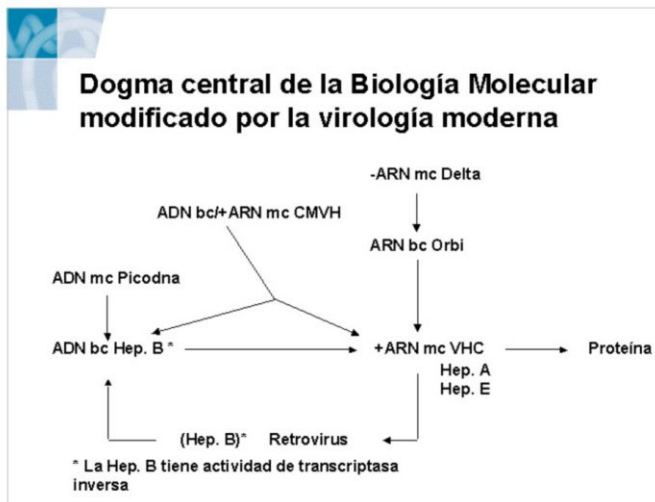


Mutaciones en el Antígeno de superficie de HBV (HbsAg)

El dogma central de la Biología Molecular establece que la información genética se almacena en el AND bicatenario. Esta información genética se transcribe a ARN monocatenario con sentido positivo o ARN mensajero. El ARN mensajero luego se traduce en proteína. Así es como la información genética se transfiere en todas las células eucariotas. Sin embargo, nuestros conocimientos sobre la replicación de los virus han modificado el dogma central de la Biología Molecular. Para entender cómo, necesitamos saber que la única función de una partícula de virus es replicarse y que una sola cadena de ácido nucleico en una cápside proteica es el requisito mínimo para ser un virus.



El gráfico muestra cómo la virología moderna ha modificado el dogma central de la Biología Molecular. En la sección izquierda del gráfico, observe los virus de ADN monocatenario o Picodnavirus. “Pico” significa pequeño, por lo cual, éstos son virus de ADN pequeño. El grupo de Virus de Papilomas representa los Picodnavirus. Estos virus deben crear ADN bicatenario a partir de su AND monocatenario. Este ADN bicatenario se transcribe luego al ARN mensajero, y luego se traduce en proteína. Los virus de ADN bicatenario están representados por la Hepatitis B, tal como se muestra en el gráfico. Los virus de ADN bicatenario siguen el dogma central de la Biología Molecular, ya que su ácido nucleico se transcribe a ARN monocatenario y luego se traduce en proteína. La Hepatitis B se señala con un asterisco, porque el esquema de replicación de la Hepatitis B incluye una actividad de transcriptasa inversa que se presenta únicamente en este grupo de virus y no en otros virus de AND monocatenario.

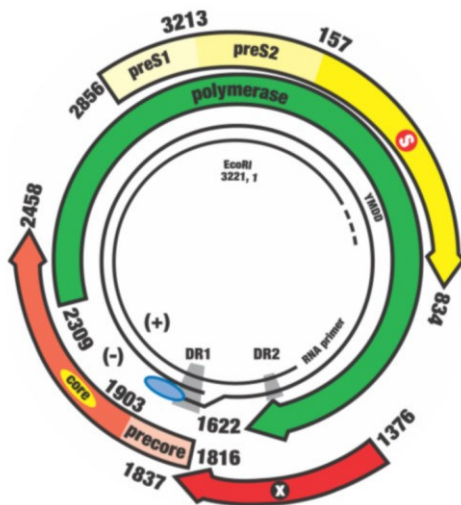
Los virus de ARN con sentido negativo están representados en la parte superior del gráfico por el Deltavirus, un verdadero virus satélite que necesita la Hepatitis B para su replicación. Los virus de la Influenza también son de ARN con sentido negativo. Estos virus deben primero crear ARN bicatenario de su cadena simple inicial. De allí, crean ARN mensajero y, por último, proteínas virales.

Los virus de ARN bicatenario están representados por el grupo de Reovirus. Éstos empiezan con ARN bicatenario y de allí crean ARN mensajero y, luego, proteína viral.

Los virus de las Hepatitis C, A y E son ejemplos de virus de ARN monocatenario con sentido positivo. Estos virus tienen un genoma de ARN monocatenario con sentido positivo que se considera infeccioso porque su ARN se puede traducir directamente en proteína viral. Existe un grupo especial de virus de ARN con sentido positivo llamado los Retrovirus. Estos Retrovirus, tales como el VIH o el VLCT, requieren la actividad de la transcriptasa inversa, que

toma el ARN y crea un ADN molde bicatenario. Luego, se crea el ARN con sentido positivo y la progenie viral del ARN. La actividad de transcriptasa inversa tiende al error por falta de capacidad correctora de pruebas. Por lo tanto, este paso está sujeto a una tasa de mutación relativamente alta. El asterisco junto a la Hepatitis B se debe a que, aunque la Hepatitis B es un virus del ADN, tiene actividad de transcriptasa inversa, donde el ADN progenie se crea a partir de un ARN molde. Esto expone a la Hepatitis B a la misma transcripción con margen de error que los Retrovirus. Se calcula que las tasas de mutación de la Hepatitis B son similares a las de la proteína gag del HIV. La última parte del gráfico presenta el esquema de replicación del Citomegalovirus, CMVH. Éste es el primer virus donde hay ADN y ARN viral en la misma partícula.

Un esquema de la partícula Dane, o clásica, de la Hepatitis B. Este virus envuelto tiene el antígeno de superficie AgHBs en la capa exterior de la partícula. La capa interior es la proteína del núcleo, conocida como el antígeno del núcleo de la Hepatitis B. Debajo del antígeno del núcleo, el antígeno de la HBE, no tiene una flecha que apunta hacia la partícula, ya que no se considera que el antígeno E es una proteína estructural. El antígeno E contiene la misma secuencia de aminoácidos que el antígeno del núcleo. Aunque este antígeno no está plegado y circula durante la replicación viral, no está incorporado en la partícula viral. El ADN bicatenario está situado en la parte interna de la célula, al igual que la polimerasa viral, que tiene actividad de transcriptasa inversa.



Este esquema representa la organización del genoma del virus de la Hepatitis B. Inmediatamente se ve en la parte interior del esquema, que el ácido nucleico bicatenario es parcialmente bicatenario o monocatenario, a lo largo de un espacio corto, cerca de la parte derecha del esquema. Las flechas exteriores representan las iniciaciones y terminaciones de las diversas proteínas virales que el virus fabrica. Asimismo, se ve que el virus ahorra espacio de información al superponer los genes y utilizar distintos codones de iniciación desfasados para las diversas proteínas. Se puede ver que el gen de superficie está completamente dentro de la secuencia del gen de polimerasa. Se sabe que la Hepatitis B se vuelve resistente a la terapia antiviral. La secuencia YMDD, el lugar de mutación para la resistencia a los fármacos, se señala junto a su ubicación en el gen de polimerasa. Se puede predecir la aparición de mutaciones concomitantes en el gen de polimerasa y el gen del antígeno de superficie en estos mutantes resistentes a los fármacos. Se ha informado recientemente de este hecho en la literatura especializada.

Entonces, ¿Qué son los mutantes del antígeno de superficie?

Las mutaciones ocurren naturalmente durante una replicación viral en la que cambios en la secuencia básica del ácido nucleico pueden conducir a un cambio de los aminoácidos en una proteína. Un resultado común de estos cambios en el antígeno de superficie es un cambio en el epítipo de la región inmunodominante del determinante A.

Los mutantes más comunes del antígeno de superficie se concentran cerca de los aminoácidos 141 a 145, y se informa en la literatura especializada que de estas mutaciones, la que más predomina es la mutación Gly 145 Arg; en otras palabras, una arginina es reemplazada por una glicina en la posición 145.

Las ilustraciones siguientes muestran los cambios superficiales en el aminoácido 145, usando el modelo de Chen et. al. en los Procedimientos de la Academia Nacional de Ciencias. El Dr. Chen es un científico de Abbott. Usando este modelo, el grupo de modelación de proteínas de Abbott añadió una estructura superficial en ubicaciones específicas de aminoácidos. Estas adiciones representan sólo los cambios estructurales en la superficie. Se debe señalar que también podrían ocurrir cambios estructurales terciarios.

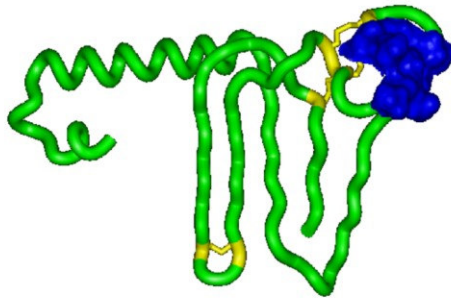
La glicina natural en 145 se denota en este gráfico por el área azul en la parte superior de la columna dorsal de la molécula del antígeno de superficie. Hay una hendidura clara en la superficie de la proteína en esta posición.

Cuando la arginina mutante se inserta en lugar de la glicina en 145, aparece un abultamiento donde estaba la hendidura. La región roja de este gráfico representa el abultamiento. Los anticuerpos monoclonales que se fijan a un epítipo buscan hendiduras, abultamientos o una estructura terciaria específica para su fijación. En este caso, si un anticuerpo monoclonal estuviera buscando la hendidura de la glicina y existiera el abultamiento de la arginina el monoclonal no se fijaría en esta ubicación.

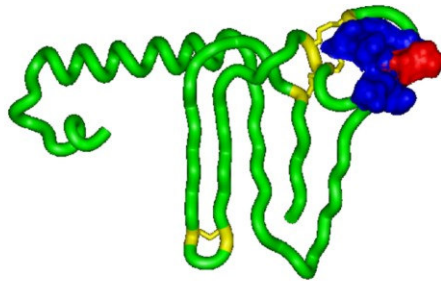
Otro ejemplo de una mutación común es el cambio de la lisina en 141 a un ácido glutámico. Véase el área plana en la parte inferior derecha de la estructura superficial de la lisina en este gráfico.

El ácido glutámico mutante en 141 crea un abultamiento y, nuevamente, si un anticuerpo monoclonal buscara una hendidura, pero encuentra un abultamiento, no se fijaría. Si esta estructura en cadena causa un cambio de conformación en esta área, y el anticuerpo monoclonal está buscando un epítipo conformacional, no se fijaría.

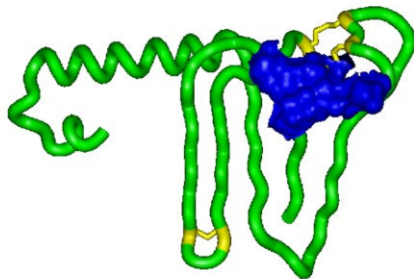
Gly natural en 145



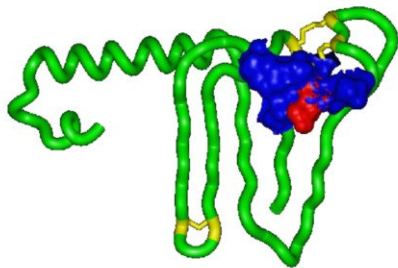
Arg mutante en 145



Lys natural en 141



Glu mutante en 141



Este cuadro fue presentado por Saw y Awe en la AACC del 2000. Se listan varios mutantes del antígeno de superficie, así como los resultados de cuatro ensayos del antígeno de superficie disponibles comercialmente. Todas las muestras de los mutantes son de 1 nanogramo/mililitro. Los ensayos C y D no detectaron los mutantes en las regiones sombreadas del cuadro. Nótese que los

resultados en las áreas sombreadas son equivalentes a los resultados del control negativo en los ensayos C y D. Estos ensayos simplemente no detectan 1 nanogramo de proteína mutante y sus resultados negativos son falsos.

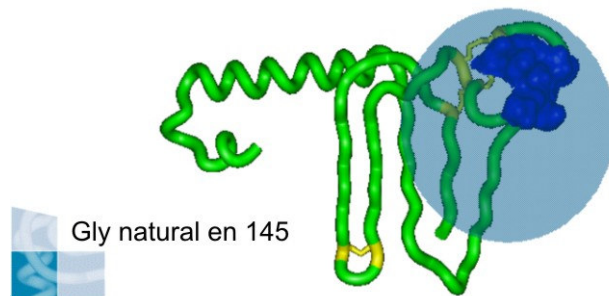
Los epítomos del antígeno de superficie con tasas de mutación altas se deben evitar al diseñar ensayos que son robustos frente a la mutación. Los modelos monoclonales individuales de captura y detección se deben evitar, salvo que estén dirigidos a epítomos del antígeno de superficie que tienen tasas bajas de mutación, o mutaciones que no afectan la fijación de anticuerpos.



Saw, S.L. y T.C. Aw, 2000. Hepatitis B Surface Antigen Mutant Detection on Four Immunoassay Analysers. *Clin. Chem.* 46 Supl.: A53

Muestra de mutante de AgHBsR a 1 ng/ml	Ensayo A	Ensayo B	Ensayo C	Ensayo D
AgHBs subtipo 'ad'	0.237	3.52	3.28	4.08
Gln129-His	0.182	3.20	2.61	3.50
Pro142-Ser + Gly145-Arg	0.177	4.94	0.454	0.19
Met133-Leu	0.255	4.18	3.08	3.47
Thr126-Ser	0.214	2.93	2.78	3.05
Gly145-Arg	0.161	3.63	0.518	0.20
Asp144-Ala + Gly145-Arg	0.143	5.27	0.580	0.23
Thr126-Ser + Gly145-Arg	0.135	3.99	0.601	0.16
Asp144-Ala	0.202	5.23	3.67	0.28
Pro142-Leu + Gly145-Arg	0.375	8.08	0.542	0.15
Tipo natural – adw2	0.337	5.36	4.37	6.51
AgHBs subtipo 'ay'	0.427	4.41	5.34	8.99
Control negativo	0.000	1.09	0.456	0.13
Unidades	IU/mL	S/N	S/CO	S/CO
Punto de corte reactivo	≥0.050	≥2.00	≥1.00	≥1.00

El área donde aparecen mutaciones en la región inmunodominante del determinante A está sombreada. La captura en esta área se debe evitar al desarrollar un ensayo. Sin embargo, al aislar anticuerpos monoclonales, la mayoría de ellos se dirigen a esta región inmunodominante. Por lo tanto, se necesita mucho trabajo y perseverancia para encontrar anticuerpos monoclonales que se fijan fuera de esta región.



El lugar de fijación de los ensayos del antígeno de superficie de Abbott, Auszyme, AxSYM, PRISM y Architect, cerca del círculo blanco, evita la región sombreada donde otros ensayos son dependientes. Abbott ha seguido mejorando la capacidad de sus ensayos de detectar los especímenes mutantes. Con respecto a la captura, Abbott ha añadido un segundo anticuerpo monoclonal de captura al ensayo de Architect, el cual evita la región hipervariable. Abbott ayuda a asegurar la detección de las especies mutantes mediante el cambio de una detección monoclonal en nuestro ensayo Auszyme a una detección policlonal con nuestras plataformas AXSYM, Architect y PRISM.

Por lo tanto, los ensayos robustos frente a la mutación del antígeno de superficie deben contener varios anticuerpos monoclonales y/o policlonales para la captura y detección, o tienen

que tener anticuerpos que evitan los epítomos que mutan con frecuencia. Los ensayos de confirmación y las neutralizaciones policlonales son sólo tan eficaces para detectar mutantes como el ensayo de base. En estos casos, el ensayo de base debe primero mostrar un resultado positivo antes de incorporar la neutralización policlonal. Si el ensayo de base no detecta mutantes, el ensayo de confirmación es inútil, ya que el protocolo dicta que los resultados negativos no están confirmados.

En resumen, la mutación del antígeno de superficie ocurre en función del virus y no de una población de pacientes o de una ubicación geográfica en particular. Además, ciertas presiones selectivas, tal como la vacunación y la IGHB, pueden aumentar el número de observaciones de mutantes.

Se pueden obtener resultados negativos falsos con los sistemas de ensayo que no dan cuenta de los mutantes del antígeno de superficie.

Por último, el diseño del ensayo es importante para hacer que los ensayos sean robustos frente a la mutación del antígeno de superficie.

Departamento de Marketing
Abbott Laboratories Argentina
add_argentina_mkt@abbott.com