

Hepatitis B: Análisis de mutaciones asociadas a resistencia al tratamiento

 26 min.



En el siguiente artículo realizado por el Lic. Ignacio Chiesa y la Dra. María Pérez del Área Medicina Genómica-MANLAB nos describen un análisis detallado de las

mutaciones asociadas a la resistencia del tratamiento de la hepatitis B. Además nos cuenta sobre nuevas técnicas de secuenciación que permiten un análisis en simultáneo de miles de fragmentos amplificados de 200 pares de bases, lo cual incrementa la probabilidad de detectar variantes minoritarias y de esta manera poder predecir y/ o detectar causas de

fracasos terapéuticos con la identificación de las mutaciones presentes en el genoma del virus infectante.



Lic. Ignacio J. Chiesa (1),
Dra. María Silvia Pérez (2).

BIO-RAD

Hemoglobina Glicosilada (Gold Standard)

Totalmente Automatizado

D-10



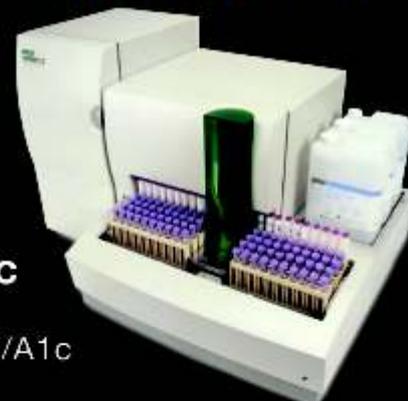
HPLC

- ▶ HbA_{1c}
- ▶ HbA₂/F/A_{1c}



Crmatograma de Paciente Diabético

VARIANT™ II
VARIANT™ II
turbo



HPLC

- ▶ HbA_{1c}
- ▶ HbA₂/F/A_{1c}

BIODIAGNOSTICO

Av. Ing. H. Largo 1437 P.B. "T" - C1107APB - Buenos Aires - Argentina Tel./Fax: +54 11 4300-9090

info@biodiagnostico.com.ar www.biodiagnostico.com.ar

(1) Licenciado en Ciencias Biológicas UBA. Biólogo Molecular Área Medicina Genómica-MANLAB.
 (2) Bioquímica UNLP. Dra. Biología Molecular UBA. Jefa del Área Medicina Genómica-MANLAB.



E-mail:
 ignacio.chiesa@genesis-manlab.com.ar



Aproximadamente, 400 millones de personas en el mundo son portadores crónicos del virus de la hepatitis B (HBV). A pesar de la existencia de una vacuna efectiva, alrededor del 5% de la población mundial está infectado con HBV. (1)

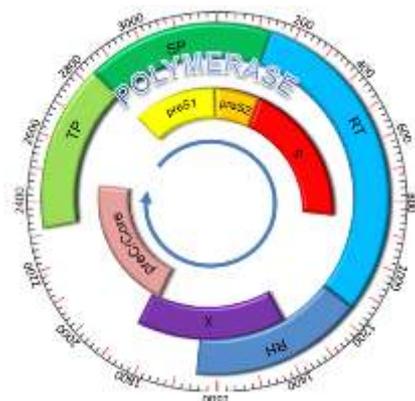
En una infección crónica, los pacientes frecuentemente desarrollan enfermedad hepática severa la cual puede llevar al desarrollo de cirrosis y de carcinoma hepatocelular como parte de la historia natural de la infección.

El HBV puede transmitirse durante el período perinatal, por vía cutánea, transfusiones y por vía sexual.

HBV es un virus perteneciente a la familia hepadnaviridae. Su genoma contiene ADN de cadena circular parcialmente doble de aproximadamente 3,2 kb de largo (Fig. 1). Los virus de esta familia son virus envueltos que realizan un proceso de retrotranscripción durante su ciclo de replicación.



Figura 1. Genoma del HBV



El genoma contiene 4 marcos de lectura parcialmente superpuestos que codifican para las proteínas de la envoltura (región preS-S), del core (región pre-core-core; preC-C), de la polimerasa y de las proteínas X. La región preS-S codifica los tres antígenos de superficie (S, preS1, preS2) a través de tres codones de inicio diferentes (Fig.1). La proteína más abundante es la S de 24 kD, conocida como HBsAg.

Hasta el momento, se han identificado ocho genotipos (A al H). Las secuencias de los genomas de los distintos genotipos difieren en más de un 8%. Debido a la diversidad genética, se han descrito numerosos subtipos dentro de los distintos genotipos (al menos 24, excepto para los genotipos E y G) que difieren entre sí al menos en un 4%. (2)

Dentro de los esquemas terapéuticos aprobados para el tratamiento de la hepatitis B crónica se encuentran: interferón-alfa, peg-interferón-alfa, y 5 análogos nucleosídicos/ nucleotídicos. Estos últimos se pueden dividir en tres grupos estructurales: L-nucleósidos (lamivudina y telbivudina), alquil-fosfonatos (adefovir dipivoxil y tenofovir) y D-ciclopentanos (entecavir) (3).

Los análogos nucleosídicos/ nucleotídicos tienen estructuras análogas a los nucleósidos/ nucleótidos que normalmente incorporan la transcriptasa reversa y la DNA polimerasa en la síntesis del DNA durante la replicación. Así, la lamivudina es análoga de citosina, adefovir lo es de adenina y entecavir de guanidina. Estos análogos para ser activos requieren de su trifosforilación intracelular alcanzando mayor similitud con los deoxinucleosidos/ deoxinucleótidos trifosforilados (dNTPs), sustratos naturales de la enzima. La transcriptasa reversa y la DNA polimerasa al realizar la síntesis del DNA incorporan estas drogas análogas en lugar de los dNTPs actuando como terminadores de la síntesis de la cadena de DNA, y por lo tanto, se inhibe la replicación viral.

La definición clínica de resistencia del HBV a análogos nucleosídicos/ nucleotídicos se define según las fluctuaciones en la carga viral (concentración de partículas virales en plasma), la cual es la mejor indicadora de replicación viral in vivo. Un

efecto antiviral se define como una reducción mínima de 1 log₁₀ UI/ml de ADN de HBV en suero luego de 3 meses tratamiento con antivirales. Un aumento de 1 log₁₀ UI/ml desde la menor carga viral obtenida durante el tratamiento indica un fracaso del mismo y podría deberse a la aparición de resistencia al análogo nucleosídico/ nucleotídico utilizado (4).

Asimismo se puede diferenciar entre resistencias primarias y secundarias o compensatorias. La resistencia primaria se define como la incapacidad del agente antiviral para disminuir la carga de ADN viral en por lo menos 1 log₁₀ UI/ml durante los primeros 3 meses de tratamiento. La resistencia secundaria o compensatoria sería el aumento de, por lo menos, 1 log₁₀ UI/ml en la carga viral de dos muestras consecutivas en un período de un mes en pacientes que previamente habían respondido al tratamiento.

La resistencia cruzada se define como la aparición de resistencia a una droga como consecuencias de la selección previa de resistencia a otra droga utilizada. Esto es más común entre drogas pertenecientes a una misma familia, pero puede observarse entre drogas con estructuras diferentes.

Las mutaciones que confieren resistencia a lamivudina producen resistencia cruzada a otros L-nucleósidos. Las mutaciones que confieren resistencia a adefovir y/ o tenofovir no producen resistencia cruzada significativa a los L-nucleósidos (lamivudina y telbivudina) y al entecavir (4).

El proceso de resistencia comienza con una mutación en el gen de la polimerasa, lo que produce un incremento de la carga viral plasmática en el paciente, un aumento en los niveles de alanina amino transferasa en suero semanas o meses después, y la posterior progresión de enfermedad hepática.

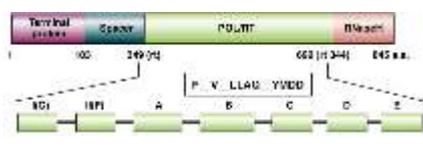
La resistencia a antivirales es la resultante de mutaciones adaptativas en el genoma viral. La infección con HBV está caracterizada por altos niveles de producción viral (más de 10¹¹ viriones por día). La alta tasa de replicación del HBV en combinación con la alta tasa de mutación (1 cada 10⁵ nucleótidos durante cada ciclo de replicación) resulta en que el paciente con

infección crónica posea una mezcla de cuasiespecies virales.

Resistencia asociada a L-nucleósidos: La resistencia a lamivudina y telbivudina causada principalmente por las mutaciones rtM204I/V, rtL180M y rtA181T/V (ver Tabla1) ha sido ubicada en el dominio catalítico tirosina-metionina-aspartato (YMDD) de la polimerasa viral (Fig. 2).



Figura 2. Polimerasa del HBV. Extraído de Zoulim F, Locarnini S. (2009) 137: 1593–1608.



Las mutaciones compensatorias que incrementan la replicación viral pueden ser detectadas en otros dominios de la polimerasa del HBV como rtL80V/I, rtI169T, rtV173L, rtT184S/G, rtS202I, y rtQ215S.

La mutación rtM204V/I no confiere resistencia a adefovir ni a tenofovir, mientras que rtA181T/V sí. Las mutaciones rtI169T, rtT184S/G, y rtS202I/G contribuyen a la resistencia a entecavir pero no confieren resistencia por sí solas. Las mutaciones rtM204V/I y rtA181T producen resistencia cruzada a todos los otros análogos L-nucleosídicos incluidos telbivudina. La mutación rtM204I ha sido detectada aislada, pero las mutaciones rtM204V y rtM204S se encuentran solamente en asociación con otras mutaciones los dominios A y B de la polimerasa viral (Fig. 2). La resistencia a lamivudina se incrementa progresivamente durante el curso del tratamiento. Del 14% al 32% de los pacientes desarrollan resistencia a la droga al año de haber empezado el tratamiento y más del 80% son resistentes después de los 2 años de tratamiento.

La tasa de aparición de resistencia a telbivudina es menor a la de lamivudina pero considerable. El 25% de los pacientes HBeAg positivos y el 11% de los pacientes HBeAg negativos desarrollan resistencia a

los 2 años de comienzo del tratamiento. (5) Resistencia asociada a alkil-fosfonatos:

La resistencia a adefovir fue asociada inicialmente a mutaciones en los dominios B (rtA181T/V) y D (rtN236T) de la enzima (Fig. 2). Estas mutaciones producen resistencia cruzada parcial a tenofovir. La mutación rtN236T no afecta significativamente a la sensibilidad de lamivudina, telbivudina o entecavir, pero disminuye la eficacia de tenofovir in vitro. La mutación rtA181T/V produce un descenso en la susceptibilidad a adefovir y tenofovir, y produce resistencia cruzada parcial a lamivudina y telbivudina. La mutación rtI233V confiere resistencia a adefovir.

La detección las mutaciones rtA181T/V y rtN236T en pacientes en los cuales falló el tratamiento con adefovir resultó en una disminución de la eficacia en la actividad antiviral cuando se les cambió el tratamiento a tenofovir (ver Tabla 1).

La tasa de selección de virus resistentes a adefovir es menor y ocurre en

Zymo Research ha desarrollado tecnologías de última generación



- Productos para todo tipo de muestras: tejidos, células, fluidos biológicos, tejidos parafinados, virus, plásmidos.
- Purificación de DNA y RNA ambiental
 - Soil Microbe DNA
 - Fecal DNA
 - Fungal/Bacterial DNA/RNA
 - Tissue & Insect DNA/RNA
 - Plant/Seed DNA
 - Plant RNA
- Tecnología de columnas de sílica con un volumen de elución mínimo de 6 µl que permite concentrar significativamente la muestra.
- El diseño de las mismas asegura la completa elución sin carryover de buffer.
- Columnas altamente versátiles en sus aplicaciones (micro, mini, midi).
- Formatos de columnas individuales y placas de 96 wells.

Muestras gratis disponibles para probar

Para mayor información: Av. Dorrego 673 (C1414CKB) Buenos Aires - Argentina - Tel: 54-11-4854-7775 (rot.) Fax: 54-11-4857-0884 - biosyst@biosyst.com.ar - www.biosyst.com.ar

un 30% de los pacientes HBeAg negativos y 42% en pacientes HBeAg positivos a los 4 o 5 años de empezado el tratamiento. Cuando se utiliza adefovir en pacientes resistentes a lamivudina, se encontró resistencia en el 20% de los pacientes a los 12 meses de tratamiento con adefovir.

Resistencia asociada a D-ciclopentanos: Las mutaciones asociadas a la resistencia a entecavir ha sido ubicada en el dominio B (rtI169T, rtL180M, y/o rtS184G), en el dominio C (rtS202I y rtM204V), y en el dominio E (rtM250V) de la polimerasa de HBV (Tabla 1 y Fig. 2).

Se han reportado bajas tasas de resistencia a entecavir (1,2%) en pacientes con 6 años de tratamiento. (5) (6).



Tabla 1: Mutaciones de resistencia a análogos nucleosídicos/ nucleotídicos.

Análogo nucleosídico/ nucleotídico	Mutaciones
Lamivudina	rtM204I rtL180M + rtM204V rtI180M + rtM204I rtL180M + rtM204V + rtV173L rtL93H + rtL180M + rtM204I
Telbivudina	rtM204I rtM204I + rtL180M + rtL801V rtM204I + rtL180M + rtV173L + rtL801V
Adefovir	rtA181T/V rtN233V rtN236T rtA181T + rtN236T
Tenofovir	rtA181T/V + rtN236T (*) L180M + A194T + M204V
Entecavir	rtI189T rtM250V + rtI169T rtM204V + rtL180M + rtI184A/I/S rtM204V + rtL180M + rtS202C rtM250V

(*) Causa pérdida de sensibilidad.

Con el advenimiento de las técnicas moleculares, actualmente es posible detectar mutaciones asociadas a resistencia de HBV, con las técnicas de PCR y secuenciación se realiza una amplificación de la región de la polimerasa donde se encuentran las mutaciones y posterior secuenciación directa del amplicón obtenido. Esta técnica permite la identificación de todas las sustituciones incluidas en el fragmento amplificado, incluyendo las mutaciones primarias, las compensatorias y nuevas mutaciones. (7)

Una vez obtenida, la secuencia puede ser analizada en busca de mutaciones utilizando programas y bases de datos disponibles en internet. Uno de estos programas es HBVSeq (Universidad de

Stanford), el cual permite a los usuarios identificar mutaciones en las secuencias ingresadas e informar sobre la prevalencia de las mismas en la base de datos de acuerdo al genotipo y al tratamiento.

HBVSeq busca homología entre la secuencia ingresada y las guardadas en la base de datos. De esta manera determina el genotipo e informa las mutaciones detectadas. (8)

El análisis de secuencia es considerado como la metodología "Gold Standard". Sin embargo la sensibilidad de la secuenciación directa para la detección de poblaciones de variantes minoritarias es pobre. La principal desventaja es su falta de sensibilidad en la detección de las poblaciones resistentes si éstas coexisten con el virus salvaje y representan menos del 20% del total. Este hecho limita su utilidad para detectar resistencias en su fase más temprana de generación. (4) (7)

Este problema puede ser superado utilizando nuevas técnicas de secuenciación, como por ejemplo la pirosecuenciación. Esta tecnología realiza una secuenciación masiva en paralelo de moléculas individuales de ADN permitiendo el análisis en simultáneo de miles de fragmentos amplificados de 200 pares de bases, lo cual incrementa la probabilidad de detectar variantes minoritarias. (7)

De esta manera el Laboratorio de Biología Molecular diagnóstica puede predecir y/ o detectar causas de fracasos terapéuticos con la identificación de las mutaciones presentes en el genoma del virus infectante.



MANLAB®
Diagnóstico Bioquímico y Genómico

Bibliografía:

- 1).Lai CL., Ratziu V., Yuen MF., Poynard T. Viral hepatitis B. Lancet. 2003; 362: 2089–2094.
- 2).Arauz-Ruiz, P., H. Norder, B. H. Robertson, and L. O. Magnius. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. J. Gen. Virol. 2002; 83: 2059–2073.
- 3).Zoulim F. Hepatitis B virus resistance to antiviral drugs: where are we going? Liver Int. 2011; 31 Suppl 1: 111-116.
- 4).Shaw T., Bartholomeusz A., Locarnini S. HBV drug resistance: Mechanisms, detection and interpretation. J Hepatol. 2006; 44: 593–606.
- 5).Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B Virus Resistance to Nucleos(t)ide Analogues. Gastroenterology. 2009; 137: 1593–1608.
- 6).Sayan M., Akhan SC., Senturk O. Frequency and Mutation Patterns of Resistance in Patients with Chronic Hepatitis B Infection Treated with Nucleos(t)ide Analogs in Add-On and Switch Strategies. Hepat Mon. 2011; 11(10): 835-842.
- 7).Solmone M, Vincenti D, Prosperi MC., Bruselles A., Ippolito G., and Capobianchi MR. Use of Massively Parallel Ultradeep Pyrosequencing To Characterize the Genetic Diversity of Hepatitis B Virus in Drug-Resistant and Drug-Naive Patients and To Detect Minor Variants in Reverse Transcriptase and Hepatitis B S Antigen. J Virol. 2009; 83(4): 1718–1726.
- 8).Rhee SY., Margeridon-Thermet S., Nguyen MH., Liu TF., Kagan RM., Beggel B., Verheyen J., Kaiser R., Shafer RW. Hepatitis B virus reverse transcriptase sequence variant database for sequence analysis and mutation discovery. Antiviral Res. 2010; 88: 269–275.