Heterogeneidad viral de la región promotora del *Core* y *Precore* del virus de la Hepatitis B

Heterogenity of Basal Core promotor and Precore region of hepatitis B virus

Diego Flichman.*

Recibido: Aceptado:

Resumen

Palabras clave: Heterogeneidad, mutaciones, seroconversión, cuasiespecies, antiHBe positivo, poblaciones virales.

La heterogeneidad viral es un fenómeno dinámico que depende de la interacción compleja de varios factores; es el equilibrio entre la generación aleatoria de las variantes virales, como consecuencia del error intrínseco del mecanismo de replicación y la selección de aquellas variantes con mejor fitness en un determinado contexto. La implicancia de la heterogeneidad viral de la región BCP/preC en la severidad de la enfermedad es motivo de controversia, visto que ninguna de las variantes descriptas se encuentra asociada de forma exclusiva a un estadío clínico particular. Esto sugiere que las mutaciones en la región BCP/preC podrían ocurrir en forma secuencial y acumulativa en el tiempo durante el curso de la infección por el HBV y no estrictamente relacionado con la actividad de la infección.

Abstract

Key words: Heterogeneity, mutations, seroconversion, quasispecies, antiHBe positive, viral populations.

The viral heterogeneity is a dynamic event that hinges on a finely poised and complex interplay of several factors; is a balance between the random generation of viral variants, as a consequence of the intrinsic mistakenness of the replication mechanism and the selection of those variants with better fitness in a given environment. The role of viral heterogeneity on the region BCP/preC in the severity of the disease is a controversial issue, since the variants described are not uniquely associated with a particular clinical stage. This finding suggests that mutations in the region BCP/pC may occur sequentially and cumulatively over time during the course of HBV infection and not strictly related to the HBV infection activity.

Introducción

En las últimas décadas, numerosos estudios se focalizaron en la caracterización de la heterogeneidad del virus de la hepatitis B (HBV) con la finalidad de correlacionar las mutantes del HBV con el amplio espectro de condiciones clínicas y patológicas asociadas a la infección por el HBV. Sin embargo, los efectos biológicos de las mutaciones, incluso los de las más frecuentemente observadas, no han sido aun esclarecidos de forma definitiva.

El HBV es el agente causal de una de las enfermedades virales más frecuentes que afectan al hombre; se estima que aproximadamente un tercio de la población -2 mil millones de personas- ha estado expuesta al HBV y alrededor de 400 millones permanecen infectados crónicamente. Cada año el HBV infecta de 10 a 30 millones de individuos en todo el mundo y más de un millón muere como consecuencia de enfermedades relacionadas a la infección (1,2).

La infección crónica por el HBV presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas con diferentes grados de actividad, que van del estadío de portador inactivo al de hepatitis crónica activa. En el curso de la infección crónica los pacientes pueden desarrollar insuficiencia hepática, cirrosis o carcinoma hepatocelular (3,4).

*PhD. Cátedra de Virología Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.
Dirección para correspondencia
Facultad de Farmacia y Bioquímica. Junin 965. C1113AAC, CABA.
dflichman@ffyb.uba.ar

Existen diferentes factores, tanto del huésped como del virus, que fueron asociados a la patogenia de la infección por HBV, entre ellos la heterogeneidad viral (5).

En numerosas estudios se observó una asociación entre las mutaciones y las manifestaciones clínicas; sugiriendo que las mutaciones podrían alterar el curso natural de la infección o conferir resistencia a los agentes antivirales. Dichas mutaciones ocurren naturalmente y han sido descriptas en los diferentes genotipos, tanto en regiones que codifican para proteínas estructurales y no estructurales, como en genes regulatorios (6,7).

Las mutantes mejor caracterizadas son las de la región Precore (preC) y de la región promotora del Core (BCP), que abrogan o reducen la expresión del antígeno e (HBeAg) respectivamente, y las mutaciones en el gen que codifica la polimerasa que confieren resistencia a los antivirales (8-10).

Sin embargo, la correlación entre la severidad de la enfermedad y la presencia o ausencia de mutaciones es motivo de controversia, visto que ninguna de las variantes descriptas se encuentra asociada de forma exclusiva a un estadío clínico particular.

Reseña histórica

En la década de los 70' solo se disponía del antígeno de superficie (HBsAg) y del HBeAg como marcadores virales para monitorear a los pacientes infectados y se había establecido como indicador de buen pronóstico la seroconversión del HBeAg. A comienzos de la década de los 80', la detección del HBV-DNA permitió evidenciar la presencia de replicación viral aún en ausencia del HBeAg (11). Hacia fines de esa década se identificó una mutación en la región preC (G1896A) que abolía la síntesis del HBeAg sin que esto afectara la replicación viral (12,13). A partir de entonces, la caracterización molecular tomó un impulso que posicionó al estudio de la heterogeneidad viral como un tema central de la caracterización del HBV.

En la década de los 90', se identificaron mutaciones en la región BCP (A1762T, G1764A) que alteraban la expresión del HBeAg a nivel de la transcripción del ARN mensajero, como así también otras mutaciones menos frecuentes que abrogaban la síntesis del HBeAg a nivel de la traducción (14,15). Estos hallazgos conllevaron a plantear diferentes hipótesis respecto al rol de las mutaciones en la patogénesis de la infección por HBV, llegando en algunas ocasiones a caer en la tentación de considerar la presencia de una mutación como la causal de un estadío clínico patológico.

Generación y selección de mutantes

El HBV posee en su biología ciertas características peculiares. El genoma tiene marcos de lectura superpuestos, más de la mitad codifica para múltiples proteínas. Por ello, los cambios sinónimos en un marco frecuentemente resultan en cambios no sinónimos en el marco superpuesto. De este modo la superposición de marcos restringe la evolución del HBV.

Por otra parte, si bien el HBV posee un genoma de ADN, su replicación presenta un intermediario de ARN el cual es retrotranscripto mediante una polimerasa viral sin actividad de *proofreading*; lo cual da origen a la heterogeneidad viral.

La resultante de estas dos particularidades hace que el HBV posea una tasa de evolución intermedia entre los virus con genoma ADN y aquellos con genoma ARN.

El HBV posee una elevada tasa de replicación, aproximadamente 10^{11} partículas/día (16) y debido a la falta de fidelidad de la polimerasa, resulta en la introducción aleatoria de aproximadamente 10^{10} mutaciones diarias (17,18), generándose así un modelo de cuasiespecies.

La acumulación de mutaciones virales depende de su tasa de generación, la cual ocurre en forma aleatoria a lo largo de todo el genoma, y de la tasa de fijación, que depende de la ventaja que la mutación le conceda respecto a la variante que no la posea.

La heterogeneidad viral es un fenómeno dinámico y complejo; la producción y selección de variantes, depende de una interacción finamente equilibrada y compleja de varios factores. Es un equilibrio entre la generación aleatoria de las variantes virales, como consecuencia del error intrínseco del mecanismo de replicación y la selección de aquellas variantes con mejor *fitness* en un determinado contexto.

Historia natural de la infección

Durante el curso de la infección crónica, una gran proporción de los individuos infectados, seroconvierte el HBeAg a anti-HBe, lo cual representa una etapa tardía en la historia natural de la infección (19,20).

La seroconversión responde a diferentes causas; sin embargo, en todos los casos refleja un desbalance a favor del anticuerpo en el equilibrio HBeAg/antiHBe. Las razones virológicas para alcanzar esta condición pueden deberse a modificaciones: -a nivel de la transcripción (síntesis disminuida de ARNm debido a mutaciones en las regiones del BCP) o -a nivel de la traducción (ausencia de HBeAg, debido a inserciones, deleciones o mutaciones). Si bien la pérdida de HBeAg parece irrelevante para la replicación del virus en la célula infectada, su expresión desempeña un papel importante en la interacción del virus con el sistema inmunológico.

En base al grado de lesión histológica, a los niveles a alanino amino transferasas (ALT) y a la carga viral, los

individuos antiHBe positivos infectados en forma crónica son considerados pacientes con hepatitis crónica activa o portadores inactivos, estos últimos en su mayoría tienen una evolución favorable. Si bien los portadores inactivos representan la mayor parte de los infectados en forma crónica, la mayor parte de los estudios sobre heterogeneidad viral han sido realizados sobre pacientes con hepatitis crónica activa, por lo cual existe una escasez de información acerca de la heterogeneidad genómica en los portadores inactivos.

Mutantes en precore y en el promotor del core

La selección de mutantes HBeAg negativas en el huésped puede deberse en parte a las propiedades inmunomoduladoras del HBeAg que resulta en una ventaja selectiva para el virus. Sin embargo, aun no está esclarecido si estas afectan el curso clínico de la infección, ni el mecanismo a través del cual lo hacen –ya sea en forma puntual o en combinación con otras mutaciones–.

Estudios in vitro de mutantes de la región preC indicaron que estas no afectan la replicación viral y su estudio en modelos animales mostraron que no ejercen ningún efecto sobre la severidad de la enfermedad hepática (21,22). También, es importante señalar, que las mutantes preC no solo han sido descriptas en pacientes con hepatitis B crónica activa, sino también en portadores asintomáticos (23,24).

Diferentes mutaciones han sido descriptas en estas regiones (Tabla 1), variando su frecuencia en función del genotipo.

Tabla 1

Mutaciones de la región BCP/preC frecuentemente descriptas		
BCP	**Precore**	
C1653T	A1814T	Altera el codón de inicio
T1753C	A1814C	Altera el codón de inicio
T1753A	T1815C	Altera el codón de inicio
T1753G	G1816T	Altera el codón de inicio
A1762T	G1816A	Altera el codón de inicio
G1764A	C1817T	Genera un *stop* en el segundo codón
	Inserción TT 1821-1826	Altera el marco de lectura y genera un codón de *stop*
	G1896A	Genera un stop en el codón 28

Las mutaciones en el BCP que modifican la expresión del HBeAg fueron inicialmente descriptas en aquellos pacientes que a pesar de seroconvertir el HBeAg no presentaban mutaciones en la región preC. En general se encuentran presentes en aislamientos de los genotipos que presentan citosina en la posición 1858 (A, C_1, C_3, F_2, F_3, H) (25).

Existen diferentes hipótesis respecto al modo en que modifican la expresión del HBeAg, pero existe un consenso en que las mutaciones afectan sitios de unión a factores de transcripción y esto reduce la expresión del mensajero que codifica el HBeAg (preC ARNm). La caracterización in vitro de estas variantes demostró el carácter aditivo de estas mutaciones, observándose que la doble mutación 1762T/ 1764A reduce la expresión en aproximadamente un 20%, mientras que la triple mutación 1753M/1762T/1764A la reduce en un 30% y la cuádruple mutación 1753M/1762T/1764A/1766T en el 80%. Concomitantemente con la reducción del HBeAg, las mutaciones incrementan la tasa de replicación en forma inversamente proporcional, aumentando el 100%, 300% y 700% para la doble, triple y cuádruple mutación respectivamente (22,26).

Curiosamente, en diferentes estudios se ha observado que una gran proporción de los infectados presentan patrones de múltiples mutaciones (A1762T + A1764A + G1896A) en los cuales cada una de ellas justifica el fenotipo anti-HBe positivo. La presencia de variantes que presentan dos o más mutaciones que independientemente previenen la expresión del HBeAg plantea varios interrogantes respecto a su selección y su implicancia biológica durante la historia natural de la infección crónica ya que la selección de mutaciones con efectos redundantes es poco probable desde el punto de vista evolutivo.

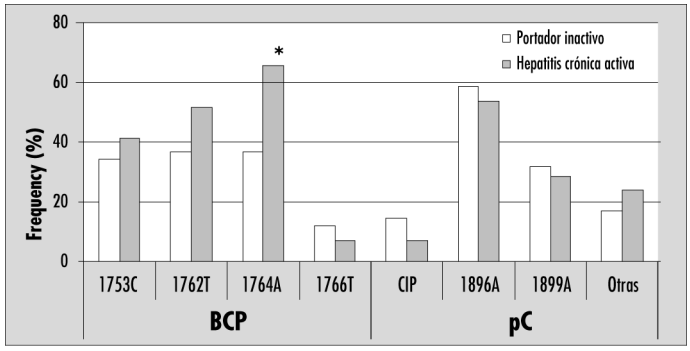
Recientemente hemos publicado un trabajo en el cual comparamos la presencia de mutaciones en las regiones PreC y BCP en pacientes con hepatitis crónica activa y en portadores asintomáticos (24). En el mismo, las mutaciones fueron observadas con elevada frecuencia y sin diferencias significativas entre los portadores inactivos y los pacientes con hepatitis crónica activa, con excepción de la posición de 1764, que fue más prevalente en pacientes con hepatitis crónica activa (Figura 1).

La distribución uniforme de las mutaciones en los portadores activos e inactivos sugiere que las mutaciones en la región BCP/pC no estarían estrictamente relacionadas con la actividad de la infección.

Edad y mutaciones

En la actualidad se dispone de numerosos estudios sobre la heterogeneidad viral. La mayoría de estos se basan en la comparación, mediante métodos estadísticos asociativos, del cuadro clínico-patológico del huésped infectado con las mutaciones halladas. Sin embargo, en la mayor parte de estos estudios no se tienen en consideración factores del huésped y se desconoce el tiempo de evolución de la infección, salvo en los casos de infecciones perina-

Figura 1



Correlación entre mutaciones en la región BCP/pC y actividad de la infección por HBV. Otras incluye: 1817T (n=1), 1847T (n=2), 1897A (n=1), inserción en 1846 (n=4), 1939(n=3), 1839(n=1), 1847(n=1) y deleción en1845 (n=1); *p < 0,05.

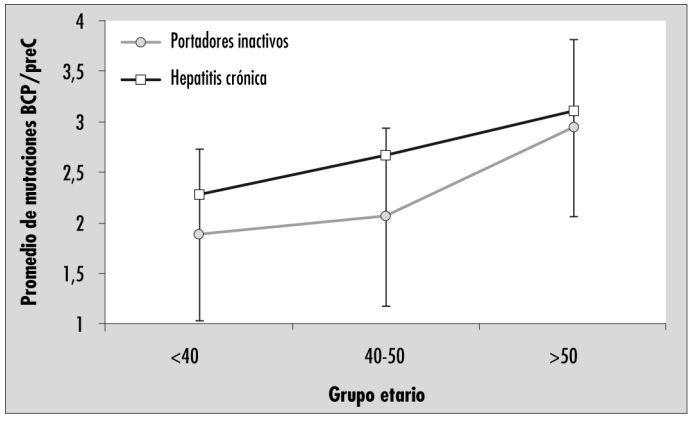
tales o en aquellas sintomáticas durante la etapa aguda de la infección.

En los últimos años se han publicado estudios en los cuales se tuvo en consideración la edad de los pacientes en los diferentes estadíos de la infección crónica (portador inactivo, hepatitis crónica activa, hepatocarcinoma) (27-29). En estos estudios pudo observarse que la mayoría de las mutaciones eran más frecuentes en los pacientes de mayor edad independientemente de su estado clínico; sugiriendo que la acumulación de las mismas serían consecuencia de la evolución de la infección y que no estarían implicadas *per se* en la patogenia de la infección.

Este año nuestro grupo publicó un trabajo (24) en el cual se verifica un aumento del número de mutaciones en correlación con la edad de los pacientes (Figura 2).

La correlación entre el número de mutaciones y la edad del paciente sugiere que estas ocurren naturalmente en forma secuencial y acumulativa en el tiempo durante el curso de la infección por el HBV.

Figura 2



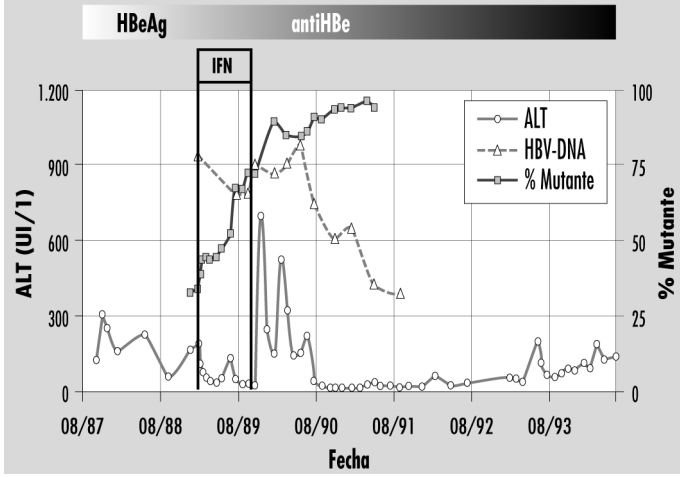
Correlación entre el promedio de mutaciones en la región BCP/preC y el grupo etario.

Dinámica de las poblaciones virales

El estudio de la dinámica de poblaciones es una valiosa herramienta para caracterizar los mecanismos asociados al proceso evolutivo del virus. Existen numerosos trabajos que describen a nivel molecular los estadíos HBeAg y antiHBe positivo; sin embargo hay poca evidencia experimental respecto al mecanismo de reemplazo de las poblaciones.

Nosotros hemos caracterizado mediante la técnica de clonado y PCR alelo específica la cinética de la población 1896G (salvaje) y 1896A (mutante), en un paciente que seroconvirtió luego de ser tratado con 9 MUI de interferón durante 6 meses (Figura 3).

Figura 3



Caracterización de las poblaciones virales durante la seroconversión.

El paciente fue monitoreado en forma mensual durante 6 años. Al momento de ser tratado el paciente presentaba los siguientes parámetros: ALT 190 U/l, HBV-DNA 9,40 Log_{10} copias/ml y el 35% correspondía a poblaciones con la mutación G1896A. Al finalizar el tratamiento las ALT se habían normalizado (31 U/l), la carga viral había disminuido a 7,90 Log_{10} copias/ml y las poblaciones con la mutación G1896A se había incrementado al 72%; observándose un cambio cuantitativo exiguo, asociado a un cambio cualitativo considerable de las poblaciones virales. En los meses siguientes a la finalización del tratamiento el paciente evidenció tres *flares* significativos de ALT, con valores que oscilaron entre 320 y 700 U/l; concomitantemente, la carga viral sufrió una disminución hasta alcanzar valores menores a 6,0 Log_{10} copas/ml, mientras que las poblaciones con la mutación G1896A aumentaron hasta valores cercanos al 95%.

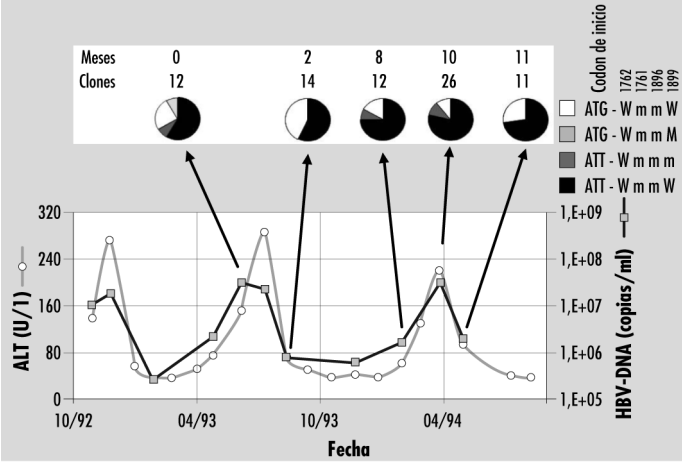
Este ejemplo sugiere que:

- La presencia de poblaciones HBeAg negativas (G1896A) se encuentran presentes antes de la seroconversión.

- Que el *turn over* (recambio) de las poblaciones es un proceso progresivo. En este caso el lapso de tiempo para modificar el equilibrio de poblaciones (de 35 a 95%) fue de aproximadamente 2 años. Los aumentos mas significativos de la población conteniendo la mutación se dieron en concomitancia con los *flares* de ALT. Lo cual sugiere que la necrosis hepática se halla probablemente asociada a la regeneración masiva de hepatocitos susceptibles de ser infectados.
- Que el efecto del tratamiento, mediado por su efecto modulador, genera una presión selectiva que altera el equilibrio de las poblaciones virales, semejante en algún modo al efecto que causa el tratamiento con análogos en la selección de variantes resistentes.

En otro paciente, antiHBe positivo, con un patrón evolutivo caracterizado por fluctuaciones en el nivel de ALT y HBV-DNA, determinamos la dinámica de las poblaciones virales de la región BCP/preC (Figura 4).

Figura 4



Dinámica de poblaciones en la región BCP/preC en un paciente antiHBe.

Durante el seguimiento el paciente evidenció tres incrementos significativos de ALT y HBV-DNA. El análisis de la secuencia nucleótidica de los clones mostró inicialmente (tiempo 0) cuatro poblaciones virales, dos de ellas presentaban la mutación G1816T en el codón de inicio del preC. A su vez el análisis de las posiciones 1.762, 1.764, 1.896 y 1.899 mostró que las posiciones 1.764 y 1.896 se hallaban mutadas en todos los clones, mientras que las posiciones 1.762 y 1.899 se hallaban en forma mutada y salvaje. El análisis de la segunda muestra, dos meses posterior a la primera y luego del segundo *flare*, evidenció la presencia de solo dos de las cuatro poblaciones iniciales, con un ligero aumento de la población sin mutaciones en el codón de inicio (33% a 43%).

En la tercer muestra, al octavo mes de seguimiento y previa al tercer *flare*, se observaron 3 poblaciones y la que presentaba el codón de inicio sin mutaciones representaba solamente el 16%. La cuarta muestra, al décimo mes, mostró una distribución de poblaciones similar a la anterior. Por último, la muestra analizada al undécimo mes de seguimiento y posterior al tercer *flare*, mostró nuevamente un aumento de la población que no presentaba la mutación en el codón, la cual pasó a representar el 27%.

El análisis del gráfico 4 sugiere que las poblaciones con mejor *fitness* se van seleccionando en el tiempo, con el consecuente aumento del HBV-DNA. Este cambio es seguido por un aumento de las ALT, tal vez como consecuencia de un *clearance* de hepatocitos por parte del sistema inmune. Este generaría una presión positiva de selección sobre las poblaciones virales presentes, modificando el equilibrio en esta nueva condición.

En este paciente, que había seroconvertido previamente, se pudo apreciar los cambios de las diferentes poblaciones en el tiempo, asociadas a las fluctuaciones de la carga viral y las ALT; ilustrando cuan compleja es la dinámica de las poblaciones virales durante la infección crónica.

Heterogeneidad viral y resistencia

El descubrimiento y la utilización clínica de agentes antivirales que actúan sobre la polimerasa viral han revolucionado el tratamiento de los pacientes infectados crónicamente por HBV. El objetivo de la terapia antiviral en la infección crónica por el HBV es conseguir una supresión sostenida de la replicación viral y, de este modo, prevenir la progresión a la cirrosis, la insuficiencia hepática terminal y el carcinoma hepatocelular. Sin embargo, el beneficio clínico de estos tratamientos está comprometido por la emergencia de variantes virales resistentes con mutaciones específicas en el gen de la polimerasa. La resistencia a tratamientos antivirales puede ser considerada desde el punto de vista fenotípico y genotípico. La resistencia fenotípica se refiere a la pérdida de supresión de la replicación a pesar de continuar la administración del tratamiento y se demuestra por un incremento de la actividad viral evidenciada por un aumento de 1 logaritmo o más en los valores de HBV-DNA a partir del valor más bajo obtenido durante la terapia. Las cepas virales resistentes son las que tienen mutaciones que confieren la resistencia fenotípica a un tratamiento determinado. Para su detección se han desarrollado ensayos genotípicos que identifican una o varias de las mutaciones en la polimerasa viral que le confieren poca o nula sensibilidad al tratamiento. En general, en muestras pre terapéuticas, estas mutaciones no son detectables en la población mayoritaria, aunque pueden estar presentes en poblaciones residuales (30). Sin embargo, estas serán predominantes en la cuasiespecie tras las reactivaciones virales.

La administración masiva y prolongada de los análogos de nucleósidos/nucleótidos, así como el desarrollo de nuevos antivirales han incrementado el énfasis en el mo-

nitoreo de la terapia antiviral, la identificación de nuevos antivirales, así como de la identificación de variantes de HBV resistentes. La aplicación de ensayos fenotípicos es de gran utilidad en la detección precoz de selección de mutantes resistentes al tratamiento, así como de variantes resistentes nuevas.

Conclusiones

Las mutaciones en la región BCP o en la región preC son un sello distintivo de la infección crónica anti-HBe positiva. La selección de mutantes ocurre en el curso de la infección crónica como un mecanismo natural de coevolución entre el huésped y el virus. La fijación de una variante dependerá de su ventaja replicativa, de su interacción con el huésped y de la disponibilidad de células susceptibles a la infección.

El HBV, como todos los virus, en su afán de perpetuarse en la naturaleza explora a través de sus variantes el universo de posibilidades. Las mutaciones observadas en el genoma viral probablemente se deben a la adaptación del virus a las diferentes presiones selectivas, sugiriendo ser la consecuencia más que la causa. Por lo tanto, las mutaciones pueden ser un marcador útil de prognosis de evolución de la infección; sin embargo, no hay evidencias que permitan establecer que la variante con la mutación sea más patógena y por ende la causa de un determinado estadío clínico.

La distribución uniforme de las mutaciones en los portadores activos e inactivos sugiere que las mutaciones en la región BCP / pC podrían ocurrir en forma secuencial y acumulativa en el tiempo durante el curso de la infección por el HBV y no estrictamente relacionado con la actividad de la infección.

ΛH

Bibliografía

1. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. J Viral Hepat. 2004; 11:97-107.
2. Maddrey WC. Hepatitis B: an important public health issue. J Med Virol 2000; 61:362-6.
3. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. Hepatology 2001; 34:1225-41.
4. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. N Engl J Med 2004; 350:1118-29.
5. Cao GW. Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations. World J Gastroenterol 2009; 15:1576-9.
6. Torresi J. The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. J Clin Virol 2002; 25:97-106.
7. Esteban J, Martell M, Carman WF, Gomez J, Esteban J, Martell M, et al. The impact of rapid evolution of the hepatitis viruses. In: Domingo E, Webster RG, Holland JI, editors. Origin and evolution of viruses. London: Academic Press 1999; p. 345¨C65.
8. Brunetto MR, Rodriguez UA, Bonino F. Hepatitis B virus mutants. Intervirology 1999; 42:69-80.
9. Tong S. Mechanism of HBV genome variability and replication of HBV mutants. J Clin Virol 2005; Suppl 1:S134-8.
10. Kay A, Zoulim F.Hepatitis B virus genetic variability and evolution. Virus Res. 2007; 127:164-76.
11. Bonino F, Hoyer B, Nelson J, Engle R, Verme G, Gerin J. Hepatitis B virus DNA in the sera of HBsAg carriers: a marker of active hepatitis B virus replication in the liver. Hepatology 1981; 1:386-91.
12. Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, Thomas HC. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. Lancet 1989; 2:588-91.
13. Brunetto MR, Stemler M, Bonino F, Schodel 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; 10:258-61.
14. Baumert TF, Rogers SA, Hasegawa K, Liang TJ. Two core promotor mutations identified in a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis result in enhanced viral replication. J Clin Invest. 1996; 98:2268-76.
15. Baumert TF, Marrone A, Vergalla J, Liang TJ. Naturally occurring mutations define a novel function of the hepatitis B virus core promoter in core protein expression. J Virol 1998; 72:6785-95.
16. Nowak MA, Bonhoeffer S, Hill AM, Boehme R, Thomas HC, McDade H. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93:4398-402.
17. Doo E and Liang T.J. Molecular anatomy and pathophysiologic implications of drugs resistance in hepatitis b virus infection. Gastroenterology 2001; 120:1000-1008
18. Locarnini S. Molecular virology and the development of resistant mutants: implications for therapy. Semin. Liver Dis. 2005; 25:9-19.
19. Hadziyannis SJ, Vassilopoulos D. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. Hepatology 2001; 34:617-24.
20. Hadziyannis SJ. Hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B. From clinical recognition to pathogenesis and treatment. Vir Hep Rev 1995; 1:7-36.

21. Chen HS, Kew MC, Hornbuckle WE, Tennant BC, Cote PJ, Gerin JL, Purcell RH, Miller RH. The precore gene of the woodchuck hepatitis virus genome is not essential for viral replication in the natural host. J Virol. 1992; 66:5682-4.

22. Jammeh S, Tavner F, Watson R, Thomas HC, Karayiannis P.Effect of basal core promoter and pre-core mutations on hepatitis B virus replication. J Gen Virol 2008; 89:901-9.

23. Liu CJ, Kao JH, Lai MY, Chen PJ, Chen DS. Precore/core promoter mutations and genotypes of hepatitis B virus in chronic hepatitis B patients with fulminant or subfulminant hepatitis. J Med Virol 2004; 72:545-50.

24. González López Ledesma M, Galdame O, Bouzas B, Tadey L, Livellara B, Giuliano S, Viaut M, Paz S, Fainboim H, Gadano A, Campos R, Flichman D, Characterization of the basal core promoter and precore regions in anti-HBe-positive inactive carriers of hepatitis B virus. Int J Infect Dis 2011; in press.

25. 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 U S A 1994; 91:4077-81.

26. Parekh S, Zoulim F, Ahn SH, Tsai A, Li J, Kawai S, Khan N, Trépo C, Wands J, Tong S. Genome replication, virion secretion, and e antigen expression of naturally occurring hepatitis B virus core promoter mutants. J Virol 2003; 77:6601-12.

27. Ito K, Tanaka Y, Orito E, Sugiyama M, Fujiwara K, Sugauchi F, et al. T1653 mutation in the box alpha increases the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus genotype C infection. Clin Infect Dis 2006; 42:1-7.

28. Shinkai N, Tanaka Y, Ito K, Mukaide M, Hasegawa I, Asahina Y, et al. Influence of hepatitis B virus X and core promoter mutations on hepatocellular carcinoma among patients infected with subgenotype C2. J Clin Microbiol 2007; 45:3191-7.

29. Choi CS, Cho EY, Park R, Kim SJ, Cho JH, Kim HC. X gene mutations in hepatitis B patients with cirrhosis, with and without hepatocellular carcinoma. J Med Virol 2009; 81:1721-5.

30. Jardi R, Rodriguez-Frias F, Schaper M, Ruiz G, Elefsiniotis I, Esteban R, Buti M. Hepatitis B virus polymerase variants associated with entecavir drug resistance in treatment-naive patients. J Viral Hepat. 2007; 14:835-40.