

MUTANTES DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B EN EL GEN S

David Navarro Ortega, Oscar Esparcia Rodríguez y Sonia Granda Rodríguez

Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario de Valencia. Valencia

La multiplicación del virus de la hepatitis B (VHB) en el individuo infectado está ligada inevitablemente a la generación de "cuasiespecies" genómicas en virtud de la intervención de una transcriptasa inversa en la replicación del DNA viral; la ineficacia con que esta enzima escinde los nucleótidos que inserta incorrectamente en el cDNA durante la retrotranscripción, a lo cual es prona, posibilita que el VHB exhiba una plasticidad genómica inusual para un virus DNA; prueba de ello es la existencia de no menos de 9 subtipos (*ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4*, *adrq+*, *adrq-*), cuya categorización es serológica, y de varios genotipos (A-H) con perfiles filogenéticos bien definidos. Estas variantes, que se originan de forma natural durante el curso de la infección por el VHB, están consolidadas en la naturaleza y presentan una distribución étnica y geográfica características. Junto a estas variantes del VHB, no exentas de interés patogénico, la literatura científica se viene ocupando prolijamente, reflejo del enorme interés que suscita en la comunidad médica, de los denominados mutantes del VHB, los cuales, si bien se generan espontáneamente durante el curso de la infección natural por el VHB, lo hacen con especial frecuencia y eficacia en un ambiente de presión selectiva, propiciado por el uso, hoy ampliamente extendido, de las inmunoprofilaxis activa y pasiva y el tratamiento antiviral.

La mayoría de las mutaciones presentes en estas cepas no acarrear cambios de la secuencia de aminoácidos de la proteína correspondiente, por lo que presuntamente carecen de relevancia clínica; unas cuantas, sin embargo, han sido halladas en cepas del VHB particularmente virulentas (mutantes *pre-core* o *core*), resistentes a ciertos análogos nucleósidos inhibidores de la síntesis del DNA viral como la lamivudina y el famciclovir (mutantes en el gen P, que codifica la polimerasa viral), especialmente vinculadas al desarrollo de hepatocarcinoma (mutantes en el gen X) y, más recientemente, en cepas capaces de eludir la respuesta inmunitaria humoral específica frente al virus (mutantes en el gen S). La trascendencia clínica potencial de estas últimas es fácilmente inferible: pueden infectar a individuos vacunados eficazmente o tratados con gammaglobulinas específicas, causar reinfecciones y ocasionar exacerbaciones o rebotes en el marco de una hepatitis B crónica. Igualmente preocupante es el hecho de que la infección activa por algunas de estas cepas pase inadvertida a las pruebas comerciales que detectan el HBsAg sérico.

El presente comentario, suscitado por el reciente control de calidad (S-1/04), y a modo de revisión, trata sobre las cepas del VHB portadoras de mutaciones en el gen S; la infección de un individuo vacunado satisfactoriamente con anterioridad por una de estas cepas hace posible, si bien transitoriamente, la detección conjunta y exclusiva en el suero del HBsAg y de los anticuerpos que reconocen este complejo antigénico (anti-HBs).

ESTRUCTURA ANTIGÉNICA DEL HBsAg

La membrana del VHB contiene tres proteínas (complejo HBsAg) de diferente tamaño: una pequeña (SHBsAg) de 226 aminoácidos (aas), una mediana (MHBsAg) de 281 aas y otra grande (LHBsAg) de 345 aas, codificadas en el gen S del genoma viral (productos de las regiones S, S/pre-S1 y S-preS1/pre-S2, respectivamente); estas proteínas comparten el extremo carboxi-terminal, pero difieren en la extensión de la región amino-terminal; se

originan como consecuencia del uso alternativo, durante la traducción del RNA viral, de tres codones ATG consecutivos.

A falta de confirmación mediante estudios de cristalografía, el modelo topológico del HBsAg prevé la existencia de una región hidrofílica globular (aas 99 a 169 del SHBsAg), que adopta una configuración en doble lazo y cuya estabilidad aseguran varios puentes disulfuro que se establecen entre 4 de los 8 aminoácidos cisteína ahí ubicados, los cuales están presentes en todos los subtipos conocidos del virus. Esta región, proyectada sobre la superficie de la partícula vírica, contiene no menos de cinco epítopos conformacionales (HBs1 a HBs5), de los cuales un número impreciso (al menos tres) contribuye al ensamblaje del denominado determinante antigénico "a" (delimitado por los aas 121 a 149 de la región S), inequívocamente inmunodominante en el curso de la infección por el VHB. En efecto, la mayoría de los anticuerpos que se generan contra el HBsAg durante la infección por el VHB, así como tras la vacunación con HBsAg nativo o recombinante, reconocen con mayor o menor afinidad el determinante antigénico "a". También, los anticuerpos de esta especificidad constituyen el grueso de los contenidos en los preparados comerciales de gammaglobulinas específicas policlonales (HBIG). Estos anticuerpos neutralizan los viriones extracelulares, coadyuvando de este modo, junto a ciertas especificidades de los linfocitos TCD8+, a la resolución de la infección. Los anticuerpos funcionales que reconocen epítopos situados en el determinante antigénico "a" neutralizan con parecida eficacia todos los subtipos conocidos del VHB. Conviene destacar, sin embargo, que otras especificidades antigénicas de anticuerpos que reconocen epítopos diferentes al determinante "a" podrían contribuir de modo sustancial al control de la infección por el VHB.

MUTANTES DEL VHB EN EL GEN S

En 1990, Carman y colaboradores describen un caso de hepatitis B en un niño italiano, nacido de madre portadora, que había sido vacunado y tratado con inmunoglobulinas específicas (HBIG) después del parto. El análisis de la secuencia del gen S de la cepa presente mayoritariamente en el suero del enfermo reveló la existencia de una mutación en el nucleótido 587 (sustitución de adenosina por guanosina) que alteraba la secuencia prototípica de aminoácidos del HBsAg, concretamente el cambio de glicina por arginina en el aminoácido 145 (G145R), situado éste de lleno en el determinante antigénico "a", específicamente en la segunda asa (aa 139-147) del dominio globular hidrofílico del complejo proteínico. Desde entonces, otras muchas cepas mutantes en el gen S han sido halladas en niños infectados perinatalmente que, no obstante, habían recibido inmunoprofilaxis activa y pasiva, en receptores de trasplante hepático tratados con HBIG para prevenir la reactivación del VHB (inmunoprofilaxis pasiva secundaria), en pacientes con hepatitis B crónica activa en presencia de anticuerpos anti-HBs séricos y, más recientemente, en pacientes sometidos a trasplante hepático o renal, vacunados, y con niveles séricos de anti-HBs supuestamente protectores. La mayoría de las mutaciones aludidas se concentran en la secuencia correspondiente al determinante antigénico "a" y modifican sustancialmente la naturaleza antigénica del HBsAg. Estas cepas mutantes, al ser escasas o nualmente neutralizadas por los anticuerpos anti-HBs presentes, atesoran una clara ventaja biológica en relación con la cepa silvestre a partir de la cual se originaron: la posibilidad de diseminarse en el hospedador en que surgen y de infectar a individuos presuntamente inmunes. Algunas de estas mutaciones no sólo modifican la antigenicidad del HBsAg, sino que también aminoran su inmunogenicidad, de modo que la infección por las cepas portadoras de éstas no genera una respuesta de anticuerpos anti-HBs ostensible.

Es incuestionable que las cepas mutantes en el gen S se originan como consecuencia de la presión selectiva que ejercen los anticuerpos anti-HBs sobre el VHB. El advenimiento y refinamiento de la tecnología de amplificación y secuenciación de ácidos

nucleicos han permitido averiguar que estas cepas surgen espontáneamente durante el curso de la infección, aunque con baja frecuencia; se ha acreditado que su emergencia podría explicar algunos casos de infección crónica persistente por el VHB en presencia de anticuerpos anti-HBs; sin embargo, se seleccionan con particular eficacia en individuos vacunados o tratados con inmunoglobulinas específicas que, no obstante, se infectan por el VHB.

En lo que respecta a las cepas mutantes que eluden la inmunidad vacunal, resulta llamativa su especial prevalencia en individuos inmunizados con la vacuna de HBsAg recombinante, quizá en relación con el hecho, bien conocido, de que ésta genera una respuesta de anticuerpos de menor calidad, en cuanto a magnitud, duración y espectro de especificidades antigénicas, que la inducida con la vacuna de HBsAg nativo, purificado a partir de plasma de individuos infectados y, muy notablemente, que la que puede objetivarse después de la infección por el VHB en ausencia de inmunización previa. Prueba de lo anterior es que las cepas mutantes del VHB que escapan del efecto protector vacunal han sido descritas con inusitada asiduidad en países del sudeste asiático, donde la hepatitis B es hiperendémica y la vacunación de la población susceptible sistemática; no conviene olvidar, sin embargo, que también están presentes en Europa, África y América, aunque ciertamente en menor medida.

La mayoría de las cepas mutantes de escape descritas en vacunados son portadoras de una o varias sustituciones no conservativas de nucleótidos, aunque no son infrecuentes las inversiones o inserciones de éstos en los dominios antigénicos HBs3 y HBs4 del determinante "a", los cuales están vertebrados en el segundo lazo del dominio hidrofílico del HBsAg. Esta situación contrasta con la que se describe en las cepas de escape que emergen en el marco de la infección natural en ausencia de inmunoprofilaxis previa, que mapean mayoritariamente en el primer lazo del mencionado dominio antigénico (aa 124-137); además de la mutación anteriormente mencionada (G145R), sin duda la más común, otra de las más referidas es N144R. Estudios recientes indican, no obstante, que algunas de estas cepas portan mutaciones en otras regiones de la región S externas al determinante antigénico "a" (codones 183 y 184), incluso en la región Pre-S2, que igualmente restringen la avidéz con que los anticuerpos anti-HBs reconocen el complejo HBsAg mutado.

La aparición de cepas mutantes en el gen S es también un fenómeno relativamente común tras tratamientos con HBIg, especialmente cuando éstos son prolongados: se han descrito con frecuencia en pacientes receptores de trasplante hepático sometidos a inmunoprofilaxis pasiva secundaria para evitar la reactivación del virus, de consecuencias deletéreas para el paciente, en niños infectados verticalmente, y más recientemente tras la inmunoprofilaxis pasiva primaria en un receptor de hígado procedente de un donante anti-HBc positivo. Los mutantes de escape han sido hallados tanto en pacientes tratados con anticuerpos anti-HBs monoclonales cuanto con policlonales, en particular cuando estos últimos provenían de plasma de individuos vacunados con HBsAg recombinante. Estas cepas mutantes no perduran en ausencia de presión selectiva de modo que desaparecen de la circulación, en beneficio de la cepa silvestre, en cuanto se retira el tratamiento con HBIg. Al igual que en las cepas de escape vacunal, las mutaciones halladas están localizadas en la secuencia correspondiente al determinante antigénico "a", implicando habitualmente a los aminoácidos 142 a 145.

El solapamiento de los genes S y P del genoma viral hace posible que el tratamiento de la hepatitis B con análogos nucleósidos tenga como epifenómeno posible la selección de cepas mutantes en el gen S. Resulta afortunado el hecho de que la mayoría de las mutaciones que confieren al VHB resistencia a estos fármacos no alteren de modo sustancial la naturaleza antigénica del HBsAg, al no superponerse la secuencia genómica

que codifica el dominio catalítico de la polimerasa viral, donde se ubican mayoritariamente las mutaciones aludidas, y la que codifica el determinante antigénico "a". Recientemente, sin embargo, se han descrito cepas mutantes, potencialmente de escape (G130N), resistentes a la lamivudina. Aunque desconocemos si estas cepas son capaces o no de generar infecciones activas, su probada emergencia es un motivo más de inquietud.

Por otra parte, se ha acreditado que no todos los ELISA comerciales que ponen de manifiesto la presencia del HBsAg en el suero son igualmente eficaces en la detección de ciertos mutantes en el gen S. En dos estudios recientes, las pruebas comercializadas por Ortho (HBsAg system 3), bioMérieux (Vidas HBsAg), Organon (UniForm II v1-2), Sanofi Pasteur (HBsAg plus) y Roche (Elecsys HBsAg) fueron incapaces, en menor o mayor grado, de detectar ciertos mutantes (G145A, G145A/N144A, P142S/G145R/N146D); en cambio, sí lo hicieron las fabricadas por Abbott (IMx HBsAg v2, AxSYM HBsAg 2 y PRISMA HBsAg) Murex (HBsAg 3), Dade-Behring (Enzygnost HBsAg 5.0) y Diagnostic Product Corporation (IMMULITE HBsAg e IMMULITE 2000 HBsAg). En relación con lo anterior, se ha invocado la posibilidad de falsos negativos de estas pruebas para explicar algunas infecciones activas por el VHB (DNA viral detectable en el suero por PCR) que cursan con el siguiente perfil serológico: HBsAg (-), anti-HBc(+) y anti-HBe (+/-).

Actualmente, existe consenso en considerar que las cepas mutantes en el gen S, sea cual fuere el marco en que se originen, pueden ser transmitidas vertical y horizontalmente y son plenamente competentes para generar infecciones activas, susceptibles de cronificarse, en individuos aparentemente inmunes; no cabe duda, por lo tanto, de que la emergencia y difusión de estas cepas pueden crear un problema de salud pública de gran envergadura. Datos recientes alertan sobre un incremento notable de la prevalencia de estas cepas en países del sudeste asiático, donde la vacunación de la población es sistemática. Incluso existen modelos matemáticos que predicen la predominancia universal de la cepa de escape portadora de la mutación G145R, la más estable de cuantas se conocen, en detrimento de la cepa silvestre que circula en la actualidad, en un periodo de 60-100 años, y la sustitución de ésta por aquélla dentro de aproximadamente 200 años. Esta predicción sólo es válida, naturalmente, si se asume que los anticuerpos anti-HBs inducidos por las vacunas en uso no confieren protección cruzada frente a las cepas mutantes en el gen S.

Dado que la vacunación de la población susceptible es uno de los pilares en que se sustenta la lucha contra la infección por el VHB, no parece aconsejable tomarse a la ligera la anterior predicción, por apocalíptica que resulte a primera vista; así lo ha entendido la comunidad científica que se afana en diseñar nuevos prototipos vacunales que soslayan este problema. En este sentido, incorporar a la vacuna clásica HBsAg recombinantes portadores de las mutaciones más extendidas o utilizar como sustrato vacunal un HBsAg recombinante en el que el primer lazo del dominio hidrofílico (aas 121-129) resulte inmunodominante, son opciones cuya factibilidad será elucidada en un futuro próximo.

BIBLIOGRAFÍA

- CARMAN WF, ZANETTI AR, KARAYIANNIS P *et al*. Vaccine induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990; 336: 325-329.
- CHEN WN, JIN OON C. Human hepatitis B virus mutants: significance of molecular changes. *FEBS letters* 1999; 453:237-242.
- COLEMAN PF, CHEN Y, MUSHAHWAR IK. Immunoassay detection of hepatitis B surface antigen mutants. *J Med Virol* 1999; 59:19-24.

- COOREMAN MP, LEROUX-ROELS G, PAULIJ WP. Vaccine- and hepatitis B immune globulin-induced escape mutations of hepatitis B virus surface antigen. *J Biomed Sci* 2001; 8:237-247.
- GANEM D, PRINCE AM. Hepatitis B virus infection- Natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004;350:1118-1129.
- TORRESI J. The virological and clinical significance of mutations in the over-lapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *J Clin Virol* 2002; 25:97-106.
- ZAAIJER HL, VRIELNIK H, KOOT M. Early detection of hepatitis B surface antigen and detection of HBsAg mutants: a comparison of five assays. *Vox sanguinis* 2001; 81:219-221.
- WEBER B, DENGLER T, BERGER A, DOERR HW, RABENAU H. Evaluation of two new automated assays for hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) detection: IMMULITE HBsAg and IMMULITE 2000 HBsAg. *J Clin Microbiol* 2003; 41:135-143.
- ZUCKERMAN JN, ZUCKERMAN AI. Mutations of the surface protein of Hepatitis B virus. *Antiviral Res* 2003; 60:75-78.