un consentimiento escrito de los pacientes para la realización de las biopsias hepáticas.

3- ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO DE LAS BIOPSIAS HEPATICAS

El diagnóstico histológico de las biopsias hepáticas fue realizado por el Departamento de Anatomía Patológica de la Fundación Jiménez Díaz, de acuerdo a criterios internacionales (Bianchi y col., 1977). En los casos en que fue posible se determinó el índice de actividad histológica según los criterios de Knodell y col. (1981).

4- METODOS

4.1. Prueba de función hepática

Los niveles de ALT séricos se analizaron por métodos estándar (Smac 20 Technicon, New York, NY).

4.2. Detección de los marcadores inmunológicos víricos

El AgHBs, AgHBe, anti-HBe y anti-VDH se determinaron mediante la técnica de radioinmunoensayo (Abbott Laboratories, North Chicago, IL). La presencia de inmuno-complejos circulantes AgHBe/anti-HBe se determinó por medio del método descrito por Castillo y col. (1990). El anti-VCH se determinó mediante enzimoimmunoensayo (Ortho Diagnostics Systems, Raritan, NJ) y los resultados se confirmaron por un ensayo de inmunoblot recombinante de tercera generación (RIBA-HCV III, Ortho Diagnostics Systems). La presencia de anticuerpos frente de anti-VIH-1 se determinó mediante un enzimoimmunoensayo comercial (Abbot Laboratories) y los resultados se confirmaron por western-blot (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA).

4.3. Aislamiento del VBH ADN de suero

El VBH ADN sérico se aisló mediante la digestión de 200 μ l de suero durante 2 horas a 37°C, en presencia de proteinasa K (1 mg/ml) y dodecil sulfato sódico (SDS) 1%. Tras la incubación, se realizaron dos extracciones con fenol:cloroformo (1:1) y una con éter. La fase acuosa se precipitó posteriormente con acetato amónico 2M y etanol a -20°C. Por último, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 12000xg y el precipitado se resuspendió en 30 μ l de agua destilada.

4.4. Aislamiento de VBH ADN de tejido hepático

El VBH ADN de hígado se purificó según el método desarrollado por Bartolomé y col. (1990), con ligeras modificaciones. El tejido hepático se disgregó en un homogeneizador en presencia de tampón TSE 1X (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 10

mM, EDTA 2 mM). Posteriormente, las muestras se digirieron durante 2 horas a 37°C con proteinasa K (1 mg/ml) y SDS (1%). A continuación se realizaron dos extracciones con fenol:cloroformo (1:1) y una con éter, y la fase acuosa se precipitó con acetato amónico 2M y etanol a -20°C. El precipitado se resuspendió en 100 µl de agua destilada y se trató con RNasa A (0,1 µg/µl) durante 1 hora a 37°C. Después de realizar dos extracciones con fenol:cloroformo (1:1) y otra con éter, el ADN total se volvió a precipitar con acetato amónico 2M y etanol y se resuspendió en agua destilada. La concentración de ADN se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm.

4.5. Detección del VBH ADN de suero y biopsia hepática

La presencia de VBH ADN en muestras de suero y biopsia hepática se analizó mediante PCR. La PCR se realizó en un volumen final de 50 µl con 5 µl de ADN aislado de suero ó 1 µg de ADN total aislado de hígado. La mezcla de reacción estaba compuesta por Tris-HCl 10 mM pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM; mezcla de deoxinucleótidos (dNTPs) 200 µM; 0,5 unidades de Taq DNA polimerasa (Perkin Elmer, Norwalk, CT) y cebadores o "primers" B1 y BC1 de la región pre-core del VBH (Tabla 5) a una concentración final de 0,2 µM. Las muestras se incubaron 40 ciclos a 94°C durante 1,5 minutos, 55°C durante 1,5 minutos y 72°C durante 2 minutos. El fragmento amplificado de 198 pb se visualizó bajo luz ultravioleta en un gel de agarosa al 2% (Figura 9).

En cada ensayo de amplificación de ADN se incluyeron los siguientes controles negativos:

- * Mezcla de reacción de PCR sin ADN.
- * Muestras de sueros de donantes sanos sin marcadores de infección por VBH (control negativo de PCR de muestras de suero).
- * ADN total aislado de células de hepatoblastoma humano de la línea HepG2 (control negativo de PCR de biopsia hepática).

Como control positivo se utilizaron 10 fg del plásmido pGBHBV2, que tiene clonado el genoma completo del VBH.

Para evitar la contaminación de las muestras, todos los ensayos de PCR se realizaron siguiendo las medidas de Kwok e Higuchi (1989). Por último, cada muestra de suero e hígado se analizó por duplicado.

Tabla 5. Secuencia nucleotídica de los primers utilizados para la detección del VBH por PCR.

Nombre	Secuencia	Posición ^a
B1	5'-GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGCGC-3'	1776-1804
BC1	5'-GGAAAGAAGTCAGAAGGCAA-3'	1954-1974

^aSegún Galibert y col. (1979).

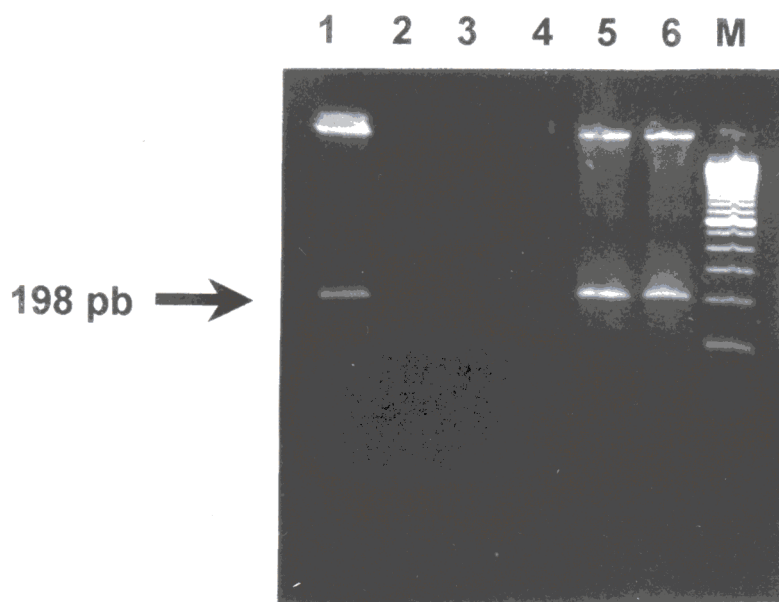


Figura 9. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio en el que se observa la banda de 198 pb correspondiente al fragmento de PCR de la región pre-core del VBH, procedente de muestras de suero. 1: control positivo, 2: control negativo (mezcla de PCR sin ADN), 3: control negativo (suero de donante sano), 4: muestra negativa, 5 y 6: muestras positivas, M: marcador de peso molecular.

4.6. Detección de las variantes del VBH de la región pre-core.

La distribución de las variantes del VBH en la región pre-core se determinó mediante la hibridación de los productos de PCR en tres experimentos simultáneos, con los oligonucleótidos WT, SM y DM, complementarios respectivamente al VBH de tipo salvaje, al mutante en la posición 1896 y al doble mutante en las posiciones 1896 y 1899 (Tabla 6). Para confirmar que la suma de las señales obtenidas con los tres oligonucleótidos era del 100%, se realizó una prueba de hibridación paralela con un cuarto oligonucleótido (C), complementario a una región altamente conservada dentro de la región pre-core del VBH, presente en todas las variantes (Tabla 6).

Tabla 6. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la detección de las variantes del VBH en la región pre-C.

Nombre	Secuencia	Posición ^a	T _m
WT	5'-TGGCTTTGGGGCATGGAC-3'	1889-1906	58 °C
SM	5'-TGGCTTT <u>A</u> GGGCATGGAC-3'	1889-1906	56 °C
DM	5'-TGGCTTT <u>A</u> GG <u>A</u> CATGGAC-3'	1889-1906	54 °C
C	5'-CAAGCCTCCAAGCTGTGC-3'	1865-1882	58 °C

^aSegún Galibert y col. (1979).

WT, tipo salvaje; SM, mutante sencillo en la posición 1896; DM, mutante doble en las posiciones 1896 y 1899; C, secuencia conservada; T_m; temperatura de fusión..

Con el fin de analizar la misma cantidad de ADN en los experimentos de hibridación con cada una de las sondas, se determinó la concentración de ADN de los productos de PCR midiendo la absorbancia a 260 nm. De este modo, se tomaron 100 ng de ADN de cada producto de PCR y se desnaturalizaron con NaOH 0,5 M durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se neutralizó la solución con una mezcla de Tris-HCl 0,5 M/NaCl 0,75 M, pH 7,0 y HCl 0,2 M/NaCl 0,8 M. Las muestras así tratadas se aplicaron mediante un aparato de filtración a vacío (Hibri-dot, Bio-Rad Laboratories) en un filtro de nitrocelulosa previamente equilibrado en tampón SSPE 6X (SSPE 1X: NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y EDTA 1 mM, pH 7,2). Por último, el ADN se fijó al filtro por calentamiento en vacío a 80°C durante 2 horas.

La prehibridación de los filtros se realizó durante 2 horas con una solución compuesta por SDS 0,5%, solución de Denhardt 5X (solución de Denhardt 1X: seroalbúmina bovina 0,02%, polivinilpirrolidona 0,02%, Ficoll 0,02%) y tampón SSPE 5X. Posteriormente, los filtros se hibridaron durante 2 horas en la misma solución de prehibridación añadiendo el oligonucleótido correspondiente marcado con [γ -³²P]-ATP en su extremo 5'-terminal mediante la enzima polinucleótido quinasa del bacteriófago T4 (Promega, Madison, WI), siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. Después de la hibridación, las membranas se lavaron durante 5 minutos con SDS 0,1%/SSPE 6X, seguido de 5 minutos con SDS 0,1%/SSPE 2X y dos veces de 5 minutos cada una con SDS 0,1%/SSPE 1X.

La temperatura empleada en la prehibridación, hibridación y lavado para cada filtro era diferente según el oligonucleótido utilizado en cada uno de ellos. Así, cada filtro fue prehibridado, hibridado y lavado a una temperatura de 5°C por debajo de la

temperatura de fusión (T_m) de la sonda empleada en cada caso. Para ello, se calculó la T_m correspondiente a cada oligonucleótido según la fórmula: $T_m = 2(A/T) + 4(G/C)$ (Farr, 1991), donde A/T representa el contenido de adenina y timina del oligonucleótido y G/C el de guanina y citosina del mismo. Por tanto, las temperaturas utilizadas fueron de 53°C para las sondas WT y C, 51°C para la sonda SM y 49°C para el oligonucleótido DM.

Después de los lavados, los filtros se expusieron en una placa de autorradiografía a -80°C durante 12-24 horas. Por último, la proporción de cada una de las variantes del VBH en la región pre-core se determinó comparando el número de cuentas por minuto (cpm) de las señales de radioactividad obtenidas en los cuatro filtros, cuantificadas por medio de un sistema radioanalítico de imagen Ambis (Ambis System Inc., San Diego, CA).

Para demostrar la especificidad del experimento de hibridación, el mismo ensayo se realizó con los plásmidos pCR-WT, pCR-SM y pCR-DM, que tenían clonado el genoma del VBH de tipo salvaje, el VBH mutante en la posición 1896 de la región pre-core y el doble mutante en las posiciones 1896 y 1899, respectivamente. Para la construcción de los plásmidos se utilizaron los productos de PCR procedentes de tres pacientes infectados con cada una de las variantes del VBH en la región pre-core, clonados en el plásmido pCRTM-2000 (TA Cloning, Invitrogen, San Diego, CA), diseñado especialmente para clonar productos de PCR. La secuencia de cada uno de los tres plásmidos se comprobó por el método de Sanger y col. (1977), utilizando el kit Sequenase 2.0 (United States Biochemical Corp., Cleveland, OH). Seguidamente, estos tres plásmidos solos o mezclados en proporciones equimoleculares y en todas

las posibles combinaciones, se amplificaron por PCR del mismo modo que las muestras de suero e hígado y se hibridaron con cada una de las sondas.

4.7. Secuenciación

Para confirmar los resultados obtenidos en los experimentos de hibridación, se secuenciaron directamente los productos de PCR de 6 muestras de suero y 20 de biopsia hepática. Primeramente, el ADN amplificado se purificó en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1,5%. Las muestras se secuenciaron mediante el método de Sanger y col. (1977), utilizando el kit Sequenase 2.0 (United States Biochemical Corp).

La comprobación de los resultados obtenidos en la estimación de las proporciones relativas de cada variante en las muestras procedentes de los pacientes estimadas mediante la técnica de hibridación, se realizó clonando los productos de PCR de 3 muestras de suero y 3 de biopsia hepática en el plásmido pCRTM-2000. Posteriormente, se secuenciaron 20 clones de cada una de las muestras y la proporción de clones de cada una de las variantes se comparó con las proporciones de las mismas de obtenida por medio de la técnica de hibridación.

5- ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico de los datos se realizó en un ordenador personal, utilizando la herramienta estadística del programa Excel 97 (Microsoft Office, Microsoft). La comparación de las proporciones se realizó mediante la prueba de Chi-cuadrado para variables continuas o la prueba exacta de Fisher para variables

discretas. Las medias de las variables que se ajustaban a una distribución normal se analizaron con la prueba t de Student.

IV- RESULTADOS

1- DESARROLLO Y ESPECIFICIDAD DE LA TECNICA DE HIBRIDACION PARA LA DETECCION DE LAS VARIANTES DEL VBH EN LA REGION PRE-CORE.

Se comprobó que los oligonucleótidos WT, SM y DM sólo hibridaban con los plásmidos pCR-WT, pCR-SM y pCR-DM, respectivamente (Figura 10). En el caso de las mezclas de plásmidos, cada sonda hibridaba únicamente con la mezcla en la que se encontraba su plásmido complementario (Figura 10). Además, la sonda C, que contenía la secuencia altamente conservada del VBH en la región pre-core, presente en todas las variantes, hibridaba con todos los plásmidos por separado y con todas las posibles mezclas (Figura 10).

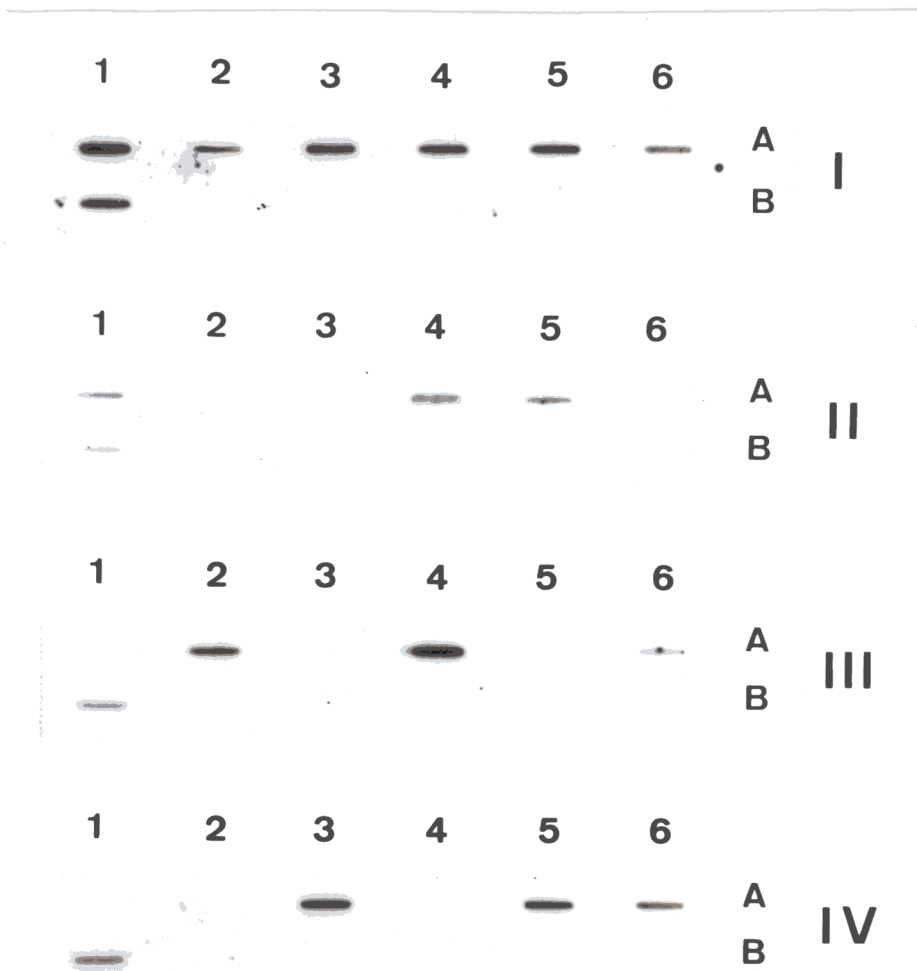


Figura 10. Hibridación de los plásmidos control de tipo salvaje (pCR-WT), mutante pre-core en la posición 1896 (pCR-SM) y doble mutante en las posiciones 1896 y 1899 (pCR-DM). Los plásmidos solos o mezclados en todas las posibles combinaciones, se hibridaron con las sondas C (I), WT (II), DM (III) y SM (IV). La posición de cada muestra es la misma en cada filtro: A1, pCR-WT; A2, pCR-DM; A3, pCR-SM; A4, pCR-WT+pCR-DM (1:1); A5, pCR-WT+pCR-SM (1:1); A6, pCR-DM+pCR-SM (1:1); B1, pCR-WT+pCR-DM+pCR-SM (1:1:1). En cada posición se aplicaron 100 ng de ADN amplificado de cada plásmido o de la mezcla correspondiente.

Cuando se compararon las señales obtenidas con cada una de las sondas y las obtenidas con la sonda C, se observó que la suma de las señales de hibridación obtenidas con cada oligonucleótido al hibridar con su plásmido complementario y con las mezclas en las que se encontraba dicho plásmido, se correspondía con la señal obtenida con la sonda C (**Figura 11**). Estos resultados demostraban que por medio de esta técnica se podía estimar la proporción relativa de cada una de las variantes del VBH en la región pre-core y que por lo tanto se podía utilizar para conocer la distribución de dichas variantes en distintas muestras obtenidas de pacientes infectados. En la **figura 12** se puede observar un ejemplo de la distribución de las variantes pre-core del VBH obtenido mediante esta técnica en muestras de suero.

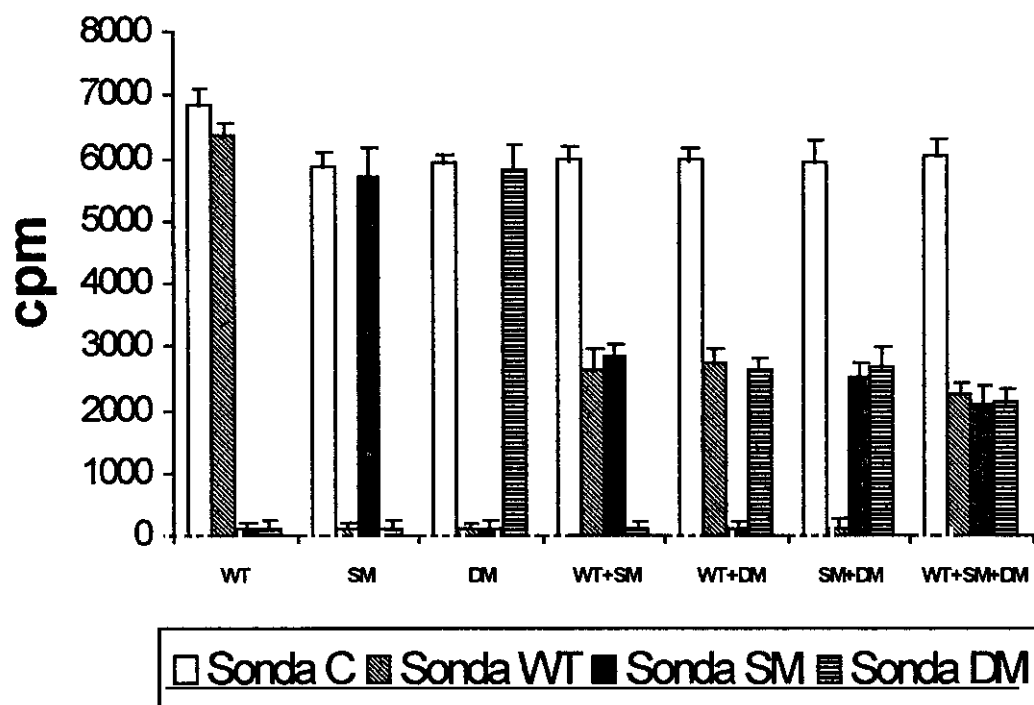


Figura 11. Señales obtenidas (cpm) en la hibridación de cada una de las sondas con los plásmidos control de cada variante del VBH en la región pre-core solos o mezclados en cantidades equimoleculares y en todas las posibles combinaciones. WT, plásmido con el VBH de tipo salvaje; SM, plásmido con el mutante en la posición 1896; DM, plásmido con el doble mutante en las posiciones 1896 y 1899. Cada uno de los valores representa la media de 3 experimentos independientes.

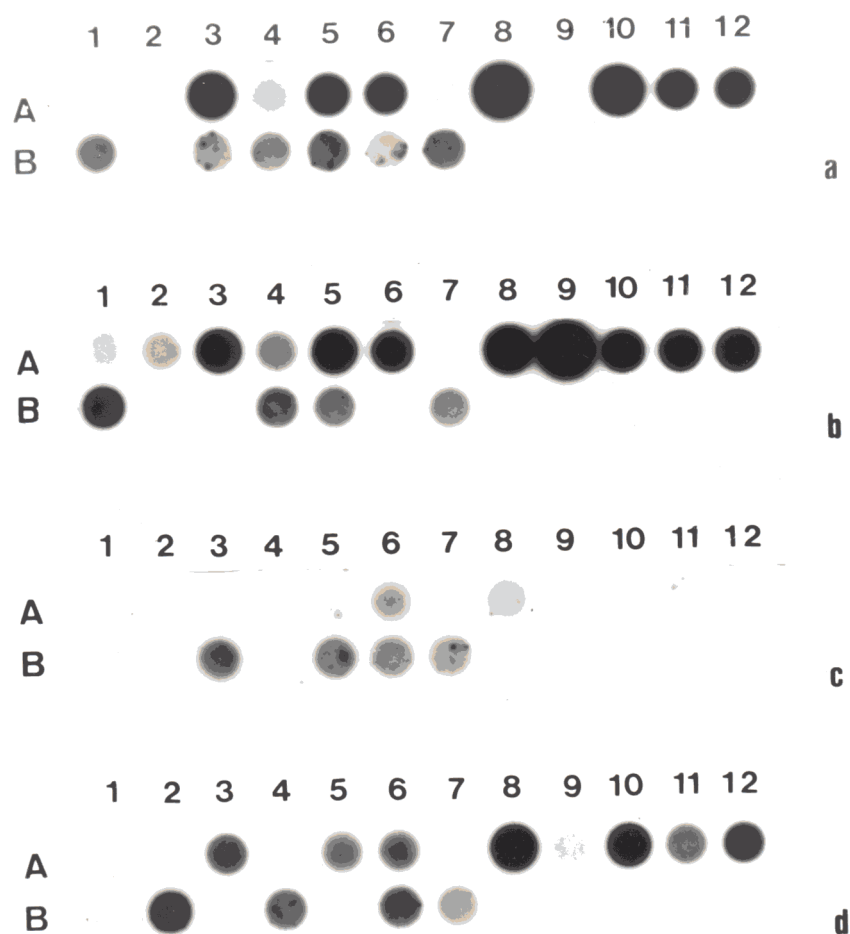


Figura 12. Hibridación de muestras de suero con las sondas C (a), WT (b), DM (c) y SM (d). A1-A6 y A8-A12, muestras de PCR positivas de suero; A7, muestra de PCR de un suero negativo; B1, pCR-WT; B2, pCR-SM; B3, pCR-DM; A4, pCR-WT+pCR-SM (1:1); A5, pCR-WT+pCR-DM (1:1); A6, pCR-SM+pCR-DM (1:1); B1, pCR-WT+pCR-SM+pCR-DM (1:1:1). La posición de las muestras es la misma en los 4 filtros.

La especificidad de la técnica en las muestras procedentes de los pacientes se comprobaron mediante la secuenciación directa de los productos de PCR procedentes de 6 muestras de suero y 20 de biopsia hepática. En todos los casos analizados los resultados obtenidos con la técnica de hibridación se confirmaron mediante la técnica de secuenciación directa (Figura 13).

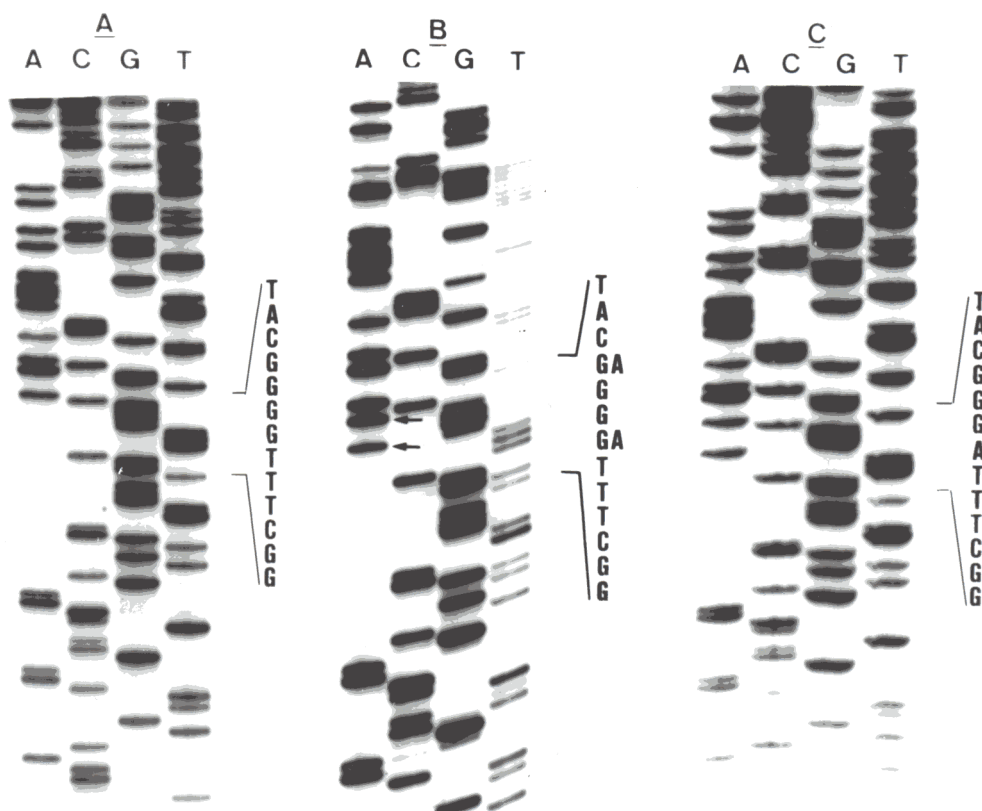


Figura 13. Secuenciación directa de los productos de PCR de la región pre-core del VBH, correspondientes a una muestra de suero y dos de hígado procedentes de 3 pacientes infectados con distintas variantes del VBH. A, VBH de tipo salvaje (GGGG) de una muestra de suero; B, mezcla de poblaciones de tipo salvaje (GGGG) y doble mutante en las posiciones 1896 y 1899 (AGGA) de una muestra de biopsia hepática; C, mutante pre-core en la posición 1896 (AGGG) procedente de una muestra de hígado.

Por último, el porcentaje de clones de cada una de las variantes en los 20 clones secuenciados de cada una de las 6 muestras (3 de suero y 3 de hígado) era similar a la proporción de cada variante determinada por medio de la técnica de hibridación (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación de la distribución de las variantes del VBH en la región pre-core obtenida por los métodos de hibridación y de secuenciación.

	HIBRIDACION			SECUENCIACION		
	WT	SM	DM	WT	SM	DM
SUERO 1	36%	64%	---	6/20 (30%)	14/20 (70%)	---
SUERO 2	55%	35%	10%	13/20 (65%)	6/20 (30%)	1/20 (5%)
SUERO 3	100%	---	---	20/20 (100%)	---	---
BIOPSIA 1	20%	80%	---	3/20 (15%)	17/20 (85%)	---
BIOPSIA 2	---	100%	---	---	20/20 (100%)	---
BIOPSIA 3	48%	47%	5%	11/20 (55%)	9/20 (45%)	---

Los resultados obtenidos con el método de secuenciación están expresados como el número de clones de cada variante con respecto a los 20 clones secuenciados en cada caso.

WT, tipo salvaje; SM, mutante sencillo en la posición 1896; DM, doble mutante en las posiciones 1896 y 1899.

2- DISTRIBUCION DE LAS VARIANTES DEL VBH EN LA REGION PRE-CORE EN SUERO Y BIOPSIA HEPATICA DE PACIENTES NO TRATADOS

En este apartado se incluyeron muestras de 49 pacientes cuyas características histológicas y epidemiológicas se resumen en la **tabla 8**. En treinta y dos pacientes se dispuso de muestras pareadas de suero y biopsia hepática, 13 tenían sólo muestra de suero, mientras que los otros 4 tenían sólo muestra de biopsia hepática.

Tabla 8. Características histológicas y epidemiológicas de los pacientes no tratados.

ALT ^a (UI/L)	<u>113 + 114</u>
Diagnóstico histológico	
CM	5
HCP	5
HCA	30
Ci	12
Epidemiología	
Post-transfusional	5
ADVP	9
Contacto intrafamiliar	8
Desconocida	30

^aExpresado como la media \pm desviación típica.

CM, cambios mínimos; HCP, hepatitis crónica persistente; HCA, hepatitis crónica activa; Ci, cirro:
ADVP, adictos a drogas por vía parenteral.

2.1. Distribución de las variantes pre-core en suero

Se estudiaron muestras de suero de 45 pacientes anti-HBe positivos sin tratar, de las cuales 36 (80%) tenían VBH ADN detectable por PCR. La mayor parte de los pacientes estaban infectados en suero por VBH de tipo salvaje y mutante pre-core, predominando el VBH de tipo salvaje (Figura 14). Por otra parte, el mutante del VBH en la región pre-core más frecuentemente observado en esos pacientes era el que presentaba la mutación simple en la posición 1896. El resto de las muestras estudiadas (10/36: 28%) estaban infectadas por una sola de las variantes del VBH en la región pre-core. La variante de tipo salvaje fue detectada en el suero de 6 pacientes (16%), el mutante en la posición 1896 fue detectado en 3 casos (8%), mientras que el doble mutante en las posiciones 1896 y 1899 sólo se detectó en un paciente (3%) (Figura 14). En ningún caso se detectó la presencia de inmunocomplejos AgHBe/anti-HBe en suero.

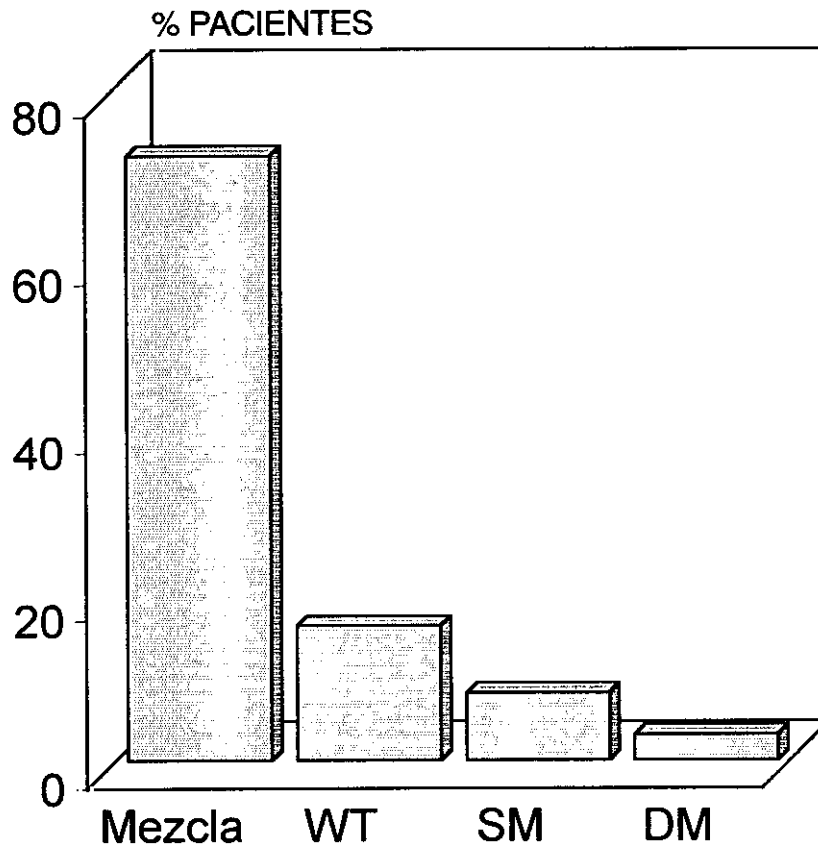


Figura 14. Distribución de las variantes de tipo salvaje y mutantes del VBH en la región pre-core en muestras de suero de pacientes anti-HBe positivos no tratados. WT, tipo salvaje; SM, mutante en la posición 1896; DM, doble mutante en las posiciones 1896 y 1899.

2.2. Distribución de las variantes pre-core en biopsia hepática

En cuanto a las 36 muestras de biopsia hepática analizadas, el VBH ADN fue detectado en 33 de ellas (92%). Como en el caso de las muestras de suero, la mayoría de los pacientes estaban infectados por una mezcla de las variantes de tipo salvaje y mutante en el hígado (23/33: 70%), predominando el VBH de tipo salvaje (Figura 15). El resto de las muestras de tejido hepático (10/33: 30%), estaban infectadas por una sola de las variantes del VBH: en 8 casos (24%) sólo se detectó la variante de tipo salvaje, mientras que en las otras 2 muestras (6%) la única variante detectada era el mutante en la posición 1896 de la región pre-core (Figura 15). En ningún caso se encontraron muestras de biopsia hepática infectadas con el doble mutante en las posiciones 1896 y 1899 de la región pre-core.

Puesto que la incidencia del doble mutante del VBH en la región pre-core era muy baja en todos los casos analizados, el análisis para la detección de esta variante no se realizó en las muestras de los demás pacientes incluidos en el estudio. Por ese motivo, en lo sucesivo cada vez que en la presente Tesis Doctoral se haga mención del genotipo mutante del VBH en la región pre-core, se hará referencia al mutante sencillo en la posición 1896, salvo que se indique expresamente que se hace referencia al doble mutante.

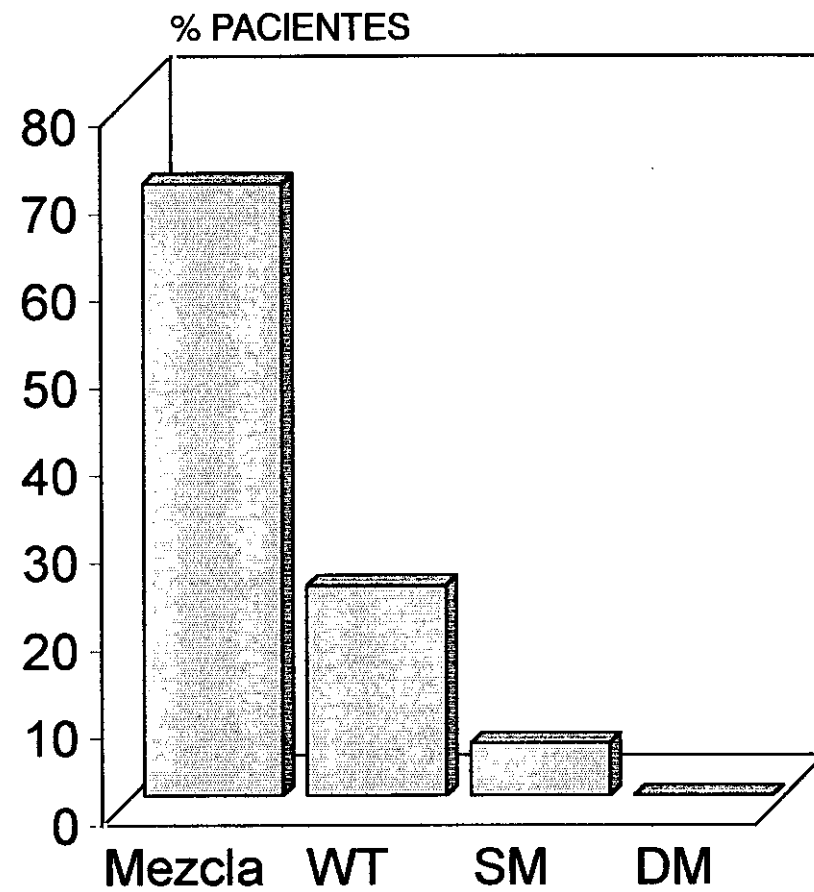


Figura 15. Distribución de las variantes de tipo salvaje y mutantes del VBH en la región pre-core en muestras de biopsia hepática de pacientes anti-HBe positivos no tratados. WT, tipo salvaje; SM, mutante en la posición 1896; DM, doble mutante en las posiciones 1896 y 1899.

2.3. Concordancia entre suero e hígado de la distribución de las variantes pre-core

En relación a los pacientes de los que se disponían muestras pareadas de suero y biopsia hepática, el VBH ADN fue detectado simultáneamente en ambas muestras en 25 de 32 casos (78%). En la **tabla 9** se muestra la distribución de las variantes pre-core en las muestras analizadas. En la mayoría de ellos (17/25: 68%) existía una concordancia total de la distribución de las variantes del VBH entre suero y tejido hepático (**Figura 16**). Por tanto, en esos pacientes las variantes detectadas en suero estaban también presentes en hígado. En cambio, en otros 5 pacientes (20%) no todos los genotipos del VBH detectados en hígado eran detectados a su vez en el suero, mientras que en otros 3 pacientes (12%) algunas de las variantes del VBH en suero no estaban presentes en el hígado (**Figura 16**).

En cuanto a la proporción relativa de cada una de las variantes del VBH en muestras de suero e hígado de un mismo paciente, en 18 de 25 casos (72%) se observó una concordancia total (**Figura 16**). Es decir, en estos casos las proporciones de cada variante eran semejantes tanto en suero como en tejido hepático (**Figura 16**).

Tabla 9. Proporción de VBH de tipo salvaje y mutante en pacientes con muestras de suero y biopsia hepática.

PACIENTE	SUERO			HIGADO		
	WT	SM	DM	WT	SM	DM
1	36%	64%	--	20%	80%	--
2	10%	85%	5%	29%	45%	26%
3	73%	27%	--	85%	11%	4%
4	55%	35%	10%	88%	12%	--
5	78%	22%	--	79%	21%	--
6	--	100%	--	--	100%	--
7	100%	--	--	51%	--	49%
8	--	--	100%	64%	--	36%
9	61%	22%	17%	76%	16%	6%
10	87%	11%	2%	81%	17%	2%
11	32%	60%	8%	48%	47%	5%
12	55%	37%	8%	80%	18%	2%
13	100%	--	--	100%	--	--
14	63%	34%	--	79%	21%	--
15	55%	45%	--	83%	17%	--
16	61%	39%	--	80%	20%	--
17	57%	36%	7%	100%	--	--
18	67%	33%	--	63%	37%	--
19	100%	--	--	100%	--	--
20	--	--	--	100%	--	--
21	--	--	--	56%	44%	--
22	26%	61%	13%	45%	40%	15%
23	--	--	--	77%	23%	--
24	--	--	--	--	--	--
25	42%	58%	--	8%	77%	5%
26	--	--	--	100%	--	--
27	100%	--	--	100%	--	--
28	100%	--	--	100%	--	--
29	--	--	--	100%	--	--
30	68%	32%	--	--	--	--
31	52%	48%	--	47%	47%	6%
32	16%	78%	6%	--	--	100%

WT, tipo salvaje; SM, mutante en la posición 1896; DM, doble mutante en las posiciones 1896 y 1899.

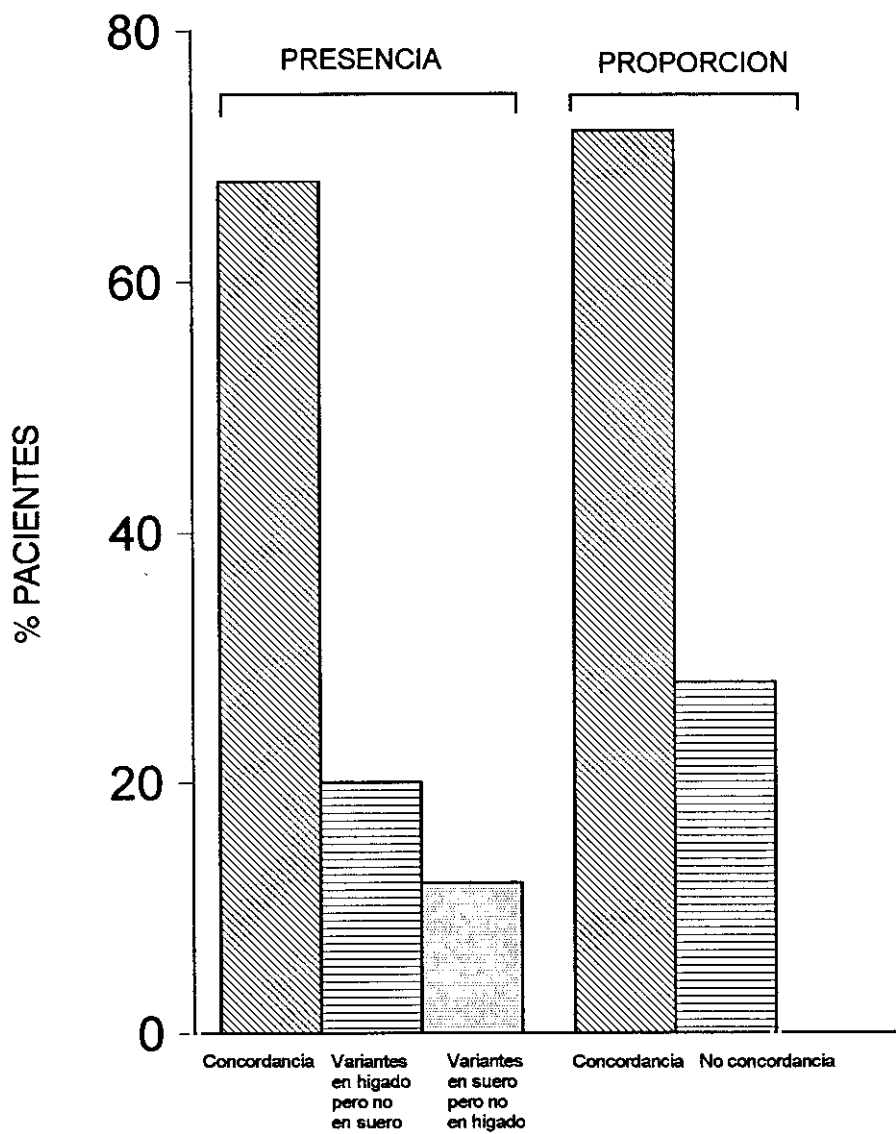


Figura 16. Concordancia en la distribución de las variantes del VBH en la región pre-core en muestras pareadas de suero y biopsia hepática de pacientes anti-HBe positivos no tratados.

3- DISTRIBUCION DE LAS VARIANTES DEL VBH EN LA REGION PRE-CORE EN PACIENTES ASINTOMATICOS

Se estudió la distribución de las variantes del VBH en la región pre-core en muestras de suero de 29 pacientes asintomáticos, cuyas características histológicas se exponen en la tabla 10. En cada paciente se estudiaron 2 muestras de suero correspondientes al inicio y al final del tratamiento respectivamente. En 15 pacientes (9 tratados y 6 controles) fue posible obtener una segunda biopsia hepática tomada en un tiempo de 7 a 14 meses después de finalizar la terapia (media \pm desviación típica: $11,3 \pm 2,6$ meses en el grupo A1 y $9,2 \pm 4,1$ meses en el grupo A2).

Tabla 10. Características histológicas basales de los pacientes asintomáticos.

	Grupo A1 (n=14)	Grupo A2 (n=15)
ALT ^a (UI/L)	$31,6 \pm 13,0$	$25,7 \pm 7,8$
Diagnóstico histológico		
CM	6	8
HCP	8	6
HCA	---	1
Indice de actividad histológica ^a	$2,5 \pm 0,9$	$3,2 \pm 1,1$

^aExpresado como la media \pm desviación típica.

CM, cambios mínimos; HCP, hepatitis crónica persistente; HCA, hepatitis crónica activa.

En la muestra basal, la mayor parte del total de los pacientes incluidos estaban infectados por la mezcla de tipo salvaje y mutante pre-core (14/29: 48%) (Figura 17). Sin embargo, el porcentaje de pacientes infectados por la mezcla era mayor en los pacientes del grupo A1 que en el grupo A2 (Figura 17), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En 10 de 29 pacientes de ambos grupos (34%) sólo se detectó la variante del VBH de tipo salvaje, siendo el porcentaje mayor aunque no significativo en el grupo A2 que en el A1 (Figura 17). En el resto de los pacientes (1 del grupo A1 y 4 del grupo A2), no había suficiente muestra de suero para el genotipado.

En cuanto a la distribución de las variantes del VBH en la región pre-core al final del tratamiento, no se encontraron cambios sustanciales entre las muestras basales y finales de los pacientes de ambos grupos.

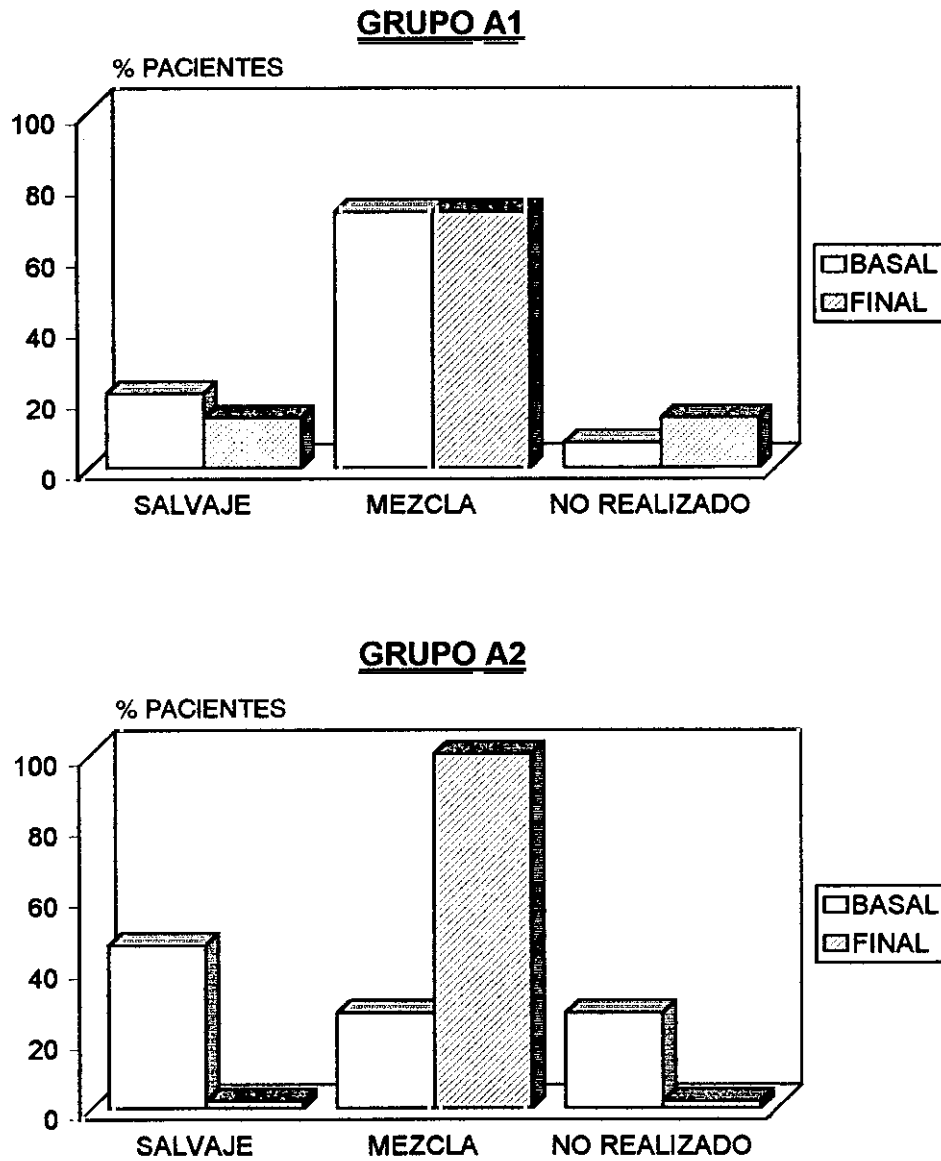


Figura 17. Distribución de las variantes del VBH en la región pre-core en pacientes asintomáticos. Grupo A1: pacientes tratados con interferón; grupo A2: pacientes control no tratados. En 7 pacientes (3 del grupo A1 y 4 del grupo A2) no se dispuso de muestra suficiente para realizar el estudio.

Por último, se comparó la distribución de las variantes del VBH observada en las muestras basales de los pacientes asintomáticos con la obtenida en el suero de los pacientes sintomáticos incluidos en el apartado anterior. Como se puede apreciar en la **figura 18**, la mayor parte de los pacientes tanto sintomáticos como asintomáticos, estaban infectados por la mezcla de tipo salvaje y mutante, siendo superior la proporción de pacientes con mezcla en el caso de los pacientes sintomáticos. Con respecto a los pacientes infectados por una sola de las variantes pre-core del VBH, el tipo salvaje se detectó con mayor frecuencia en el grupo de los pacientes asintomáticos, mientras que el mutante sólo se detectó únicamente en el grupo de pacientes sintomáticos. Sin embargo, las diferencias encontradas en ambos grupos no fueron estadísticamente significativas en ningún caso.

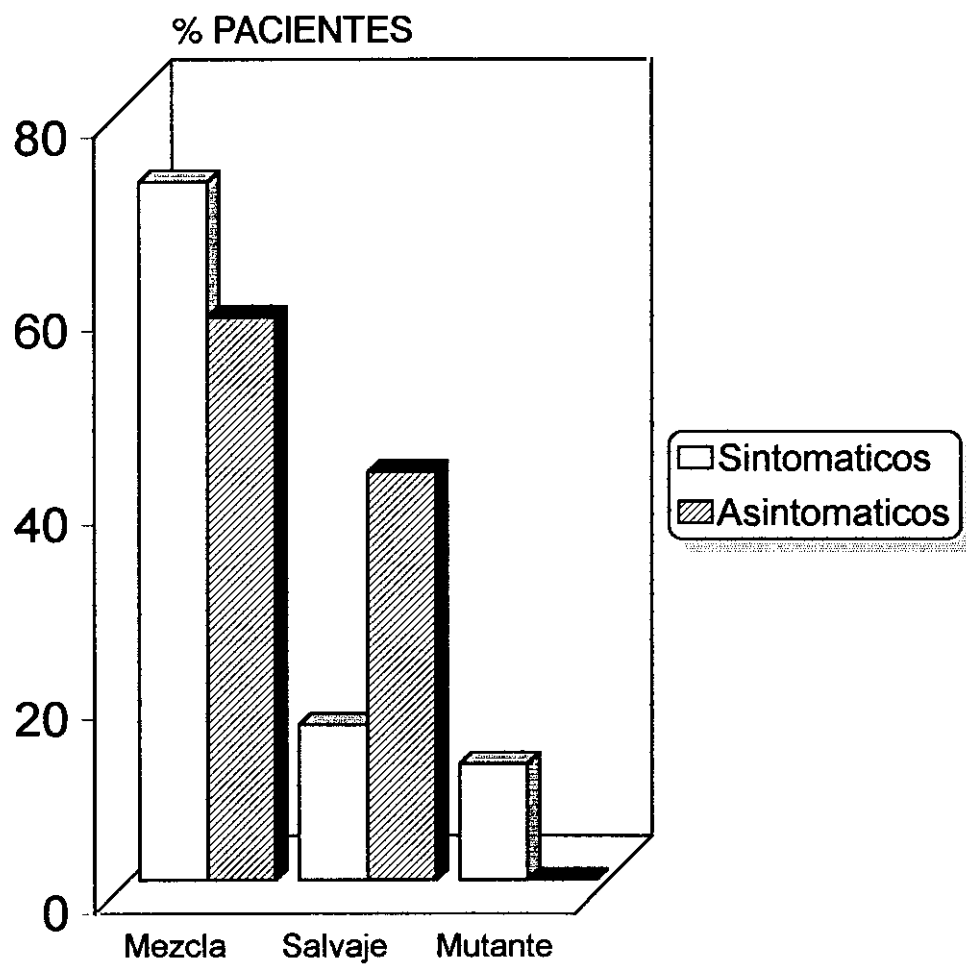


Figura 18. Distribución de las variantes de tipo salvaje y mutante del VBH en la región pre-core en pacientes sintomáticos y asintomáticos.

4- DISTRIBUCION DE LAS VARIANTES DEL VBH EN LA REGION PRE-CORE EN PACIENTES TRATADOS INTERFERON

En este apartado se incluyeron 38 pacientes tratados con interferón durante 6 (Grupo S1) ó 12 meses (Grupo S2), cuyas características histológicas y epidemiológicas se resumen en la **tabla 11**. En estos pacientes se estudiaron muestras de suero correspondientes al inicio y final del tratamiento, así como una muestra correspondiente a los 12 meses de seguimiento.

Tabla 11. Características histológicas y epidemiológicas basales de los pacientes tratados con interferón.

	Grupo S1 (n=19)	Grupo S2 (n=19)
ALT ^a (UI/L)	146,1 ± 150,7	112,9 ± 89,5
Diagnóstico histológico		
CM	2	—
HCP	1	5
HCA	16	14
Epidemiología		
Parenteral	7	6
Intrafamiliar	2	4
Desconocida	10	9

^aExpresado como la media ± desviación típica.

CM, cambios mínimos; HCP, hepatitis crónica persistente; HCA, hepatitis crónica activa.

La distribución de los genotipos del VBH en ambos grupos se expone en la tabla 12. Como se puede observar, la mayor parte de los pacientes de los dos grupos estaban infectados básicamente por la mezcla de variantes del VBH de tipo salvaje y mutante pre-core, predominando el primero de ellos en todos los pacientes. En los pacientes infectados con un solo genotipo, la variante detectada correspondía al tipo salvaje en todos los pacientes salvo en uno del grupo S1. Esta distribución obtenida en la muestra basal se mantuvo con ligeros cambios tanto al final del tratamiento como al final del seguimiento.

Tabla 12. Distribución de las variantes pre-core del VBH, negativización del VBH DNA y normalización de ALT en pacientes tratados con interferón.

	Grupo S1 (n=19)			Grupo S2 (n=19)		
	Basal	Final	Seguimiento	Basal	Final	Seguimiento
Mezcla	63%	74%	74%	69%	69%	69%
WT	31%	26%	26%	31%	31%	31%
M	6%	--	--	--	--	--
VBH DNA negativos	0	21%	10%	0	26%	26%
ALT normales	0	53%	47%	0	26%	42%

WT: tipo salvaje, M: mutante pre-C

Con respecto a la relación entre la distribución de las variantes del VBH y la respuesta al tratamiento, se observó que la proporción de pacientes infectados básicamente por la mezcla de VBH de tipo salvaje y mutante pre-core era mayor en los pacientes no respondedores que en los respondedores (pacientes que normalizaron los niveles de ALT al final del tratamiento), si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 19). Por otra parte, la proporción de pacientes infectados sólo por tipo salvaje o mutante pre-core en la muestra basal, fue similar en los pacientes respondedores y en los no respondedores (Figura 19).

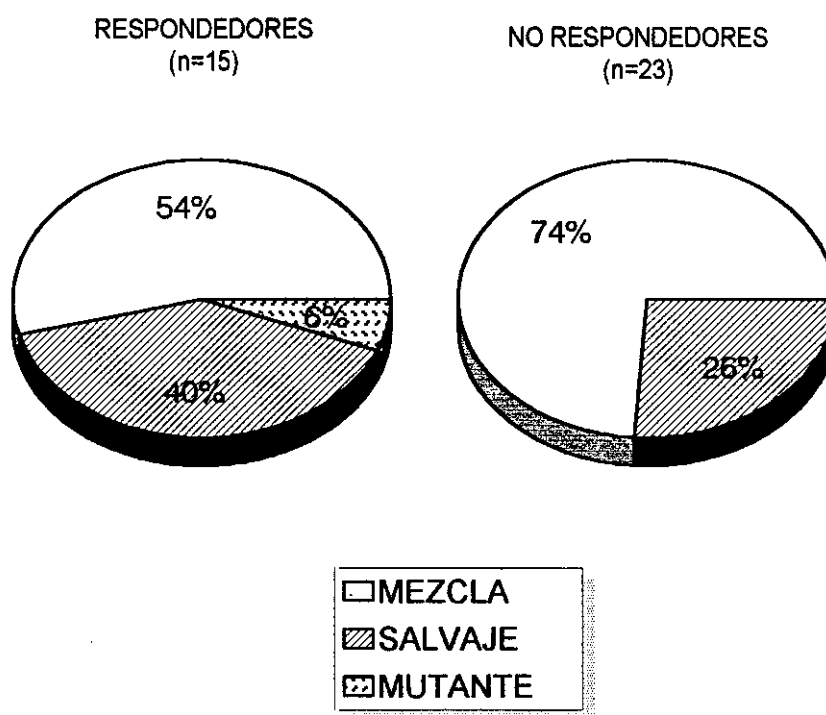


Figura 19. Proporción basal de VBH de tipo salvaje y mutante pre-core en pacientes respondedores y no respondedores a la terapia con interferón.

5- DISTRIBUCION DE LAS VARIANTES DEL VBH EN LA REGION PRE-CORE EN PACIENTES TRATADOS CON PREDNISONA E INTERFERON

Se estudiaron muestras de suero de 9 pacientes que habían sido tratados con la combinación de prednisona e interferón. Las características histológicas y epidemiológicas de los mismos se recogen en la **tabla 13**. En estos pacientes se estudiaron muestras de suero correspondientes al inicio y al final del tratamiento con prednisona y al final del tratamiento con IFN (excepto en uno de ellos del que no se pudo disponer de muestra de suero al final del tratamiento con IFN).

Tabla 13. Características histológicas y epidemiológicas basales de los pacientes tratados con prednisona e interferón.

ALT ^a (U/L)		116,7 ± 61,0
Diagnóstico histológico		
	CM	5
	HCP	2
	HCA	1
	Ci	1
Epidemiología		
	Parenteral	2
	Intrafamiliar	2
	ADVP	3
	Desconocida	2

^aExpresado como la media ± desviación típica.

CM, cambios mínimos; HCP, hepatitis crónica persistente; HCA, hepatitis crónica activa; Ci, c
ADVP, adictos a drogas por vía parenteral.

En los pacientes incluidos en este estudio, el VBH ADN fue detectado en la muestra basal de 8/9 (89%) de los mismos y en todos los casos también se detectó en las dos muestras tomadas al final del tratamiento con prednisona y con interferón respectivamente. El análisis de la distribución de las variantes del VBH en la región pre-core en la muestra basal, al final del tratamiento con prednisona y al final del tratamiento con interferón, puso de manifiesto que la mayoría de los pacientes estudiados estaban infectados por una mezcla de VBH de tipo salvaje y mutante pre-core (Tabla 14). En la mayor parte de estos pacientes en los que se detectó la mezcla de variantes de la región pre-core, la variante que predominaba era la de tipo salvaje. Por el contrario, en un pequeño porcentaje de pacientes se detectó una sola variante del VBH, que resultó ser en todos los casos la variante de tipo salvaje (Tabla 14).

Al final del tratamiento con prednisona, la proporción del VBH de tipo mutante decreció ligeramente en 4 pacientes, mientras que aumentó en otros 3 casos, aunque las diferencias no fueron en ningún caso estadísticamente significativas (Tabla 14). En el otro paciente no se observó ningún cambio en la distribución de las variantes entre la muestra basal y la tomada al final del tratamiento con prednisona. Sin embargo, después del tratamiento con interferón el porcentaje del mutante pre-core se incrementó con respecto al tipo salvaje en tres pacientes (Tabla 14). En estos tres casos no se observó normalización en el nivel de ALT. Por otro lado, en otros dos pacientes, la proporción del mutante disminuyó ligeramente con respecto al tipo salvaje, normalizándose a su vez los niveles de ALT. En los otros pacientes no se observó ningún cambio en la proporción relativa de las variantes del VBH en la región pre-core.

Tabla 14. Distribución de las variantes del VBH en la región pre-core en los pacientes tratados con prednisona e interferón.

Paciente	BASAL			FINAL PREDNISONA			FINAL INTERFERON		
	ALT	WT (%)	M (%)	ALT	WT (%)	M (%)	ALT	WT (%)	M (%)
1	104	58	41	158	79	20	252	46	53
2	61	100	0	46	100	0	110	87	8
3	137	57	42	159	68	31	82	61	38
4	100	77	22	167	71	28	27	78	22
5	146	34	65	160	45	54	166	42	57
6	274	96	3	214	94	5	N.D.	N.D.	N.D.
7	67	88	11	46	100	0	26	100	0
8	76	--	--	57	42	57	15	58	41
9	85	86	13	92	81	18	65	63	36

ALT expresadas en UI/L.

WT: tipo salvaje, M: mutante pre-C.

N.D.: muestra no disponible.

V- DISCUSION

Durante las primeras fases de la infección crónica por VBH, se producen altos niveles de replicación del virus con AgHBe y VBH ADN detectables en el suero de los pacientes, los cuales generalmente presentan una lesión hepática progresiva. Posteriormente, de forma espontánea (Realdi y col., 1980; Hoofnagle y col., 1981) o después de terapia antivírica (Hoofnagle y col., 1988; Carreño y col., 1994), se produce seroconversión a anti-HBe con pérdida de los marcadores de replicación séricos, normalización de los niveles de transaminasas y mejora en la histología hepática.

Frecuentemente, la seroconversión de AgHBe positivo a anti-HBe positivo está acompañada por la aparición en el suero de los pacientes infectados de una variante del VBH con mutaciones en la región pre-core (Fiordalisi y col., 1990). La variante que aparece con más frecuencia presenta una mutación de G a A en la posición 1896 de la región pre-core, con la que se genera un codón de terminación que impide la síntesis del AgHBe (Carman y col., 1989; Bhat y col., 1989; Brunetto y col., 1989; Brunetto y col., 1990; Raimondo y col., 1990). En muchas ocasiones, esta variante aparece asociada con otra que presenta una transición adicional de G a A en la posición 1899 de la región pre-core (Carman y col., 1989; Bhat y col., 1989; Brunetto y col., 1989; Brunetto y col., 1990; Fiordalisi y col., 1990; Raimondo y col., 1990, Tong y col., 1990; Tong y col., 1991). Generalmente, estas variantes coexisten en el suero de los pacientes junto con el VBH de tipo salvaje.

Este mutante se aisló por primera vez en pacientes con hepatitis fulminante (Brunetto y col., 1989; Brunetto y col., 1990; Carman y col., 1991). Estos resultados sugerían que la presencia del mutante podría estar relacionada con una mayor

agresividad de la infección por el VBH. Por otro lado, diversos autores encontraron que existía una relación directa entre la falta de respuesta al tratamiento y la presencia del mutante del VBH en la región pre-core, de modo que los pacientes infectados por éste respondían peor al tratamiento que aquellos infectados por el tipo salvaje (Hadziyannis y col., 1990; Fattovich y col., 1992; Pastore y col., 1992; Xu y col., 1992; Brunetto y col., 1993; Fattovich y col., 1995). Por estas razones parece importante detectar la presencia de estos mutantes del VBH en los portadores crónicos del virus tanto para poder predecir la agresividad de su infección como para decidir la opción terapéutica a aplicar en ellos. Sin embargo, en estos primeros trabajos la detección de los mutantes se realizaba mediante la secuenciación de los productos de PCR, lo que hacía inviable su utilización en la rutina diagnóstica. Por tanto, sería necesario el desarrollo de una técnica de detección rápida, que permitiera el procesamiento simultáneo de un gran número de muestras, ya que mediante las técnicas convencionales de secuenciación sólo se pueden analizar simultáneamente un número muy limitado de muestras.

En este trabajo se describe un método rápido para la detección y la cuantificación del VBH de tipo salvaje y de las variantes en la región pre-core con una mutación en la posición 1896 y doble mutación en las posiciones 1896 y 1899, basado en la hibridación con oligonucleótidos específicos para cada una de ellas. Dicho método se ha aplicado para la detección y cuantificación en suero y en biopsia hepática de las variantes del VBH anteriormente descritas así como para el estudio de la influencia de éstas sobre el tratamiento con interferón.

En primer lugar, para comprobar si esta técnica era específica para cada una

de las variantes del VBH en la región pre-core y si además se podía utilizar para la detección de cada una de ellas en el caso en el que hubiese mezcla de las mismas, se realizaron ensayos con plásmidos que tenían clonada cada una de las variantes pre-core solos o mezclados en todas las combinaciones posibles. En todos los casos se observó que únicamente se detectaba la variante o variantes esperadas tanto en el caso de cada plásmido correspondiente por separado como en los casos de las mezclas de plásmidos, lo que ponía de manifiesto la especificidad de la técnica.

En estos mismos experimentos se trató de comprobar si esta técnica se podía utilizar para estimar la proporción relativa de cada una de las variantes en el caso de que hubiera mezcla de las mismas. Como control en estos ensayos se utilizó otra sonda complementaria a una región con una secuencia conservada en todas las variantes, incluida dentro de la zona estudiada, con la cual teóricamente debían hibridar todas ellas. Cuando se cuantificaron las señales de hibridación obtenidas con esta sonda en las mezclas de los plásmidos de cada variante, se comprobó que coincidían con la suma de las señales que se obtenían con las sondas específicas para cada variante, lo que indicaba que la técnica servía efectivamente para estimar la proporción de cada variante en las mezclas. Posteriormente, se utilizó dicha técnica para la detección de las variantes del VBH en la región pre-core en muestras de suero e hígado procedentes de pacientes. Para comprobar los resultados obtenidos con esta técnica, se secuenciaron directamente los productos de PCR de 6 muestras de suero y 20 de biopsia hepática. En todos los casos, los resultados obtenidos mediante la hibridación coincidían con los obtenidos por secuenciación directa, demostrando la especificidad de la técnica, es decir, que cuando mediante hibridación

se detectaba la presencia de cada variante o la mezcla de ellas, la secuenciación confirmaba estos resultados.

Por último, se clonaron los productos de PCR de 6 muestras (3 de suero y 3 de hígado) y se secuenciaron 20 clones de cada una de ellas para comprobar si la proporción de clones de cada variante reflejaba la proporción de cada una de las variantes estimada mediante hibridación. Se observó que en todos los casos las proporciones obtenidas con los dos métodos eran semejantes, demostrando que la técnica servía para estimar la proporción de cada variante en suero y en hígado. Todos estos resultados demostraron la aplicabilidad de esta técnica para la detección y estimación de las cantidades relativas de estas variantes en muestras procedentes de pacientes infectados con el VBH, con la ventaja de que permite el análisis de un gran número de muestras en cada experimento.

Los primeros trabajos publicados acerca de la detección de los mutantes del VBH en la región pre-core se realizaron en suero de pacientes infectados, existiendo pocos datos acerca de la presencia de estas variantes en el hígado de estos pacientes. En 1992, Ackrill y col. describieron por primera vez la presencia de estos mutantes en hígado, aunque en su trabajo no determinaron la proporción de cada una de las variantes tanto en suero como en biopsia hepática, de modo que no se conocía si los resultados obtenidos en suero reflejaban la situación real de los mutantes en el hígado. Por este motivo, en una primera fase del presente trabajo se aplicó la técnica de hibridación descrita sobre muestras de suero y biopsia hepática de pacientes infectados crónicamente por VBH, para determinar si la distribución del tipo salvaje y de los mutantes era similar en ambos compartimentos. Los resultados

demonstraron que la mayoría de los pacientes anti-HBe positivos estaban infectados por una mezcla de población de VBH, compuesta por variantes de tipo salvaje y mutante en la región pre-core, tanto en suero como en biopsia hepática, predominando la variante de tipo salvaje. En cuanto a los mutantes pre-core, la variante con la mutación en la posición 1896 se detectó con mucha más frecuencia que el doble mutante en las posiciones 1896 y 1899. En cambio, en los pacientes anti-HBe positivos analizados por otros autores, predominaba el genoma del VBH de tipo mutante sobre el tipo salvaje (Carman y col., 1989; Naoumov y col., 1991). Existen varias razones que podrían explicar esta discrepancia. En primer lugar, la localización geográfica podría influir en la distribución de las variantes del VBH en la región pre-core, de modo que la proporción relativa del VBH de tipo salvaje con respecto al mutante podría ser diferente en distintos países (Brown y col., 1992). Por otra parte, las diferencias podrían ser debidas a las distintas técnicas utilizadas para la detección de las variantes: hibridación molecular frente a secuenciación directa de los productos de PCR (Carman y col., 1989) y secuenciación en fase sólida (Brunetto y col., 1994; Goergen y col., 1994; Hawkins y col., 1994).

En el 68% de los pacientes anti-HBe positivos analizados en este trabajo existía una concordancia total de la distribución de las variantes del VBH en la región pre-core entre suero e hígado, es decir, todas las variantes presentes en hígado se detectaban también en suero. En el 20% de los pacientes, algunos de los genotipos detectados en hígado no fueron detectados en suero, aunque teóricamente las variantes del VBH circulantes en el suero deberían ser un reflejo de las variantes del VBH que infectan el hígado. Una posible explicación de esta discrepancia podría ser

que los genomas de las variantes detectadas en hígado pero no en suero se replicaran con menor eficiencia y por lo tanto la proporción de las mismas en suero podría estar por debajo de los límites de detección de la técnica. Otra explicación sería que los distintos tipos de VBH tengan la misma capacidad de replicación pero que existan variantes que no se encapsiden en la nucleocápside vírica y que por tanto sólo sean detectables en hígado pero no en suero. En este sentido, se ha comprobado que la mutación en la posición 1896 se encuentra dentro de la secuencia del ARN pregenómico que forma la señal de encapsidación y por tanto para que la estructura secundaria de esta región sea correcta se necesita otra mutación compensatoria en la posición 1858 para mantener el apareamiento de bases necesario para formar la estructura secundaria de dicha señal (Tong y col., 1993; Lok y col., 1994; Lindh y col., 1995). La ausencia de esta mutación compensatoria podría explicar los casos en los que los mutantes aparecen en suero pero no en hígado.

Por otra parte, en un 28% de los pacientes estudiados, la proporción relativa de cada variante era diferente en suero e hígado. Incluso en el 12% de los pacientes, algunos de los genotipos presentes en el suero no fueron detectados en tejido hepático. Una explicación a este fenómeno podría ser que las variantes detectadas en suero pero no en hígado provinieran de la replicación del VBH en tejidos extrahepáticos. Así, se ha demostrado recientemente que el VBH es capaz de replicarse en células mononucleares de sangre periférica (Stoll-Becker y col., 1997). Por tanto, esta discrepancia se podría explicar por la liberación de partículas virales por parte de estas células al torrente circulatorio, que tendría como consecuencia que la proporción relativa de las variantes del VBH fuera distinta en suero e hígado. Por

último, la diferencia en las proporciones de cada variante en suero e hígado podría ser debida a un error de muestreo al tomar la biopsia hepática. Puesto que la biopsia hepática representa una porción muy pequeña con respecto al órgano completo y se ha demostrado que los hepatocitos infectados por el VBH no se distribuyen de manera uniforme en el hígado (Burrell y col., 1982), los hepatocitos tomados en la biopsia podrían estar infectados por una población de VBH en los que las variantes estarían en proporciones distintas a las observadas en la muestra de suero.

Puesto que la mayoría de pacientes analizados estaban infectados tanto por VBH de tipo salvaje como mutante, en teoría debería poderse detectar AgHBe en el suero de los mismos. Sin embargo, todos ellos eran anti-HBe positivos y en ninguno de ellos se pudo detectar AgHBe sérico. Una explicación podría ser que el AgHBe sintetizado en estos pacientes estuviera unido a su anticuerpo correspondiente formando inmuno-complejos AgHBe/anti-HBe, que enmascararían el antígeno. Aunque la presencia de inmuno-complejos circulantes ha sido descrita en pacientes anti-HBe positivos (Castillo y col., 1990), no se detectaron en los pacientes incluidos en este estudio. Hay que tener en cuenta que los pacientes analizados en el estudio de Castillo y col., (1990) tenían niveles altos de VBH ADN en suero, detectables por medio de técnicas de hibridación de ácidos nucleicos, a diferencia de los pacientes incluidos en este trabajo ya que el VBH ADN sérico era detectable únicamente por PCR. Por tanto, el nivel de proteínas víricas, y entre ellas del AgHBe en estos pacientes, podría ser muy bajo e inferior al límite de detección de las técnicas utilizadas para la determinación del AgHBe.

Otro de los objetivos de este estudio fue determinar si los mutantes pre-core

del VBH presentaban una mayor patogenicidad que el tipo salvaje. Así, en trabajos previos se había sugerido que la aparición de los mutantes pre-core se asociaban con el desarrollo de hepatitis fulminante (Yoshida y col., 1992; Uchida y col., 1993; Laskus y col., 1993; Liang y col., 1994), aunque otros autores no habían encontrado esta asociación, detectando los mutantes pre-core en pacientes con histología hepática normal (Tur-Kaspa y col., 1992). Sin embargo, en estos trabajos sólo estudian la presencia o ausencia del mutante y lo que puede que influya es la proporción en que se encuentra. Existen una serie de pacientes con infección crónica por el VBH denominados portadores sanos o asintomáticos, que presentan anti-HBe en suero y niveles normales de ALT y que sin embargo están infectados por el VBH, como demuestra el que tengan AgHBs y VBH ADN detectables en suero (De Franchis y col., 1980). En el presente trabajo se estudió la distribución de las variantes del VBH en la región pre-core en este tipo de pacientes. Se observó que aproximadamente la mitad de los pacientes incluidos presentaban la variante mutante junto con la de tipo salvaje. Este resultado confirma el obtenido por otros autores que describen la presencia de la variante mutante del VBH en la región pre-core en pacientes asintomáticos (Nakahori y col., 1995). La presencia del mutante en pacientes asintomáticos, con niveles de ALT e histología hepática normales, sugiere que este mutante no siempre está asociada con una mayor agresividad de la infección. Esta hipótesis confirma los resultados de Tur-Kaspa y col. (1992) que como se ha comentado anteriormente, demostraron la presencia del mutante pre-core en pacientes con histología hepática normal, lo cual confirma que la presencia de esta variante no siempre está relacionada con un agravamiento de la enfermedad.

Tampoco se conoce con detalle como influye la presencia del mutante en la respuesta al tratamiento. En cuanto al efecto de la distribución de las variantes pre-core sobre la respuesta al tratamiento con interferón, se estudiaron dos grupos de pacientes sometidos a terapia con interferón con dos pautas distintas y durante tiempos diferentes (6 ó 12 meses). Al igual que en los grupos anteriores, la mayoría de los pacientes estaban infectados basalmente por la mezcla de tipo salvaje y mutante, siendo la variante de tipo salvaje la predominante en la mayor parte de los casos. Para comprobar la influencia de las variantes del VBH sobre la respuesta al tratamiento con interferón, se comparó la distribución basal de las variantes pre-core en pacientes que resapondieron a la terapia (normalizaron los niveles de ALT al final del tratamiento) frente a los que no lo hicieron (continuaron con niveles alterados de ALT al finalizar el tratamiento). Se observó que la mayor parte de los pacientes con respuesta estaban infectados por la mezcla de tipo salvaje y mutante, predominando el primero de ellos, aunque las diferencias con los que no respondieron no eran estadísticamente significativas. Esto sugiere que la presencia del VBH mutante en la región pre-core no condiciona la respuesta al interferón. Este resultado está en discrepancia con los obtenidos por Hadziyannis y col., 1990; Fattovich y col., 1992; Pastore y col., 1992; Xu y col., 1992; Brunetto y col., 1993 y Fattovich y col., 1995, que observan que el porcentaje de repuesta al interferón es mucho menor en los pacientes infectados predominantemente con las variante de tipo mutante que en aquellos infectados con el tipo salvaje. Existen una serie de factores que podrían explicar esta discrepancia. En primer lugar, el método de detección de las variantes del VBH en la región pre-core utilizados por estos autores fue la secuenciación directa

de los productos de PCR (Hadziyannis y col., 1990; Fattovich y col., 1992; Pastore y col., 1992; Xu y col., 1992; Brunetto y col., 1993; Fattovich y col., 1995). También, como se ha comentado anteriormente, la localización geográfica podría influir en la distribución de las variantes del VBH en la región pre-core, lo que podría distorsionar los resultados (Brown y col., 1992). Otros factores que podrían explicar esta discrepancia serían las diferencias existentes en el tiempo de tratamiento con interferón y la dosis administrada. Sin embargo, en este trabajo se han estudiado pacientes sometidos a distintas dosis de interferón durante tiempos diferentes y se ha comprobado que la presencia del mutante no influye en la respuesta al tratamiento.

Uno de los aspectos más interesantes del estudio de las variantes del VBH es determinar cómo surgen estos mutantes a lo largo de la historia natural de la infección por el virus. Se ha descrito la existencia de regiones dentro del genoma de algunos virus, denominadas "hot spots", donde la probabilidad de que ocurran mutaciones es muy alta (Carman y col., 1993). A menudo son zonas cuya secuencia es GGGGG y frecuentemente, durante la replicación vírica se producen mutaciones debidas a errores introducidos por la polimerasa (Carman y col., 1993). Posteriormente, la selección de estos mutantes dependerá del balance que exista entre su capacidad replicativa y su infectividad por un lado y los mecanismos que posee el organismo hospedador para la eliminación del virus. Un ejemplo sería la aparición de mutantes en la región pre-core del VBH, donde precisamente existe un "hot spot" cuya secuencia es GGGG. Una posible hipótesis es que a lo largo de la infección por el VBH, la presión del sistema inmunitario podría jugar un papel muy importante en la selección de estos mutantes pre-core. Sin embargo, el estudio de la implicación del

sistema inmunitario en la selección del mutante es difícil de realizar "in vivo" puesto que normalmente ya está presente cuando los pacientes son diagnosticados de hepatitis crónica por VBH (Cabrerizo y col., 1996). Un modelo sería el estudio del comportamiento del mutante en pacientes que pasaran alternativamente por una fase de inmunosupresión seguida de una fase de inmunoestimulación. Para ello, en este trabajo se ha analizado la distribución de las variantes pre-core del VBH en pacientes que habían sido incluidos en un estudio de tratamiento combinado de prednisona (agente inmunosupresor), seguido del tratamiento con interferón (agente inmunoestimulante). La mayoría de los pacientes estudiados estaban infectados basalmente por la mezcla de las variantes de tipo salvaje y mutante, predominando el genotipo salvaje sobre el mutante en todos los casos. Durante la fase de inmunosupresión, se observó que la proporción del mutante decreció ligeramente, aunque no de forma estadísticamente significativa, en la mitad de los casos estudiados. Este resultado sugiere que el sistema inmunitario podría intervenir en la selección de estos mutantes. Sin embargo, este hallazgo no es del todo concluyente, puesto que el período de inmunosupresión al que se sometió a los pacientes era tan solo de siete semanas, que es un tiempo relativamente corto para que se seleccionen unas variantes sobre otras. Por otra parte, Protzer y col. (1996) han obtenido resultados semejantes en otro modelo, que es el de pacientes tratados con terapia inmunosupresora para evitar el rechazo después de transplante hepático. Estudiando la población de virus antes y después del transplante, los autores observan que los mutantes pre-core tienden a desaparecer durante el periodo de inmunosupresión, por lo que concluyen que el sistema inmunitario está implicado en la selección del

mutante.

En los pacientes incluidos en este trabajo, durante la fase de inmunoestimulación se observó que el tipo mutante tendía a aumentar en los pacientes que continuaban con los niveles alterados de transaminasas después de la inmunoestimulación. Este resultado vuelve a confirmar la influencia del sistema inmunitario sobre la selección de la variante de tipo mutante sobre el tipo salvaje. Sin embargo, tampoco podría descartarse que la disminución del tipo salvaje sea debida a que éste fuera más susceptible que el mutante a la acción antivírica del interferón.

VI- CONCLUSIONES

- 1- Se ha desarrollado una técnica de hibridación específica para la determinación de las variantes del VBH de tipo salvaje y mutante en la región pre-core, que detecta la proporción relativa de cada una de las variantes. Esta técnica permite el análisis de un gran número de muestras simultáneamente.
- 2- En los pacientes con anti-HBe existe una concordancia de la distribución de las variantes del VBH en la región pre-core entre suero y tejido hepático.
- 3- Los pacientes anti-HBe positivos sintomáticos y asintomáticos están infectados por VBH de tipo salvaje y mutante pre-core.
- 4- Durante la terapia con interferón, la proporción de mutantes pre-core no condiciona la respuesta al tratamiento.
- 5- El porcentaje del mutante pre-core tiende a disminuir durante el tratamiento con prednisona mientras que durante el tratamiento con interferón la proporción de mutante tiende a aumentar en los pacientes con niveles alterados de ALT al final de la terapia.

VII- REFERENCIAS

Ackrill AM, Naoumov NV, Eddleston ALWF, Williams R. Comparison of precore/core hepatitis B virus region in liver tissue and serum from patients with chronic hepatitis B infection. *J Hepatol* 1992; 16: 224-227.

Almeida JD, Rubenstein D, Stott EJ. New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet* 1971; 2: 1225-1227.

Bartolomé J, Moraleda G, Ruiz-Moreno M, Porres JC, Carreño V. Hepatitis B virus DNA patterns in the liver of children with chronic hepatitis B. *J Med Virol* 1990; 31: 195-199.

Bassendine MF, Chadwick RG, Salmerón J, Shipton U, Thomas HC, Sherlock S. Adenine arabinoside therapy in HBsAg-positive chronic liver disease: a controlled study. *Gastroenterology* 1981; 80: 1016-1022.

Beasley RP. Hepatitis B virus as the etiologic agent in hepatocellular carcinoma-epidemiological considerations. *Hepatology* 1982; 2 (Suppl.): 21S-26S.

Bhat RA, Ulrich PP, Vyas GN. Molecular characterization of a new variant of hepatitis B virus in a persistently infected homosexual man. *Hepatology* 1990; 11: 271-276.

Bianchi L, De Groote J, Desmet VJ, Gedigk P, Korb G, Popper H, Poulsen H, Scheuer PJ, Schmid M, Thaler H, Wepler W. Acute and chronic hepatitis revisited. *Lancet* 1977;

2: 914-919.

Blum HE, Zhang ZS, Galum E, von Weizsacker F, Garner B, Liang TJ, Wands JR. Hepatitis B virus X protein is not central to the viral life cycle in vitro. *J Virol* 1992; 66: 1223-1227.

Blumberg BS, Gerstley BSJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AJ. A serum antigen (Australia Antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis. *Ann Intern Med* 1963; 66: 924-931.

Bosch O, Moraleda G, Castillo I, Carreño V. Treatment of chronic hepatitis B with recombinant interferon alpha versus recombinant interferon alpha plus levamisole. *J Hepatol* 1993; 19: 437-441.

Brown JL, Carman WF, Thomas HC. The clinical significance of molecular variation within the hepatitis B virus genome. *Hepatology* 1992; 15: 144-148.

Brunetto MR, Stemler M, Schödel F, Will H, Ottobrelli A, Rizzetto M, Verme G, Bonino F. Identification of HBV variants which cannot produce precore derived HBeAg and may be responsible for severe hepatitis. *Ital J Gastroenterol* 1989; 21: 151-154.

Brunetto MR, Stemler M, Bonino F, Schödel F, Oliveri F, Rizzetto M, Verme G, Will H. A new hepatitis B virus strain in patients with severe anti-HBe positive chronic hepatitis

B. J Hepatol 1990; 10: 258-261.

Brunetto MR, Giarin MM, Oliveri F, Chiaberge E, Baldi M, Alfarano A, Serra A, Saracco G, Verme G, Will H, Bonino F. Wild-type and e antigen-minus hepatitis B viruses and course of chronic hepatitis. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 4186-4190.

Brunetto MR, Giarin M, Saracco G, Oliveri F, Calvo P, Capra G, Randone A, Abate MI, Manzin P, Capalbo M, Piantino P, Verme G, Bonino F. Hepatitis B virus unable to secrete e antigen and response to interferon in chronic hepatitis B. Gastroenterology 1993; 105: 845-850.

Brunetto MR, Randone A, Ranki M, Jalanko A, Piantino P, Giarin M, Capra G, Calvo PL, Oliveri F, Bonino F. Quantitative analysis of Wild-type and HBeAg minus hepatitis B viruses by a sequence-dependent primer extension assay. J Med Virol 1994; 43: 310-315.

Bruss V, Ganem D. Mutational analysis of hepatitis B surface antigen particle assembly and secretion. J Virol 1991; 65: 3813-3820.

Burrell CJ, Gowans EJ, Jilbert AR, Lake JR, Marmion BP. Hepatitis B virus DNA detection by in situ cytohybridization: implications for viral replication strategy and pathogenesis of chronic hepatitis. Hepatology 1982; 2 (Suppl.): 85S-91S.

Cabrerizo M, Bartolomé J, Ruiz-Moreno M, Otero M, López-Alcorocho JM, Carreño V. Distribution of the predominant hepatitis B virus precore variants in hepatitis B e antigen-positive children and their effect on treatment response. *Pediatr Res* 1996; 39: 980-984.

Carman WF, Hadziyannis S, McGarvey MJ, Jacyna MR, Karayiannis P, Makris A, Thomas HC. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with hepatitis B infection. *Lancet* 1989; ii: 588-590.

Carman WF, Hadziyannis S, Karayiannis P, Fagan EA, Tassopoulos NC, Williams R, Thomas HC. Association of the precore variant of HBV with acute and fulminant hepatitis. En: Hollinger FB, Lemon SM, Margolis HS, ed. *Viral hepatitis and liver disease*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1991: 216-219.

Carman W, Thomas HC, Domingo HC. Viral genetic variation: hepatitis B virus as a clinical example. *Lancet* 1993; 341: 349-353.

Carreño V, Porres JC, Hernández-Guio C, Alvarez V, Hernando L. The significance of hepatitis B infection to nurses, paramedics and laboratory workers. En: Krugman S, Sherlock S, Merck, Sharp & Dohme Int Press, ed. New York, 1981: 27-38.

Carreño V, Alvarez V, Porres JC, Hernández-Guio C, Hernando L. Patrón serológico de la respuesta del virus B de la hepatitis en el personal sanitario. *Gastroenterol*

Hepatology 1984; 7: 57-60.

Carreño V, Bartolomé J, Castillo I. Long-term effect of interferon therapy in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1994; 20: 431-435.

Castillo I, Bartolomé J, Quiroga JA, Porres JC, Carreño V. Detection of HBeAg/anti-HBe immune complexes in the reactivation of hepatitis B virus replication among anti-HBe chronic carriers. *Liver* 1990; 10: 79-84.

Chang HK, Wang BY, Yuh CH, Wei CL, Ting LP. A liver-specific nuclear factor interacts with the promoter region of the large surface protein gene of human hepatitis B virus. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 5189-5197.

Cheng SI, La Porte P, Yee JK. Mutational analysis of hepatitis B virus enhancer 2. *Virology* 1993; 196: 652-659.

Cheng Y, Robinson WS, Marion PL. Selected mutation of the duck hepatitis virus P gene RNase H domain affect both RNA packaging and priming of minus-strand DNA synthesis. *J Virol* 1994; 68: 5232-5238.

Cherrington J, Russnak R, Ganem D. Upstream sequences and cap proximity in the regulation of polyadenylation in ground squirrel hepatitis virus. *J Virol* 1992; 66: 7589-7596.

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

Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1970; 1: 695-698.

De Franchis R, D'Arminio A, Vecchi M, Ronchi G, Del Ninno E, Parravicini A, Ferroni P, Zanetti AR. Chronic asymptomatic HBsAg carriers: histologic abnormalities and diagnostic and prognostic value of serologic markers of the HBV. *Gastroenterology* 1980; 79: 521-527.

Dejean A, Sonigo P, Wain Hobson S, Tiollais P. Specific hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma through a viral 11-base-pair direct repeat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 5350-5354.

Eble BE, Lingappa VR, Ganem D. The N-terminal (pre-S2) domain of hepatitis B virus surface glycoprotein is translocated across membranes by downstream signal sequences. *J Virol* 1990; 64: 1414-1419.

Farr CJ. The analysis of point mutations using synthetic oligonucleotide probes. En: Mathew C, ed. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 9: *Protocols in Human Molecular Genetics*. Clifton, NJ: The Humana Press Inc., 1991: 69-76.

Fattovich G, Farci P, Rugge M, Brollo L, Mandas A, Pontisso P, Giustina G, Lai ME, Belussi F, Busatto G, Balastrieri A, Ruol A, Alberti A. A randomized controlled trial of lymphoblastoid interferon-alfa in patients with chronic hepatitis B lacking HBeAg. *Hepatology* 1992; 15: 584-589.

Fattovich G, McIntyre G, Thursz M, Colman K, Giuliano G, Alberti A, Thomas HC, Carman WF. Hepatitis B precore/core variation and interferon therapy. *Hepatology* 1995; 22:1355-1362.

Feitelson M. Hepatitis B virus infection and primary hepatocellular carcinoma. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5: 275-301.

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.

Fowler P, Nayarsina R, Missale G, Bertoletti A, Penna A, Ando K, Gerny A, Fiaccadori F, Ferrari C, Chisari FV. The role of the cytotoxic T lymphocyte response in hepatitis B virus immunology and pathogenesis. En: Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T, eds. *Viral hepatitis and liver disease*. Tokyo: Springer-Verlag, 1994: 173-177.

Fried MW, Fong TL, Swain MG, Park Y, Beames MP, Banks SM, Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Therapy of chronic hepatitis B with a 6-month course of ribavirin . *J*

Hepatology 1994; 21: 145-150.

Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charney P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in E. coli. Nature 1979; 281: 646-650.

Gallina A, De Koning A, Rossi F, Calogero R, Manservigi R, Milanesi G. Translational modulation in hepatitis B virus preS-S open reading frame expression. J Gen Virol 1992; 73: 139-148.

Ganem D. Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. En: Mason WS, Seeger C, eds. Hepadnaviruses. Molecular Biology and Pathogenesis. Current Topics in Microbiology and Immunology, 1991; 168: 61-83.

Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. Annu Rev Biochem 1987; 56: 651-693.

Gerlich WH, Robinson WS. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. Cell 1980; 21: 801-809.

Gerlich WH. Estructura y biología del virus B de la hepatitis. Hepatología Clínica 1993; 1: 251-283.

Goergen B, Meyer zum Büschenfelde KH, Gerken G. Mutation specific PCR and direct

solid phase sequencing assay for the detection of hepatitis B virus pre-C/C mutants in anti-HBe-positive, chronic hepatitis B. *J Med Virol* 1994; 43: 97-102.

Guidotti LG, Guilhot S, Chisari FV. Interleukin-2 and alpha/beta interferon down-regulate hepatitis B virus gene expression in vivo by necrosis factor-dependent and -independent pathways. *J Virol* 1994a; 68: 1265-1270.

Guidotti LG, Ando K, Hobbs MV, Ishikawa T, Runkel L, Schreiber RD, Chisari FV. Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994b; 91: 3764-3768.

Guilles PN, Fey G, Chisari FV. Tumor necrosis factor alpha negatively regulates hepatitis B virus gene expression in transgenic mice. *J Virol* 1992; 66: 3955-3960.

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

Hadziyannis S, Bramou T, Makris A, Moussoulis G, Zigneno L, Papaionnou C. Interferon alfa-2b treatment of HBeAg negative/serum HBV DNA positive chronic hepatitis type B. *J Hepatol* 1990; 11 (Supl.): S133-S136.

Hawkins AE, Gilson RJC, Beath SV, Boxall EH, Kelly DA, Tedder RS, Weller IVD. Novel application of a point mutation assay: evidence for transmission of hepatitis B viruses

with precore mutations and their deletion in infants with fulminant hepatitis. *J Med Virol* 1994; 44: 13-21.

Henkler FF, Koshy R. Hepatitis B virus transcriptional activators: mechanisms and possible role in oncogenesis. *J Viral Hepat* 1996; 3: 109-121.

Hess G, Born M, Dormeyer H, Zoller B, Arnold W, Knolle J. Hepatitis B virus markers among family contacts of asymptomatic HBsAg carriers. *Scand J Gastroenterol* 1979; 14: 373-378.

Hirsch RC, Lavine JE, Chang LJ, Varmus HE, Ganem D. Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription. *Nature* 1990; 344: 552-555.

Hoofnagle JH, Dusheiko GM, Seeff LB, Jones EA, Waggoner JG, Bales ZB. Seroconversion from hepatitis B e antigen to antibody in chronic type B hepatitis. *Ann Int Med* 1981; 94: 744-748.

Hoofnagle JH, Peters M, Mullen KD, Jones DB, Rutsgi V, Di Bisceglie A, Hallahan C, Park Y, Meschievitz C, Jones EA. Randomized controlled trial of recombinant human alpha-interferon in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1988; 95: 1318-1325.

Hu KQ, Siddiqui A. Regulation of the hepatitis B virus gene expression by the enhancer element I. *Virology* 1991; 181: 721-726.

Hyams KC. Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 992-1000.

Janssen H, Berck L, Heijtkink RA, Kate FJW, Schalm SW. Interferon alpha and zidovudine combination therapy for chronic hepatitis B: results of a randomized, placebo-controlled trial. *Hepatology* 1993; 17: 383-388.

Junker-Niepmann M, Bartenschlager R, Schaller K. A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J* 1990; 9: 3389-3396.

Kaplan PM, Greenman RL, Gerin JL, Purcell RH, Robinson WS. DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol* 1973; 12: 995-1005.

Kennedy RC, Adler-Storthz K, Henkel RD, Sanchez Y, Melnick JL, Dressman GR. Immune response to hepatitis B surface antigen: enhancement by prior infections of antibodies to idio type. *Science* 1983; 221: 853-855.

Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing

histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1: 431-435.

Krugman S, Giles GP, Hammond J. Infectious hepatitis: evidence for two distinctive clinical, epidemiological and immunological types of infection. *JAMA* 1967; 200: 365-373.

Kwok J, Higuchi R. Avoiding false positive with PCR. *Nature* 1989; 339: 237-238.

Landers TA, Greenberg HB, Robinson WS. Structure of hepatitis B Dane particle and nature of the endogenous DNA polymerase reaction. *J Virol* 1977; 23: 368-276.

Laskus T, Persing DH, Nowicki MJ, Mosley JW, Rakela J. Nucleotide sequence analysis in the precore region in patients with fulminant hepatitis B in the United States. *Gastroenterology* 1993; 105: 1173-1178.

Liang TJ, Hasegawa K, Muñoz SJ, Shapiro CN, Yoffe B, McMahon BJ, Feng C, Bei H, Alter MJ, Dienstag. Hepatitis B virus precore mutation and fulminant hepatitis in the United States. A polymerase chain reaction-based assay for the detection of specific mutation. *J Clin Invest* 1994; 93: 550-555.

Liaw YF, Lin SM, Chen TJ, Chien RN, Sheen IS, Chu CM. Beneficial effect of prednisolone withdrawal followed by human lymphoblastoid interferon on the treatment

of chronic type B hepatitis in Asians: a randomized controlled trial. *J Hepatol* 1994; 20: 175-180.

Lindh M, Furuta Y, Vahlne A, Norkrans G, Horal P. Emergence of precore TAG mutation during hepatitis B e seroconversion and its dependence of pregenomic base pairing between nucleotides 1858 of 1896. *J Infect Dis* 1995; 172: 1343-1347.

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 USA* 1994; 91: 4077-4081.

Magnius LO, Espmark A. A new antigen complex co-occurring with Australia antigen. *Acta Pathol Microbiol Scand B* 1972; 80: 335-337.

Marion PL, Oshiro LS, Regnery DC, Scullard GH, Robinson WS. A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 2941- 2945.

Martín J, Bosch O, Moraleta G, Bartolomé J, Quiroga JA, Carreño V. Pilot study of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology* 1993; 18: 775-780.

Maruyama T, Lino S, Koike K, Yasuda K, Milich DR. Serology of acute exarcebation

in chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 1993; 105:1141-1151.

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.

Miller RH, Marion PL, Robinson WS. Hepatitis B viral DNA-RNA hybrid molecules in particles from infected liver are converted to viral DNA molecules during an endogenous DNA polymerase reaction. *Virology* 1984; 139: 64-72.

Mora I, Porres JC, Carreño V. Marcadores virológicos del virus B de la hepatitis (VBH). Progresos realizados. *Rev Clin Esp* 1984; 173: 9-13.

Nakahori S, Yokosuka O, Ehata T, Chuang WL, Imazeki F, Ito Y, Ohto M. Detection of hepatitis B virus precore stop codon mutants by selective amplification method: frequent detection of precore mutants in hepatitis B e antigen positive healthy carriers. *J Gastroenterol Hepatol* 1995; 10: 419-425.

Naoumov NV, Schneider R, Grötzinger T, Jung MC, Miska S, Pape GR, Will H. Precore mutant hepatitis B virus infection and liver disease. *Gastroenterology* 1991; 102: 538-543.

Nassal M, Junker-Niepmann M, Schaller H. Translational inactivation of RNA function: discrimination against a subset of genomic transcripts during HBV nucleocapsid

assembly. Cell 1990; 63: 1357-1363.

Nassal M, Schaller H. Hepatitis B virus replication --an update. J Viral Hepat 1996; 3: 217-226.

Offensperger WB, Offensperger S, Walter E, Blum HE, Gerok W. Inhibition of duck hepatitis B virus infection by lysosomotropic agents. Virology 1991; 183: 415-418.

Omata M, Ehata T, Yokosuka O, Hosoda K, Ohto M. Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. N Engl J Med 1991; 324: 1699-1704.

Okamoto H, Yotsumoto S, Akahane Y, Yamanaka T, Miyazaki Y, Sugai Y, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis B viruses with pre-core regions defects prevail in persistently infected host along with seroconversion to the antibody against e antigen. J Virol 1990; 64: 1298-1303.

Ou JH, Laub O, Rutter WJ. Hepatitis B virus gene function: the precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 1578-1582.

Pastore G, Santantonio T, Millela M, Monno L, Mariano N, Moschetta R, Pollice L. Anti-HBe-positive chronic hepatitis B with HBV-DNA in the serum response to a 6-month

course of lymphoblastoid interferon. *J Hepatol* 1992; 14: 221-225.

Perrillo RP, Regenstein FG, Peters MG, De Schryver-Kecsckemeti K, Bodicky CJ, Campbell CR, Kuhns MC. Prednisone withdrawal followed by recombinant alpha interferon in the treatment of chronic type B hepatitis. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1988; 109: 95-100.

Perrillo RP. Interferon for hepatitis B: US experience. *Gut* 1993; 34 (Suppl.): S95-S96.

Peterson DL. Isolation and characterization of the major protein and glycoprotein of hepatitis B surface antigen. *J Biol Chem* 1981; 256: 6975-6983.

Price JS, France AJ, Moaven LD, Welsby PD. Foscarnet in fulminant hepatitis B. *Lancet* 1986; 2: 1273.

Protzer U, Goergen B, Hopf U, Neuhaus P, König V, Meyer zum Büschenfelde KH, Gerken G. Pre-core mutants of hepatitis B virus in patients receiving immunosuppressive treatment after orthotopic liver transplantation. *J Med Virol* 1996; 50: 135-144.

Raimondo G, Schneider R, Stemler M, Smedila V, Rodino G, Will H. A new hepatitis B virus variant in a chronic carrier with multiple episodes of viral reactivation and acute hepatitis. *Virology* 1990; 179: 64-68.

Raney AK, Le HB, McLachlan A. Regulation of transcription from the hepatitis B virus major surface antigen promoter by the Sp1 transcription factor. *J Virol* 1992; 66: 6912-6921.

Realdi G, Alberti A, Rugge M, Bortolotti F, Rigoli AM, Tremolada F, Ruol A. Seroconversion from hepatitis B e antigen to anti-HBe in chronic hepatitis B infection. *Gastroenterology* 1980; 79: 195-199.

Rehermann B, Lau D, Hoofnagle JH, Chisari FV. Cytotoxic T lymphocyte responsiveness after resolution of chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Invest* 1996; 97: 1655-1665.

Reichen J, Bianchi L, Frei PC, Malé PJ, Lavanchy D, Schmid M, Swiss Association for the Study of the Liver. Efficacy of steroid withdrawal and low-dose interferon treatment in chronic active hepatitis B. Results of a randomized multicenter trial. *J Hepatol* 1994; 20: 168-174.

Rieger A, Nassal M. Specific hepatitis B virus minus-strand DNA synthesis requires only the 5' encapsidation signal and the 3'-proximal direct repeat DR1. *J Virol* 1996; 70: 585-589.

Robinson WS, Greenman RL. DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate. *J Virol* 1974; 13: 1231-1236.

Robinson WS, Clayton DA, Greenman RL. DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J Virol* 1974; 14: 384-391.

Rossol S, Marinos G, Carucci P, Singer MV, Williams R, Naoumov NV. Interleukin-12 induction of Th1 cytokines is important for viral clearance in chronic hepatitis B. *J Clin Invest* 1997; 99: 3025-3033.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467.

Sattler F, Robinson WS. Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends. *J Virol* 1979; 32: 226-233.

Scully LJ, Shein R, Karayiannis P, McDonald JA, Thomas HC. Lymphoblastoid interferon therapy for chronic HBV infection: a comparison of 12 versus 24 weeks of thrice weekly treatment. *J Hepatol* 1987; 5: 51-58.

Spandau DF, Lee CH. Trans-activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. *J Virol* 1988; 62: 427-434.

Stoll-Becker S, Repp R, Glebe D, Schaefer S, Kreuder J, Kann M, Lampert F, Gerlich WH. Transcription of hepatitis B virus in peripheral blood mononuclear cells from persistently infected patients. *J Virol* 1997; 71: 5399-5407.

Sprengel R, Kaleta EF, Will H. Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol* 1988; 62: 3832-3839.

Stibbe W, Gerlich WH. Variable protein composition of hepatitis B surface antigen from different donors. *Virology* 1982; 123: 436-442.

Summers J, Smolec JM, Snyder R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 4533-4537.

Summers J, Mason WS. Replication genome of a hepatitis B like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 1982; 29: 403-415.

Tiollais P, Charnay P, Vyas GN. Biology of hepatitis B virus. *Science* 1981; 213: 406-411.

Tong S, Li J, Vivitski L, Trepo C. Active hepatitis B virus replication in the presence of anti-HBe is associated with viral variants containing an active pre-C region. *Virology* 1990; 176: 596-603.

Tong S, Diot C, Gripon P, Li J, Vivitski L, Trépo C, Guguen-Guillouzo C. In vitro replication competence of a cloned hepatitis B virus with a nonsense mutation in the distal pre-C region. *Virology* 1991; 181: 733-737.

Tong SP, Li JS, Vitvitski L, Kay A, Trepo C. Evidence for a base-paired region of hepatitis B pregenome encapsidation signal which influences the pattern of precore mutations abolishing HBe protein expression. *J Virol* 1993; 67: 5651-5655.

Treinin M, Laub O. Identification of a promoter element located upstream from the hepatitis B virus X gene. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 545-548.

Tur-Kaspa R, Burk RD, Shaul Y, Shafritz DA. Hepatitis B virus DNA contains a glucocorticoid-responsive element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 1627-1631.

Tur-Kaspa R, Klein A, Aharonson S. Hepatitis B precore mutants are identical in carriers from various ethnic origins and are associated with a range of liver disease severity. *Hepatology* 1992; 16: 1338-1342.

Uchida T, Age TT, Becker SO, Hirashima M, Shikata T, Komine F, Moriyama M, Arakawa Y, Takase S, Mima S. Detection of precore/core-mutant hepatitis B virus genome in patients with acute or fulminant hepatitis without serological markers for recent HBV infection. *J Hepatol* 1993; 18: 369-372.

Valenzuela P, Gray P, Zaldivar J, Goodman HM, Rutter WJ. Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of hepatitis B virus surface antigen. *Nature* 1979; 280: 815-819.

Wang GH, Seeger C. The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. *Cell* 1992; 71: 663-670.

Xu J, Brown D, Harrison T, Liu Y, Dusheiko G. Absence of hepatitis B precore mutants in patients with chronic hepatitis B responding to interferon-alfa. *Hepatology* 1992; 15: 1002-1006.

Yoshiba M, Sekiyama K, Sugata F, Okamoto H, Yamamoto K, Yatsumoto S. Reactivation of precore mutant hepatitis B virus leading to fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 1253-1259.

Yuh CH, Chang YL, Tiing LP. Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNAs of hepatitis B virus. *J Virol*; 66: 4073-4084.

VIII- ANEXO

En las siguientes publicaciones se recoge parte del trabajo presentado en esta Tesis Doctoral.

Analysis of hepatitis B precore region in serum and liver of chronic hepatitis B virus carriers

Juan M. López-Alcorocho¹, Gloria Moraleda¹, Javier Bartolomé¹, Inmaculada Castillo¹, Teresa Cotonat¹, José Aguilar², Enrique Ortega³, José A. Pons⁴, Javier Salmerón⁵, José L. Vázquez-Iglesias⁶ and Vicente Carreño¹

¹Hepatology Unit, Fundación Jiménez Díaz, Madrid; ²Depts. of Gastroenterology ³Hospital Virgen del Rocío, Sevilla; ⁴Hospital General Universitario, Valencia; ⁵Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia; ⁶Hospital Universitario de Granada, Granada; and ⁶Hospital Juan Canalejo, La Coruña, Spain

(Received 12 December 1992)

Using an oligonucleotide hybridization assay we studied the prevalence of wild-type and the predominant pre-core mutant hepatitis B virus in serum and liver of 49 antibody to hepatitis B e antigen carriers and three hepatitis B e antigen positive patients. Of the 45 serum samples from the anti-HBe carriers analyzed (no serum sample was available in four patients), 36 (80%) had hepatitis B virus DNA. In 26 of these 36 patients (72%) a mixed population was detected, wild-type genome alone was found in six patients (16%), the single mutant (nucleotide position 1896), in three cases (8%) and in one patient (2%) the viral DNA had the two nucleotide mutation (1896 and 1899). Of the liver biopsies from the 36 anti-HBe patients studied (no liver biopsy was available in 13 patients), 33 (92%) had hepatitis B virus DNA. A mixed viral population was detected in 23 patients (69%), only wild-type virus or a single mutation was found in eight (34%) and two patients (8%), respectively. In all cases, wild-type was the predominant genome. In serum and liver samples from the same patient, we found a concordance of the presence of wild-type HBV and the pre-core mutants studied in 23/26 (88%) of the patients. Alanine aminotransferase levels were higher ($p < 0.01$) and the duration of hepatitis B surface antigen carrier lower ($p < 0.02$) in patients with a predominance of precore mutant in comparison to wild-type. These data may indicate that in most cases, the presence of the HBV strains found in serum reflects the HBV genotypes which are infecting the hepatocytes. © Journal of Hepatology.

Key words: Hepatitis B virus; Mutant precore region; Oligonucleotides; Polymerase chain reaction; Sequencing

Recently, several studies of the natural history of the hepatitis B virus (HBV) have demonstrated the existence of a sequence variation among viral genomes isolated from individual patients infected with HBV. These mutant viruses, with change in the precore or core gene regions, are found in some patients with persistent HBV infection (1-6). Furthermore, the identification of HBV variants which cannot express e-antigen due to a point mutation in the precore region (from guanine to adenine at nucleotide position 1896, which generates a stop codon: TGG to TAG) indicates that hepatitis B e antigen (HBeAg) expression is not essential for HBV viability

(7,8). This HBV variant sometimes appears associated with a second mutation (guanine to adenine at position 1899) (1,9). However, these variations of viral sequences have been mainly studied in serum, and there is little information about the distribution of pre-C variants in liver biopsies. Manzin et al. (10) have found a higher percentage of pre-C mutants in nontumoral than in tumoral liver tissues from patients with hepatocellular carcinoma (HCC), although in some cases a mixed population was detected. The presence of pre-C mutants in serum and liver samples has been analyzed by Ackrill et al. (11), who found no discrepancies in the distribution of these HBV

strains between serum and liver samples from the same patient, although the number of analyzed patients was small.

In this work, the distribution and the relative proportion of the predominant HBV pre-core variants have been analyzed in serum and liver of anti-HBe patients, by means of hybridization with specific (wild-type, one-point mutation and two-point mutation) oligonucleotides.

Patients and Methods

Patients

Fifty-two patients (37 males and 15 females) with chronic hepatitis, histologically proven according to international criteria (12), were analyzed in this study. Forty-nine patients were antibody to hepatitis B e antigen (anti-HBe) positive and three were HBeAg positive. All patients had abnormal alanine aminotransferase (ALT) levels (133 ± 114 IU/l). In all patients HBV-DNA was undetectable in serum by dot-blot hybridization. At admission liver histology indicated chronic persistent hepatitis in five patients, chronic active hepatitis in 30 patients, cirrhosis in 12 cases and minimal liver changes in the remaining five patients. The patients had a mean age of 36 years (range: 10–74 years). The epidemiological route of infection was transfusion in five patients, drug addiction in nine patients, eight were household contacts of hepatitis B surface antigen (HBsAg) carriers and 30 patients had no known antecedents. They had been carriers of HBsAg for a mean period of 4 years (range: 0.6–18 years). Twelve patients had antibodies against hepatitis C virus (anti-HCV), 21 presented antibodies against hepatitis delta virus (anti-HDV) and five were human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) asymptomatic carriers (CDC grade II, $CD4 > 400$ cells/mm³). Thirty-four of the patients had a frozen liver biopsy taken the same day as the serum samples. In 14 of them, only a serum sample was available and four patients only had a liver biopsy.

Serological markers

HBsAg, HBeAg, anti-HBe and anti-HDV were tested by commercial radioimmunoassays (Abbott Laboratories, North Chicago, IL). Anti-HIV-1 and anti-HCV were detected by commercial enzyme-linked immunoassays (Abbott and Ortho Diagnostics Systems Ins., Raritan, NJ, USA, respectively). Confirmation of anti-HCV positive samples was performed using the recombinant immunoblot assay for anti-HCV (Ortho).

Liver function tests were analyzed by standard methods (Smac 20, Technicon, New York, NY, USA).

Amplification technique and oligonucleotide hybridization

Viral DNA was isolated from 200 μ l of serum after proteinase K (1 mg/ml) and 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) digestion at 37°C for 2 h. Nucleic acids were extracted twice with phenol:chloroform (1:1) and once with ether, collected through 2 M ammonium acetate and ethanol precipitation and dissolved in 30 μ l of distilled water. Liver HBV-DNA was isolated using the method described by Bartolomé et al. (13). The total DNA concentration was determined measuring its absorbance at 260 nm.

Polymerase chain reaction (PCR) was performed in duplicate for each sample in a 50- μ l assay containing 5 μ l of serum DNA sample or 1 μ g of total liver DNA sample, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 0.5 U Taq DNA polymerase (Perkin Elmer, Norwalk, CT) and 0.2 μ M of each primer [B1: 5'-GGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGCGC-3' at positions 1776–1804 according to Galibert et al. (14) and BC1: 5'-GGAAAGAAGTCAGAAGGCAA-3' at positions 1954–1974 according to Carman et al. (1)] for 40 cycles (94°C, 1.5 min; 55°C, 1.5 min; 72°C, 3 min).

Oligonucleotide hybridization assay was carried out with three primers which cover from nucleotide 1889 to 1906 of the pre-core region of HBV-DNA, corresponding to wild-type: 5'-TGGCTTTGGGGCATGGAC-3' (probe 1#), a two nucleotide mutant sequence: 5'-TGGCTTTAGGACATGGAC-3' (probe 2#) and one nucleotide mutant: 5'-TGGCTTTAGGGCATGGAC-3' (probe 3#) according to Brunetto et al. (15). To confirm that the sum of all signals with all three primers reached 100%, an additional hybridization assay was performed. Thus, amplified DNA was hybridized with a fourth probe from a highly conserved region of pre-core (nucleotide positions 1865 to 1882): 5'-CAAGCCTCCAAGCTGTGC-3' (probe 0#). The concentration of amplified DNA was determined by measuring the absorbance at 260 nm in a spectrophotometer, and 100 ng of amplified DNA was denatured and spotted on nitrocellulose membranes. The filters were prehybridized for 2 h with a solution containing 0.5% SDS, 5 \times Denhardt's solution (1 \times Denhardt's: 0.02% bovine serum albumin, 0.02% polyvinylpyrrolidone, 0.02% Ficoll), 5 \times SSPE (1 \times SSPE: 150 mM sodium chloride, 10 mM di-sodium hydrogen phosphate, 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid, pH 7.2) and hybridized for 2 h with the same prehybridization solution containing ³²P 5'-end-labelled oligonucleotides according to Maniatis et al. (16). After hybridization, the membranes were washed once for 5 min with 0.1% SDS/6 \times SSPE, 0.1% SDS/2 \times SSPE and twice in 0.1% SDS/1 \times SSPE. Hybridization and washing temperatures for each oligonucleotide were calculated by the formula $T_m = 2 \times A/T + 4 \times G/C$

(17), carrying out both hybridization and washing steps at 5°C below the T_m .

The ratio of wild-type/mutant precore sequences was estimated by the cpm number of the radioactive spots counted in an Ambis Radioanalytic Imaging System (Ambis System Inc; San Diego; CA) (Fig. 1).

The assay was performed in duplicate for each sample.

As negative controls, PCR reaction buffer without DNA, serum samples from healthy donors without HBV markers and total DNA extracted from HepG2 cells, were included in each assay.

To demonstrate the specificity of the hybridization assays, plasmids containing wild-type HBV or the two precore mutant sequences were amplified as described for serum and liver samples and hybridized alone or mixed in all possible combinations with the corresponding oligonucleotides.

DNA sequencing

To confirm the results obtained with the oligonucleotide hybridization assay of the samples, DNA se-

quences from six serum and 20 liver samples were determined by direct sequencing. Therefore, amplified DNA was purified through 1.5% low melting point agarose gel; the bands were cut out and used as template DNA in a sequencing reaction using Sequenase kit reagents (United States Biochemical Corp., Cleveland, OH) and α - 32 P-dATP (Amersham International, England).

HBeAg/anti-HBe immune complexes assay

The presence of circulating HBeAg/anti-HBe immune complexes was assessed according to the method described by Castillo et al. (18).

Statistical analysis

Analysis was performed by using the Student's *t*-test and Fisher's exact test.

Results

Specificity of the hybridization assay

The specificity of the oligonucleotide hybridization assay was demonstrated by the fact that each probe hybridized with the cloned HBV-DNA which contained the appropriate sequence (wild-type, one- or two-point mutations) alone or in combinations (Fig. 1 and Table 1).

The sum of the signals obtained in the hybridization assay of the serum and liver samples reached 100% in all cases. The results obtained after the oligonucleotide hybridization assay were confirmed by sequencing the PCR products (Fig. 2 and 3).

Anti-HBe positive patients

Of the 45 anti-HBe patients, 36 (80%) had HBV-DNA in serum as indicated by PCR. In 26/36 of these patients (72%), both wild-type and HBeAg minus HBV sequences were detected with a predominance of wild-type HBV. The most frequently observed mutation in these patients was the single mutation at position 1896. Wild-type HBV-

TABLE I

Counts of the signals obtained in the hybridization assay of the HBV DNA controls

Control	Probe 0#	Probe 1#	Probe 2#	Probe 3#
Wild type	6876	4698	1851	1778
Double mutant	5615	2005	1776	4727
Single mutant	5673	1719	4756	1724
Wild type+double mutant	5787	3782	1825	5558
Wild type+single mutant	5614	3037	3724	1891
Single+double mutant	5500	1833	3094	2979
Wild type+single+double mutant	6188	2578	2693	2654

Quantitation was performed with an Radioanalytic Imaging System (AMBIS).

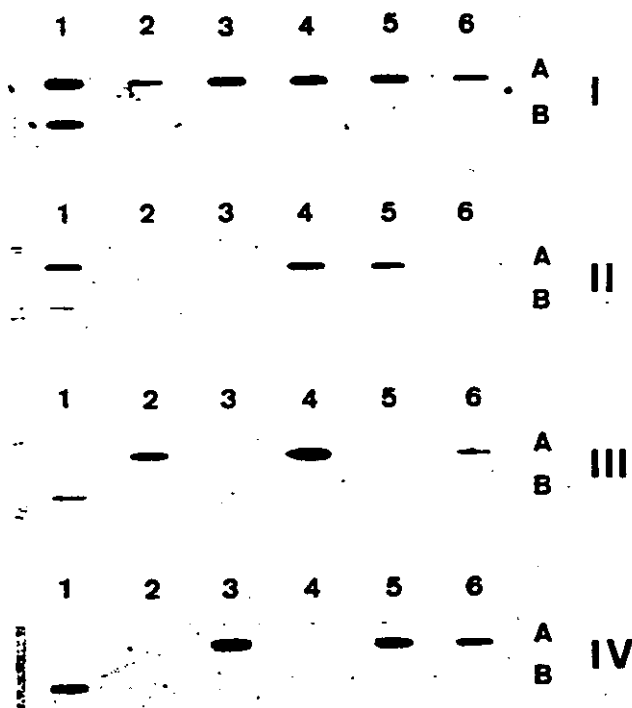


Fig. 1. Oligonucleotide hybridization assay of plasmids containing wild-type, one-point mutated or two-point mutated HBV DNA and mixtures in all possible combinations. Hybridization was carried out with probes 0# (I), probe 1# (II), probe 2# (III) and probe 3# (IV). Lane A1: wild-type, A2: double mutant, A3: single mutant, A4: wild-type and double mutant mixture (1:1), A5: wild-type and single mutant mixture (1:1), A6: single and double mutant mixture (1:1), B1: wild-type and single and double mutant mixture (1:1:1). In each lane 100 ng of amplified DNA was applied. The position of the controls is the same in the four filters.

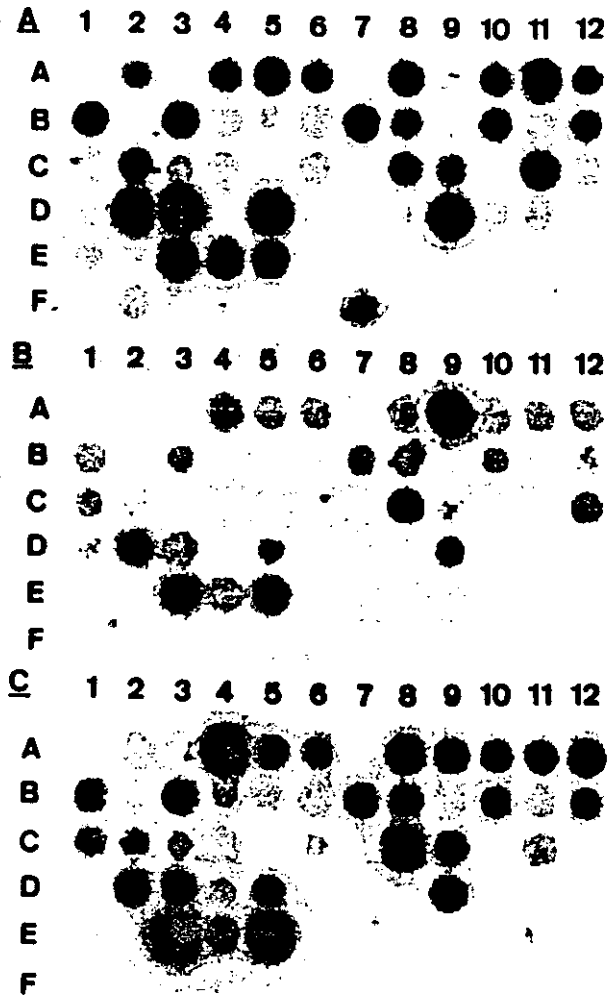


Fig. 2. Detection of wild-type and precore mutant HBVs with oligonucleotide hybridization assay. The image has been obtained by a Radioanalytic Imaging System (AMBIS). Hybridization of samples was carried out with probe 1# (A), probe 2# (B) and probe 3# (C). Lanes A1-C9: serum samples. Lanes C10-E5: liver samples. Lane F: negative (1,3-6) and positive (2,7) controls. In each lane 100 ng of amplified DNA was loaded. The position of the samples, negative and positive controls are the same in the three filters.

DNA alone was found in the serum of six patients (16%). In three patients (8%) the HBV-DNA genome observed had the single mutation exclusively (nt. 1896), while in one case (3%) the HBV-DNA genome had the two nucleotide mutation (nt. 1896 and 1899).

Thirty-three of 36 (92%) liver samples studied had HBV-DNA as indicated by PCR. As in serum samples, a mixed viral population (mutant and wild-type) was detected in the livers of most patients (23/33: 70%) the wild-type HBV being the predominant HBV genome. Of the liver samples that did not contain a mixed viral population, eight (24%) had only the wild-type of HBV and in two (6%) cases the only type of HBV-DNA detected had the one-nucleotide mutation at position 1896. No cases of infection with the double mutant alone were found.

TABLE 2

Percentage of wild-type and mutant HBV genomes in anti-HBe patients with serum and liver samples

Pat.	Serum			Liver			HD	ALT (IU/l)
	1#	2#	3#	1#	2#	3#		
1	36%	-	64%	20%	-	80%	Ci	59
2	10%	5%	85%	29%	26%	45%	CAH	161
3	73%	-	27%	85%	4%	11%	Ci	37
4	55%	10%	35%	88%	-	12%	CAH	78
5	78%	-	22%	79%	-	21%	Ci	77
6	-	-	100%	-	-	100%	Ci	48
7	100%	-	-	51%	49%	-	CAH	135
8	-	100%	-	64%	36%	-	CPH	98
9	61%	17%	22%	76%	8%	16%	MC	59
10	87%	2%	11%	81%	2%	17%	MC	9
11	32%	8%	60%	48%	5%	47%	CPH	268
12	55%	8%	37%	80%	2%	18%	CAH	85
13	100%	-	-	100%	-	-	CAH	99
14	63%	-	34%	79%	-	21%	CAH	67
15	55%	-	45%	83%	-	17%	CPH	30
16	61%	-	39%	80%	-	20%	Ci	29
17	57%	7%	36%	100%	-	-	CAH	20
18	67%	-	33%	63%	-	37%	CAH	53
19	100%	-	-	100%	-	-	Ci	208
20	-	-	-	100%	-	-	Ci	230
21	-	-	-	56%	-	44%	CPH	39
22	26%	13%	61%	45%	15%	40%	CAH	340
23	-	-	-	77%	-	23%	CAH	64
24	-	-	-	-	-	-	CAH	40
25	42%	-	58%	8%	5%	77%	CAH	92
26	-	-	-	100%	-	-	CAH	74
27	100%	-	-	100%	-	-	CAH	142
28	100%	-	-	100%	-	-	MLC	96
29	-	-	-	100%	-	-	CAH	99
30	68%	-	32%	-	-	-	CAH	184
31	52%	-	48%	47%	6%	47%	CAH	124
32	16%	6%	78%	-	-	100%	CAH	279

1#: Wild-type; 2#: 2 nucleotide mutant; 3#: 1 nucleotide mutant. NT: not tested; Ci: Cirrhosis; CAH: chronic active hepatitis; CPH: chronic persistent hepatitis; MLC: minimal liver changes.

With respect to those patients in whom serum and liver biopsies were available, HBV-DNA was simultaneously detected in both samples in 26/32 (81%) (Table 2). In 23 of these 26 patients (88%), correlation between the studied HBV genotypes present in serum and liver was observed. So, in all of these patients, the HBV variants detected in serum were reflected in liver. In 17 of these 23 patients (74%), total correlation was observed, while in the remaining six patients, not all the genotypes found in liver were also detected in serum. In contrast, in only 3/26 patients with HBV-DNA positivity in serum and liver, were some of the HBV variants present in serum not detected in liver (Table 2).

When the relative proportion of each HBV variant in serum and liver samples taken from the same patient was analyzed, there was concordance in 18 of 26 (69%) patients with HBV-DNA detected by PCR in serum and liver (Table 2).

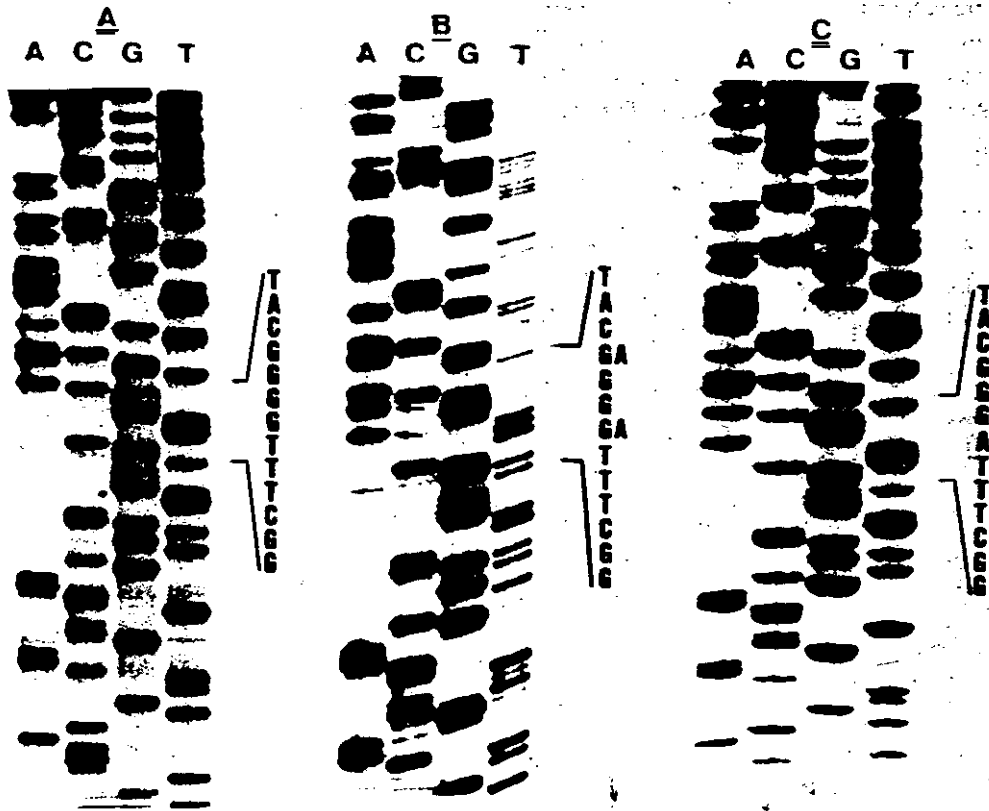


Fig. 3. Sequence analysis of the precore region by direct sequencing of PCR products. A: wild-type HBV genome (TGGGG) from serum of patient 27. B: a mixed viral population including virions with wild-type (TGGGG) and double mutation (TAGGA) from liver of patient 7. C: pre-core mutant HBV containing a single mutation at position 1896 (TAGGG) from liver of patient 6.

The presence of circulating HBeAg masked by its antibody as immune complexes was tested in patients with wild-type HBV in serum or in liver samples, and all of them resulted negative (data not shown).

Twenty-seven patients (60%) were coinfecting simultaneously with HDV, HCV or HIV (Table 3). In most of these coinfecting anti-HBe patients, the predominant HBV genome was the wild-type HBV (58% wild-type vs 30% mutant HBV) as in the patients without superinfection. Furthermore, concordance in the distribution of wild-type

and pre-core mutants in serum and liver samples was similar between coinfecting and non-coinfecting patients (Table 3).

When comparing the characteristics of patients with a predominance of each genome, it was observed that the ALT level was higher ($p < 0.01$) (Table 4) and the duration of the HBsAg carrier state shorter (5.68 ± 4.01 years vs 2.54 ± 1.12 years, $p < 0.02$) in patients with predominance of HBeAg minus in comparison to HBV wild-type. On the other hand, no differences in ALT levels or duration of HBsAg carrier were observed between patients coinfecting with HDV, HCV or HIV and non-coinfecting patients (140 ± 124.3 IU/l vs 125.2 ± 110.5 IU/l, respectively).

The histological diagnosis was similar irrespective of the predominance of each HBV genome (wild-type vs mu-

TABLE 3

Coinfection by HDV, HCV and HIV in the anti-HBe patients included in the study

	WT	HBe-	WT > HBe-	HBe- > WT	HBV-DNA-	Total (n=27)
HDV	1	2	5	4	1	13
HCV	1	-	2	1	1	5
HIV	-	-	-	-	-	1*
HDV+HCV	2	-	1	-	1	4
HDV+HIV	2	-	-	-	-	2
HCV+HIV	-	-	-	1	-	1
HDV+HCV+HIV	-	-	1	-	-	1

WT: wild-type HBV. HBe-: precore mutant HBV. *No serum sample was available in this patient.

TABLE 4

ALT levels in anti-HBe patients with wild-type and mutant HBV genomes

	Serum	Liver	Serum+Liver
WT > HBe-	83 ± 53.36 ^a	99 ± 101.50	79 ± 51.69 ^c
HBe- > WT	177 ± 116.15 ^b	158 ± 101	178 ± 117.82 ^d

WT: Wild-type HBV. HBe-: precore mutant HBV. a vs b, $p < 0.01$. c vs d, $p < 0.01$. Data are expressed as mean IU/l ± SD.

tant HBV: chronic active hepatitis: 56% vs 50%; chronic persistent hepatitis: 6% vs 16%; Ci: 18% vs 33%). No differences were observed in the histological diagnosis between coinfecting patients and those infected with HBV alone (Table 5).

HBeAg-positive patients

HBV-DNA was detected by PCR in the serum samples of three patients. In two of them, amplified DNA hybridized with only wild-type HBV in serum. Moreover, one of these two patients had wild-type virus in the liver biopsy, while a liver sample was not available in the other patient. Anti-HDV, anti-HCV or anti-HIV-1 antibodies were not detected in either case. The remaining patient had a mixed viral population with predominance of wild-type HBV in serum and liver samples. This patient was positive for anti-HCV.

Discussion

In this study we determined the presence and proportion of the predominant HBV pre-core variants in liver and serum samples of patients with chronic hepatitis B, using an oligonucleotide hybridization assay which can be used to test a large number of patients per assay, as previously reported (15,19-21).

We found that most anti-HBe patients have a mixture of wild-type and mutant HBV genomes in serum, with a predominance of the former. In these patients, the HBV variant with the mutation at position 1896 was more frequently detected than that at position 1899, in agreement with other reports (1,22).

In contrast to this study, other authors have found that the predominant HBV genome was the mutant form (1,23). This discrepancy may be due to the geographic distribution of the HBV mutants, which may differ between countries (24) or to differences in the sensitivity of the techniques used (hybridization assay of amplified DNA vs direct sequencing of the PCR products). Another

possibility could be the presence of other HBV pre-core mutants which were not tested in this study, and may affect the detection of those analyzed. However, this is unlikely because the sum of the signals obtained in the hybridization of the samples with the three primers reached 100% and in the samples sequenced other mutations in the pre-core region were not found.

The explanation for the lack of detection of HBeAg in serum from patients with a mixture of wild and mutant HBV genomes is not clear. According to our results, the presence of HBeAg/anti-HBe immune complexes can be excluded, since no positivity to circulating immune complexes was observed in the patients studied. Although it has been reported that almost all anti-HBe patients exhibit circulating immune complexes, the patients in that study had HBV-DNA in serum by dot-blot hybridization (18), in contrast to the patients in the present study in whom this marker was only detectable by PCR. Probably, there is a very low synthesis of viral proteins, and the sensitivity of the assay used could be under the detection limit.

As expected, concordance in the distribution of wild-type HBV and precore mutant genomes in serum and liver samples was observed in most patients (88%), as previously reported (11). In a high percentage of these patients (74%), total correlation between the serum and the liver was found. This seems logical since circulating HBV particles reflect ongoing HBV replication in the liver. In the remaining patients (26%), the genotypes detected in liver were not all found in serum. The reason for this finding is unclear. Whether there are any differences between alternate forms of elimination by the immune system of wild-type HBV with respect to the pre-core variants must be proven in future studies.

In contrast, some of the HBV genotypes detected in serum were not detected in the liver samples in a low percentage of patients (11%). When the relative proportion of each HBV genotype in serum and liver of the same patient was analyzed, there was a concordance in 69% of patients. However, in the remaining 31%, the proportion

TABLE 5

Parameters of liver disease in patients coinfecting by HCV, HDV or HIV

	Patients	ALT	Ci	CAH	CPH	MLC
HDV	13	153±124.85	33%	44%	22%	-
HCV	5	77±31.90	-	50%	-	50%
HIV	1	517	100%	-	-	-
HDV+HCV	4	163.5±70.41	50%	50%	-	-
HDV+HIV	2	102±115.96	-	100%	-	-
HCV+HIV	1	59	100%	-	-	-
HCV+HDV+HIV	1	86	100%	-	-	-

ALT are expressed as mean IU/l±SD. Ci, cirrhosis; CAH, chronic active hepatitis; CPH, chronic persistent hepatitis; MLC, minimal liver changes.

of wild-type and precore mutants differed between serum and liver samples. One explanation may be that different types of HBV genomes were released from storage in other tissues, for example, peripheral blood mononuclear cells, etc. (25), which could induce a difference in the frequency of detection of HBV genomes between serum and liver. If this genome release is indeed the reason for the discrepancy, it will be shown in future studies. A sampling error of the biopsies may also have occurred; the hepatocytes taken may, by chance, have been infected by one HBV genome.

As in other reports, patients with the mutation in the precore region had a significantly higher ALT level than other patients (15,21). Since no differences in ALT levels and histological diagnosis were found when comparing the patients infected with HBV alone with those coinfecting, coinfection with other hepatotropic viruses does not seem to be the reason for higher ALT levels and a higher level of liver damage. This suggests that mutant HBV is more aggressive than the wild-type. On the other hand, the patients with higher ALT levels may also have been in a high immune clearance phase.

We found that patients with the predominant wild-type had been carriers of HBsAg for longer than those with a predominance of HBV mutant. Surprisingly, this finding suggests that a longer HBsAg carrier state may favour wild-type HBV. However, since it is difficult to determine the length of HBsAg carrier state, caution must be used concerning the significance of this finding and it should be proven in future studies.

Finally, we have observed that the predominant viral genome in HBeAg patients was wild-type HBV. This agrees with other studies (14,23). However, one HBeAg patient had a mixed viral population with a predominant wild-type genome. It has been reported that in some patients the mutant HBV emerge during HBeAg/anti-HBe seroconversion from the wild-type virus (26). The HBe peptides may be a target on the cell surface for the immune system (27). In this case, hepatocytes harbouring wild-type HBV might be eliminated by cytotoxic T cells, while hepatocytes harbouring precore mutants may escape immune attack due to the absence of these HBe peptides presented by MHC molecules on the cell membrane. In this HBeAg-positive patient, the mutation may have occurred under the pressure of the immune system before seroconversion to anti-HBe.

In conclusion, there seems to be a concordance between wild-type and precore mutant HBVs in serum and liver. The presence of HBeAg-minus HBV is not always associated with liver damage, so, further studies are needed to investigate whether factors besides precore sequence variation can contribute to liver disease.

Acknowledgements

This work was supported in part by grant 89/1891-2 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (Spain) and by a grant from Fundación para el Estudio de las Hepatitis Virales (Spain).

G. Moraleda is a research fellow from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain). J. Bartolomé and I. Castillo are supported by the Fundación para el Estudio de las Hepatitis Virales, (Spain).

We are grateful to R. Seminago from Hospital de la Santa Cruz y San Pablo (Barcelona) who kindly provided us with the plasmid with the double mutant HBV DNA clone.

References

1. Carman WF, Hadziyannis S, McGarvey MJ, et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989; ii: 588-90.
2. Bhat RA, Ulrich PP, Vyas GN. Molecular characterization of a new variant of hepatitis B virus in a persistently infected homosexual man. *Hepatology* 1990; 11: 271-6.
3. Brunetto MR, Stemler M, Schödel F, et al. Identification of HBV variants which cannot produce precore derived HBeAg and may be responsible for severe hepatitis. *Ital J Gastroenterol* 1989; 21: 151-4.
4. Brunetto MR, Stemler M, Bonino F, et al. A new hepatitis B virus strain in patients with severe anti-HBe positive chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1990; 10: 258-61.
5. Fiordalisi G, Cariani E, Mantero G, et al. 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.
6. Raimondo G, Schneider R, Stemler M, Smedila V, Rodino G, Will H. A new hepatitis B virus variant in a chronic carrier with multiple episodes of viral reactivation and acute hepatitis. *Virology* 1990; 179: 64-8.
7. Tong S, Li J, Vitvitski L, Trepo C. Active hepatitis B virus replication in the presence of anti-HBe is associated with viral variants containing an active pre-c region. *Virology* 1990; 176: 596-603.
8. Tong S, Diot C, Gripon P, et al. *In vitro* replication competence of a cloned hepatitis B virus variant with a nonsense mutation in the distal pre-c region. *Virology* 1991; 181: 733-7.
9. Carman WF, Hadziyannis S, Karayiannis P, et al. Association of the precore variant of HBV with acute and fulminant hepatitis B infection. In: Hollinger FB, Lemon SM, Margolis H, ed. *Viral Hepatitis and Liver disease*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1991: 216-9.
10. Manzin A, Menzo S, Bagnarelli P, et al. Sequence analysis of the hepatitis B virus pre-C region in hepatocellular carcinoma (HCC) and nontumoral liver tissues from HCC patients. *Virology* 1992; 188: 890-5.
11. Ackrill AM, Naoumov NV, Eddleston ALWF, Williams R. Comparison of pre-core/core hepatitis B virus region in liver tissue and serum from patients with chronic hepatitis B infection. *J Hepatol* 1992; 16: 224-7.
12. Bianchi M, De Groote J, Desmet VK, et al. Acute and chronic hepatitis revised. *Lancet* 1977; ii: 914-9.
13. Bartolomé J, Moraleda G, Ruiz-Moreno M, Porres JC, Carreño V. Hepatitis B virus DNA patterns in the liver of children with chronic hepatitis B. *J Med Virol* 1990; 31: 195-9.
14. Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charney P. Nu-

- cleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 1979; 281: 646-50.
15. Brunetto MR, Giarin MM, Oliveri F, et al. Wild-type e antigen-minus hepatitis B viruses and course of chronic hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4186-90.
 16. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edn. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY, 1989.
 17. Farr CJ. The analysis of point mutations using synthetic oligonucleotide probes. In: Mathew C, ed. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 9: *Protocols in Human Molecular Genetics*. Clifton, NJ: The Humana Press Inc., 1991: 69-76.
 18. Castillo I, Bartolomé J, Quiroga JA, Porres JC, Carreño V. Detection of HBeAg/anti-HBe immune complexes in the reactivation of B virus replication among anti-HBe chronic carriers. *Liver* 1990; 10: 79-84.
 19. Li J, Tong S, Vitvitski L, Zoulim F, Trepo C. Rapid detection of infection with hepatitis B virus variants containing a stop codon in the distal preC region. In: Hollinger FB, Lemon SM, Margolis H, ed. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1991: 212-5.
 20. Grötzinger T, Will H. Sensitive method for identification of minor hepatitis B mutant viruses. *Virology* 1992; 187: 383-7.
 21. Lin HJ, Lai CL, Lau JYN, Chung HT, Lauder IJ, Fong MW. Evidence for intrafamilial transmission of hepatitis B virus from sequence analysis of mutant HBV DNAs in two Chinese families. *Lancet* 1990; ii: 208-12.
 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.
 23. Naoumov NV, Schneider R, Grötzinger T, et al. Precore mutant hepatitis B virus infection and liver disease. *Gastroenterology* 1991; 102: 538-43.
 24. Brown JL, Carman WF, Thomas HC. The clinical significance of molecular variation within the hepatitis B virus genome. *Hepatology* 1992; 15: 144-8.
 25. Moraleda G, Bartolomé J, Martinez MG, Porres JC, Carreño V. Influence of hepatitis delta virus replication in the presence of hepatitis B virus DNA in peripheral blood mononuclear cells. *Hepatology* 1990; 12: 1290-4.
 26. Okamoto H, Yotsumoto S, Akahane Y, et al. Hepatitis B viruses with pre-core region defects prevail in persistently infected hosts along with seroconversion to the antibody against e antigen. *J Virol* 1990; 64: 1298-303.
 27. Alberti A. Do single nucleotide mutations result in clinically significant changes in hepatitis B virus pathogenicity? *J Hepatol* 1990; 10: 268-70.

Activation of Liver Disease in Healthy Hepatitis B Surface Antigen Carriers During Interferon-Alpha Treatment

Elena Rodríguez-Iñigo,^{1,3} Javier Bartolomé,^{1,3} Juan Manuel López-Alcorocho,^{1,3} Teresa Cotonat,^{1,3} Horacio Oliva,² and Vicente Carreño^{1,3*}

¹Department of Hepatology, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

²Department of Pathology, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

³Fundación para el Estudio de las Hepatitis Virales, Madrid, Spain

Fifty percent of healthy hepatitis B surface antigen carriers may have histologically proven chronic hepatitis. Our aim was to study the benefit of interferon-alpha in healthy patients. Twenty-nine hepatitis B surface antigen carriers with normal liver enzymes and with serum hepatitis B virus DNA were randomized into two groups: Group I, 14 patients treated with 9 megaunits of interferon alpha-2a thrice weekly for six months, and Group II, 15 control patients. A liver biopsy was obtained from each patient at study initiation. A second biopsy was available in nine treated patients and six controls. During treatment, a significant increase in alanine amino transferase levels was observed in treated patients as compared with the controls ($P < 0.05$). After treatment, transaminase levels decreased to normal values. No differences between treated and control patients were observed in clearance of hepatitis B virus markers. A significant increase in the total histological activity index between base line and final liver biopsies was observed in treated patients ($P < 0.05$). It is concluded that interferon alpha treatment may induce a biochemical and histological activation of liver disease. Accordingly, interferon alpha should not be administered to healthy hepatitis B surface antigen carriers, at least with the schedule used in this work. *J. Med. Virol.* 53:76-80, 1997. © 1997 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: hepatitis B virus; healthy carriers; interferon treatment

INTRODUCTION

Hepatitis B virus (HBV) infection is a worldwide problem, with approximately 350 million carriers. During the natural history of chronic hepatitis B infection, two phases may be recognized. In the first years of the

infection, high replication levels of HBV are detected, with serum hepatitis B e antigen (HBeAg) and HBV DNA and a progressive liver disease. Either spontaneously, in about 25% of patients per year [Realdi et al., 1980; Hoofnagle et al., 1981], or after successful interferon (IFN) alpha treatment (40% of patients treated) [Hoofnagle et al., 1988; Carreño et al., 1994], seroconversion to antibody to hepatitis B e antigen (anti-HBe) with clearance of HBV replication markers may occur and the disease becomes inactive, with alanine aminotransferase (ALT) normalization and improvement in the liver histology. Those patients with hepatitis B surface antigen (HBsAg), anti-HBe and normal ALT may be classified as healthy carriers; however, healthy carriers may have serum or liver HBV DNA. Furthermore, up to 50 % of healthy HBsAg carriers with constantly normal ALT may have histologically proven chronic hepatitis [De Franchis et al., 1980].

No therapeutic attempt has been made to clear HBV DNA and improve the possible histological lesion in healthy carriers.

The aim of our study was to determine the possible benefit (virological and histological) of IFN alpha for the treatment of healthy HBsAg carriers as compared with untreated carriers.

MATERIALS AND METHODS

The sample size was calculated by a computer, using the EPISTAT program. Considering a possible dropout rate of about 20%, and assuming no loss of HBV DNA in control patients and a 40% HBV DNA clearance rate in treated patients, a minimum of 14 patients and 14 controls were required to detect a significant difference at a 95% confidence interval with a power of 80%. Accordingly, in the study were included 29 con-

*Correspondence to: Dr. Vicente Carreño, Department of Hepatology, Fundación Jiménez Díaz, Avda. Reyes Católicos, 2, 28040, Madrid, Spain.

Accepted 28 April 1997

TABLE I. Base Line Features of Patients

	Treated (n = 14)	Controls (n = 15)	P
Age (years) ^a	39.6 ± 12.0	39.4 ± 11.5	n.s.
Sex (M/F)	10/4	6/9	n.s.
ALT (IU/L) ^a	31.6 ± 13.0	25.7 ± 7.8	n.s.
Time with normal ALT levels (months) ^{a,b}	49.0 ± 38.7	82.8 ± 51.1	n.s.
Histology			
Minimal chronic hepatitis			
No fibrosis	9	8	n.s.
Mild fibrosis	2	5	n.s.
Moderate fibrosis	1	—	n.s.
Severe fibrosis	—	1	n.s.
Mild chronic hepatitis			
No fibrosis	2	1	n.s.
Histological activity index ^a	2.5 ± 0.9	3.2 ± 1.1	n.s.

^aMean value ± SD.

^bTime elapsed since the discovery of serum HBsAg in each case.

secutive healthy HBsAg and anti-HBe positive patients without HBV DNA detectable by dot-blot hybridization with constantly normal ALT levels (upper normal limit: 45 IU/L), as checked every six months after the diagnosis, for a mean period of 67.38 ± 51.76 months. For inclusion in the study, the patients also had to have serum and liver HBV DNA detectable by polymerase chain reaction (PCR), as well as histologically proven damage according to Desmet et al. [1994] (Table I) in a liver biopsy obtained within six months of entry to the study. The patients included had never been treated with an antiviral or immunosuppressive therapy. The base line characteristics of the patients are summarized in Table I. Clinical and biochemical analyses were performed monthly during therapy and the 6 months of post-treatment follow-up. A second liver biopsy was obtained from 15 patients (nine treated and six controls) from 7 to 14 months after therapy (mean: 11.3 ± 2.6 months in treated patients and 9.2 ± 4.1 months in controls). Histological activity index in the first and final liver biopsies was assessed according to Knodell et al. [1981].

The patients were randomized into two groups: Group I, 14 patients treated with 9 megaunits of recombinant IFN alpha-2a (Roferon A, Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) three times weekly for six months, and Group II, 15 untreated patients who served as controls and were studied under the same conditions as the patients treated. All patients gave written informed consent, and the trial was approved by the ethics committee of the hospital.

HBsAg, HBeAg and anti-HBe were tested by commercial radioimmunoassay (Abbott Laboratories, North Chicago, IL). Anti-IFN antibodies were tested by enzyme immunoassay (Anawa Biochemical, Zürich, Switzerland). Liver function tests were analyzed by standard methods (Smac 20, Technicon, New York, NY).

Viral DNA from serum samples was isolated as described elsewhere [López-Alcorocho et al., 1994]. Liver HBV DNA was isolated using the method described

previously [Bartolomé et al., 1990]. The total DNA concentration isolated from the liver biopsies was determined measuring its absorbance at 260 nm. The pre-core region of the HBV genome was amplified by PCR in a final volume of 50 µL containing 10 µL of serum DNA or 1 µg of liver DNA samples, 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 200 µmol/L dNTPs, 0.5 Units of Taq DNA polymerase (Promega Co., Madison, WI) and 0.2 µmol/L of each primer M2 (nucl. pos. 2370–2394) and M3 (nucl. pos. 1730–1754), for 30 cycles (94°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 1.5 min). A second round of PCR was carried out with 10 µL of the first PCR product, using primers B1 (nucl. pos. 1776–1804) and BC1 (nucl. pos. 1955–1974) for 30 cycles (94°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 1.5 min). The nucleotide position of the primers is stated according to Ono et al. [1983].

In order to avoid false positive results, the Kwok and Higuchi [1989] contamination-prevention measures were followed. As negative controls, three serum samples from healthy donors without HBV markers were included in each PCR assay. All serum samples were tested in duplicate and analyzed in a blinded fashion.

The predominant HBV pre-core variant, with a single change from G to A at position 1896, was determined in the base line and final samples by a specific oligonucleotide hybridization assay of nested PCR products, using probes for the wild-type HBV and pre-core mutant (G to A substitution at position 1896), as described previously [López-Alcorocho et al., 1994].

The Chi-square and Fisher's exact tests were used for comparison of proportions. Continuous variables were analyzed by Student's *t*-test.

RESULTS

The base line characteristics were similar in both groups (Table I). Surprisingly, after one month of treatment, a significant increase in ALT was observed in the treated patients, while no changes were found in the controls (treated vs. controls, 51.92 ± 31.39 vs. 25.13 ± 8.20 IU/L; *P* < 0.01) (Fig. 1). This trend remained the same during the entire treatment period, and the ALT values were always statistically higher than the base line levels (with the exception of the last serum sample of treatment). In contrast, no changes in the ALT levels were observed in the controls during these 6 months, and the differences with respect to those of the treated patients were always significant (Fig. 1).

After three months of IFN alpha therapy, 6/14 treated patients (43%) had abnormal ALT levels, but this occurred in none of the controls (*P* < 0.05) (Fig. 2). In the final sample treatment, 5/14 patients from the treated group (36%) had abnormal ALT levels, while all the controls continued to have normal ALT values (*P* < 0.05). After treatment end, the ALT levels decreased progressively, and, at twelve months of follow-up, all treated patients, as well as the controls, had normal ALT (Fig. 2).

With respect to serum HBV DNA, one of the treated

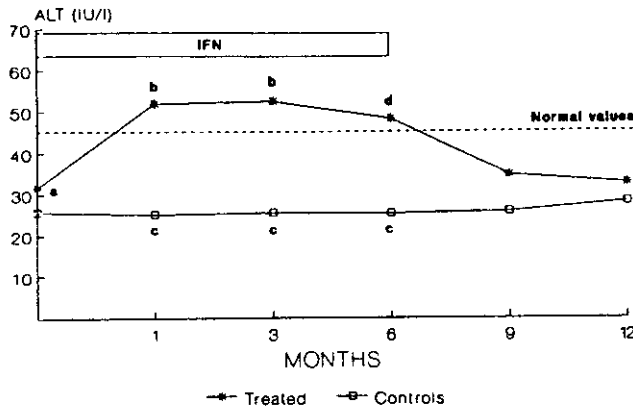


Fig. 1. Changes in ALT levels during treatment and follow-up periods. a vs. b: $P < 0.01$; b vs. c: $P < 0.01$; d vs. c: $P < 0.05$ (upper normal limit of ALT: 45 IU/L).

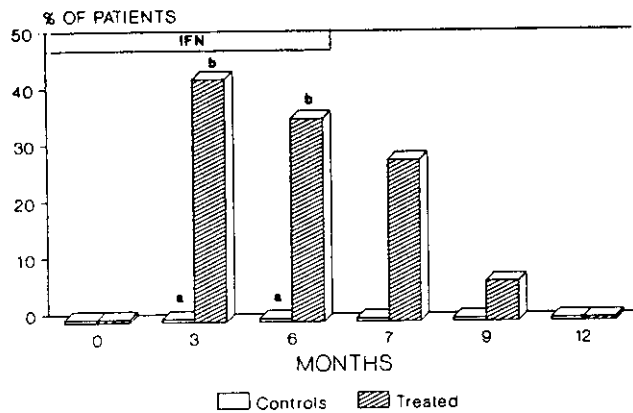


Fig. 2. Percentage of patients with abnormal ALT levels during treatment and follow-up. a vs. b: $P < 0.05$.

patients (7%) became negative at the end of follow-up, while another lost serum HBV DNA at the end of treatment, with reappearance at the end of follow-up. None of the controls cleared serum HBV DNA. Serum HBsAg became undetectable in 3/14 (21%) treated patients and 2/15 (13%) controls without significant differences between the groups. No correlation between HBV DNA, or HBsAg clearance, and liver histology or known duration of the HBsAg carriage was observed (data not shown).

A second liver biopsy was obtained from nine treated patients and six controls. When comparing the total histological activity index of the base line and final biopsies, a significant increase was observed in the treated patients (base line 2.50 ± 0.98 vs. final 3.80 ± 2.00 ; $P < 0.05$) but not in the controls (base line 3.20 ± 1.10 vs. final 3.83 ± 1.34 ; n.s.). This increase was at expense of periportal necrosis, portal inflammation and fibrosis although the increase of each individual score did not reach statistical significance (Table II). No relation was found between the time of the second liver biopsy and deterioration of liver.

With respect to the HBV pre-core genotypes, in the base line sample, 34% of the patients had wild-type

HBV and 48% a mixture of wild-type and pre-core mutant; in five cases no serum was available for HBV genotyping. When comparing the HBV genotype distribution between treated patients with or without an ALT increase during therapy, no significant differences were observed (ALT increase: wild-type, 33%; mixture, 67%; no ALT increase: mixture, 100%). No substantial changes in HBV genotype distribution were observed when comparing the base line and final serum samples (this latter taken at the treatment end) in either treated or control patients (Table III).

The secondary effects were as described previously with IFN [Quesada et al., 1984]. Four treated patients developed anti-IFN antibodies (three of these had an ALT increase during treatment). One of these four patients cleared HBsAg. In addition, there was no relation between the appearance of anti-IFN antibodies and liver histology.

DISCUSSION

Healthy HBsAg carriers with anti-HBe have a generally good prognosis without developing liver disease [Lok and Lai, 1988]. However, as many as 50% of these patients may have histologically proven liver disease even in the presence of constantly normal ALT levels [De Franchis et al., 1980]. Furthermore, reactivation of HBV in healthy carriers with an increase in ALT and the development of active chronic hepatitis have been reported [Davis et al., 1984; Castillo et al., 1990]. In addition, between 50 and 70% of HBsAg healthy carriers may have serum HBV-DNA as detected by PCR [Chemin et al., 1991; Luo et al., 1992]. For all these reasons, a controlled study of IFN alpha treatment was undertaken in healthy HBsAg, anti-HBe carriers with normal ALT, HBV DNA in serum and liver, and histologically proven liver damage.

After 1 month of treatment, a significant increase above the upper limits of normality in ALT took place in treated patients and after three months as many as 43% of these patients had abnormal ALT levels. However, all the untreated controls continued to have normal ALT during the study, with significant differences between both groups. This result demonstrates that IFN alpha treatment of HBsAg healthy carriers induces a biochemical activation of the liver disease. An explanation for this finding is not clear but several possibilities may be considered. The presence of pre-core HBV mutants has been associated with acute fulminant hepatitis [Yoshida et al., 1992; Uchida et al., 1993] and with severe chronic hepatitis [Omata et al., 1991]. However, pre-core mutants were found in 48% of the healthy HBsAg carriers with minimal liver damage and normal ALT. This finding is in agreement with previous reports [Tur-Kaspa et al., 1992] and would suggest that the presence of pre-core mutants alone is not necessarily associated with aggressive liver disease. On the other hand, ALT increase during the IFN alpha therapy may be due to the appearance of HBV escape mutants under the immunological pressure of IFN alpha, as has been described previously [Günther

TABLE II. Scoring of Histological Activity Index Components in the Base Line and Final Liver Samples in Treated and Control Patients

	Treated (n = 14)		Controls (n = 15)	
	Base line	Final	Base line	Final
Periportal necrosis	0.20 ± 0.44	0.78 ± 1.64	0.33 ± 0.52	0.17 ± 0.41
Intralobular degeneration	1.22 ± 0.83	1.11 ± 0.78	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
Portal inflammation	0.44 ± 0.53	0.78 ± 0.97	1.17 ± 0.98	1.50 ± 1.25
Fibrosis	0.55 ± 0.73	0.89 ± 1.17	0.83 ± 0.41	1.17 ± 0.41
Total	2.50 ± 0.98 ^a	3.80 ± 2.00 ^b	3.20 ± 1.10	3.83 ± 1.34

^a vs. ^b *P* < 0.05.

TABLE III. Changes in HBV Pre-core Genotypes in Treated and Control Patients

	Treated (n = 14)		Controls (n = 15)	
	Base line	Final	Base line	Final
Wild-type	3 (21%)	2 (14%)	7 (46%)	—
Mixture	10 (72%)	10 (72%)	4 (27%)	15 (100%)
Not done	1 (7%)	2 (14%)	4 (27%)	—

et al., 1992]. We did not find differences at least in the pre-core region when comparing the base line and final samples; thus, escape mutants in this region of the HBV genome do not seem to play a role in the ALT increase observed in our patients. However, the association of mutations in other regions of the viral genome with disease activity cannot be discarded. Another possibility is that IFN alpha induces an immune stimulation with a better expression of the HLA-Class I molecules and recognition by T lymphocytes with clearance of HBV [Pignatelli et al., 1986]. However, this hypothesis appears unlikely because, were this the case, HBV clearance would be achieved. In this context no significant differences in the frequency of HBsAg negativization or serum HBV DNA clearance were observed between treated and control healthy HBsAg carriers. Finally, several investigators [Real et al., 1986; Kabbash et al., 1988; Leventhal et al., 1988] found that IFN alpha treatment may lead to liver toxicity, with an ALT increase in different diseases. In this sense, it has been reported that IFN alpha may increase ALT levels in as many as 64% of patients with recurrent respiratory papillomatosis who had normal base line ALT values and were treated with a similar dose and type of IFN alpha as were used in our study, and for the same treatment period [Leventhal et al., 1988]. Moreover, IFN alpha has been used to treat the AIDS-associated Kaposi's sarcoma, and a direct relation between ALT increase and IFN treatment was reported in these patients [Real et al., 1986; Kabbash et al., 1988]. Accordingly, direct toxicity of IFN alpha in the liver may also explain the increase in ALT which we observed in HBsAg healthy carriers with a normal base line level of ALT. In favour of this hypothesis is the fact that the increase in ALT levels was transitory, all patients having normal ALT six months after IFN alpha treatment.

With respect to liver histology, a deterioration was found when comparing the base line and final liver biopsies of treated patients, while no significant

changes were observed in the liver biopsies of controls. The increase in histological activity was at the expense of periportal necrosis portal, inflammation and fibrosis. Therefore, the histological damage induced during IFN alpha treatment of HBsAg healthy carriers is not transitory, lasting for at least six months after treatment end. However, we cannot discard a regression in the liver histology thereafter, as occurred with the ALT increase.

For the above reasons, IFN alpha treatment should not be administered, at least with the schedule used in this work, to HBsAg healthy carriers with normal ALT, irrespective of the presence of a chronic hepatitis or serum HBV DNA. In the future, other drugs with specific antiviral effects and a lack of hepatotoxicity such as lamivudine [Schalm et al., 1995] may be attempted in these patients.

ACKNOWLEDGMENTS

J.M. López-Alcorocho is a research fellow of Fundación Conchita Rábago. This work was supported in part by a kindly donation of Mr. Juan Barrado González.

REFERENCES

- Bartolomé J, Moraleda G, Ruiz-Moreno M, Porres JC, Carreño V (1990): Hepatitis B virus DNA patterns in the liver of children with chronic hepatitis B. *Journal of Medical Virology* 31:195-199.
- Castillo I, Bartolomé J, Quiroga JA, Porres JC, Carreño V (1990): Detection of HBeAg/anti-HBe immune complexes in the reactivation of hepatitis B virus replication among anti-HBe chronic carriers. *Liver* 10:79-84.
- Carreño V, Bartolomé J, Castillo I (1994): Long-term effect of interferon therapy in chronic hepatitis B. *Journal of Hepatology* 20: 431-435.
- Chemin I, Baginski I, Petit MA, Zoulim F, Pichoud C, Capel F, Hantz O, Trepo C (1991): Correlation between HBV-DNA detection by polymerase chain reaction and pre-S1 antigenemia in symptomatic and asymptomatic hepatitis B virus infection. *Journal of Medical Virology* 33:51-57.
- Davis JM, Hoofnagle JH, Waggoner JG (1984): Spontaneous reactivation of chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 86: 230-235.
- De Franchis R, D'Arminio A, Vecchi M, Ronchi G, Del Ninno E, Paravicini A, Ferroni P, Zanetti AR (1980): Chronic asymptomatic HBsAg carriers: Histologic abnormalities and diagnostic and prognostic value of serologic markers of the HBV. *Gastroenterology* 79:521-527.
- Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ (1994): Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 19:1513-1520.
- Gunther S, Maisel H, Reup A, Miska S, Krüger DH, Will H (1992): Frequent and rapid emergence of mutated pre-C sequences in HBV from e-antigen positive carriers who seroconverted to anti-HBe during interferon treatment. *Virology* 187:271-279.
- Hoofnagle JH, Dusheiko GM, Seeff LB, Jones EA, Waggoner JG.

- Bales ZB (1981): Seroconversion from hepatitis B e antigen to antibody in chronic type B hepatitis. *Annals of Internal Medicine* 94:744-748.
- Hoofnagle JH, Peters M, Mullen KD, Jones DB, Rustgi V, Di Bisceglie A, Hallahan C, Park Y, Meschievitz C, Jones EA (1988): Randomized controlled trial of recombinant human alpha-interferon in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 95:1318-1325.
- Kabbash L, Desalis B, Shideler J, Gilmore N (1988): AIDS-associated Kaposi's sarcoma: Treatment with moderate doses of recombinant interferon alpha-2a. *Clinical and Investigative Medicine* 11 (Suppl.4):C6.
- Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J (1981): Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1:431-435.
- Kwok J, Higuchi R (1989): Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237-238.
- Leventhal BG, Kashima HK, Weck PW, Mounts P, Whisnant JK, Clark KL, Cohen S, Dedo HH, Donovan DJ, Fearon BW, Gardiner LJ, Lusk RP, Muntz HR, Richardson MA, Singleton GT, Yonkers AJ, Wold D (1988): Randomized surgical adjuvant trial of interferon alfa-n1 in recurrent papillomatosis. *Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 114:1163-1169.
- Lok ASF, Lai CL (1988): A longitudinal follow-up of asymptomatic hepatitis B surface antigen-positive Chinese children. *Hepatology* 8:130-133.
- López-Alcorocho JM, Moraleta G, Bartolomé J, Castillo I, Cotonat T, Aguilar J, Ortega E, Pons JA, Salmerón J, Vázquez-Iglesias JL, Carreño V (1994): Analysis of hepatitis B precore region in serum and liver of chronic hepatitis B virus carriers. *Journal of Hepatology* 21:353-360.
- Luo KX, Zhou R, Liang ZS, Jiang S (1992): Correlation between the prevalence of serum HBV DNA and immunoserologic HBV markers in the subjects with or without hepatitis. *Immunological Investigations* 21:275-281.
- Omata M, Ehata T, Yokosuka O, Hosoda K, Ohto M (1991): Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. *New England Journal of Medicine* 324:1699-1704.
- Ono Y, Onda H, Sasada R, Igarashi K, Sugino Y, Nishioka K (1983): The complete nucleotide sequence of the cloned hepatitis B virus DNA; subtype adr and adw. *Nucleic Acids Research* 11:1747-1757.
- Pignatelli M, Waters J, Brown D, Lever A, Iwarson S, Schaff Z, Gerety R, Thomas HC (1986): HLA class I antigens on hepatocyte membrane expression during interferon therapy of chronic hepatitis B. *Hepatology* 6:349-353.
- Quesada JR, Reuben J, Manning JT, Hersh EM, Gutterman JU (1984): Alpha interferon for induction of remission in hairy-cell leukemia. *New England Journal of Medicine* 310:15-18.
- Real FX, Herbert HF, Krown SE (1986): Kaposi's sarcoma and the acquired immunodeficiency syndrome: Treatment with high and low doses of recombinant leukocyte A interferon. *Journal of Clinical Oncology* 4:544-551.
- Realdi G, Alberti A, Rugge M, Bortolotti F, Rigoli AM, Tremolada F, Ruol A (1980): Seroconversion from hepatitis B e antigen to anti-HBe in chronic hepatitis B infection. *Gastroenterology* 79:195-199.
- Schalm SW, de Man RA, Heijtkink RA, Niesters HG (1995): New nucleoside analogues for chronic hepatitis B. *Journal of Hepatology* 22:52-56.
- Tur-Kaspa R, Klein A, Aharonson S (1992): Hepatitis B virus precore mutants are identical in carriers from various ethnic origins and are associated with a range of liver disease severity. *Hepatology* 16:1338-1342.
- Uchida T, Age TT, Becker SO, Hirashima M, Shikata T, Komine F, Moriyama M, Arakawa Y, Takase S, Mima S (1993): Detection of precore/core-mutant hepatitis B virus genome in patients with acute or fulminant hepatitis without serological markers for recent HBV infection. *Journal of Hepatology* 18:369-372.
- Yoshihara M, Sekiyama K, Sugata F, Okamoto H, Yamamoto K, Yatsumoto S (1992): Reactivation of precore mutant hepatitis B virus leading to fulminant hepatic failure. *Digestive Diseases and Sciences* 37:1253-1259.

Efficacy of prolonged interferon-alpha treatment in chronic hepatitis B patients with HBeAb: comparison between 6 and 12 months of therapy

J. M. Lopez-Alcorocho, J. Bartolome, T. Cotonat and V. Carreño¹ ¹Hepatology Unit, Fundación Jiménez Díaz, and ²Fundación para el Estudio de las Hepatitis Virales, Madrid, Spain

SUMMARY. We compared the response and the relapse rates of HBeAb-positive patients treated with interferon-alpha for 6 or 12 months. Thirty-eight HBeAb-positive patients with chronic hepatitis B were randomly allocated into two groups: Group I (19 patients receiving 10 MU of recombinant interferon-alpha 2b three times a week for 2 months, followed by 5 MU three times a week for 2 months and then 3 MU three times a week for 2 months); Group II (19 patients receiving 10 MU of recombinant interferon-alpha 2b three times a week for 2 months, followed by 5 MU three times a week for 2 months and then 3 MU three times a week for 8 months). At the end of treatment,

alanine aminotransferase normalization was higher but not more significant in Group I than in II (53% vs 26%), while hepatitis B virus DNA clearance was similar in both groups (21% in Group I vs 26% in Group II). However, at 12 months of follow-up, biochemical relapses occurred only in Group I (60% vs 0% in Groups I and II, respectively). Five complete responders cleared hepatitis B surface antigen at that time. In conclusion, prolonged treatment of HBeAb patients is efficient in reducing the biochemical relapse.

Keywords: HBeAb patients, hepatitis B virus, interferon, precore mutants, polymerase chain reaction.

INTRODUCTION

Several antiviral agents have been used in the treatment of chronic hepatitis B virus (HBV) infection with active viral replication. Among these, recombinant interferon-alpha (IFN- α) appears to be the most effective therapy. In this context, approximately 35-50% of HBeAg-positive patients respond to this treatment, with ALT normalization, loss of serum HBV DNA and HBeAb seroconversion [1]. There have also been reports of the use of IFN- α in HBeAb positive patients with serum HBV DNA detectable by dot-blot hybridization, with different treatment schedules and doses (3-18 MU of interferon for 3-6 months) [2-5]. Loss of HBV DNA and ALT normalization were observed in 57-100% of these patients. However, in most of these cases, the response was transient, because as many as 90% of the responder patients relapsed after therapy.

Persistence of viraemia in HBeAb positive patients is

associated with the presence of pre-core mutants [6]. The HBV pre-core variant most frequently isolated from HBeAb-positive patients is a point mutation from G to A at position 1896; this results in the absence of hepatitis B e antigen (HBeAg) production, due to the appearance of a new stop codon [7]. It has been reported that high levels of pre-core mutant in the total viral population may influence the long-term response to IFN- α treatment in these patients [8]. Therefore, new schedules with higher doses and longer periods of IFN therapy should be tested to avoid the high percentage of relapse after therapy.

The aim of this study was to compare the response between two groups of HBeAb positive patients treated with recombinant IFN- α 2b for 6, or 12, months, respectively.

PATIENTS AND METHODS

The sample size was calculated using the EPISTAT program. Considering a possible drop-out rate above 25%,

Correspondence: Dr V. Carreño, Hepatology Unit, Fundación Jiménez Díaz, Avda. Reyes Católicos, 2, 28040, Madrid, Spain

and assuming that responder patients treated for 6 months show 80% relapse [2–5] and with an expected relapse of 50% in patients treated for 12 months, a minimum of 16 patients were needed in each group to detect a significant difference at the 5% level. Accordingly, 38 consecutive HBeAb positive patients with chronic HBV histologically proven according to international criteria [9], and with abnormal ALT levels were included in this trial. No patient had previously been treated, and all had HBV DNA detectable in serum only by PCR. None of the patients had antibodies against the hepatitis delta virus (anti-HDV), hepatitis C virus (anti-HCV), or the human immunodeficiency virus type-1 (anti-HIV-1).

The patients were randomly separated into two different treatment schedules with recombinant IFN- α 2b (Intron-A, Schering Plough, Kenilworth, NJ): Group I (19 patients), received 10 MU of IFN-2b three times a week for 2 months, followed by 5 MU three times a week for 2 months and then 3 MU three times a week for another 2 months; and Group II (19 patients), received 10 MU of IFN-2b three times a week for 2 months, followed by 5 MU three times a week for 2 months and then 3 MU three times a week for 8 months. Patients were followed for 12 additional months: thus, the total duration of the study was of 18 and 24 months in Groups I and II, respectively. The patients gave written informed consent, and the trial was approved by the hospital Ethics Committee. Clinical and biochemical analyses were performed monthly during therapy and monthly as well during the 12 months of post-treatment follow-up.

HBsAg, HBeAg, HBeAb and anti-HDV were tested by commercial radioimmunoassay (Abbott Laboratories, North Chicago, IL). Anti-HIV-1 and anti-HCV were detected by commercial enzyme linked immunoassays (Abbott Laboratories and Ortho Diagnostics Systems, Raritan, NJ). Anti-IFN antibodies were tested in serial 2-fold dilutions (starting at 1 : 5) by an antiviral neutralization bioassay of 5 units of recombinant IFN- α 2b on A549 lung carcinoma cells infected with the encephalomyocarditis virus [10]. Liver functions tests were analysed by standard methods (Smac 20, Technicon, New York, NY).

Viral DNA from serum samples was isolated as described elsewhere [11]. HBV DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) in a final volume of 50 μ l containing 10 μ l of serum DNA sample, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1% Triton

X-100, 200 μ M dNTPs, 0.5 units of Taq DNA polymerase (Promega Co., Madison, WI) and 0.2 μ M of each primer M2 (nucl. pos 2370–2394) and M3 (nucl. pos. 1730–1754), for 30 cycles (94°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 1.5 min). A second round of PCR was performed with 10 μ l of the first PCR product, using primers B1 (nucl. pos. 1776–1804) and BC1 (nucl. pos. 1955–1974) for 30 cycles (94°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 1.5 min). Nucleotide position of the primers is given according to Ono *et al.* [12].

To avoid false-positive results, the Kwok & Higuchi contamination-prevention measures were followed [13]. As negative controls, three serum samples from healthy donors without HBV markers were included in each PCR assay. All serum samples were tested in duplicate and analysed in a blinded fashion.

The predominant HBV pre-core variant, with a single change from G to A at position 1896, was detected in the basal sample by a specific oligonucleotide hybridization assay of nested PCR products, using probes for the wild-type HBV and pre-core mutant (G to A substitution at position 1896), as previously described [11].

Response to the treatment was classified as follows: biochemical response, when ALT levels decreased to normal values (≤ 45 IU/l); virological response, when loss of serum HBV DNA by PCR occurred; and complete response, when biochemical and virological response concurred. A biochemical relapse was defined as a situation in which a patient who had ended the treatment with normal ALT had a subsequent increase in ALT above normal values.

Results were analysed on an intention-to-treat basis. χ^2 and Fisher's exact tests were used for comparison of proportions. Continuous variables were analysed by the Student's *t*-test.

RESULTS

In the basal sample, no significant differences with respect to the epidemiological, clinical and virological characteristics of the patients were observed between both treatment groups (Tables 1 and 2). All but five patients from Group II finished the treatment. Three of these five patients left the study voluntarily (one in the first month of treatment, another patient in month 4 and another dropped out in month 5). Another patient left the study in month 2 of therapy because of neuropsychiatric disorders.

	Group I	Group II
Number of patients	19	19
Age* (years)	37.26 ± 11.36	31.21 ± 14.02
Range	(20–56)	(20–64)
Male/Female	17/2	16/3
Time of HBsAg carriage* (months)	67.80 ± 55.48	61.58 ± 47.72
Range	(9–216)	(14–144)
ALT* (IU/l)	146.10 ± 150.70	112.95 ± 89.51
Range	(51–615)	(49–371)
Epidemiology		
Parenteral exposure	7	6
Intrafamilial	2	4
Unknown	10	9

*Expressed as mean ± SD.

Table 2 Histological diagnosis of the patients included in the study

	Group I	Group II
Minimal chronic hepatitis		
with no fibrosis	2	1
with mild fibrosis	1	5
with severe fibrosis	1	0
with cirrhosis	1	1
Mild chronic hepatitis		
with no fibrosis	3	4
with mild fibrosis	7	5
with severe fibrosis	0	1
Moderate chronic hepatitis		
with no fibrosis	2	0
with mild fibrosis	1	1
with cirrhosis	1	0
Severe chronic hepatitis		
with cirrhosis	0	1

and one died in month 8 of therapy of causes unrelated to the IFN- α therapy.

With respect to ALT, at month 3 of therapy, patients from Group I (6 months of treatment) had more frequent ALT normalization (4/19: 21%) than those from Group II (2/19: 10%), although the difference was not significant. At month 6 of therapy, the frequency of ALT normalization was significantly higher in Group I than in Group II (10/19: 53% vs

3/19: 16%, respectively, $P < 0.05$). When the proportion of ALT normalization was analysed at the end of each treatment period (6 months for Group I and 12 months for Group II), the frequency of ALT normalization was higher in Group I (5/19: 26%) than in Group II (5/19: 26%), but without significant differences. However, during the post-treatment follow-up, the percentage of patients with normal ALT was similar in both groups (9/19: 47% vs 7/19: 37% at 6 months and 9/19: 47% vs 8/19: 42% at 12 months of follow-up in Groups I and II, respectively). (Fig. 1). Oscillations in ALT levels were observed in the non-responders in both groups during follow-up, becoming normal at month 12 of follow-up in 6/18 (30%) biochemical non-responders (three patients from Group I and three from Group II, $P = \text{NS}$). Of the 10 patients from Group I who had ended the treatment with normal ALT, six (60%) had a relapse at 12 months of post-treatment follow-up. However, none of the five patients from Group II who had ended treatment with normal ALT had a relapse during follow-up, the differences were statistically significant with respect to Group I ($P < 0.05$).

All patients from both groups had serum HBV DNA in the basal sample, as detected by PCR. In the final treatment sample, a similar proportion of patients from both groups had cleared serum HBV DNA (4/19: 21% from Group I and 5/19: 26% from Group II). During the post-treatment follow-up, although some intermittency in the positivity of serum HBV DNA took place in patients from both groups, at 6 months of treatment end, 6/19 (31%) patients from Group II had cleared

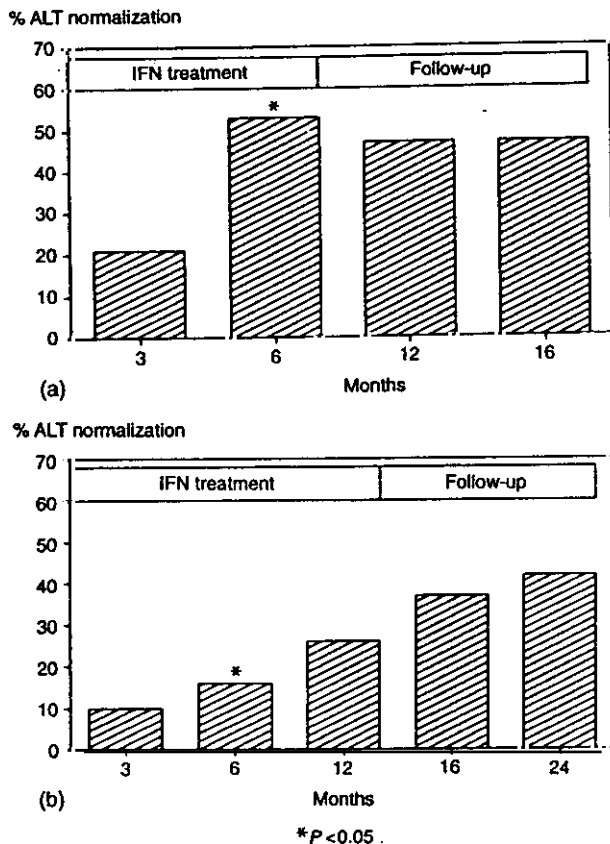


Fig. 1 Proportion of ALT normalization in Group I (a) and Group II (b), over the treatment and follow-up.

serum HBV DNA, while none of those from Group I had done so (31% vs 0%, $P < 0.01$). This tendency remained the same until the end of the study (12 months of post-treatment follow-up), although, at that time, differences between the two groups did not reach statistical significance (2/19: 10% from Group I vs 5/19: 26% from Group II). Six months after the end of treatment, 4/19 (29%) of the patients from Group II, and none of those from Group I, had a complete response (biochemical and virological), without significant differences between the groups. At month 12 of follow-up, the proportion of complete responders was still higher in Group II than in Group I (4/19: 21% vs 2/19: 10%), but without statistical differences.

The distribution of HBV pre-core mutants, or wild-type, was studied in both groups in the basal sample. The majority of patients (12/19: 63% from Group I and 13/19: 69% from Group II) had a mixture of wild-type and pre-core mutants, without differences between the groups. A similar frequency of infection

with wild-type (6/19: 31% in both groups), or HBV pre-core mutant alone (1/19: 6% in Group I and none in Group II), was observed in both groups. The distribution of HBV genotypes was compared with relation to the biochemical response. Non-responder patients more frequently had a mixture of wild-type and pre-core mutants as compared with responders (17/23: 74% vs 8/15: 54%), but without significant differences. Wild-type HBV, or pre-core mutant HBV alone, were detected in a similar proportion between responders and non-responders (6/15, 40% of responders and 6/23, 26% of non-responders were infected only by wild-type, while 1/15 responders and no non-responders were infected by pre-core mutant alone).

With respect to HBsAg, five complete responder patients (two and three patients from Groups I and II, respectively) cleared this antigen at the end of follow-up. Furthermore, 2 years after finishing the treatment, these patients had developed anti-HBsAg antibodies. In contrast, the rest of the patients, even those with a complete response, remained HBsAg-positive in serum.

The treatment was well tolerated by all the patients who finished the study, and no dose modification was needed. None of the patients developed anti-IFN antibodies.

DISCUSSION

Approximately 50% of patients with chronic HBV due to wild type HBV (HBeAg-positive patients) respond to IFN- α , and only 10% relapse after therapy [1]. In contrast 70% of patients with chronic HBV with HBeAb infected mainly by the HBV pre-core mutant normalize the ALT values, but as many as 90% of them relapse after treatment [2]. To date, several reports using different doses of IFN- α in the treatment of HBeAb positive patients have been published, but the patients were never treated for more than 6 months [2-5]. In this trial, we have compared the response and the relapse rate of HBeAb-positive patients treated with recombinant-IFN- α for 6 (Group I) or 12 (Group II) months.

During IFN- α administration, and at treatment end, patients treated from Group I had ALT normalization more frequently than patients from Group II, although without significant differences. The explanation for these differences is not clear, as no basal differences

were observed between the groups, and, at the end of follow-up, the frequency of ALT normalization was similar between both groups.

The overall frequency of ALT normalization (40%) at treatment end was different from that previously reported (57–90%) [2–5]. The reason for this discrepancy is not known. Thus, the total dose of IFN- α administered and the basal characteristics of our patients (years of HBsAg carriage, liver histology, etc.) were similar to those of other reports [2–5]. Moreover, the proportion of patients with HBV pre-core mutants, which may influence response to IFN- α [6], was similar to that in other trials [2–5].

At treatment end, 21% and 26% of patients from Groups I and II, respectively, did not have serum HBV-DNA as detected by PCR. In other trials the percentage of HBV DNA loss was higher (67–90%). However, in none of these studies was HBV DNA studied by PCR, as has been done in the present study.

With respect to the 12 months of post-treatment follow-up, none of the patients treated for 12 months who ended with normal ALT had a relapse in ALT levels, while 60% of those treated for 6 months did so; and the difference was statistically significant. The frequency of relapse obtained in our chronic HBV patients treated for 6 months is similar to that in other reports [2–5]. This result demonstrates that prolonging IFN- α treatment for up to 12 months significantly reduces biochemical relapse at treatment end. It had similarly been demonstrated that treatment of chronic HCV for 12 months significantly suppressed relapse after therapy, as compared with a 6-month period of IFN- α administration [14].

It appears that patients with chronic HBV (HBeAb) and HCV may benefit from prolonged IFN treatment (12 months), but this is not the case for patients infected by wild-type HBV. The different response to IFN- α between patients with HBeAg or HBeAb (pre-core mutant), may be due to differences in the pathogenicity of wild-type or mutant HBV. In this context, it has been reported that, in transfected hepatoma cells, the replication capacity of the pre-core mutant at position 1896 is greater than that for the wild-type virus [15]. In addition, 50% of the patients with chronic HBV and HBeAg who respond to IFN- α had an ALT peak before HBV DNA clearance, while this does not occur with any of our biochemical responders with HBeAb; this is similar to the behaviour observed in patients with chronic HCV [16]. This observation sug-

gests that the mechanism of viral clearance induced by IFN may be different in HBeAg and HBeAb patients.

After 6 months of post-treatment follow-up, the frequency of normal ALT levels and serum HBV-DNA clearance was significantly higher in patients treated for 12 months than in those treated for 6 months. These results again demonstrate that a sustained biochemical and virological response is more often achieved with prolonged treatment. The frequency of virological relapse in both groups at the end of treatment was higher than that for biochemical relapse. This finding is similar to the results reported in other studies and may be explained by the fact that clearance of serum HBV DNA may take several years to occur after ALT normalization. In this context, Michalak *et al.* [17] have detected serum HBV DNA as long as 7 years after the resolution of acute HBV, even in the absence of HBsAg. The clinical relevance of the presence of serum HBV DNA in patients with normal ALT values remains to be elucidated.

We did not find significant differences between responders and non-responders with respect to the frequency of infection with wild-type or pre-core mutant. These results differ slightly from those of Brunetto *et al.* [8], although we did not determine the proportion of each HBV genotype, which may be more important than the presence or absence of each HBV type.

Finally, we found that 16% of the patients treated for 12 months cleared HBsAg, while only 10% of those with a 6-month course did so. These results again suggest that eradication of HBV infection may be more efficient with a prolonged treatment.

ACKNOWLEDGEMENTS

JMLA is a fellow from 'Fundación Conchita Rábago'. This work was supported by a grant from 'Fundación para el Estudio de las Hepatitis Virales'.

REFERENCES

- 1 Perrillo RP. Interferon in the management of chronic hepatitis B: review article. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 577–593.
- 2 Brunetto MR, Oliveri F, Roca G *et al.* Natural course and response to interferon of chronic hepatitis B accompanied by antibody to hepatitis B e antigen. *Hepatology* 1989; 10: 198–210.
- 3 Hadziyannis S, Bramou T, Makris A, Moussoulis G, Zigneno L, Papaioannou C. Interferon alfa-2b treatment

- of HBeAg negative/serum HBV DNA positive chronic hepatitis type B. *J Hepatol* 1990; 11 (Suppl.): S133-S136.
- 4 Fattovich G, Farci P, Rugge M *et al.* A randomized controlled trial of lymphoblastoid interferon-alfa in patients with chronic hepatitis B lacking HBeAg. *Hepatology* 1992; 15: 584-589.
 - 5 Pastore G, Santantonio T, Millela M *et al.* Anti-HBe-positive chronic hepatitis B with HBV-DNA in the serum response to a 6-month course of lymphoblastoid interferon. *J Hepatol* 1992; 14: 221-225.
 - 6 Xu J, Brown D, Harrison T, Liu Y, Dusheiko G. Absence of hepatitis B precore mutants in patients with chronic hepatitis B responding to interferon-alfa. *Hepatology* 1992; 15: 1002-1006.
 - 7 Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S *et al.* Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989; ii: 588-590.
 - 8 Brunetto MR, Giarin M, Saracco G *et al.* Hepatitis B virus unable to secrete e antigen and response to interferon in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1993; 105: 845-850.
 - 9 Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994; 19: 1513-1520.
 - 10 Meager A. Antibodies against interferons: characterization of interferons and immunoassays. In: Clemens MJ, Morris AG, Gearing AJH. eds. *Lymphokines and Interferons. A practical approach*. Oxford: IRL Press, 1987.
 - 11 López-Alcorocho JM, Moraleda G, Bartolomé *et al.* Analysis of hepatitis B precore region in serum and liver of chronic hepatitis B virus carriers. *J Hepatol* 1994; 21: 353-360.
 - 12 Ono Y, Onda H, Sasada R, Igarashi K, Sugino Y, Nishioka K. The complete nucleotide sequence of the cloned hepatitis B virus DNA: subtype adr and adw. *Nucl Acid Res* 1983; 11: 1747-1757.
 - 13 Kwok J, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; 339: 237-238.
 - 14 Kasahara A, Hayashi N, Hiramatsu N *et al.* Ability of prolonged interferon treatment to suppress relapse after cessation of therapy in patients with chronic hepatitis C: a multicenter randomized controlled trial. *Hepatology* 1995; 21: 291-297.
 - 15 Lamberts C, Nassal M, Velhagen I, Zentgraf H, Schröder CH. Precore-mediated inhibition of hepatitis B virus progeny DNA synthesis. *J Virol* 1993; 67: 3756-3762.
 - 16 Di Bisceglie AM, Martin P, Kassianides C *et al.* Recombinant interferon alfa therapy for chronic hepatitis C: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med* 1989; 321: 1506-1510.
 - 17 Michalak TI, Pasquinelli C, Guilhot S, Chisari FV. Hepatitis B virus persistence after recovery from acute viral hepatitis. *J Clin Invest* 1994; 93: 230-239.

Analysis of hepatitis B virus precore variants in hepatitis B e antibody-positive patients treated with prednisone plus interferon

J. M. Lopez-Alcorocho, M. Cabrerizo, J. Bartolome, T. Cottonat and V. Carreño *Hepatology Unit, Fundación Jiménez Díaz and Fundación para el Estudio de las Hepatitis Virales, Madrid, Spain*

Received 26 June 1995; accepted for publication 14 August 1995

SUMMARY. To assess the effects of prednisone and interferon on the distribution of hepatitis B virus (HBV) precore mutants, nine hepatitis B e antibody (HBeAb)-positive patients with HBV chronic infection were studied. Patients were treated with prednisone (30 mg day⁻¹ for 4 weeks, followed by 20 mg day⁻¹ for 2 weeks and by 10 mg day⁻¹ for 1 week), followed by recombinant interferon- α (15 MU thrice per week) for 6 months, without a clearance period. The HBV precore region was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and distribution of the precore mutants was determined by hybridization of PCR products. Moreover, the glucocorticoid-responsive element (GRE) was sequenced to determine whether changes in the sequence were produced at the end of prednisone treatment. During prednisone treatment, changes in alanine transaminase (ALT) were observed in only two patients, in whom ALT decreased to nearly normal values. In three patients ALT normalized at

the end of interferon treatment. At baseline, wild-type HBV alone was detected in one patient, while seven patients were infected by a mixture of wild-type and precore mutants, predominantly wild type. At the end of prednisone treatment, two patients were infected by only wild-type HBV. The proportion of precore mutants decreased in three cases, while no changes were observed in three. At the end of interferon treatment, the precore mutant proportion decreased in the three responders, while tending to increase or remain unchanged in the rest. No significant changes in GRE sequence were found as a result of prednisone treatment. Our results would appear to confirm the role of the immune system in the selection of precore mutants.

Keywords: corticosteroids, glucocorticoid-responsive element, hepatitis B virus, hybridization, interferon, polymerase chain reaction, precore mutants.

INTRODUCTION

Hepatitis B virus (HBV) causes acute and chronic hepatitis in man, and its persistence is related to the development of hepatocellular carcinoma [1]. The viral genome is a small, partially double-stranded DNA molecule of about 3.2 kb in size that replicates by reverse transcription of a pregenome RNA molecule

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; GRE, glucocorticoid-responsive element; HBeAb, hepatitis B e antibody; HBeAg, hepatitis B e antigen; HBsAg, hepatitis B surface antigen; HBV, hepatitis B virus; HcVAb, hepatitis C virus antibody; HDAb, hepatitis delta antibody; PCR, polymerase chain reaction.

Correspondence: Dr V. Carreño, Hepatology Unit, Fundación Jiménez Díaz, Avda. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain.

[2]. The existence of several HBV variants with mutations in open reading frame C (ORF-C) has been described [3]. The most frequent HBV variant isolated from these patients is a transition from guanine to adenine at nucleotide position 1896, which generates a stop codon in the precore region, preventing the synthesis of the hepatitis B e antigen (HBeAg) [4–8]. This variant is sometimes associated with another which has an additional transition from guanine to adenine at position 1899 of the precore region [4, 5, 8]. These HBV precore mutants have been isolated from both HBeAg- and HBeAb-positive patients and commonly coexist with the wild-type HBV [7, 8]. HBeAg and probably HBeAg-derived peptides exposed in the membrane of infected cells are targets for the host immune system

[9,10]. It has been hypothesized that a selective immune response against wild-type HBV-infected hepatocytes plays an important role in the emergence of precore variants [11,12]. To date, no reports have been published concerning the possible effect of prednisone on the HBV precore mutants in HBeAb-positive patients. In addition, the possible changes in the glucocorticoid-responsive element (GRE) of the HBV genome of HBeAb-positive patients during steroid treatment are not known.

In this paper, we have studied the distribution of HBV precore mutants in patient serum taken before and after treatment with prednisone and after interferon therapy. The nucleotide sequence of the putative GRE described in the HBV genome [13–16] was analysed to search for the possible appearance of new HBV strains selected during the treatment with prednisone.

PATIENTS AND METHODS

Patients

Nine HBeAb-positive patients with chronic hepatitis B, histologically proven according to international criteria [17], were included in this study (seven patients had chronic active hepatitis, one chronic persistent hepatitis and one cirrhosis). All patients had serum HBV DNA detectable by PCR using primers from the ORF-S, abnormal ALT levels (mean value 116.67 IU l^{-1}) and were not previously treated. Two patients had antibodies against the hepatitis delta virus (HDAb); two had antibodies against the hepatitis C virus (HCVAb); and one had HDAb and HCVAb. None of the patients presented antibodies against the human immunodeficiency virus type 1 (anti-HIV-1).

The patients were treated in a pilot study with prednisone and recombinant interferon- α 2b (Intron-A, Schering Plough, Kenilworth, NJ) (rIFN), as follows: 30 mg of prednisone daily for the first month, followed by 20 mg daily for 2 weeks, and by 10 mg for the final week. The patients then received 15 MU of rIFN three times a week for 6 months, beginning on the last day of prednisone treatment. The patients gave written, informed consent, and the trial was approved by the hospital ethics committee.

Serum samples for HBV DNA analysis were taken before and at the end of prednisone treatment and at the end of IFN treatment.

Serum markers

HBsAg, HBeAg, HBeAb and HDAb were tested by commercial radioimmunoassays (Abbott Laboratories, North Chicago, IL). Anti-HIV-1 and HCVAb were detected by commercial enzyme-linked immunoassays (Abbott Laboratories and Ortho Diagnostics Systems, Raritan, NJ). Confirmation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) HCAb-positive samples was performed using the recombinant immunoblot assay for HCVAb (RIBA-HCV III, Ortho Diagnostic Systems).

Liver function tests were analysed by standard methods (Smac 20, Technicon, New York, NY).

Serum HBV DNA detection with ORF-S primers

Viral DNA was isolated from 200 μl of serum after digestion with proteinase k (1 mg ml^{-1}) and 1% sodium dodecyl sulphate at 37°C for 2 h. DNA was extracted with phenol, phenol-chloroform (1:1) and ether. After ethanol precipitation in the presence of 2 M ammonium acetate, the pellet was washed with 70% ethanol, vacuum dried and dissolved in 20 μl of distilled water.

The polymerase chain reaction (PCR) was performed in a final volume of 50 μl containing 5 μl of serum DNA sample, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 200 μM dNTPs, 0.5 U of *Taq* DNA polymerase (Promega, Madison, WI) and 0.2 μM of each outer primer G1 and G2 (Table 1), for 40 cycles (94°C , 1.5 min; 55°C , 1.5 min; 72°C , 3 min). Nested PCR was carried out with 20 μl of the first PCR products, using the inner primers G3 and G4 (Table 1), for 40 cycles (94°C , 1.5 min; 56°C , 1.5 min; 72°C , 2 min).

To avoid false-positive results, the contamination prevention measures of Kwok & Higuchi [18] were followed. As negative controls, three serum samples from healthy donors without HBV markers were included in each PCR assay. All serum samples were tested in duplicate and analysed in a blinded fashion.

Detection of HBV precore variants

Viral DNA was isolated as described above, and the precore region was amplified by PCR using primers B1 and BC1 (Table 1) for 40 cycles (94°C , 1.5 min; 55°C , 1.5 min; 72°C , 3 min). The proportion of the predominant HBV precore variants was estimated by a specific oligonucleotide hybridization assay of PCR products, using probes for the wild-type (probe no. 1), single mutant at position 1896 (probe no. 3) and double

Table 1 Sequence of primers and probes used in the study

	Nucleotide position
<i>Precore amplification</i>	
B1: 5'-GGAGGCTGTAGGCATAAAATGGTCTGCGC-3'	1776-1804
BC1: 5'-GGAAAGAAGTCAGAAGGCAA-3'	1954-1974
<i>Probes for HBV precore variants detection</i>	
0: 5'-CAAGCCTCCAAGCTGTGC-3'	1865-1882
1: 5'-TGGCTTTGGGGCATGGAC-3'	1889-1906
2: 5'-TGGCTTTAGGACATGGAC-3'	1889-1906
3: 5'-TGGCTTTAGGGCATGGAC-3'	1889-1906
<i>ORF-S and GRE amplification</i>	
G1: 5'-ATTGCCCTCTCACATCTCGTCAATCT-3'	102-126
G2: 5'-GGGCAACATACCTTGATAATCCATAGAACC-3'	442-472
G3: 5'-ACTTCTCTCAATTTTCTAGC-3'	265-288
G4: 5'-AGGATGAAGAGGAATATGAT-3'	397-417

mutant at positions 1896 and 1899 (probe no. 2), and for a highly conserved sequence on the precore region (probe no. 0), as previously described [8]. The assay was performed in duplicate for each serum sample (one example is shown in Fig. 1).

Cloning and sequencing of the glucocorticoid-responsive element

In order to analyse the GRE sequence of HBV, nested PCR products from ORF-S were purified using the Wizard Magic PCR Preps kit (Promega) and following the instructions supplied by the manufacturers. Purified PCR products were cloned into the PCR-2000 plasmid (TA Cloning, Invitrogen, San Diego, CA) by standard techniques.

Three clones from each PCR product of the basal samples, and from those taken at the end of the prednisone treatment, were sequenced for HBV GRE sequence analysis by the dideoxynucleotide chain-termination method, using the Sequenase kit (United States Biochemical, Cleveland, OH). Verification of the sequences was effected by sequencing both DNA strands.

RESULTS

In the basal sample, a mixture of precore mutants and wild-type HBV was detected in seven of the nine patients, the wild type being the predominant genotype in all but one case. Another patient (patient no. 2) was infected only by the wild-type HBV, and in the remain-

ing patient (patient no. 8) HBV DNA was undetectable, using primers from the precore region (Table 2).

During prednisone treatment, significant changes in ALT levels were observed in only two patients (nos 2

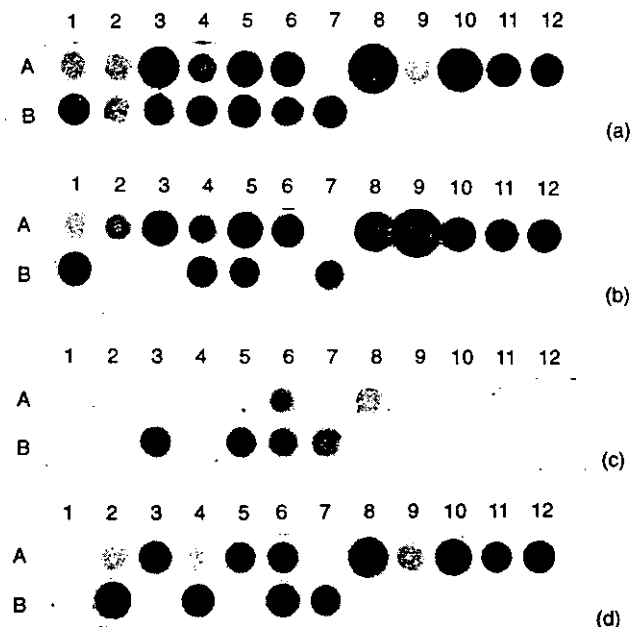


Fig. 1 Oligonucleotide hybridization assay of serum samples. Hybridization was carried out with probes 0 (a), 1 (b), 2 (c) and 3 (d). Lanes: A1-A6 and A8-A12, PCR products from precore region; A7, negative controls; B1, wild-type; B2, single mutant; B3, double mutant; B4, wild-type and single mutant mixture (1:1); B5, wild-type and double mutant mixture (1:1); B6, single and double mutant mixture (1:1); B7, wild-type, single and double mutant mixture (1:1:1). The position of controls is the same in the four filters.

Table 2 ALT values and distribution of predominant precore mutants during treatment of patients included in the study

Patient no.	Basal			End of prednisone			End of interferon		
	ALT	WT (%)	M (%)	ALT	WT (%)	M (%)	ALT	WT (%)	M (%)
1	104	58	41	158	79	20	252	46	53
2	61	100	0	46	100	0	110	87	8
3	137	57	42	159	68	31	82	61	38
4	100	77	22	167	71	28	27	78	22
5	146	34	65	160	45	54	166	42	57
6	274	96	3	214	94	5	NA	NA	NA
7	67	88	11	46	100	0	26	100	0
8	76	—	—	57	42	57	15	58	41
9	85	86	13	92	81	18	65	63	36

ALT values are expressed as IU l⁻¹.

WT, wild-type HBV; M, HBV precore mutants (double and single mutant); NA, not available.

and 7), in whom ALT levels decreased to nearly normal values (Table 2). At the end of the prednisone course, the wild-type HBV was the only genotype detectable in the two patients with almost normal ALT values. The percentage of precore mutants decreased in three cases, while no substantial changes were observed in another three patients. In the remaining patient (patient no. 8), in whom HBV DNA was undetectable in the basal sample, a mixture of wild-type and precore mutants was found in the sample taken at the end of the prednisone treatment (Table 2).

At the end of the IFN course, ALT levels became normal in three patients, but all of these relapsed when therapy was stopped. IFN treatment was interrupted in patient no. 6, after 2 months of therapy, owing to the appearance of anti-smooth muscle antibodies with a titre of 1:160 in association with an increase in ALT levels from 214 to 808 IU l⁻¹. In the sample taken at the end of IFN therapy, the percentage of precore mutants increased in three cases; all three of these patients were non-responders to therapy. In the other two non-responder patients, no significant changes were observed in the proportion of HBV precore mutants. The percentage of precore mutants decreased slightly in two of the three biochemical responders, while in the remaining patient only wild-type HBV was detected, as had previously occurred in the sample taken at the end of the prednisone course (Table 2).

With reference to the GRE sequence, in the basal sample all patients had a wild-type GRE sequence corresponding to the *adw* subtype of HBV [19]. This situa-

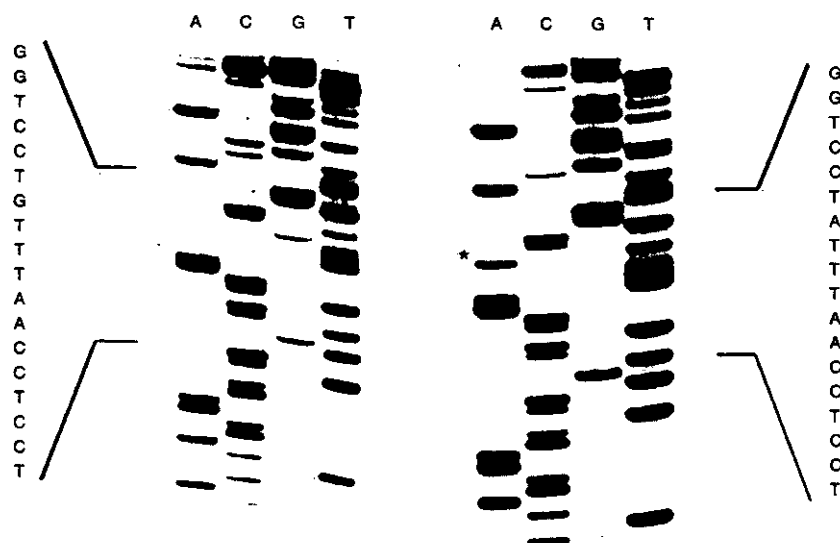
tion remained unchanged at the end of the prednisone course in all but one patient (patient no. 6). In this case, a C to T substitution at position 376 (downstream of the GRE sequence) was observed in the three clones analysed. In one of these clones, an additional G to A change was found at position 363 (at the second hexanucleotide of the GRE sequence) (Fig. 2).

DISCUSSION

Patients with chronic hepatitis B who are HBeAb positive have a poor response to IFN therapy, as up to 90% of responder patients relapse after treatment [20,21]. The reason for this poor response is not clear, although it may be due to a low expression of viral targets for the immunoclearance of infected hepatocytes or to the pathobiology of the HBV infecting these patients [10,12]. The administration of prednisone followed by rIFN in HBeAg-positive patients with high viraemia and low ALT levels has given promising results [22–24].

Prednisone, followed by IFN, has not previously been used in the treatment of anti-HBe-positive patients: accordingly, we administered this combination to anti-HBe-positive carriers. In our study, patients were treated with prednisone, immediately followed by rIFN, without a clearance period, in contrast with the protocol followed previously in other studies [22–24]. The reason for this modification was an attempt to enhance HBV replication, thus perhaps increasing the expression of the T-cell targets on the infected hepatocytes

Fig. 2 Sequence analysis of the HBV glucocorticoid-responsive element. I, wild-type sequence; II, mutant sequence from patient no. 6 with a G to A change at position 363.



and avoiding the previously described acute liver decompensation induced by prednisone withdrawal as a result of immunological rebound [25], as HBeAb-positive patients may have more severe disease than HBeAg-positive patients [26]. However, ALT normalized in only 37% of patients: all still had HBV DNA in their serum and relapsed when treatment was stopped. It may therefore be concluded that the combination of prednisone and rIFN does not improve the results obtained with rIFN alone (55% of response) [27], at least with the schedule used in this study.

On the other hand, in the patients treated in this trial, we analysed the prevalence of wild type and the previously described precore mutants [4–8]. It has been suggested that precore mutants may represent an escape mechanism for HBV under immunological pressure [10]. Therefore, we studied the distribution of wild-type HBV and precore mutants after immunosuppression (prednisone course) or immunostimulation (rIFN course). In the basal sample, all patients but one (who was infected only by wild-type HBV) were infected with a mixture of wild-type and HBV precore mutants, with a predominance of the former in most cases. This result confirms previous observations in our HBeAb-positive population [8]. During the immunosuppression phase, a slight decrease in the precore mutant population was observed in half the cases. This finding may suggest that the immune system plays a role in the selection of precore mutants during the natural history of the HBV chronic infection. However,

this result must be approached with caution because of the small number of patients studied and the relatively short period of immunosuppression (7 weeks).

During the immunostimulation phase, the precore mutant population was observed to behave in two different ways. The percentage of precore mutants tended to decrease in the three biochemical responder patients, while the opposite occurred in the non-responder patient. This finding also suggests an important role for immunological pressure in the selection of precore mutants.

With respect to the GRE sequence, no substantial changes were observed during prednisone treatment: only in one case was a single nucleotide change from C to T at position 376 observed. This change has been previously described in *adw* and *adr* HBV subtypes [28]. In this patient, an additional G to A change was found at position 363 in the second hexanucleotide of the putative GRE of the HBV genome. This change decreases the homology of the HBV GRE with relation to the canonical GRE sequence. This finding shows that corticosteroid treatment does not select HBV variants more likely to be transactivated by steroids.

In summary, prednisone plus rIFN therapy—in the schedule used in this pilot study—does not improve the results obtained with rIFN alone in the treatment of HBeAb-positive patients. Our results seem to confirm the role for immune pressure in the selection of precore mutants, and prednisone treatment does not select any mutant in the GRE of the HBV genome.

ACKNOWLEDGEMENTS

J. M. Lopez-Alcorocho is a fellow of 'Fundación Conchita Rábago'. This study was supported in part by a kind donation from Mr José Luis Beistegui to 'Fundación para el Estudio de las Hepatitis Virales'.

REFERENCES

- 1 Feitelson M. Hepatitis B virus infection and primary hepatocellular carcinoma. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5: 275–301.
- 2 Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B like by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 1982; 29: 403–415.
- 3 Wakita T, Kakumu S, Shibata M *et al.* Detection of pre-C and core mutants of hepatitis B virus in chronic hepatitis B virus carriers. *J Clin Invest* 1991; 88: 1793–1801.
- 4 Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S *et al.* Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989; 2: 588–591.
- 5 Brunetto MR, Stemler M, Bonino F *et al.* A new hepatitis B virus strain in patients with severe anti-HBe positive chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1990; 10: 258–261.
- 6 Akahane Y, Yamanaka T, Suzuki H *et al.* Chronic active hepatitis with hepatitis B virus DNA and antibody against e antigen in the serum. Disturbed DNA synthesis and secretion of e-antigen from hepatocytes due to a point mutation in the precore region. *Gastroenterology* 1990; 90: 1113–1119.
- 7 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: 1338–1342.
- 8 López-Alcorocho JM, Moraleda G, Bartolomé J *et al.* Analysis of hepatitis B precore region in serum and liver of chronic hepatitis B virus carriers. *J Hepatol* 1994; 21: 353–360.
- 9 Milich DR, McLachlan A. HBcAg can function both as a T cell independent and a T cell dependent antigen: HBcAg and HBeAg are cross-reactive at the T cell level. In: Zuckerman AJ, ed. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. New York: Alan Liss, 1988; 645–649.
- 10 Mondelli M, Mieli-Vergani G, Bortolli F *et al.* Specificity of T lymphocyte cytotoxicity to autologous hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection: evidence that T cells are directed against HBV core antigen expressed on hepatocytes. *J Immunol* 1982; 129: 2773–2778.
- 11 Thomas HC. The hepatitis B virus and the host response. *J Hepatol* 1990; 11: S83–S89.
- 12 Alberti A. Do single nucleotide mutations result in clinically significant changes in hepatitis B virus pathogenicity? *J Hepatol* 1990; 10: 268–270.
- 13 Tur-Kaspa R, Burk RD, Shaul Y, Shafritz DA. Hepatitis B virus DNA contains a glucocorticoid-responsive element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 1627–1631.
- 14 Tur-Kaspa R, Shaul Y, Moore DD *et al.* The glucocorticoid receptor recognizes a specific nucleotide sequence in hepatitis B virus DNA causing increased activity of the HBV enhancer. *Virology* 1988; 167: 630–633.
- 15 Tur-Kaspa R, Laub O. Corticosteroids stimulate hepatitis B virus DNA, mRNA and protein production in a stable expression system. *J Hepatol* 1990; 11: 34–36.
- 16 Chou CK, Wang LH, Lin HM, Chi CW. Glucocorticoid stimulates hepatitis B viral gene expression in cultured human hepatoma cells. *Hepatology* 1992; 16: 13–18.
- 17 Bianchi M, De Groote J, Desmet UJ *et al.* Acute and chronic hepatitis revisited. *Lancet* 1977; 2: 914–919.
- 18 Kwok J, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; 339: 237–238.
- 19 Valenzuela P, Quiroga M, Zaldivar J, Gray P, Rutter WJ. The nucleotide sequence of the hepatitis viral genome and the identification of the major viral genes. In: Fields B, Jahnish R, Fox CF, eds. *Animal Virus Genetics*. New York: Academic Press, 1981; 57–70.
- 20 Fattovich G, Brollo L, Alberti A *et al.* Long-term follow-up of anti-HBe-positive chronic active hepatitis B. *Hepatology* 1988; 8: 1651–1654.
- 21 Brunetto MR, Oliveri F, Demartini A *et al.* Treatment with interferon of chronic hepatitis B associated with antibody to hepatitis e antigen. *J Hepatol* 1991; 1: S8–S11.
- 22 Perrillo RP, Schiff ER, Davis GL *et al.* A randomized, controlled trial of interferon alfa-2b alone and after prednisone withdrawal for the treatment of chronic hepatitis B. *New Engl J Med* 1990; 323: 295–301.
- 23 Reichen J, Bianchi L, Frei PC *et al.* Efficacy of steroid withdrawal and low-dose interferon treatment in chronic active hepatitis B. Results of a randomized multicenter trial. *J Hepatol* 1994; 20: 168–174.
- 24 Liaw YF, Lin SM, Chen TJ *et al.* Beneficial effect of prednisolone withdrawal followed by human lymphoblastoid interferon on the treatment of chronic type B hepatitis in Asians: a randomized controlled trial. *J Hepatol* 1994; 20: 175–180.
- 25 Bonino F, Rosina F, Rizzetto M *et al.* Chronic hepatitis in HBsAg carriers with serum HBV-DNA and anti-HBe. *Gastroenterology* 1986; 90: 1268–1273.
- 26 Bird GLA, Smith H, Portmann B, Alexander GJM, Williams R. Acute liver decompensation on withdrawal of cytotoxic chemotherapy and immunosuppressive therapy in hepatitis B carriers. *Q J Med* 1989; 270: 895–902.
- 27 Feinman SV, Berris B, Sooknanan R, Fernandes B, Bojarski S. Effects of interferon-alpha therapy on serum and liver HBV DNA in patients with chronic hepatitis B. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 1477–1482.
- 28 Lauder IJ, Lin HJ, Lau JY, Siu TS, Lai CL. The variability of the hepatitis B virus genome: statistical analysis and biological implications. *Mol Biol Evol* 1993; 10: 457–470.