

Tesis Doctoral

Coinfección HIV-HBV en regiones genómicas reguladoras

Cassino, Lucila

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Cassino, Lucila. (2011). Coinfección HIV-HBV en regiones genómicas reguladoras. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Cassino, Lucila. "Coinfección HIV-HBV en regiones genómicas reguladoras". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Coinfección HIV-HBV: análisis de la variabilidad del HBV en regiones genómicas reguladoras

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Lucila Cassino

Director de Tesis: Dr. Jorge F. Quarleri

Consejero de Estudios: Dra. Laura Alché

Lugar de trabajo: Centro Nacional de Referencia para el SIDA
Dpto. de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2011.

Coinfección HIV-HBV: análisis de la variabilidad del HBV en regiones genómicas reguladoras

La coinfección con HIV y HBV es común en virtud de que ambos virus comparten similares vías de transmisión. La coexistencia de HIV puede modificar la historia natural de la infección por HBV favoreciendo la progresión a cronicidad y aumentando la tasa de replicación de éste. Estos eventos encuentran sustento en la potencial capacidad de modificar el accionar de elementos que regulan la expresión génica. Desde allí surge como objetivo principal de la presente tesis estudiar el impacto de HIV sobre la variabilidad y la evolución molecular de HBV desde las regiones genómicas S, pol, preC/C y X a partir de pacientes crónicamente mono infectados con HBV y HIV-coinfectados, estudiados longitudinalmente.

El genotipo A2 de HBV resultó el más prevalente ante la coinfección. Sin embargo, comparativamente los aislamientos de tal genotipo caracterizados en pacientes mono infectados mostraron mayor propensión a cambios en regiones regulatorias. En línea con ello, la evolución molecular de HBV exhibió diferentes tasas de evolución así como menor heterogeneidad y diversidad de cuasiespecies cuando HIV está presente.

Este estudio muestra por vez primera el impacto que le imprime la concomitante infección por HIV sobre diferentes parámetros relacionados a la evolución molecular del HBV.

Palabras clave: Virus de la hepatitis B, Virus de inmunodeficiencia humana, coinfección, mutaciones, evolución molecular, resistencia.

HIV-HBV coinfection: Analysis of HBV variability in regulatory genomic regions

Coinfection with HIV and HBV is a common event since both viruses share blood-borne transmission routes. The natural history of HBV infection is modified by HIV infection leading to an increased risk of hepatitis B evolution to chronicity and a higher replication rate. These events are related with a potential capacity of HIV to modify the activity of regulatory elements of genomic expression. Taking this into account, this thesis is aimed to study HIV impact on HBV variability and molecular evolution in S, pol, preC/C and X HBV genomic regions from HBV monoinfected and HIV coinfecting patients, longitudinally studied.

Hepatitis B genotype A2 was the most prevalent in coinfecting individuals. However, genotype A2 isolates from monoinfected patients showed more changes in regulatory regions. In line with these results, HBV molecular evolution exhibited different evolutionary rates and less heterogeneity and quasispecies diversity when HIV coexists.

This study demonstrates HIV influence in different parameters related with HBV molecular evolution.

Key words: Hepatitis B virus, human immunodeficiency virus, coinfection, mutations, molecular evolution, resistance.

Agradecimientos

A mis papás, Miriam y Claudio, por darme todo su apoyo sin el cual no hubiera logrado todo lo que logré profesional y personalmente; por enseñarme los valores de la vida que hicieron que hoy sea la persona que soy.

A Maria y Pedro y mi hermano Emi, por estar ahí siempre y por compartir conmigo innumerables charlas y consejos.

A Checha, Solcis y Fede, mis grandes amigos de la facu con quienes compartimos muchas anécdotas facultativas. En especial a Fede por su gran paciencia.

A Naty y Aneta, que han estado conmigo en las buenas y en las malas, por sus consejos de “mamás” y su apoyo.

A Bel, Ro, Fiby, Ruso, Loli, Sol y Rena, mis amigos que, incondicionalmente, me han prestado su hombro y su oído tantas veces... y lo siguen haciendo.

A mi director Jorge por confiar en mí, abrirme las puertas del Telohepatoteam y sin quien esta tesis no se hubiera logrado.

A Horacio Salomón por permitirme formar parte del CNRS.

A todos los chicos del CNRS, especialmente del Brownish (Franco, Cris D., Mauri) quienes más de una vez me han dado una mano.

A Carolina Torres y Viviana Mbayed por su gran ayuda en la parte de evolución.

Índice

Índice	i
Abreviaturas	ix
1 Introducción	2
1.1 Virus de Hepatitis B	2
1.1.1 Historia	2
1.1.2 Clasificación	2
1.1.3 Estructura	2
1.1.4 Elementos regulatorios que controlan la replicación viral	5
1.1.5 Ciclo de replicación viral	7
1.1.6 Patogénesis	9
1.1.7 Historia natural de la infección	11
1.1.8 Infección primaria	12
1.1.9 Infección crónica	12
1.1.10 Vías de transmisión	13
1.1.11 Variabilidad genómica de HBV, implicancias clínicas y epidemiología en Argentina	14
1.1.11.1 Variabilidad genotípica	14
• Genotipos de HBV, distribución geográfica y sus implicancias clínicas	14
1.1.11.2 Variabilidad fenotípica	16
• Variantes de precore	16
• Variantes del promotor del core	17
• Variantes de la polimerasa viral	18
• Variantes en el gen S	20
1.1.12 Epidemiología mundial de HBV	20
1.1.13 Epidemiología de HBV en Argentina	21
1.1.14 Evolución molecular de HBV	22
1.2 Virus de la inmunodeficiencia humana	23
1.2.1 Breve reseña histórica	23
1.2.2 Clasificación	24
1.2.3 Replicación viral	25
1.2.4 Vías de transmisión	26
1.2.5 Historia natural de la infección	26
1.2.6 Epidemiología mundial	27

1.2.7	Situación del HIV-sida en Argentina	27
1.3	Coinfección HIV/HBV	28
1.3.1	Epidemiología de la coinfección HIV/HBV	28
1.3.2	Historia natural de la coinfección HIV/HBV	28
1.3.3	Manejo de la coinfección HIV-HBV.....	30
1.3.4	Diagnóstico de la coinfección HIV-HBV.....	30
2	Objetivos	33
2.1	Objetivo principal.....	33
2.2	Objetivos particulares	33
3	Materiales y Métodos.....	36
3.1	Distribución de genotipos en el contexto de la coinfección con HIV y Dinámica de variantes de las regiones genómicas preC/C y S en pacientes crónicamente infectados con HBV en un estudio longitudinal ..	36
	• Población bajo estudio	36
	• Datos clínicos.....	40
	• Obtención y procesamiento de las muestras	40
	• Medición de la carga viral plasmática de HIV.....	40
	• Estudio de poblaciones celulares.....	41
	• Medición del nivel de transaminasas hepáticas	41
	• Diagnóstico de infección por HBV	41
	• Medición de la carga viral plasmática de HBV	41
	• Extracción de ADN y amplificación de las regiones genómicas de HBV S y preC/C	42
	▪ Amplificación de la región S.....	42
	▪ Amplificación de la región preC/C.....	42
	• Clonado.....	43
	• Genotipificación de los aislamientos de HBV mediante análisis filogenético	43
	• Análisis de la estructura secundaria del ARN pregenómico de HBV.....	44
	• Análisis de mutaciones y deleciones en preC/C	44
	• Amplificación de pol para mutaciones de resistencia a terapia 44	
	• Relaciones filogenéticas intra e interpaciente	45
	▪ Análisis filogenético.....	45
	▪ Determinación de la tasa de evolución molecular de HBV 45	
	▪ Análisis de la heterogeneidad de HBV	46
	Análisis interpaciente:.....	46
	Análisis intrapaciente:.....	46
	▪ Selección positiva y negativa	47
	• Análisis de evolución molecular en epitopes antigénicos de linfocitos T citotóxicos y T helper	48
	• Análisis estadístico.....	48

3.2	Análisis de la dinámica de cuasiespecies virales a lo largo de 14 años bajo diferentes terapias antivirales	48
	• Paciente bajo estudio	48
	• Patrón serológico HBeAg-Anti HBe.....	50
	• Medición del nivel de transaminasas hepáticas	51
	• Medición de la carga viral plasmática de HBV	51
	• Procesamiento de las muestras	51
	• Medición de la concentración plasmática de tenofovir	51
	• Evolución molecular de HBV a lo largo de 14 años	51
	▪ Análisis de composición de cuasiespecies.....	51
	▪ Análisis filogenético.....	52
	▪ Análisis de la heterogeneidad de HBV en la región pol.....	52
	▪ Selección positiva y negativa	52
	▪ Determinación de la tasa de evolución molecular de HBV y tMRCA.....	52
	• Análisis estadístico.....	53
3.3	Prevalencia de variantes de HBV con resistencia basal al tratamiento antiviral.....	53
	• Población bajo estudio e inspección de mutantes de resistencia.....	53
4	Resultados.....	56
4.1	Distribución de genotipos de HBV en el contexto de la coinfección con HIV	56
	• Asignación de genotipos de HBV basada en la región preC/C en coinfectados (P)	57
	▪ Pacientes HBeAg (+).....	57
	▪ Pacientes HBeAg (-).....	60
	• Asignación de genotipos de HBV basada en la región preC/C en monoinfectados (M).....	61
	▪ Pacientes HBeAg (+) y (-)	61
	• Impacto de la coinfección con HIV en la dinámica de variantes de las regiones genómicas preC/C y S en pacientes crónicamente infectados con HBV	62
	▪ Análisis de la estructura secundaria del RNA de la señal de encapsidación:	62
	• Prevalencia y dinámica de mutaciones y deleciones a lo largo de 3 años, en los ORFs preC/ C y pol y, su relación con parámetros virales y bioquímicos	64
	▪ Pacientes HBeAg (+), coinfectados.....	64
	▪ Pacientes HBeAg (-), coinfectados.....	66
	▪ Pacientes HBeAg (+), monoinfectados	67
	▪ Pacientes HBeAg (-), monoinfectados	67
	• Resistencia a LMV y eficiencia replicativa.....	68
4.2	Estudio de la evolución molecular de HBV en el contexto de la coinfección con HIV:	70
	• Análisis filogenético.....	70
	• Análisis de tasa de evolución molecular.....	74

•	Análisis de secuencias a nivel interpaciente	74
•	Análisis de secuencias a nivel intrapaciente	75
•	Análisis de la relación dN/dS.....	76
•	Análisis de evolución molecular en epitopes antigénicos de linfocitos T citotóxicos y T helper	79
▪	Selección positiva y negativa	80
4.3	Análisis de la dinámica de cuasiespecies virales a lo largo de 14 años bajo diferentes terapias antivirales	81
▪	Análisis de mutaciones de resistencia al tratamiento antiviral.....	81
▪	Análisis de variaciones en preC/C.....	82
•	Evolución molecular de HBV a lo largo de 14 años	83
▪	Análisis filogenético.....	83
▪	Selección positiva y negativa	85
▪	Tasa de mutación y tMRCA	85
▪	Heterogeneidad de HBV en la región genómica pol.....	85
4.4	Prevalencia de variantes de HBV con resistencia basal al tratamiento antiviral.....	86
5	Discusión.....	92
5.1	Distribución de genotipos de HBV en el contexto de la coinfección con HIV	92
•	Prevalencia y dinámica de mutaciones y deleciones a lo largo de 3 años, en los ORFs preC/ C y pol y su relación con parámetros virales y bioquímicos	94
▪	Análisis de la estructura secundaria del RNA de la señal ϵ de encapsidación:	99
▪	Relación con parámetros virales y bioquímicos	100
5.2	Estudio de la evolución molecular de HBV en el contexto de la coinfección con HIV:	101
5.3	Análisis de la dinámica de cuasiespecies virales a lo largo de 14 años bajo diferentes terapias antivirales	106
▪	Dinamica de las mutaciones de resistencia a la terapia antiviral.....	106
▪	Perfil serológico HBeAg- Anti HBe	110
▪	Evolución molecular y dinámica de mutaciones en pol y preC/C.....	111
5.4	Prevalencia de variantes de HBV con resistencia basal al tratamiento antiviral.....	114
6	Conclusión	118
7	Bibliografía	121

Abreviaturas

aa: aminoácido

ADNc: ADN copia

ADNdc: ADN doble cadena

ADNrc: ADN no cerrado covalentemente

ADNccc: ADN circular y covalentemente cerrado

ADV: adefovir dipivoxil

ALT: transaminasas hepáticas

anti HBc: anticuerpos contra el antígeno del core

anti HBe: anticuerpos contra el antígeno e

anti HBs: anticuerpos contra el antígeno S

ARN: Ácido ribonucleico

ARNpg: ARN pregenómico

ARNm: ARN mensajero

BCP: promotor basal del core (siglas en inglés de *Basal core promoter*),

BS: variante con baja resistencia al tratamiento

CMP: variantes compensatorias

CP: promotor del core

CTL: linfocito T citotóxico

CV: carga viral

d: distancia genética media

dN: sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato

dS: sustituciones sinónimas por sitio sinónimo

ETV: entecavir

Fem: sexo femenino

HBsAg: antígeno de superficie de hepatitis B

HBcAg: antígeno del *core* de hepatitis B

HBeAg: antígeno e de hepatitis B

HBV: virus de hepatitis B

HBx: proteína X de hepatitis B

HMX: homosexual

HPD: mayor densidad probabilística (siglas en inglés de *high posterior density*).

HTSX: heterosexual
HIV: virus de la inmunodeficiencia humana
IFN: interferón.
IgM: inmunoglobulina M.
LMV: lamivudina
LT-CD4+: linfocitos CD4+
LT-CD8+: linfocitos T CD8+
LTR: secuencias repetitivas terminales
Masc: sexo masculino
MCMC: cadenas de Markov de Montecarlo
MHC II: complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
ML: Máxima Verosimilitud (siglas en inglés de *open Maximun Likelihood*)
M: pacientes mono infectados con HBV
NC: no corresponde
ND: no disponible
NEG: resultado negativo
NJ: Neighbor Joining
nt: nucleótido
ORF: marco abierto de lectura (siglas en inglés de *open reading frames*)
P: pacientes HIV-HBV coinfectados
Paciente HBeAg (+): paciente HBeAg positivo
Paciente HBeAg (-): paciente HBeAg negativo
pb: pares de bases
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
Pol: polimerasa
POS: resultado positivo
preC/C: región precore/core de hepatitis B
RES: variante resistente al tratamiento
RT: transcriptasa reversa (siglas en inglés de *reverse transcriptase*)
sida: síndrome de inmunodeficiencia adquirida
Sn: Entropía de Shannon
TARV: terapia antiretroviral de alta eficacia
TDF: tenofovir dipivoxil fumarato

TEL: telbivudina

tMRCA: tiempo del ancestro común más cercano

UDIs: usuarios de drogas inyectables

wt: tipo salvaje (siglas en inglés de *wild type*)

INTRODUCCIÓN

1 Introducción

1.1 Virus de Hepatitis B

1.1.1 Historia

Entre los años 50s y principio de los 70s, Murray [1] y Krugman [2] definieron las relaciones seroepidemiológicas entre hepatitis A y B que luego llevaron a la evaluación de nuevos métodos de diagnóstico e inmunoprofilaxis de estas enfermedades [3].

En 1963, Baruch Blumberg descubrió que una muestra de suero de un aborigen australiano contenía un antígeno que reaccionaba con un anticuerpo presente de un paciente hemofílico. Estudios posteriores de Okochi y Murakami [4] en 1968, demostraron que este antígeno australiano, hoy conocido como antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg), estaba presente exclusivamente en el suero de pacientes infectados con hepatitis B.

En 1970, Dane y colaboradores detectaron el virión completo de hepatitis B. Visualizaron la presencia de partículas virales de HBsAg de 42-nm junto con partículas virales incompletas en sangre de pacientes con hepatitis B [5].

1.1.2 Clasificación

El virus de hepatitis B (HBV) es el miembro prototipo de la familia *Hepadnaviridae* (virus ADN hepatotrópicos). Los miembros de esta familia infectan células hepáticas preferentemente pero pueden encontrarse pequeñas cantidades de virus en riñón, páncreas y células mononucleares.

1.1.3 Estructura

En el microscopio electrónico se pueden visualizar 3 tipos de partículas virales en el suero de pacientes infectados (figura 1A). Dos de ellas presentan una estructura esférica de 20 nm y filamentos de distintas longitudes y un ancho de 22 nm.

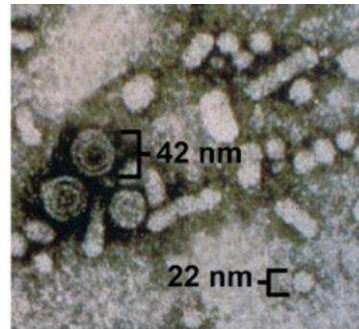


Figura 1A: Microfotografía electrónica de las formas de las partículas circulantes de HBV en sangre [6].

Las partículas esféricas y filamentosas están compuestas por el antígeno de superficie y lípidos del hospedador pero carecen de ácido nucleico viral y, por lo tanto, son no infectivas [7].

El virión infectivo presenta una estructura esférica de 42 nm de diámetro que consiste en una envoltura lipídica que contiene el HBsAg y que rodea a una nucleocápside interna compuesta por el antígeno del core (HBcAg). Éste forma un complejo con la polimerasa y el genoma viral (Figura 1B).

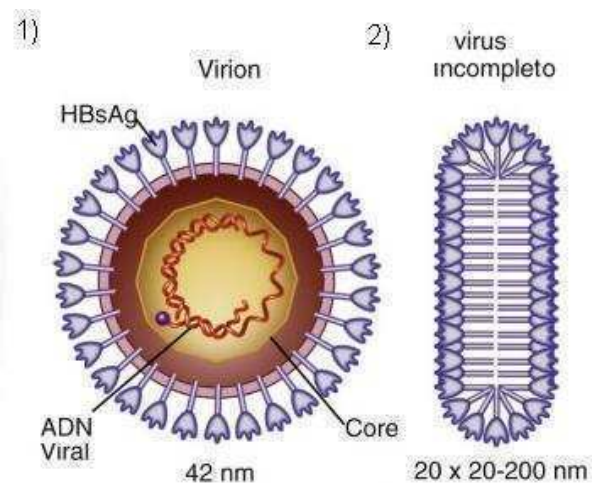


Figura 1B: 1) Diagrama de la partícula de Dane

2) Diagrama de la partícula filamentososa de 22 nm. Adaptado de: Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, et al. Principles of Virology, 2nd ed. Washington, DC: ASM Press; 2004, p 808 [8].

El genoma de HBV es circular, parcialmente bicatenario, de aproximadamente 3200pb. La polimerasa viral se encuentra unida covalentemente al extremo 5' de la cadena negativa [9].

El genoma se mantiene de forma circular a pesar de no estar cerrado covalentemente (ADNrc) debido a una pequeña región cohesiva que solapa la región situada entre los extremos 5' de ambas cadenas.

En el núcleo del hepatocito, el ADN viral pasa de la conformación ADNrc a ser circular y cerrado covalentemente (ADNccc) por acción de la polimerasa viral, así como por otras actividades enzimáticas de la célula hospedadora [10-11].

El ADNccc permanece en el hepatocito durante toda la vida de la célula y sirve como molde para la síntesis de los diferentes ARNm mediante la acción de la ARN polimerasa II del hospedador [12]. El genoma viral codifica para cuatro marcos de lectura (ORF: *open reading frames*) superpuestos (ORF: S, preC/C, P, y X) [13] (figura 1C). El ORF S codifica para las proteínas virales de la superficie de la envoltura conformando el HBsAg. Este puede dividirse, desde el punto de vista estructural y funcional, en las regiones preS1, preS2 y S, que codifican respectivamente para tres antígenos de superficie la proteína mayor o L-HBsAg (*Large*, la cual estaría involucrada a la adsorción del virus, el ensamblaje y liberación del virión); la proteína M-HBsAg (*Middle*, función desconocida); y la proteína más pequeña S-HBsAg, (*Small*, la más abundante) [14].

El ORF preC/C contiene las regiones precore y core. Cuando la traducción se produce a partir del primer codón, en la región de precore (posición 1814), codifica para el antígeno e (HBeAg). Dicho ORF codifica para un péptido señal que dirige el producto traducido al retículo endoplasmático donde es procesado para formar el HBeAg, que es secretado.

En cambio, si la traducción es iniciada en la región del core (codón de iniciación en la posición nucleotídica 1901), codifica para el HBcAg [14]. El HBcAg es una proteína estructural de la cápside viral mientras que la función del HBeAg se desconoce aunque se lo implica en la persistencia de la infección al actuar como un inmunotolerágeno [15] y como modulador del perfil T [16]. La secuencia corta situada entre los 2 codones de iniciación se denomina preC o precore.

El ORF P cubre las tres cuartas partes del genoma y solapa la porción carboxi-terminal del gen C, la totalidad del gen S y la porción amino-terminal del gen X. Codifica para la polimerasa (pol), proteína de aproximadamente 800 aminoácidos que se divide funcionalmente en 3 dominios: el dominio terminal de la proteína, involucrada en la encapsidación e iniciación de la síntesis de la cadena negativa; el dominio de la transcriptasa reversa (RT), que cataliza la

síntesis del genoma; y el dominio de la ribonucleasa H, que degrada el ARN pregenómico (ARNpg) y facilita la replicación [14].

El ORF X codifica una proteína de 16.5 Kd (HBx), con múltiples funciones incluyendo la transducción de señales, activación transcripcional, reparación del ADN viral e inhibición de la degradación de proteínas [17]. El mecanismo por el cual la proteína HBx lleva a cabo estas actividades se desconoce. Sin embargo está bien establecido que es necesaria para la infección por HBV *in vivo* y se lo relaciona con el potencial oncogénico del HBV [18].

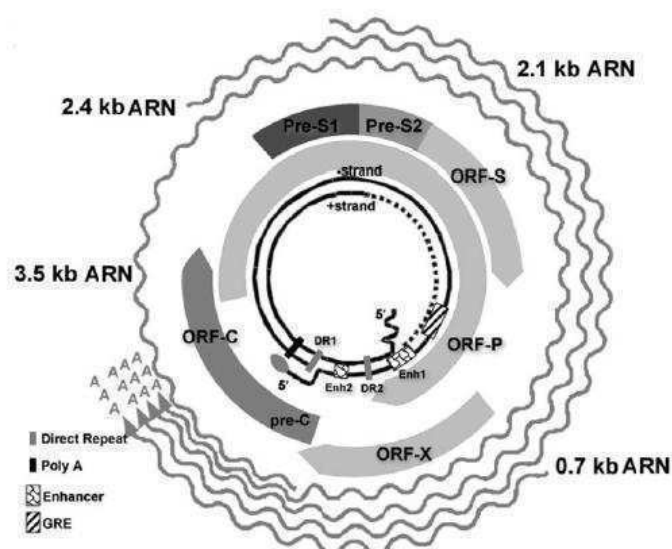


Figura 1C: Genoma de HBV, modificado de: Hepatitis B: The virus and the disease, Liang, 2009 [6].

1.1.4 Elementos regulatorios que controlan la replicación viral

Múltiples elementos regulatorios están diseminados por el genoma viral y están involucrados en la regulación y expresión de cada uno de los genes.

Todos los elementos regulatorios que actúan *in cis* se encuentran dentro de las secuencias codificantes de cada uno de los genes.

La expresión genómica está regulada por dos regiones incrementadoras o *enhancer* de la transcripción, situadas en ORF P y ORF preC/C, respectivamente (EnhI y EnhII) [19], 4 regiones promotoras para la transcripción de los 5 ARNm, un elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) en el dominio S [20] y un elemento de regulación negativa (NRE). Los cuatro promotores; el promotor basal del core (BCP), Pre-S1, PreS2/S y X, controlan la transcripción de los correspondientes ARNm de distintas

longitudes: 3.5 kb (PreC/C y ARNpg), 2.4 kb (ARNm Pre-S1), 2.1 kb (ARNm Pre-S2/S) y 0.7 kb (ARNm x). Estos ARNm generados no presentan *cap* o *splicing* y comparten una señal de poliadenilación.

Las funciones de estos transcritos son distintas y están sujetas a una regulación transcripcional coordinada y diferencial. De las 4 regiones promotoras, cabe destacar la correspondiente al gen preC/C desde donde se transcriben tanto el ARNpg como el ARN del precore (preC ARN). Este elemento regulatorio, que cumple este rol central en la replicación viral y morfogénesis, es el promotor del core (CP) (figura 1D). El mismo abarca la región comprendida entre los nucleótidos (nt) 1591 y 1822. Se solapa con el extremo 3' del ORF X y el extremo 5' del ORF preC-C. Consiste en dos regiones: el promotor basal del core (BCP) y el elemento regulatorio superior (URR).

El BCP contiene elementos regulatorios en *cis* que dirigen la transcripción del ARNpg y del preC ARN. Esta regulación está controlada por regiones ricas en AT (3 TATA boxes para preC ARN y 4 para ARNpg) [21].

El BCP contiene también 2 secuencias cortas idénticas, la DR1 (nt1824-1834) y la DR2 (nt 1590-1600), que son esenciales en el proceso de replicación [22].

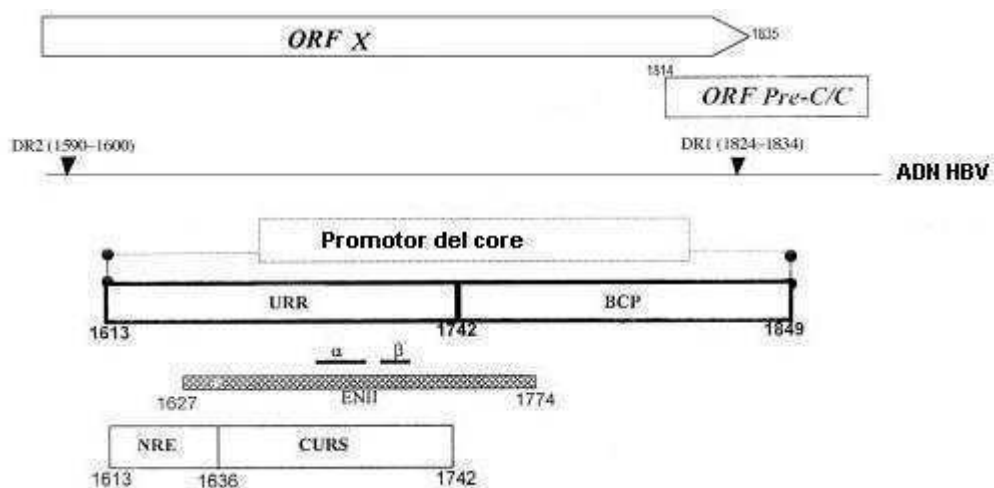


Figura 1D: Organización del promotor del core. Modificado de: The core promoter of Hepatitis B virus, Kramvis, 1999 [21].

Existen otros tres elementos regulatorios que controlan la replicación y se encuentran a nivel del ARN: la señal de poliadenilación, un elemento de regulación post-transcripcional (PRE) y la señal ϵ de encapsidación [23].

La señal de encapsidación consiste en 70 nucleótidos (posición 1846-1916). Contiene secuencias repetitivas que forman una estructura secundaria que puede ser reconocida en la reacción de empaquetamiento [24]. Dicha estructura secundaria está constituida por un *loop* y un *bulge* o protuberancia, ambos involucrados en la función de ϵ . La secuencia de ARN que codifica para ϵ forma parte del templado que se traducirá en la proteína precore/core que dará origen al HBeAg [24].

Además de la encapsidación, ϵ está involucrada en la iniciación de la retrotranscripción. La unión de la RT a ϵ desencadena las dos etapas esenciales de la replicación de HBV, el inicio de la retrotranscripción y el ensamblaje de la nucleocápside, llevando a la incorporación selectiva de RT y el ARNpg al interior del core viral [25].

1.1.5 Ciclo de replicación viral

La infección de la célula hepática se inicia con la interacción del virión con un receptor, todavía desconocido, de la membrana del hepatocito. La interacción depende del dominio preS1 [26]. Luego de la fusión de membranas, se libera la nucleocápside al citoplasma, y ésta se dirige al núcleo conducida por la señal de localización nuclear presente en la proteína del core. La nucleocápside interacciona con los poros nucleares y se disocia liberando el ADNrc en el interior del núcleo celular, donde es convertido a la forma "ccc" por acción de la polimerasa viral y otras enzimas de la célula [10-11]. La cadena negativa del ADNccc sirve de molde para la transcripción de los distintos ARN virales mediante la ARN polimerasa II celular. Estos ARN se transportan al citoplasma donde funcionan como molde para su traducción en las diferentes proteínas virales. Estos transcritos de 3,5Kb son de dos especies distintas, con extremos 5' diferentes: ARN pregenómico y preC ARN. El ARNpg sirve de templado para la retrotranscripción y el ARN mensajero, para las proteínas del core y la polimerasa. El preC ARN dirige la traducción del producto del gen precore (Figura 1E).

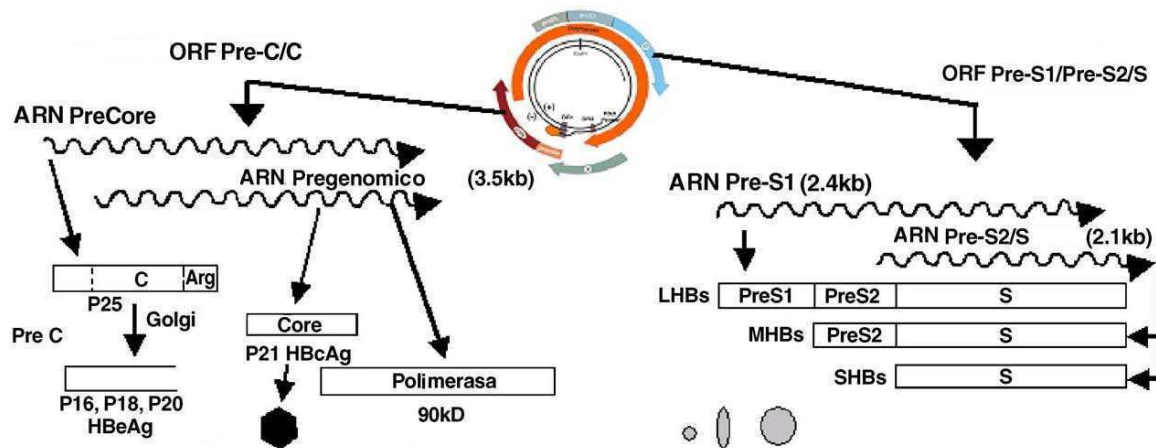


Figura 1E: Genoma de HBV mostrando los 4ORFs. Síntesis de precore/core, polimerasa y proteínas de envoltura desde distintos ARNm [27] .

La traducción de la polimerasa se inicia en el codón de iniciación de pol en el ARNpg, probablemente como resultado de un escaneo por parte del ribosoma [28]. Para que ocurra la retrotranscripción el ARNpg interactúa con sus 2 productos génicos, las proteínas de core y polimerasa, en la señal ϵ de encapsidación, formando cápsides en las cuales tiene lugar la retrotranscripción por acción de la polimerasa que, a medida que sintetiza el ADN, va degradando el ARN que le sirve de molde por acción del dominio RNAsaH [29]. La etapa clave para este proceso es la unión de la polimerasa al ARNpg en la señal ϵ de encapsidación, situada en la posición 5' del ARNpg [30].

La polimerasa media la retrotranscripción, primero a ADN de polaridad negativa y posteriormente sintetiza la hebra de polaridad positiva. Posteriormente, la forma circular del ADN se completa a través de una serie de pasos complejos que implican la transferencia de cadenas [31]. Luego, la nucleocápside interactúa con las proteínas de envoltura en el retículo endoplasmático para ensamblar los viriones maduros que luego serán secretados al medio extracelular.

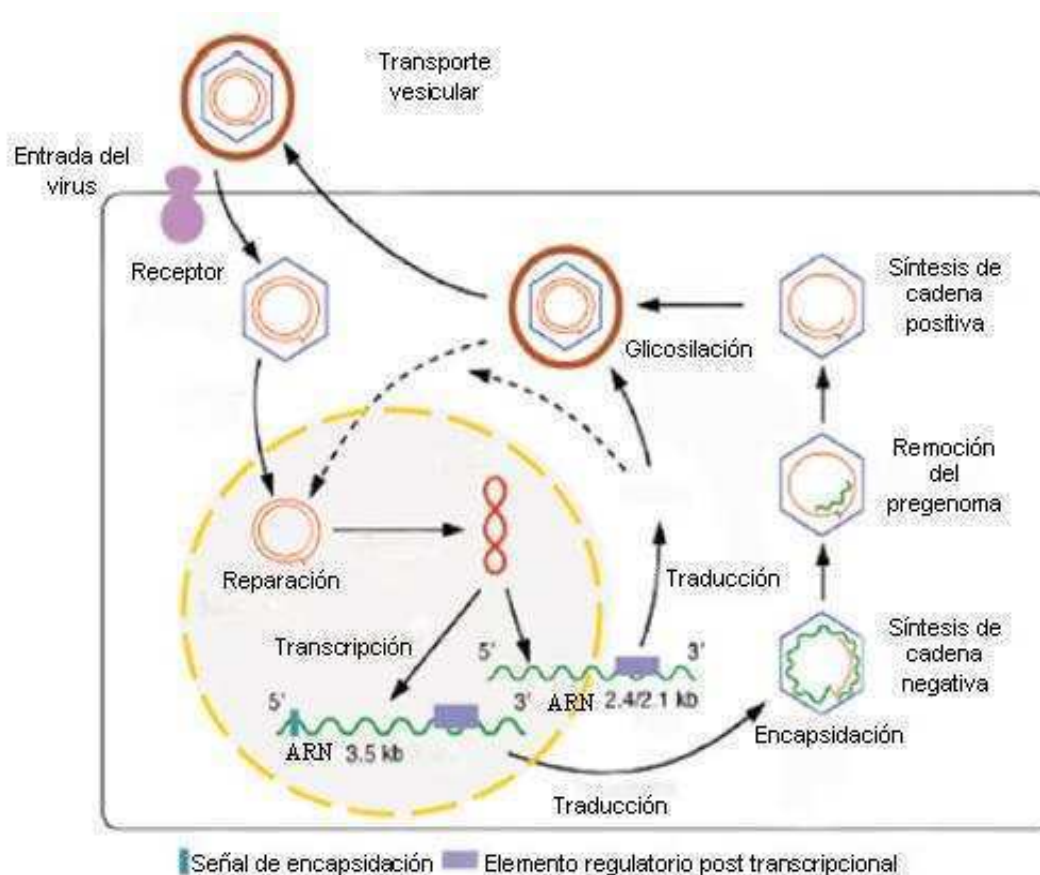


Figura 1F: Esquema del ciclo de replicación de HBV, modificado de Hepatitis B: The virus and the disease, Liang, 2009 [6].

1.1.6 Patogénesis

El ciclo de replicación de HBV no es directamente citopático para las células, a pesar que se postulan algunas diferencias según el genotipo [32]. Actualmente se sostiene que la respuesta inmune del hospedador a los antígenos virales expresados en los hepatocitos infectados son los principales determinantes del daño hepático. Pacientes con defectos inmunes exhiben daño hepático agudo y leve aunque elevadas tasas de progresión a cronicidad [33].

Distintos estudios clínicos muestran que en la hepatitis B aguda y autolimitada, una fuerte respuesta inmune celular T a muchos antígenos es demostrable en sangre periférica [34]. Esta respuesta involucra linfocitos T CD4+ (LT-CD4+) y T CD8+ (LT-CD8+) y está dirigida hacia múltiples epitopes de HBV.

Sin embargo, en los portadores crónicos de HBV, la respuesta T específica anti HBV está mayormente atenuada. La respuesta humoral es vigorosa en ambas

situaciones. Este patrón sugiere que la respuesta celular T, en especial la T citotóxica, juega un rol importante en la limitación de la infección (Figura 1G).

Cabe destacar que la magnitud de la muerte hepatocitaria por acción de linfocitos T citotóxicos (CTL), es escasa e insuficiente para producir todo el daño hepático. Se deduce que gran parte de dicha injuria es debida a una respuesta inflamatoria antígeno inespecífica puesta en marcha por los mismos linfocitos T citotóxicos. Presumiblemente, mucho del daño ocurrido es debido a productos citotóxicos de la respuesta inflamatoria como $TNF\alpha$ y el $IFN\gamma$, junto a radicales libres y proteasas [35-36].

Otras células involucradas en este sentido son las NK y NKT. Los efectos antivirales por este medio no incluyen la destrucción de las células infectadas. Dichas células (presentadoras de antígenos de la respuesta innata) son la fuente principal de de citoquinas antivirales a nivel intrahepático ($TNF\alpha$, $IFN\gamma$, $IFN\alpha/\beta$) [37]. Estas células son reclutadas en el hígado por quimiocinas secretadas por hepatocitos infectados y, una vez allí, reclutarán otras células del sistema inmune [38]. Las células NK son esenciales para el proceso de maduración de las células dendríticas, requeridas para la estimulación de las células T. Además, la secreción de $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, $IFN\alpha/\beta$ depende de la presencia de IL12 e IL18, que son producidas por las células dendríticas inducidas por HBV, células NK y los linfocitos T CD8+. Se ha demostrado que la inducción de estas citoquinas interfiere en el transporte post transcripcional del ARN de HBV del núcleo al citoplasma [39] y el ensamblaje post traduccional de la proteína del core a través de la eliminación de las nucleocápsides inmaduras conteniendo ARNpg [40].

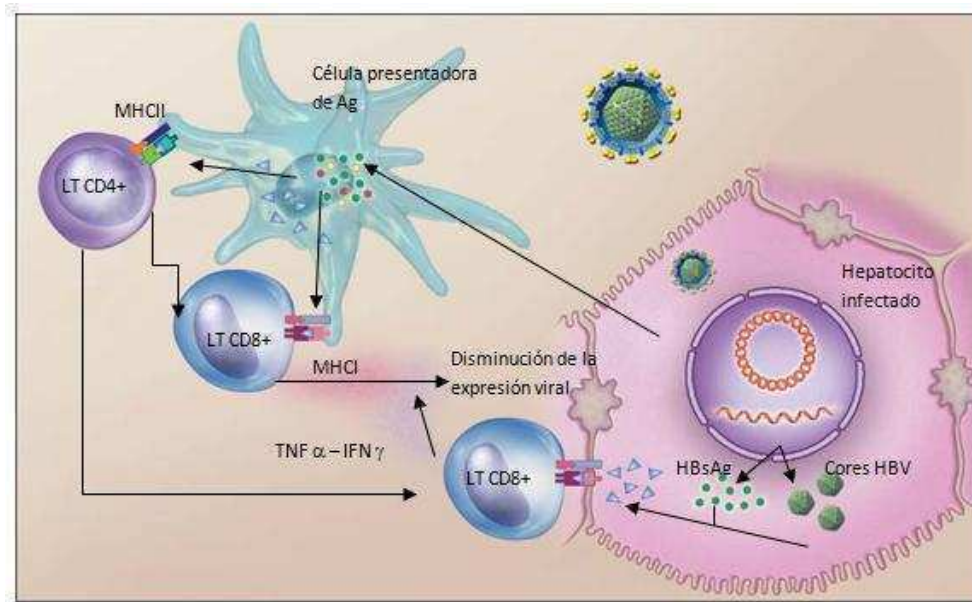


Figura 1G: Respuesta inmune celular a HBV. Modificado de: Hepatitis B virus infection- Natural history and clinical consequences. Ganem y Prince, 2004 [41].

1.1.7 Historia natural de la infección

La infección primaria en hospedadores susceptibles (no inmunes) puede ser sintomática o asintomática. Ésta última es más común que la primera. La mayoría de las infecciones primarias en adultos, ya sea sintomáticas o no, son autolimitadas, con eliminación del virus de la sangre e hígado y con desarrollo de inmunidad duradera a las reinfecciones [42]. Sin embargo, algunas infecciones primarias en adultos (menos del 5%), no resuelven la infección y desarrollan infección persistente. En estos casos, la replicación viral continúa en hígado y hay una viremia persistente aunque los títulos de carga viral plasmática y hepática pueden ser variables.

La infección persistente puede ser sintomática o asintomática. El hospedador con infección persistente subclínica, que presenta niveles normales de transaminasas hepáticas (ALT) y sin anomalías hepáticas mayores, se denomina *portador crónico asintomático*. Cuando existen hallazgos bioquímicos e histológicos anormales, el paciente presenta *hepatitis B crónica*. La cirrosis se desarrolla en el 20% de las personas con HBV crónica y se caracteriza por la presencia de nódulos regenerativos y fibrosis junto a injuria hepática severa.

1.1.8 Infección primaria

En la infección primaria, el HBsAg se detecta en sangre tras un período de incubación de 4-10 semanas, seguido de la aparición de anticuerpos contra el antígeno del core (anti HBc), los cuales son, en etapas tempranas, principalmente IgM [42]. La viremia se correlaciona con la detección de HBsAg. Los títulos virales en la infección aguda son muy altos, alcanzando niveles de 10^9 - 10^{10} viriones/ml de sangre [43].

El HBeAg se hace detectable en circulación en la mayoría de los casos. Si no hay injuria hepática en la infección primaria, los niveles de ALT no aumentan hasta que la infección está bien establecida, reflejando el tiempo requerido para generar la respuesta T que llevará adelante el daño tisular. Una vez que dicha respuesta está establecida, el título viral en hígado y sangre comienza a bajar. Con la limitación de la infección, los HBsAg y HBeAg desaparecen de circulación y los anticuerpos anti HBs se hacen detectables.

1.1.9 Infección crónica

En la infección persistente, los eventos tempranos son similares aunque el HBsAg persiste en sangre y continúa la producción de virus por períodos prolongados o aún de por vida. Sin embargo, los niveles de viremia en la infección crónica son más bajos que en la infección primaria, aunque puede ser variable entre individuos.

Durante la fase inicial de la infección crónica por HBV (*Fase inmunotolerante*), los niveles de ADN de HBV en suero son altos, el HBeAg está presente y los niveles de ALT son normales [44].

Luego de este período inmunotolerante de duración variable, se desarrolla una *fase inmunoreactiva* durante la cual el HBeAg puede desaparecer espontáneamente (*clearance*). La mayoría de los pacientes en esta fase desarrollan daño hepático de severidad variable que podría ocasionar cirrosis en el caso de que el HBeAg persista a pesar de existir respuesta inmune frente a HBV. La pérdida del HBeAg y la seroconversión a anticuerpo anti HBeAg (anti HBe) podría ocurrir espontáneamente sin el aumento de ALT y sin desarrollar daño hepático [45].

En la mayoría de los pacientes, la pérdida de HBeAg es seguida por una fase de baja replicación viral con niveles de ALT normales.

Una proporción de pacientes HBeAg negativo/ anti HBe positivo pueden reactivar mediante la reversión al estado de HBeAg positivo o manteniendo el estado HBeAg negativo/ anti HBe positivo. Este fenómeno puede ocurrir cercano a la serconversión a anti HBe o varios años más tarde (Figura 1H) [44].

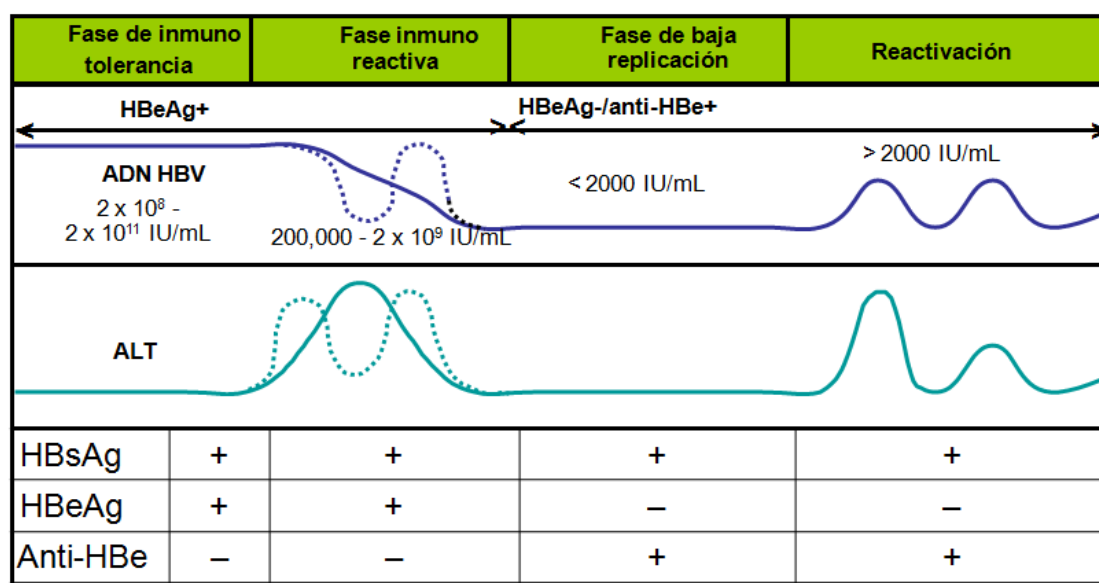


Figura 1H: Representación esquemática de las fases de la infección crónica por HBV.

1.1.10 Vías de transmisión

En áreas donde la prevalencia es alta, tales como países del extremo sudeste asiático, China y África, la infección crónica por HBV es común y usualmente adquirida en forma perinatal o en la niñez [46]. En cambio, en países de baja prevalencia como Australia, Argentina y países de Europa Central y América del Norte, solo una minoría de la población toma contacto con el virus, como resultado de transmisión sexual y/o parenteral entre adultos jóvenes. Desde el año 1987 el número de casos ha declinado en todo el mundo a causa de la inmunización de las poblaciones más vulnerables y el control en los bancos de sangre [46].

El material más infeccioso es la sangre del enfermo o portador y, el semen y otros fluidos en menor medida. La principal vía de transmisión es la exposición percutánea y de mucosas a fluidos corporales infectados. El ingreso por vía parenteral se produce especialmente mediante transfusiones de sangre o por

compartir el equipo de inyección entre usuarios de drogas inyectables (UDIs) [47].

1.1.11 Variabilidad genómica de HBV, implicancias clínicas y epidemiología en Argentina

La diversidad genómica de HBV puede dividirse en dos categorías: *variabilidad genotípica*, resultado de la evolución gradual del genoma en ausencia de presión de selección, y *variabilidad fenotípica* que resulta de la adaptación del virus a presiones de selección del sistema inmune o de la terapia antiviral [48].

1.1.11.1 Variabilidad genotípica

- Genotipos de HBV, distribución geográfica y sus implicancias clínicas

La clasificación de HBV en diferentes genotipos se basa en la comparación de genomas completos. El genotipo de HBV se define como una secuencia o grupo de secuencias que divergen en más de un 8%. Actualmente existen al menos 8 genotipos (A-H), con una distribución geográfica característica [48-49]. Recientemente se han descrito dos posibles nuevos genotipos I [50-51] y J [52] en Asia.

El HBV también se puede clasificar en 24 subgenotipos (con diferencias del 4-8%) con propiedades virológicas y epidemiológicas características [48].

Se ha visto que solo un genotipo puede ser hallado predominantemente en el este de África y oeste de Asia (A y D respectivamente), donde la prevalencia de otros genotipos es menor al 5%. Por otro lado, en países con elevada inmigración, se han reportado una variedad de genotipos tal que se hallan diversos genotipos en Europa y Norteamérica. En Australia, los genotipos A, B, C y D tienen la misma prevalencia. Los genotipos A y D son prevalentes en la Unión Europea, a excepción del Mediterráneo, donde predomina el D, y en el centro y sur de Asia.

Los genotipos B y C son los mayoritarios en el sur y sudeste asiático y la región del pacífico. El genotipo E está restringido al centro y oeste de África. El F, es prevalente en América del Sur y Central y Alaska; mientras que el G se encuentra en Europa y Estados Unidos. Por último, el H se encuentra en América Central [53] (Figura 11).

El patrón de distribución de genotipos cambia de acuerdo al patrón de inmigración mundial [53].

Los subgenotipos también parecen presentar una distribución geográfica característica. Por ejemplo, los subgenotipos A1 y A3 se encuentran principalmente en África, el A2 es característico de Europa y Norte América, mientras que el subgenotipo B1 es frecuente en Japón y el B2 lo es en el resto de Asia [48].

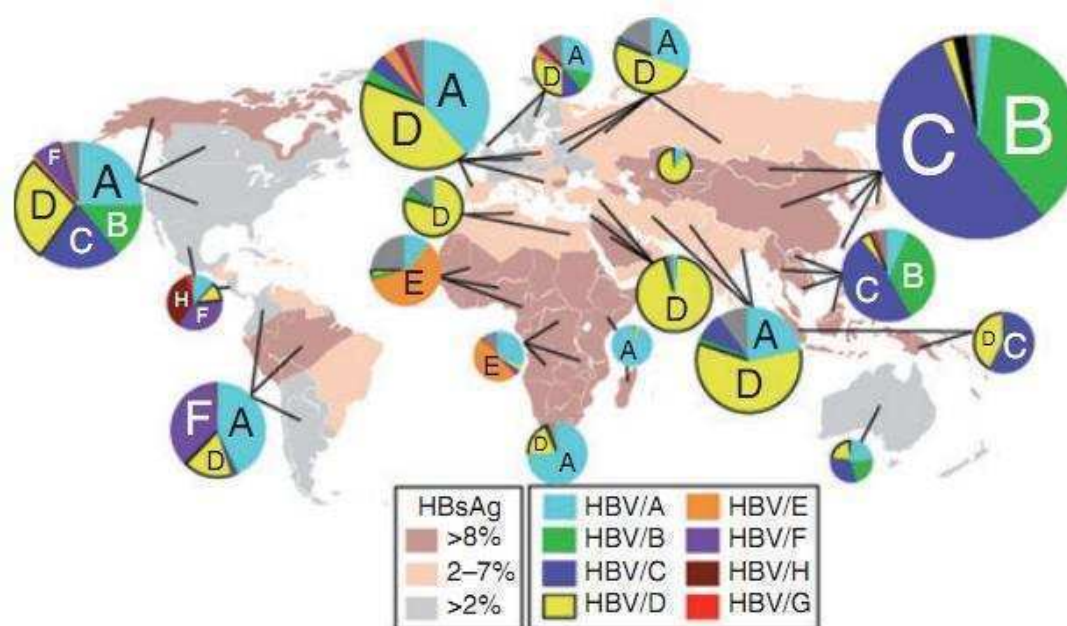


Figura 11: Distribución de genotipos y prevalencia de HBV en cada región geográfica [53].

Cada vez se dispone de mayores evidencias que el genotipo de HBV podría tener implicancias clínicas y en la respuesta al tratamiento. Estudios realizados en Asia, indican que el genotipo C se asocia con una enfermedad más avanzada y peor respuesta al tratamiento con interferón que el genotipo B [54-55]. La cirrosis y el hepatocarcinoma son más frecuentes en pacientes con HBV genotipo C que en aquellos con genotipo B [56].

En relación a los genotipos A y D, el genotipo A parece asociarse con un mejor pronóstico que el genotipo D (mayores proporciones de aclaración del HBsAg y de remisión sostenida tras la seroconversión a anti HBe). Se ha visto también que la falla hepática fulminante se da más frecuentemente en pacientes con genotipo F, que con A y D [57].

En relación con el tratamiento antiviral, en pacientes tratados con interferón se ha observado que la tasa de seroconversión a anti HBe es del 47% para el genotipo A, del 44% para el B, del 28% para el C y del 25% para el D, lo que indica que el genotipo puede ser un importante predictor de la respuesta al tratamiento con interferón [58].

1.1.11.2 Variabilidad fenotípica

Se han descrito otras variantes genéticas que emergen en respuesta a la presión de selección; entre ellas, son de especial interés en el curso de la infección por HBV, las observadas en la región precore/core, la polimerasa viral y la región S.

- Variantes de precore

La mutante de precore más común es en la posición 1896 del genoma de HBV (G1896A). Dicha mutación convierte un triptófano en un codón de *stop* y, por lo tanto, impide la producción de HBeAg aunque la replicación viral y la expresión de HBcAg no se ven afectadas [59]. Esta mutación se encuentra más frecuentemente en HBV genotipo D y, en menor proporción, en B, C y E. Raramente ocurre en los genotipos A, F o H [60]. Esta restricción a genotipos específicos se relaciona con la necesidad de mantener la estructura secundaria de la señal de encapsidación ϵ [61]. En la figura 1J se observa la estructura de la señal de encapsidación ϵ con las distintas variantes nucleotídicas según el genotipo correspondiente. La variante G1896A frecuentemente aparece durante la seroconversión de HBeAg [62]. La falta de producción de HBeAg podría ser un mecanismo del virus para impedir el reconocimiento por parte del sistema inmune, lo que facilitaría su persistencia.

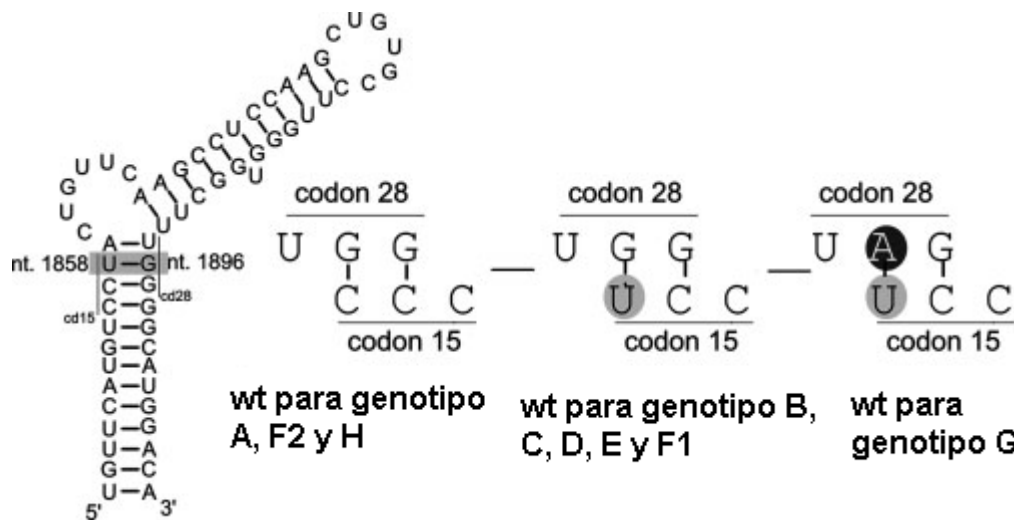


Figura 1J: Diagrama de la estructura secundaria de la señal de encapsidación [61].

En menor proporción y en las posiciones 1814-1816 se detectan otras variantes caracterizadas por la destrucción del codón de iniciación [59].

- Variantes del promotor del core

Las variantes más comunes incluyen una doble mutación A1762T y G1764A. Mutaciones en las posiciones 1653, 1753-1757, 1766 y 1768 también han sido reportadas, generalmente asociadas con los cambios A1762T y G1764A [63-64].

Estas mutaciones en la región del promotor del core resultan en una regulación negativa de la síntesis del preC ARN y de HBeAg [65]. Se pueden encontrar en todos los genotipos de HBV aunque son más frecuentes en el genotipo C.

Las mutaciones en el promotor del core son seleccionadas en un estadio previo a la aparición de mutaciones en precore y podría preceder a la seroconversión [66]. Las mutaciones tanto en el promotor basal como en la región del precore, además de estar relacionadas con la seroconversión de HBeAg, están implicadas en la replicación de las variantes resistentes a lamivudina [67].

Además de las mutaciones, la progresión de la enfermedad hepática en pacientes crónicos, está relacionada con la aparición de deleciones, principalmente en la región del promotor del core. Estas deleciones pueden afectar la funcionalidad del promotor basal y pueden alterar la expresión de la proteína X perdiéndose, de esta forma, la capacidad transactivadora [21].

- Variantes de la polimerasa viral

Las funciones de la polimerasa viral son fundamentales para la replicación, lo que la convierte en el principal blanco de las drogas antivirales.

Las variantes de la polimerasa viral son las causantes de las resistencias a tratamientos con inhibidores de dicha enzima (análogos de nucleósidos/nucleótidos).

Actualmente, 5 análogos de nucleósidos/nucleótidos son utilizados para el tratamiento de HBV crónica: lamivudina, adefovir dipivoxil, entecavir, telbivudina y tenofovir (figura 1K).

La más común de las variantes que está asociada con la resistencia al tratamiento con lamivudina se localiza en el dominio catalítico (C) de la RT. Esta mutación corresponde a un cambio de una metionina (M) por una valina (V) una isoleucina (I) o una serina (S) en el aminoácido 204, situada en el motivo YMDD y provoca una disminución de la capacidad enzimática. La mutación rtM204V/I está comúnmente asociada a una mutación secundaria donde una leucina (L) en la posición 180 es sustituida por una metionina (rtL180M), en el dominio B de la RT. A pesar que esta mutación afecta mínimamente la replicación viral cuando se encuentra sola, aumenta la replicación al estar acompañada de rtM204V/I [68]. Estas mutaciones hacen que la unión entre la lamivudina y la polimerasa sea menos fuerte en comparación con el sustrato natural y que la lamivudina no se una a la polimerasa por un impedimento estérico [69].

Otra mutación compensatoria es una sustitución de una valina por una leucina en el aminoácido 173 de la RT (rtV173L). Esta mutación ubicada en el dominio B podría alterar el ambiente alrededor del sitio catalítico de manera de aumentar la eficiencia de polimerización [70].

La resistencia a adefovir se asocia con la presencia de las mutaciones rtN236T y/o rtA181V/T, localizadas en los dominios D y B, respectivamente [71]. La primera está compartida con la droga tenofovir y cambia la configuración del bolsillo de unión a adefovir. Además pueden aparecer otras mutaciones secundarias como rt181T, rtQ215S y rtV214A. Las dos primeras son mutaciones compensatorias que se pueden encontrar en pacientes con resistencia a lamivudina [72].

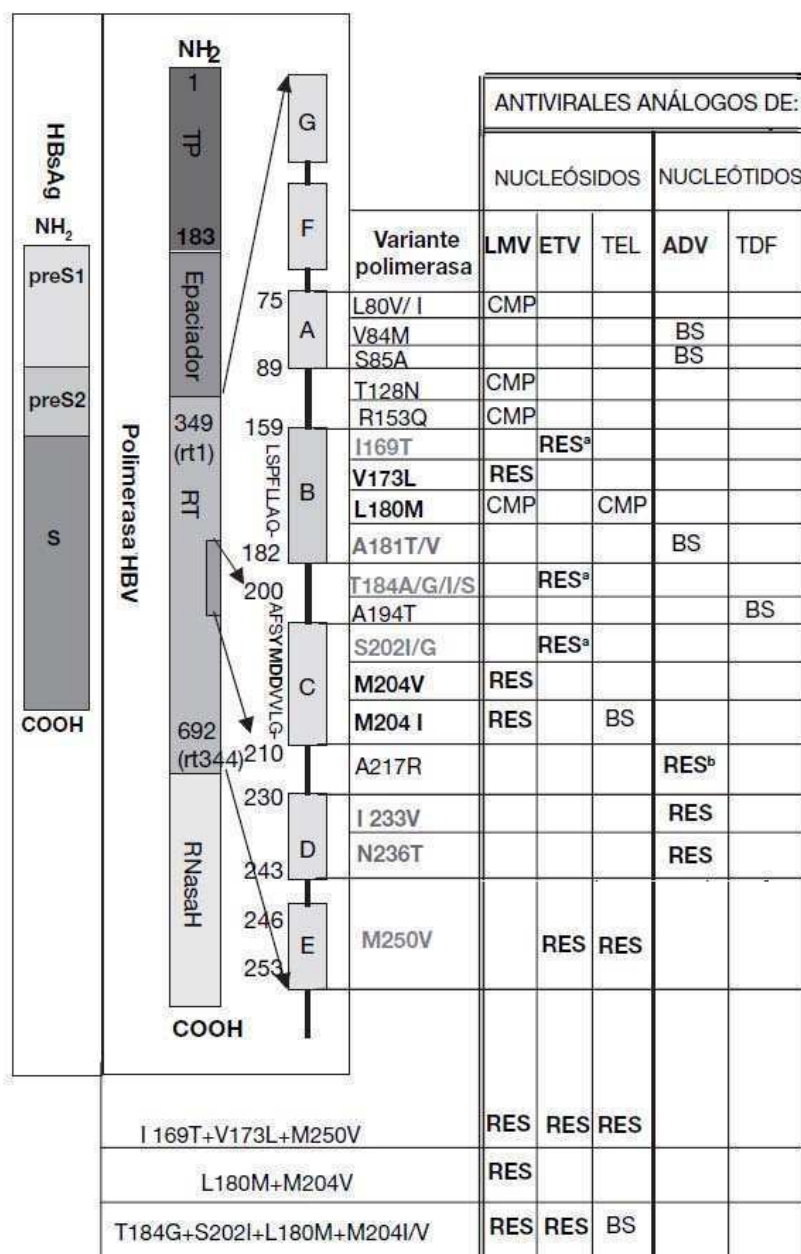


Figura 1K: Esquema de la polimerasa viral, incluidas las diferentes regiones catalíticas de la retrotranscriptasa y las variantes de esta proteína asociadas con la resistencia a tratamientos antivirales con lamivudina (LMV), entecavir (ETV), telbivudina (TEL), adefovir dipivoxil (ADV) y tenofovir (TDF). BS: variante con baja resistencia al tratamiento; CMP: variantes compensatorias (en presencia de variantes resistentes); RES: variante resistente al tratamiento; a) Variante resistente en presencia de otras variantes; b) Resistencia primaria; falta confirmación fenotípica. Modificado de: Virología molecular del virus de la hepatitis B. Rodríguez-Frias y Jordi. 2008 [73].

El entecavir presenta actividad frente a las variantes resistentes a lamivudina, y hasta el momento únicamente se han observado cepas resistentes al tratamiento con entecavir (rtI169T, rtT184S, rtS202I, rtM250V) en pacientes

que presentaban también mutaciones relacionadas con resistencia a lamivudina [48, 74]. La resistencia a entecavir se asocia con 2 grupos o perfiles de mutaciones, y ambos incluyen mutaciones de resistencia a lamivudina: a) rtM250V ± rtI169T + rtM204V + rtL180M; b) rtT184G + rtS202I + rtM204V + rtL180M. La mutación rtM250V se localiza en el dominio D, mientras que rtI169T y rtT184S, en el B. La mutación rtI169T tiene una función compensatoria frente a los cambios conformacionales introducidos en la polimerasa por otras mutaciones. La mutación rtS202I se localiza en el dominio C y podría alterar la geometría del bolsillo de unión a dNTPs [70].

La resistencia a tenofovir fue hallada en pacientes HIV-HBV coinfectados. La mutación rtA194T, localizada en el extremo del dominio B de la polimerasa, junto a las mutaciones de resistencia a lamivudina rtL180M y rtM204V, ha sido asociada a resistencia a tenofovir [75]. Sin embargo, otros reportes han fallado en comprobar este hallazgo [76]. Por lo tanto, se necesitan nuevos estudios para confirmar la capacidad de la mencionada mutación para reducir la eficacia antiviral del tenofovir.

- Variantes en el gen S

Dado que el gen S está completamente solapado con el gen de la polimerasa, las mutaciones en pol, producirán cambios en S y viceversa. Así las mutaciones en pol: V173L y A181T, darán origen a las variantes E164D y codón *stop* en S, que reducirá la unión del HBsAg a su anticuerpo y una disminución en la secreción del virión, respectivamente [77-79].

Los epitopes dominantes del HBsAg que neutralizan la respuesta de las células B residen en el determinante “a” (aminoácidos 124-149). La mutante más común en esta región es G145R, permitiendo el escape a la respuesta inmune [77].

1.1.12 Epidemiología mundial de HBV

Se estima que dentro de la población mundial existen, aproximadamente, 350 millones de portadores de HBV [80].

Existe un amplio rango de tasas de prevalencias en distintas partes del mundo. Las áreas con baja prevalencia (0.1-2%) son: oeste de Europa, Estados Unidos, Canadá, Australia y Nueva Zelanda.

En los países del Mediterráneo, Japón, Asia central y Sudamérica, la prevalencia alcanza niveles medios (3-5%); mientras que en el sudeste de Asia, China y África sub Sahariana, la prevalencia es elevada (10-20%).

La tasa de progresión de HBV aguda a crónica decrece con la edad. El 90% de las infecciones adquiridas en forma perinatal evolucionan a cronicidad, mientras que sólo el 5% lo hace en adultos [81].

La incidencia de nuevas infecciones ha disminuido gracias a la implementación de estrategias de vacunación [82]. Sin embargo, las complicaciones relacionadas a la infección por HBV tales como el desarrollo de cáncer o muerte han aumentado [83] debido a los efectos tardíos de la vacunación. El mejoramiento en las técnicas de diagnóstico y la mejor documentación de casos han permitido una mayor detección y reporte de nuevas infecciones por HBV. Sin embargo, las estimaciones se dificultan debido a la migración desde áreas con prevalencia alta o media a países con baja prevalencia [84].

1.1.13 Epidemiología de HBV en Argentina

Argentina tiene baja prevalencia de infección por HBV [85]. La mayoría de los datos epidemiológicos datan de la Región Metropolitana, donde los genotipos A, D y F han sido hallados [85-89].

Estudios realizados en donantes de sangre dieron evidencia de una mayor prevalencia del genotipo F en el norte del país (88,9%) [90].

Estudios más recientes, mostraron, también, la mayor prevalencia del genotipo F en el norte con respecto a la región Metropolitana (27.5%, 42.5% y 30.0% para A, D y F, respectivamente) [88] y que, la prevalencia de dicho genotipo podría estar relacionada al origen autóctono ya que fue hallado predominantemente en poblaciones originarias [91-92]. Por último, la circulación de los genotipos A y D se podría explicar por la presencia de europeos que inmigraron a la Argentina desde el período de colonización [93].

1.1.14 Evolución molecular de HBV

A pesar de su importancia, la evolución de HBV continúa aún sin dilucidarse. Esta complejidad evolutiva se debe, en parte, a que a pesar de ser un virus cuyo genoma es ADN, replica vía un ARN intermediario. Su transcriptasa reversa carece de actividad de lectura de prueba o *proofreading* [94] llevando a una mayor tasa de sustitución nucleotídica comparada con otros virus ADN. Sin embargo, no se conoce con certeza la tasa de sustitución nucleotídica. Aunque variable, distintas estimaciones han reportado que su tasa de mutación no es tan elevada como la que se observa en virus cuyo genoma es ARN. Los valores obtenidos van desde un rango de $2,6 \times 10^{-4}$ a $7,9 \times 10^{-5}$ sustituciones/sitio/año [95-99]. Sobre la base de estas tasas, se ha calculado que el tiempo del ancestro común más cercano (tMRCA) de HBV es de 3000-6000 años [96].

La tasa de mutación se ve influenciada por distintos factores. Primero, el genoma presenta un patrón complejo de marcos abiertos de lectura solapados. Dicho solapamiento puede actuar como una restricción (*constraint*) en la evolución viral ya que cambios sinónimos en un ORF puede ser no sinónimo en otro, llevando a un patrón complejo de selección purificadora [96]. Por lo tanto, cambios aminoacídicos podrían ser seleccionados positivamente como consecuencia de la presión ejercida por el sistema inmune [100]. La aparición de mutaciones en genes solapados pero no relacionados puede producir variantes con diferente antigenicidad que podrían tener un impacto diferente en la evolución de la infección por HBV [101].

Un segundo *constraint* está impuesto por la necesidad de conservar los promotores y otros elementos de activación en *cis* que están involucrados en la replicación de HBV. A pesar de estas restricciones, la secuencia nucleotídica entre distintos aislamientos de HBV, puede variar hasta un 12% [102].

Cambios en la presión de selección del hospedador puede afectar las tasas de sustitución. De esa manera, se ha observado que los virus que no expresan HBeAg (HBeAg negativos) evolucionan más rápidamente que aquellos HBeAg positivos, siendo esta diferencia atribuible a la intensidad de la respuesta inmune del hospedador [97]. Los pacientes que han eliminado el HBeAg, han exhibido variantes virales con mayor número de sustituciones nucleotídicas que

aquellos HBeAg positivos donde la respuesta inflamatoria es débil [98]. Durante la fase inmunotolerante de la HBV crónica (HBeAg positivo), hay una respuesta muy débil frente al virus y por lo tanto se observan mínimas elevaciones de ALT en suero, poca inflamación hepática y elevados niveles de replicación viral [103]. En la fase HBeAg negativa, hay una activación del perfil Th1 que reconocería los diferentes epitopes de HBV en los hepatocitos generándose una elevada respuesta inmune [104].

1.2 Virus de la inmunodeficiencia humana

1.2.1 Breve reseña histórica

El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) es el agente etiológico de una de las enfermedades de mayor importancia en Salud Pública en la actualidad, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida).

Desde su descubrimiento, hace 30 años, se han reportado 25 millones de muertes a nivel mundial y ha generado profundos cambios demográficos [105].

La epidemia de sida fue reconocida por primera vez en el año 1981, en distintos puntos de Estados Unidos, entre individuos homosexuales que presentaban infecciones oportunistas que incluían *Pneumocystis jirovecii* (previamente conocido como *Pneumocystis carinii*) y Sarcoma de Kaposi [106-107].

Sin embargo, no fue hasta 1983 cuando el HIV fue aislado por el grupo de Luc Montagnier y Françoise Barré-Sinoussi, quienes relacionaron la etiología del sida con un agente aislado por este grupo, denominado Virus Asociado a Linfadenopatía (LAV, *Lymphadenopathy Associated Virus*) [108].

Durante ese año y el siguiente, Robert Gallo [109-110] aisló un retrovirus citopático que presentaba tropismo por células T. Lo denominó Virus Linfotrópico Humano Tipo III (HTLV-III, Human T Lymphotropic Virus Type III). Un año más tarde, Jay Levy [111] obtuvo un aislamiento viral a partir de células sanguíneas provenientes de un paciente con sida al cual denominó Virus Relacionado al sida (ARV, AIDS Related Virus). Posteriormente, diversos estudios revelaron similitudes en la morfología de los tres virus mencionados con los Lentivirus, un género de la familia *Retroviridae* [112]. Allí fue cuando se

determinó que los tres aislamientos virales correspondían al mismo agente viral. En 1986 el Comité Internacional de Taxonomía de Virus designó definitivamente el nombre de Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV).

1.2.2 Clasificación

El HIV pertenece al género *Lentivirus* de la familia *Retroviridae*. Dicha familia está formada por retrovirus cuyo genoma está organizado por genes gag, pol y env, y la presencia de la enzima transcriptasa reversa (RT) que cataliza la síntesis de ADN a partir de ARN genómico [113].

El virión de HIV es una partícula esférica, envuelta, de aproximadamente 100 a 120 nm de diámetro (figura 1A). Su envoltura, una bicapa lipídica, está compuesta por espículas que la atraviesan. Éstas, están formadas por dos glicoproteínas, la gp41 (proteína de transmembrana) y la gp120 (proteína de superficie) [8]. Además, en la envoltura viral se encuentran proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II), entre otras proteínas de origen celular.

Por dentro de la envoltura lipídica se encuentra la matriz, constituida por la proteína estructural p17. Dentro de ella se halla la nucleocápside, formada por la proteína p24, que contiene el genoma viral. El mismo está constituido por 2 cadenas de ARN monocatenario de 9.2 kb, de polaridad positiva. Cada una de ellas está formada por dos secuencias repetitivas terminales (LTR), tres genes estructurales característicos de los retrovirus (gag, pol, env) y seis genes reguladores (tat, rev, nef, vif, vpr, vpu). Asociadas al genoma se encuentran las proteínas p7 y la RT. Otras proteínas estructurales incluyen a la proteasa y la integrasa, las cuales, junto a la RT, son codificadas por el gen pol.

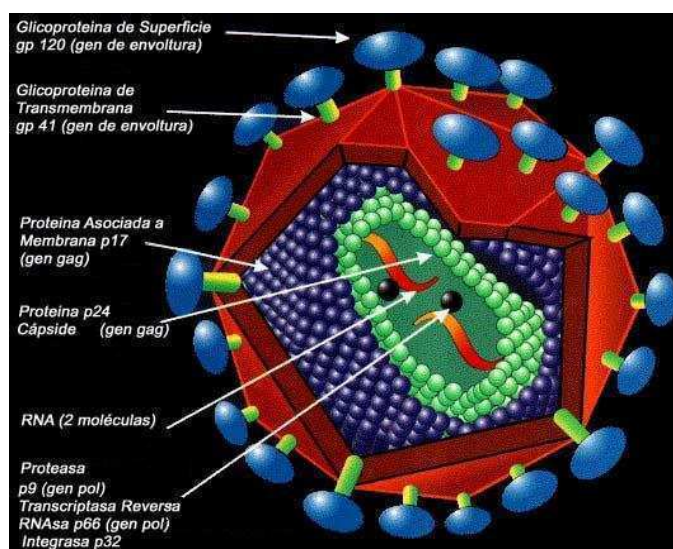


Figura 1A: Estructura del virión de HIV. Modificado de www.pmsida.gov.ar/prevencion/infeccion/infeccion1.htm

1.2.3 Replicación viral

El ciclo de replicación viral se inicia con la unión de la glicoproteína gp120 con el receptor CD4 presente en la célula hospedadora [114]. Una vez que la gp120 se fija a dicha molécula, experimenta un cambio de configuración espacial que facilita su fijación a uno entre un grupo de correceptores. Los dos correceptores principales para el HIV son CCR5 y CXCR4. A partir de esta unión, se produce un cambio conformacional que permite la exposición de un péptido presente en la gp41 que media la fusión entre la envoltura viral y la membrana de la célula blanco [115-116].

En el interior de la célula tiene lugar la liberación de la nucleocápside viral al citoplasma celular y su posterior desnudamiento. Una vez que el virus logra evadir los mecanismos de defensa intracelulares, ocurre la retrotranscripción del ARN genómico viral, proceso mediado por la enzima RT asociada a cada una de las cadenas de ARN. Las dos moléculas de ADNc (ADN copia) producto de la retrotranscripción se asocian, convirtiendo al genoma viral en una molécula de ADN doble cadena (ADNdc).

Este ADN bicatenario puede circularizarse o permanecer de forma lineal para luego migrar al núcleo donde, catalizado por la enzima viral integrasa y otras proteínas celulares, se integra al ADN celular. El ADN viral integrado se denomina provirus. Cuando la célula es activada, el provirus inicia la síntesis de

2 tipos de ARN: los ARN mensajeros (ARNm), que serán usados para la traducción de las proteínas virales y el ARN que formará parte del genoma de la progenie viral.

Las proteínas virales estructurales se sintetizan como poliproteínas que son clivadas por proteínas de origen viral y celular. Una vez glicosiladas, se ubican en regiones especializadas de membrana de la célula hospedadora junto al resto de los componentes del virión. Posteriormente se produce el ensamblado y brotación del virus [117-119] Esta brotación puede producirse de forma lenta, conservando la integridad celular o rápida, conduciendo a la lisis de la célula hospedadora [120].

1.2.4 Vías de transmisión

Las vías de transmisión del HIV se encuentran bien definidas: sexual, parenteral y vertical. Cada una de ellas exhibe tasa de transmisión definidas en función del epitelio expuesto y el líquido expuesto que vehiculiza el virus [121-126].

1.2.5 Historia natural de la infección

A partir del momento del contagio, el HIV se disemina rápidamente a través del organismo invadiendo múltiples órganos, principalmente los sistemas linfático y nervioso.

A las 2-6 semanas de la inoculación la mayoría de los pacientes tienen una carga viral muy elevada en el plasma, encontrándose infectados una gran proporción de los LT-CD4+ [127]. Entre las 4 y las 12 semanas desde la inoculación se detectan anticuerpos anti HIV específicos, siendo estos de dudosa actividad neutralizante [128].

Luego de aproximadamente 6 meses de la infección, los niveles plasmáticos de viremia alcanzan un estado de equilibrio [129].

La infección aguda es seguida por un período de infección asintomática (latencia clínica) [130]. Durante esta etapa persiste una elevada actividad replicativa del virus, produciéndose diariamente 10^9 - 10^{10} partículas virales [131]. A la latencia clínica le sigue una etapa que comprende manifestaciones clínicas que denotan progresión de la enfermedad, que por sí solas no

clasifican al paciente como enfermo de sida y se las agrupa dentro de la “Clase B” según la clasificación de 1993 del CDC. En la última fase (sida) se produce un incremento de la actividad replicativa del virus. Clínicamente, los pacientes presentan una grave alteración del estado general e infecciones oportunistas.

1.2.6 Epidemiología mundial

Se estima que en el año 2009 hubo 2,6 millones de personas que contrajeron el HIV. En algunos países, principalmente en África sub-Sahariana, la incidencia bajó un 25% entre 2001 y 2009. Sin embargo, en Europa del este, oeste y central, el centro de Asia y Norteamérica, la tasa de nuevas infecciones se mantuvo estable durante los últimos 5 años (figura 1B).

Según estimaciones, el número de personas fallecidas a causa de enfermedades relacionadas a sida está disminuyendo desde 2004, disminución que está relacionada con el acceso a terapia antirretroviral y al cuidado de las personas que viven con HIV.

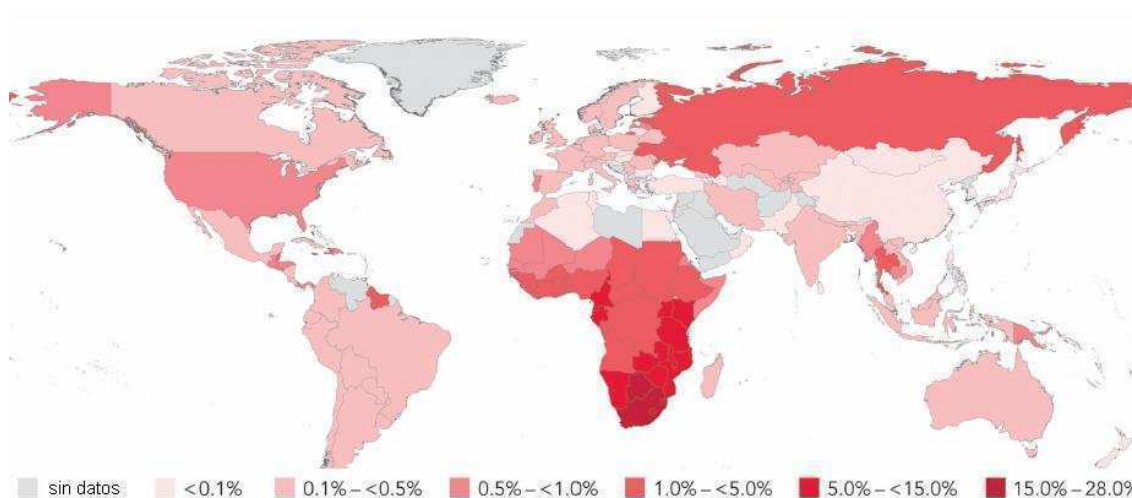


Figura 1B: Mapa mundial de prevalencia de HIV en 2009 (de Reporte de epidemia mundial de sida 2010) [132].

1.2.7 Situación del HIV-sida en Argentina

Actualmente, en Argentina, existe una epidemia concentrada, es decir, la prevalencia de HIV en la población general es 0,4%. Distintos grupos de riesgo superan esta cifra, entre ellos se encuentran: travestis-transexuales (34%), homosexuales y otros hombres que tienen sexo con hombres (12%), UDIs (7%) y trabajadores/as sexuales (5%) [133].

Se estima que la cantidad de personas infectadas es de 120.000. La tasa de casos de sida fue aumentando hasta el año 1997, cuando comenzó a disminuir por la introducción de la terapia antirretroviral de alta eficacia (TARV). La tasa de mortalidad por sida tiene una evolución descendente y se ubicó en 36 por millón de habitantes en 2007 [133].

1.3 Coinfección HIV/HBV

1.3.1 Epidemiología de la coinfección HIV/HBV

Se estima que aproximadamente, 3 millones de personas infectadas con HIV están coinfectadas con HBV [134] .

La tasa de coinfección por HBV es elevada entre los individuos infectados por HIV debido a que ambos virus comparten similares vías de transmisión. La prevalencia varía marcadamente entre los diferentes grupos en riesgo, pero uno de los mayores determinantes es la localización geográfica [135]. En áreas con baja endemicidad de HBV, como Argentina, Estados Unidos, Australia, y países de Europa, tanto HBV como HIV son adquiridos usualmente en los adultos a través de relaciones sexuales no protegidas o transmisión percutánea [135]. La probabilidad de transmisión parenteral del HBV es 100 veces mayor que la del HIV [136]. Debido a esto, se considera altamente probable que la infección por HBV precede a la del HIV. En áreas de baja endemicidad, la prevalencia de coinfección crónica por HBV (HBsAg persistente por más de 6 meses) en individuos infectados por HIV es del 5-7% pero varía dependiendo de la vía de infección [137]. En los países con endemicidad intermedia y alta la principal ruta de transmisión del HBV es la perinatal o la producida en la infancia temprana [135], por lo que la infección por HBV en general precede a la infección por HIV en décadas. En dichos países, la mayoría de los estudios exhiben prevalencias de coinfección del 10 al 20% [138-139].

1.3.2 Historia natural de la coinfección HIV/HBV

Existe evidencia que la coinfección con HIV modifica significativamente la historia natural de la infección por HBV [140].

La infección por HIV trae como consecuencia una mayor tasa de cronicidad [141-143]. Se observa una menor tasa de seroconversión a anti HBe y anti HBs. Una posible explicación de esta mayor cronificación es la inmunosupresión asociada al HIV. La mayoría de los pacientes infectados con HIV no presentan una respuesta inmune significativa frente a HBV [144].

En algunos estudios, la coinfección con HIV se asoció a mayores niveles de replicación de HBV y una tasa mayor de reactivación, en comparación con pacientes mono infectados con HBV. La reactivación de HBV ha sido relacionada con la depleción de LT-CD4+ que se observa en pacientes infectados con HIV.

Independientemente de la menor actividad inflamatoria, se observa una mayor frecuencia de fibrosis y cirrosis en los pacientes coinfectados. Existen varias posibles razones para esta relación paradójica entre el daño hepático y la presencia de alteraciones inmunológicas. En las personas infectadas por HIV se ha descrito una forma rápidamente progresiva de enfermedad hepática secundaria a un efecto citopático viral en lugar de secundario al daño inmunológico [145]. Por lo tanto, ciertas variantes del HBV encontradas más frecuentemente en los pacientes coinfectados podrían ser responsables del aumento del daño hepático en esta población [79, 146]. También se ha postulado que la activación inmune producida por la translocación microbiana a nivel intestinal relacionada con el HIV que conduce a un mayor grado de activación inmunológica podría ser un mecanismo asociado a la progresión de la enfermedad hepática [147].

La reconstitución inmune asociada a TARV puede llevar a un mejor control de la replicación de HBV. Estudios han demostrado que en pacientes coinfectados bajo terapia antiretroviral, se favorecería la seroconversión de HBeAg y HBsAg [148]. Se debe prestar especial atención a que, en determinadas situaciones, la magnitud de la reconstitución inmune puede llevar al desarrollo de mayor daño hepático (síndrome de reconstitución inmune).

En la era “pre-TARV”, las consecuencias de la enfermedad crónica por HBV estaban ocultas por la alta mortalidad debida a enfermedades extra-hepáticas. Desde la introducción de la TARV se evidenció una marcada disminución en la morbi-mortalidad de los pacientes, los que, ante la prolongación de su

sobrevida, empezaron a presentar las complicaciones crónicas de las coinfecciones con este virus hepatotropo, convirtiéndose la enfermedad hepática en una de las primeras causas de morbi-mortalidad en los países desarrollados [149].

1.3.3 Manejo de la coinfección HIV-HBV

La erradicación viral no es posible con las terapias anti HBV disponibles actualmente debido a que no pueden actuar a nivel del ADN circular covalentemente cerrado que se encuentra en el núcleo de las células infectadas. Como en los pacientes mono infectados con HBV, el principal objetivo del tratamiento es prevenir el desarrollo de enfermedad hepática terminal. Además, el tratamiento pretende minimizar el riesgo de hepatotoxicidad secundario a la TARV y a la reconstitución inmune.

La decisión acerca del inicio del tratamiento anti HBV debe considerar el estado de la infección por HIV dado que algunos de los análogos nucleósidos/nucleótidos son activos frente a ambos virus. Si se necesita iniciar tratamiento de la infección por HIV, deberá incluirse en el esquema antirretroviral dos drogas con acción mixta [150]. Dado que ambos agentes son activos contra el HBV, se trata de esta manera en forma simultánea al HIV y HBV.

Si no hay necesidad de iniciar tratamiento para HIV pero si para HBV, deberá evaluarse la utilización de drogas sin acción anti-HIV (interferón) o el inicio de la TARV independientemente del estado inmunológico del paciente [150].

1.3.4 Diagnóstico de la coinfección HIV-HBV

El diagnóstico de infección por HBV se establece de la misma manera que en personas no infectadas por HIV [150] (Tabla 1A). El tamizaje de los pacientes infectados por HBV, mono infectados o coinfectados con HIV, comienza por la detección de HBsAg, anti HBc y anti HBs.

En el caso de detectarse la presencia del HBsAg, se debe continuar con el estudio de HBeAg, anti HBe y la medición del ADN viral. Sin embargo, se ha definido infección oculta por HBV a la presencia de ADN de HBV en ausencia de HBsAg detectable [151]. El mecanismo exacto responsable de la hepatitis B

oculta no está aún dilucidado. Uno de las posibilidades involucra la existencia de mutaciones en las regiones regulatorias de HBV que inhiben la producción de HBsAg y la replicación viral [152].

HBsAg	Anti HBc Total	IgM Anti HBc	Anti HBs	Interpretación
NEG	NEG	NEG	NEG	Nunca existió infección
POS	NEG	NEG	NEG	Infección aguda temprana
POS	POS	POS	NEG	Infección aguda
NEG	POS	POS	POS/NEG	Infección aguda en resolución
NEG	POS	NEG	POS	Infección pasada resuelta
POS	POS	NEG	NEG	Infección crónica
NEG	POS	NEG	NEG	Falso positivo, patrón de core aislado, transferencia pasiva vertical de anti HBc
NEG	NEG	NEG	POS	Vacunación, administración de inmunoglobulina hiperinmune para HBV

Tabla 1A: Interpretación de los estudios serológicos para infección por HBV
 HBsAg: antígeno de superficie de HBV; Anti HBc: anticuerpo anti-core, IgM: inmunoglobulina M, Anti HBs: anticuerpo anti HBsAg; NEG: resultado negativo del estudio serológico, POS: resultado positivo del estudio serológico. Modificado de: Comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Part II: immunization of adults. Mast, 2006 [153].

OBJETIVOS

2 Objetivos

La coinfección HIV-HBV es frecuente debido a que ambos virus comparten similares vías de transmisión, pudiendo, desde la coexistencia, modificarse la historia natural de ambas infecciones.

Se sugiere que HIV favorecería la aparición de variaciones genómicas en regiones regulatorias de la expresión de los genes y la evolución molecular de HBV, influyendo en el desenlace de la coinfección.

2.1 Objetivo principal

Estudiar el impacto de la variabilidad genómica de hepatitis B sobre parámetros virológicos y bioquímicos en el contexto de la coinfección con HIV.

2.2 Objetivos particulares

1) Caracterizar los genotipos de HBV en el contexto de la coinfección con HIV.

- Analizar la distribución de genotipos basados en el análisis de los ORFs preC/C y S.

2) Analizar el impacto de la coinfección por HIV sobre la dinámica de las variantes de HBV en las regiones genómicas preC/C y S en pacientes crónicamente infectados con HBV.

- Analizar la prevalencia y dinámica de mutaciones y deleciones en los ORFs preC/ C y S y establecer su relación con la cinética de replicación viral de HBV (carga viral, mutaciones de resistencia a lamivudina) y el grado de lesión hepática (niveles de transaminasas hepáticas), en un estudio longitudinal a lo largo de 3 años.
- Observar la estructura secundaria del ARN inferida en la secuencia nucleotídica de la señal ε de encapsidación del HBV.

3) Estudiar la evolución molecular de HBV en el contexto de la coinfección con HIV.

- Establecer la distribución de cuasiespecies virales de HBV y sus implicancias sobre:

- Presencia de mutaciones de resistencia a drogas antivirales.
- Relaciones filogenéticas interpaciente e intrapaciente (inferencia filogenética, tasa de mutación).
- la diversidad y complejidad de la población viral.
- la posible selección positiva y negativa ejercida sobre ellas.

✓ Actualmente existen pocos estudios longitudinales de evolución molecular de HBV debido a la dificultad del muestreo por tiempos prolongados. Ante ello, las tasas de mutación en las diferentes etapas de la infección por HBV no están bien establecidas [97]. El estudio de evolución molecular de un paciente crónicamente infectado con HBV, a lo largo de 14 años, permitiría inferir la dinámica y el tiempo de evolución molecular de manera más precisa.

4) Indagar sobre la evolución molecular de HBV en el contexto de la monoinfección a partir de un estudio longitudinal.

✓ La presión ejercida por la terapia antiviral tiene impacto sobre la variabilidad genómica de HBV. La coinfección HIV-HBV impactaría en distintas regiones genómicas de HBV, entre ellas el gen de la polimerasa donde residen los blancos de la terapia. Es necesario el conocimiento de la prevalencia de mutantes naturales de HBV en pol, en ausencia de tratamiento y de coinfección de manera de poder establecer luego el posible impacto de HIV en dicha región genómica.

5) Determinar la prevalencia de variantes de HBV con resistencia basal al tratamiento antiviral.

3 Materiales y Métodos

A continuación se detalla la población bajo estudio y los métodos que se utilizaron para llevar a cabo el estudio que involucra los primeros dos objetivos de esta tesis [1) *Distribución de genotipos en el contexto de la coinfección con HIV* y 2) *Dinámica de variantes de las regiones genómicas preC/C y S en pacientes crónicamente infectados con HBV en un estudio longitudinal*].

3.1 Distribución de genotipos en el contexto de la coinfección con HIV y Dinámica de variantes de las regiones genómicas preC/C y S en pacientes crónicamente infectados con HBV en un estudio longitudinal

- Población bajo estudio

Entre septiembre de 2004 y abril de 2005 se recolectaron muestras de plasma de 593 adultos mayores de 21 años. Los sujetos debían tener diagnóstico de infección por HIV basado en la detección de anticuerpos específicos presentes en el suero: tamizaje que incluyó dos técnicas de alta sensibilidad; un enzimoimmuno-ensayo (ELISA) y una aglutinación de partículas (Genscreen HIV1/2 version 2, Bio-Rad; SFD HIV 1/2 PA, Bio-Rad, Fujirebio); los resultados reactivos se confirmaron con la técnica de Western Blot (HIV: New LAV Blot I, Bio-Rad). Todos los individuos estudiados, se encontraban en seguimiento en el Servicio de Infectología del Hospital Juan A. Fernández y procedían de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y sus alrededores. Dichos individuos concurren para la determinación de carga plasmática de HIV al Centro Nacional de Referencia para el Sida (CNRS, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires).

Desde las muestras de suero se realizó diagnóstico para HBV mediante la detección de HBsAg y anti HBc por enzimoimmuno-ensayo (Abbot, USA). El 41,5% (246 pacientes) dio evidencia de infección (HBsAg y/o anti HBc positivos) (Figura 3.1).

Se detectó antigenemia (HBsAg) en 22 de los 593 pacientes (3,7%) con infección crónica por HIV. Además, 72 individuos exhibieron anticuerpos anti HBc como único marcador de infección por HBV (perfil "core aislado"). Desde los 22 pacientes HBsAg positivos, se procedió a realizar la detección de ADN genómico de HBV mediante la amplificación del gen S por PCR. Se detectó

ADN de HBV en 19 de ellos. En cambio, sólo 4 pacientes de 72, con el perfil “core aislado” exhibieron la presencia de ADN de HBV, infiriéndose como infecciones ocultas.

Se realizó, además, el diagnóstico de infección oculta por HBV en muestras de suero de pacientes que sólo daban evidencia de transaminasas hepáticas elevadas como único marcador de daño hepático; es decir, con marcadores serológicos negativos para HBV (23 muestras).

El 61,7% (n=152) de las muestras que exhibían reactividad para anti HBc presentaban concomitantemente anti HBs detectable, considerando esta situación serológica como “infección resuelta” por HBV.

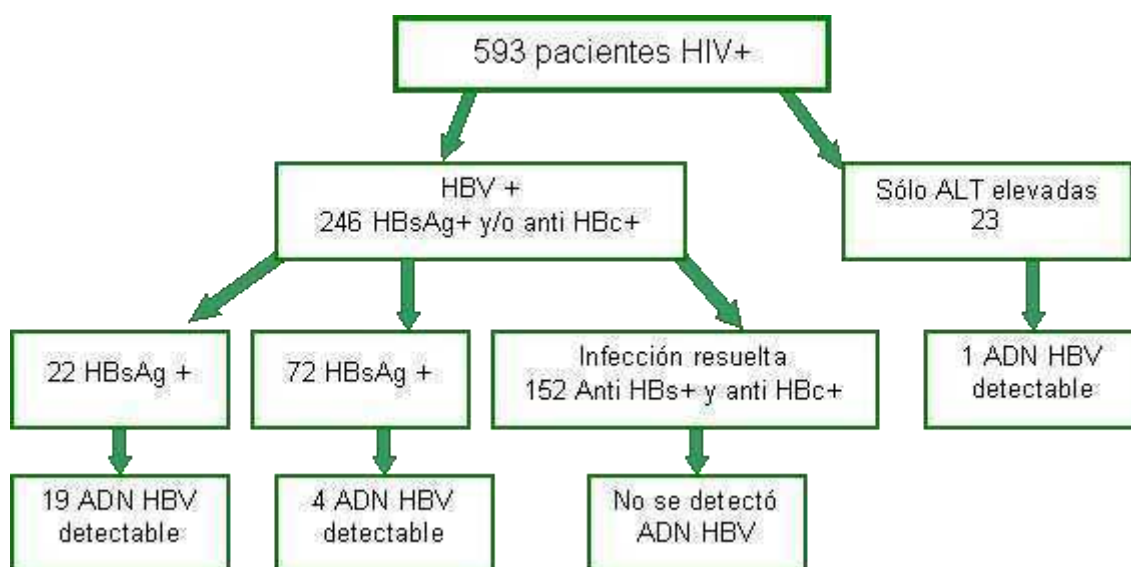


Figura 3.1: Esquema de la población bajo estudio con su correspondiente perfil serológico y detección de ADN de HBV por PCR del gen S. HBsAg: antígeno superficie HBV, Anti HBc: anticuerpo anti core, Anti HBs: anticuerpo anti HBsAg, ALT: transaminasas hepáticas.

En los 4 grupos de pacientes mencionados (pacientes virémicos para HBV con ADN y HBsAg detectable, pacientes con anticuerpos anti HBc como único marcador serológico, pacientes sin marcadores serológicos para HBV pero que presentan niveles elevados de ALT en suero y pacientes con anticuerpos anti HBs y anti HBc), se realizó la detección de material genómico de HBV por PCR del gen S (descrita más abajo). Desde aquellos con genoma detectable, se realizó la genotipificación de HBV. Dicha genotipificación se realizó mediante PCR-RFLP (PCR-polimorfismo del largo de fragmentos de restricción) utilizando el amplicón obtenido por PCR del gen S. Además se realizó la

genotipificación mediante análisis filogenético por métodos de distancia (Neighbor joining) de las secuencias del gen S obtenidas por PCR [154].

La genotipificación de los aislamientos con ADN detectable dio como resultado una alta prevalencia de genotipo A (17/19 HBsAg positivos) comparado con aquellos pacientes mono infectados con HBV (mencionados a partir de aquí como “mono infectados”) [154].

A partir de los 22 pacientes HBsAg positivos, se seleccionaron muestras de suero retrospectivas en un período de 17-34 meses. Muestras de 20 pacientes mono infectados por HBV, atendidos en el Hospital Francisco J. Muñiz, fueron utilizadas como grupo control. Todos los pacientes que fueron incluidos en el estudio prospectivo resultaron negativos para hepatitis C y D (testado con equipos comerciales, HCV EIA II, y Anti-Delta, respectivamente; Abbott Laboratories).

En la tabla 3.1 se resumen los pacientes incluidos en el estudio longitudinal con su correspondiente perfil serológico y parámetros virológicos y bioquímicos.

La distribución de sexo y edad de los pacientes no difirió entre aquellos que son mono infectados (15 de 20 son hombres; $35,6 \pm 7,4$ años) y los individuos coinfectados (16 de 19 son hombres; $33,6 \pm 6,3$ años). Sin embargo, el recuento de LT-CD4+ (media \pm desvío estándar; células/ml) resultó significativamente mayor en pacientes mono infectados: $420 \pm 416,4$ y $970,6 \pm 188,6$ para coinfectados y mono infectados, respectivamente ($p= 0,002$). No se observó seroconversión a anti HBe de ambos grupos de pacientes durante el estudio.

Paciente	Sexo-edad (años)	Riesgo	HBeAg	CV HBV (log)	ALT	Tratamiento LMV (meses)	CD4 cel/ml	Mutaciones de resistencia a LMV	CV HIV (log)
P1	Masc-36	HTSX	Pos	4,4	1-2X	>60	177 ND	wt	3,6 ND
P2	Masc-41	HTSX	Pos	7,3	N	>30	108 108	wt	ND 4,8
P3	Fem-31	ND	Pos	>7,6	1-2X	0	54 210	wt	<1,7 <1,7
P6	Masc-36	UDI	Pos	3,6	1-2X	>60	479 505	L180M/M204V	<1,7 <1,7
P7	Fem-32	HTSX	Pos	>7,6	N	>30	253 308	wt	<1,7 <1,7
P9	Masc-48	HMX	Pos	>7,6	N	>30	1000 650	V173L/L180M/M204I/V/S	<1,7 <1,7
P12	Masc-47	HMX	Pos	3,5	1-2X	>30	108 252	wt	<1,7 <1,7
P13	Masc-28	HTSX	Pos	>7,6	N	>30	1384 1073	L180M/M204V/S	<1,7 <1,7
P16	Masc-27	UDI	Pos	>7,6	N	>30	130 315	wt	5,1 <1,7
P19	Masc-28	UDI	Pos	6,7	1-2X	28	564 761	wt	<1,7 <1,7
P20	Masc-30	HTSX	Pos	>7,6	N	>30	26 69	wt	<1,7 <1,7
P21	Masc-31	HTSX	Pos	>7,6	N	>60	312 338	L180M/M204V/S	<1,7 <1,7
P10	Masc-43	HMX	Neg	<3	N	>30	193 672	wt	5,3 <1,7
P14	Masc-39	HMX	Neg	<3	N	0	373 317	wt	4,34 3
P15	Masc-32	HTSX	Neg	<3	N	>60	ND 855	wt	<1,7 <1,7
P17	Masc-31	UDI	Neg	<3	N	0	231 ND	ND	ND ND
P18	Fem-29	UDI	Neg	<3	N	>60	1142 1255	wt	<1,7 <1,7
P22	Masc-34	UDI	Neg	<3	1-2X	>60	448 734	ND	<1,7 <1,7
P24	Masc-35	HTSX	Neg	3,4	N	0	408 388	wt	4,6 4,6
M1	Fem-49	HTSX	Pos	7,1	N	0	838	wt	
M2	Masc-31	HTSX	Pos	6,8	N	0	670	wt	
M3	Fem-43	HTSX	Pos	>7,6	4X	18	1240	L80V/V173L/L180M/M204V	
M4	Masc-20	HMX	Pos	7,1	N	16	907	L80V/V173L/L180M/M204V	
M5	Fem-28	UDI	Pos	>7,6	N	22	ND	V173L/L180M/M204V	
M6	Masc-47	HTSX	Pos	>7,6	1-2X	0	1130	M204V	
M7	Masc-48	UDI	Pos	4,8	1-2X	16	1007	L180M/M204V	
M8	Masc-35	HMX	Pos	>7,6	N	24	987	L80V/V173L/L180M/M204V	
M9	Masc-41	HTSX	Pos	>7,6	N	18	804	V173L/L180M/M204V	
M10	Fem-36	HTSX	Pos	7,1	2X	0	1201	wt	
M11	Masc-38	HTSX	Pos	>7,6	N	22	1002	V173L/M204V	
M12	Masc-44	HMX	Pos	>7,6	2X	20	904	L180M/M204V	
M13	Masc-37	HMX	Neg	<3	N	0	709	NC	
M14	Fem-36	HTSX	Neg	<3	N	0	1120	NC	
M15	Masc-41	HTSX	Neg	<3	N	0	981	NC	
M16	Masc-29	UDI	Neg	<3	N	0	769	NC	
M17	Masc-31	UDI	Neg	<3	N	0	1407	NC	
M18	Masc-36	HTSX	Neg	<3	1-2X	0	1010	NC	
M19	Masc-41	HTSX	Neg	<3	N	0	852	NC	
M20	Masc-33	HTSX	Neg	<3	N	0	903	NC	

Tabla 3.1: Datos clínicos, serológicos y virológicos de los pacientes HBV-HIV coinfectados (P) y mono infectados (M). En la octava y décima columna se muestran el recuento de células T CD4+ y la carga viral de HIV en el primer y último tiempo, separado por (|), respectivamente. Masc: masculino, Fem: femenino, CV: carga viral, UDI: usuario de drogas inyectables, HTSX: heterosexual, HMX: homosexual, Neg: negativo, Pos: positivo, N: valor normal, NC: no corresponde, ND: no disponible, wt: *wild type*.

Los pacientes con ADN de HBV detectable con patrón serológico “core aislado” y con ALT elevadas como único marcador, no pudieron ser incluidos en el estudio longitudinal debido a que, en muestras posteriores a la basal (en las que el ADN de HBV fue detectable), no se evidenció la presencia de material genómico de HBV. Los datos bioquímicos y virológicos de los pacientes con “core aislado” (mencionados como C1-C4) están descriptos en la tabla 3.2.

Paciente	Sexo	Riesgo	HBeAg	CV HBV (log)	ALT	Tratamiento LMV (meses)	Mutaciones de resistencia a LMV
C1	Masc	HTSX	Neg	<3	N	0	<i>wt</i>
C2	Masc	HTSX	Neg	<3	N	0	<i>wt</i>
C3	Masc	HTSX	Neg	<3	N	0	<i>wt</i>
C4	Masc	UDI	Neg	<3	1-2X	5	<i>wt</i>

Tabla 3.2: Datos clínicos, serológicos y virológicos de los pacientes HBV-HIV coinfectados con patrón serológico “core aislado” (C). Masc: masculino, UDI: usuario de drogas inyectables, HTSX: heterosexual, Neg: negativo, N: valor normal, CV: carga viral, LMV: lamivudina, *wt*: *wild type*

- Datos clínicos

Los datos demográficos, conductas de riesgo, fecha de infección por HIV y HBV, estadios clínicos, histología y tratamiento antiviral fueron recabados de las historias clínicas de los pacientes por la médica responsable en el servicio de Infectología del Hospital Juan A. Fernández

- Obtención y procesamiento de las muestras

La extracción de la muestra de sangre se realizó por punción venosa en forma estéril colocándose la sangre en tubos Vacutainer conteniendo EDTA como anticoagulante. Todas las extracciones fueron realizadas en el Centro Nacional de Referencia para el SIDA. El plasma obtenido se fraccionó en criotubos y fue congelado a -70° hasta su utilización.

- Medición de la carga viral plasmática de HIV

La carga viral plasmática es un parámetro que informa acerca de los niveles de la replicación viral existente en los pacientes. La misma fue realizada en el CNRS y se llevó a cabo por el método del ADN ramificado (b-DNA, *branched DNA*) con un límite de detección de 50 copias de ARN del HIV-1/ml (VERSANT HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA), Bayer Corporation, CA, EE.UU.), siguiendo las especificaciones del fabricante.

- Estudio de poblaciones celulares.

La cuantificación de poblaciones linfocitarias de sangre periférica (linfocitos T CD4+ y CD8+) se realizó mediante la técnica de citometría de flujo (Coulter XL, Coulter Co., Hialeah, Fl, EE.UU.) en el Hospital Juan A. Fernández, para evaluar el estado inmunológico de los pacientes.

- Medición del nivel de transaminasas hepáticas

Se realizó la medición de los niveles de aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa en las 593 muestras de suero. Se utilizó un equipo comercial que emplea el método cinético (BioSystems S.A. Barcelona, España); valor normal ≤ 41 IU/mL.

- Diagnóstico de infección por HBV

El diagnóstico de infección por HBV, realizado en la Unidad de Virología del Hospital Francisco J. Muñiz. Los ensayos de detección de antígenos virales (HBsAg y HBeAg) y de los anticuerpos específicos (anti HBc, anti HBe, anti HBs) se realizaron empleando equipos comerciales (AxSYM, ABBOTT) basados en técnicas inmunoenzimáticas.

Se siguió un algoritmo diagnóstico. Todas las muestras fueron evaluadas para la detección de HBsAg y anti HBc. Las muestras que resultaron reactivas para HBsAg y/o anti HBc fueron estudiadas para detectar la presencia de HBeAg y anti HBe. En todas las muestras en las que se detectó la presencia solamente de anti HBc se prosiguió al estudio para la detección de anti HBs.

- Medición de la carga viral plasmática de HBV

La carga viral de HBV fue evaluada, en todas las muestras en las que se detectó positividad del HBsAg, mediante el ensayo comercial AMPLICOR HBV MONITOR Test, version 2.0, (Roche Molecular Diagnostics), con un rango de cuantificación de 1000- 40×10^6 copias/mL. Dicha determinación se realizó en la Unidad de Virología del Hospital Francisco J. Muñiz.

La carga viral plasmática de HBV se considerará como una estimación de la capacidad replicativa del virus. De esta manera, la carga viral <3 log será asociada a “baja tasa de replicación”.

- Extracción de ADN y amplificación de las regiones genómicas de HBV S y preC/C

El ADN de HBV se extrajo desde 200µl de plasma utilizando un equipo comercial de extracción de ADN, QIAamp DNA blood kit (Qiagen AG, Basel, Switzerland), siguiendo los pasos indicados por el fabricante. Desde el ADN obtenido en 3 muestras consecutivas de cada paciente HBsAg positivo a lo largo de 3 años, se realizó la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (*nested-PCR*) de los fragmentos genómicos S (585 nt) [154] y preC/C (304nt).

- Amplificación de la región S

Los cebadores (*primers*) utilizados para la región parcial del gen S se diseñaron para amplificar entre las bases 203 y 787 del genoma de HBV. La amplificación implicó dos rondas de PCR. Para la primera, los *primers* externos fueron:

- PrsS2 : 5' GGGACACCATATTCTTGG 3'
- S1R: 5' TTAGGGTTTAAATGTATACCCA 3'

La amplificación por PCR consistió en 35 ciclos de 45'' a 94°C, 60'' a 53°C, 90'' a 72°C.

La segunda ronda de amplificación se llevó a cabo bajo el mismo esquema de ciclado pero utilizando los *primers* internos YS1 e YS2:

- YS1: 5' GCGGGGTTTTTCTTGTTGA 3'
- YS2: 5' GGGACTCAAGATGTTGTACAG 3'

- Amplificación de la región preC/C

Las región parcial preC/C se amplificó empleando *primers* ya diseñados [66] y ligeramente modificados en nuestro laboratorio. Los externos (P1 y P2) e internos (P3 y P4) que se utilizaron para la primera y segunda ronda de ciclado respectivamente fueron:

- P1: 5' TCGCATGGAGACCACCGTGA 3'
- P2: 5' ATAGCTTGCCTGAGTGC 3'
- P3: 5' CATAAGAGGACTCTTGGACT 3'
- P4: 5' GGAAAGAAGTCAGAAGGC 3'

La amplificación de preC/C implicó un programa de 36 ciclos de 1' a 94°C, 1' a 56°C y 3' a 72°C. La segunda ronda de amplificación se llevó a cabo bajo el mismo esquema de ciclado.

Ambas reacciones de amplificación presentaron sensibilidad semejante y cercana a 500 copias/ml. Esta sensibilidad se determinó a partir de un ensayo "in house" en el cual se realizó la detección de ADN por PCR desde muestras de suero con cargas virales conocidas.

Los productos de amplificación obtenidos fueron secuenciados bidireccionalmente, utilizando el BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit en un secuenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

- Clonado

Para llevar a cabo el análisis de cuasiespecies virales de HBV en coexistencia con HIV, a lo largo de 3 años de seguimiento se procedió a clonar los productos de PCR de preC/C y gen S en los distintos tiempos. El clonado se realizó en el plásmido pGEM-T Easy Vector (Promega) con posterior transformación de bacterias *E. coli* DH5 α . A partir de las colonias obtenidas luego de la transformación y, mediante la realización de la PCR de colonias (*Colony* PCR), se obtuvieron los amplicones de interés utilizando el mismo ciclado térmico que para la amplificación directa de S y preC/C.

Posteriormente se secuenciaron y analizaron entre 15-25 clones de cada muestra como ya se indicó. Dicho número de clones fue considerado adecuado de manera de poder inferir la composición de cuasiespecies [155]. Posteriormente, se procedió al análisis filogenético.

- Genotipificación de los aislamientos de HBV mediante análisis filogenético

Las secuencias consenso de las regiones S y preC/C fueron alineadas junto a secuencias de los distintos genotipos de HBV (A-H), obtenidas del GenBank utilizando el programa ClustalX v1.83 y editadas con el programa Bioedit v7.0.9.0 [156]. Se realizó un árbol de distancia obtenido por Neighbor-Joining (NJ) con el modelo de Kimura-2 parámetros para establecer el genotipo de HBV de cada uno de los aislamientos. El soporte de las ramas se evaluó

mediante el análisis de remuestreo o *bootstrap*. Los valores se asignaron luego de 100 remuestreos por NJ utilizando el programa ClustalX v1.83.

- Análisis de la estructura secundaria del ARN pregenómico de HBV

La secuencia de ARN_{pg} correspondiente a la señal ϵ de encapsidación (1846-1916) se analizó para cada uno de los aislamientos obtenidos desde la muestra de suero del primer tiempo en pacientes que expresaban HBsAg, en forma predictiva en lo referido a su estructura secundaria. Se empleó el programa mFold (version 3.2) [157]. El algoritmo implementado predice la energía libre mínima, ΔG , además de las energías libres mínimas que debe contener cualquier apareamiento de bases [158]. La temperatura de plegamiento se estableció a 37°C.

- Análisis de mutaciones y deleciones en preC/C

Para el análisis de mutaciones y deleciones en la región preC/C se realizó la comparación de las secuencias de HBV obtenidas desde las muestras de suero de los pacientes en comparación con secuencias de referencia genotipo-específicas obtenidas del GenBank. El estudio longitudinal implicó el análisis de tres muestras de suero separadas por un período de 10-13 meses una de la otra (T1, T2 y T3). Se realizó la inspección visual de mutaciones ampliamente descritas en el promotor basal y precore tales como T1753C-A1762T-G1764A -C1766T y C1858T-G1896A, respectivamente, y de deleciones en ambas regiones del ORF preC/C.

- Amplificación de pol para mutaciones de resistencia a terapia

La caracterización de mutaciones puntuales asociadas a resistencia al tratamiento antiviral anti HBV se realizó mediante la amplificación del gen pol de HBV usando los *primers* previamente descritos por Tenney y colaboradores [159] y modificados por nuestro grupo.

Los mismos generan un amplicón de 1298pb como resultado de la primera ronda de amplificación. Para ello se utilizan los *primers*:

- KPHBV8: 5' CCTCAGGCCATGCAGTGGAA 3'
- BRHBV4: 5' GCTAGGAGTTCCGCAGTATGGA 3'

Una segunda ronda de amplificación se realizó para generar un producto de *Nested-PCR* de 589pb mediante los *primers*:

- FS1: 5' TCCTCTTCATCCTGCTGCTAT 3'
- RS4: 5' GACATACTTTCCAATCAATAGG 3'

Para ambas amplificaciones se utilizó el siguiente programa de ciclado: 40 ciclos de 1' a 94°, 1'a 55° y 2'a 72°, con una extensión final de 10'a 72°.

- Relaciones filogenéticas intra e interpaciente

Para el estudio de evolución molecular de HBV se seleccionaron aquellos pacientes crónicamente infectados con HBV, genotipo A2 y que expresaban HBeAg (tabla 3.1). Se utilizaron para el análisis las secuencias de los aislamientos de HBV pertenecientes a la primera y última muestra de suero, separadas por 3 años, de los pacientes seleccionados

- Análisis filogenético

Con el objeto de establecer si la coexistencia de HIV influye en la evolución molecular de HBV, se realizó un árbol filogenético por Máxima Verosimilitud (ML) utilizando el programa PhyML v3.0 [160] con el modelo de sustitución estimado de acuerdo al criterio de Akaike, mediante la utilización del programa ModelTest [161]. Este análisis indicó qué modelo es el que presenta el número de parámetros que permite el mejor ajuste para el estudio de las secuencias de las regiones genómicas S y preC/C. El soporte de las ramas se evaluó mediante el análisis de *bootstrap*. Los valores se asignaron luego de 100 remuestreos por Máxima Verosimilitud utilizando el programa PhyML v3.0.

Las inferencias filogenéticas por ML se realizaron bajo el algoritmo del programa PhyML que permite el análisis de matrices con un número de taxones superior a 40-50 secuencias.

- Determinación de la tasa de evolución molecular de HBV

Para estimar la tasa de sustitución de HBV en aislamientos de pacientes mono infectados y coinfectados con HBV y HIV (desde aquí serán mencionados únicamente como "coinfectados"), se realizó un análisis de coalescencia por el método Bayesiano utilizando el programa BEAST v1.4.8. [162]. Este programa permite incorporar información filogenética a la estimación de la tasa de evolución y que la tasa de sustitución varíe entre linajes (mediante la

incorporación del reloj molecular relajado). Además se pueden adoptar diferencias en la historia demográfica de los virus (tasas en el crecimiento poblacional) [163]. Dicho análisis se llevó a cabo a partir de secuencias directas de preC/C y S de los individuos mono infectados y coinfectados. Se utilizó el modelo de reloj molecular log-normal no correlacionado (UCLN) [164] y se consideró un tamaño de población constante como modelo demográfico de manera de evitar la sobreparametrización. El análisis se corrió el tiempo suficiente de manera de llegar a la convergencia. El 10% del muestreo realizado (MCMC) se descartó como parte del proceso de *burn-in*. La incertidumbre de los parámetros estimados se evaluó en el intervalo de densidad posterior mayor al 95% (HPD95%).

- Análisis de la heterogeneidad de HBV

El análisis de la diversidad a nivel nucleotídico se evaluó a nivel inter e intra paciente:

- *Análisis interpaciente:*

Se realizó un análisis comparativo de la heterogeneidad en las regiones S y preC/C en pacientes mono infectados y coinfectados. Se evaluó la distancia genética media (d) basada en las secuencias directas de las regiones S y preC/C concatenadas, de manera de inferir la diversidad entre ambos grupos de pacientes en el primer y último tiempo. La distancia genética media fue calculada a nivel nucleotídico utilizando el modelo Tamura-Nei [165] y una distribución Gamma para la distribución de las tasas de sustitución en cada sitio (con valores α estimados mediante el programa ModelTest) implementando el programa MEGA 4.0 [165].

- *Análisis intrapaciente:*

Se evaluó la heterogeneidad de cuasiespecies de HBV durante los 3 años en mono infectados y coinfectados. El análisis de heterogeneidad viral incluyó el estudio de la complejidad viral y la distancia genética en el primer y último tiempo de los 3 años de análisis. Para tales análisis se utilizaron secuencias de clones de las regiones preC/C y S de ambos grupos de pacientes. La distancia genética intrapaciente de HBV se estimó utilizando el modelo Tamura-Nei y la distribución Gamma para la heterogeneidad en la velocidad de cambios en cada sitio, como se indicó para en análisis interpaciente.

La complejidad se midió mediante el cálculo de la Entropía de Shannon (S_n) a nivel nucleotídico. Este parámetro indica la cantidad de variantes virales identificadas en una muestra y toma valores en un rango entre 0 (cuando todos los genomas son iguales) y 1 (cuando todos los genomas son diferentes entre sí). Fue calculado bajo la siguiente fórmula matemática:

$S_n = -\sum_i [(p_i \times \ln p_i) / \ln N]$ donde p_i es la frecuencia de cada secuencia en la distribución de mutantes y N es el número total de secuencias que se comparan [166].

- Selección positiva y negativa

El análisis de cuasiespecies incluyó el cálculo de la relación entre el número de sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo (dN) y el número de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo (dS) a nivel intrapaciente. La relación dN/dS fue calculada en las regiones codificantes S, pol, preC/C y X en cada uno de los aislamientos genotipo A2 de pacientes mono infectados y coinfectados que expresaban HBeAg, a lo largo del tiempo. Se realizó a nivel nucleotídico mediante el programa MEGA 4.0 bajo el modelo Tamura Nei [165]. Esta relación determina el grado de selección natural. Así, dN/dS >1 indica selección positiva mientras que valores menores a 1 indican presión de selección negativa.

Además, para evaluar la selección positiva y negativa en cada codón, se utilizó el programa *Hyphy* [167]. La selección positiva ocurre cuando un cambio aminoacídico confiere una ventaja adaptativa mientras que la selección negativa implica la eliminación de cambios en aminoácidos que puedan conferir una desventaja. El programa *Hyphy* permite la comparación estadística del número de sustituciones sinónimas y no sinónimas en cada posición de un grupo de secuencias alineadas.

Para establecer la comparación del grado de selección positiva y negativa en cada una de las posiciones aminoacídicas, se evaluaron alineamientos de los ORF S y preC/C y en sus respectivos genes solapados, Pol y X) como fue descrito por Audsley y col [168]. Se utilizó el algoritmo SLAC (siglas en inglés de: *single likelihood ancestor counting*) del mencionado programa [169] (Kosakovsky Pond & Frost 2005) para evaluar la selección intrapaciente (análisis de clones de cada paciente) e interpaciente (análisis comparativo de

los clones de pacientes mono infectados y coinfectados). Dicho algoritmo permite la detección de la selección no neutral basado en el modelo de Suzuki y Gojobori. Los sitios identificados por SLAC con un nivel de significancia de $p < 0,01$ fueron considerados como sitios seleccionados positiva o negativamente según corresponda.

- Análisis de evolución molecular en epitopes antigénicos de linfocitos T citotóxicos y T helper

Se evaluaron los cambios aminoacídicos en epitopes T citotóxicos y T helper específicos implicados en las diferentes regiones genómicas de HBV que aquí fueron analizadas desde pacientes mono infectados y coinfectados.

A partir de las secuencias nucleotídicas de preC/C y S obtenidas desde cada aislamiento de todos los pacientes analizados (genotipo A2, HBeAg positivos), se dedujo la secuencia aminoacídica de las secuencias parciales de precore/core y S y las regiones de X y pol, cuyos marcos abiertos de lectura se encuentran solapados a los primeros y se procedió a la inspección visual de variaciones en las secuencias en epitopes antigénicos reportados en la bibliografía [170] a lo largo del tiempo y entre los dos grupos de pacientes analizados.

(nota: La numeración para la ubicación de los distintos epitopes se realizó según el codón inicial para el gen S en la secuencia de genotipo A X027631, obtenida desde el GenBank).

- Análisis estadístico

El presente estudio implicó el análisis comparativo entre diferentes parámetros evaluados en dos grupos de pacientes, mono infectados y coinfectados, a lo largo del tiempo. Se utilizó *Student t-test* para muestras independientes para comparar las variables. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS para Windows versión 13.0 (SPSS Inc, Chicago, USA). Un valor de p de 2 colas menor a 0,05 se consideró como estadísticamente significativo.

3.2 Análisis de la dinámica de cuasiespecies virales a lo largo de 14 años bajo diferentes terapias antivirales

- Paciente bajo estudio

Desde el año 1996 al 2010 se colectaron muestras de suero de un paciente crónicamente infectado con HBV, diagnosticado en 1996. En la tabla 3.3 se muestran los parámetros bioquímicos, serológicos y virales del paciente. Los datos de fecha de infección por HBV, estadios clínicos, histología y tratamiento antiviral fueron aportados por el médico tratante.

Muestra	Fecha	HBeAg	Anti HBe	ALT	ΔV HBV (UI/ml)	Tratamiento
	05/01/1996	NEG	POS	42		SIN
Ros753	26/05/1998	NEG	POS	154	650000	SIN
	01/12/1998			25	500	IFN + LMV
	22/01/1999			16		
	29/04/1999	NEG	POS	19		
	29/06/1999			9		
	21/09/1999			12		LMV
Ros438	15/02/2001	NEG	POS	15		SIN
Ros864	24/05/2001			295	103.000.000	SIN
	18/07/2001			64		
	12/09/2001			56		
	23/11/2001	NEG	POS	81		
	16/01/2002			32		
	08/05/2002			22		
	14/08/2002			15		
	02/12/2002			24		
	20/05/2002			24		
	13/11/2003			83		LMV
	19/02/2004			79		
	02/06/2004	POS	NEG			
	28/09/2004	POS	NEG	29		
	10/01/2005	POS	NEG	46		
	19/05/2005			47		
	25/08/2005	POS	NEG	48	3042000	LMV
	01/12/2005	POS	NEG	55		
	16/02/2006	POS	NEG	33		
	06/06/2006	POS	POS	30	85000	ADV
Ros827	04/07/2006					ADV
	24/11/2006			29		
	23/04/2007	POS	ND	20		
	16/07/2007			34		
	27/12/2007	POS	POS	65	7.150.000	ETV
	26/02/2008	POS	POS	41	17.600.000	ETV
	15/05/2008	POS	POS	75	109.000	ETV + TDF
	04/09/2008	POS	POS	28	199.000	ETV + TDF
Ros654	16/12/2008			879	110.000.000	ETV + TDF
	07/01/2009	NEG	POS	413		ETV + TDF
Ros802	14/05/2009	POS	POS	90		ETV + TDF
	07/08/2009	POS	POS	89		ETV + TDF
Ros252	27/08/2009	POS	IND	94		ETV + TDF
Ros727	19/11/2009	POS	NEG	76	110.000.000	ETV + TDF
Ros065	25/03/2010	POS	NEG		4.290.000	ETV + TDF

Tabla 3.3: Datos clínicos, serológicos y virológicos del paciente bajo estudio (Ros). Las muestras indicadas en negrita son aquellas a partir de las cuales se procedió a la amplificación del genoma viral. POS: positivo, NEG: negativo, ND: no detectable, IFN: interferón, LMV: lamivudina, ETV: entecavir, TDF: tenofovir.

La terapia se inició cuando la carga viral de HBV aumentó hasta llegar al valor de $6,5 \times 10^6$ UI/ml. En el año 1998, mientras el paciente se encontraba bajo tratamiento con IFN α , 5 millones UI, 3 veces por semana durante 30 semanas, los niveles de carga viral se encontraron por debajo de límite de detección. Esta terapia se interrumpió y en el año 1999 se reemplazó por monoterapia con LMV (100 mg por día). Después de 2 años bajo dicho tratamiento, el ADN viral volvió a ser detectable. Durante este tratamiento, el paciente permaneció como HBeAg negativo con anti HBe detectable. En 2001 se evidenció un aumento del ADN viral hasta que en el año 2003, se reintrodujo la terapia con LMV (100 mg/día).

En ese momento se evidenció un evento de reversión a HBeAg positivo y anti HBe negativo, que permaneció detectable por 2 años, y se observó un aumento de la carga viral de HBV.

Hacia el 2006, el tratamiento con LMV se reemplazó por monoterapia con ADV (10 mg/día). Inicialmente los niveles de carga viral disminuyeron pero 48 semanas más tarde, la carga viral volvió a aumentar. Durante este intervalo, los niveles de ALT permanecieron normales. Seis meses más tarde, los niveles de ALT aumentaron levemente y se implementó la terapia con ETV. Cinco meses luego de instaurada la monoterapia con ETV, se agregó al tratamiento con TDV (300 mg/día). En ese momento, la carga viral disminuyó considerablemente por 4 meses pero 3 meses más tarde, la misma se incrementó hasta valores mayores a $1,1 \times 10^8$ UI/ml. Adicionalmente, aumentaron los valores de ALT, dando evidencia de inflamación hepática. Durante las siguientes 48 semanas, la replicación viral disminuyó pero enseguida aumentó, primero a $3,6 \times 10^7$ para alcanzar valores mayores a $1,1 \times 10^8$ UI/ml nuevamente.

Durante el segundo semestre del 2010, los valores de ADN de HBV fluctuaron dentro de niveles elevados.

A lo largo de los últimos 2 años de seguimiento, los valores de ALT permanecieron elevados. Además, el paciente serorevirtió a HBeAg positivo.

- Patrón serológico HBeAg-Anti HBe

Los ensayos de detección de HBeAg y del anticuerpo específico (anti HBe) se realizaron empleando la técnica de electroquimioluminiscencia (ELECSYS 2010, Roche Diagnostic).*

- Medición del nivel de transaminasas hepáticas

Se realizó la medición de los niveles de ALT como se indicó más arriba*.

- Medición de la carga viral plasmática de HBV

La carga viral de HBV fue evaluada por PCR en tiempo real (COBAS TaqMan Roche Molecular Systems) con un rango de cuantificación de 30 UI/ml a 110000000 UI/ml [171]*.

*Los ensayos fueron realizados en el laboratorio CIBIC (Centro de Diagnóstico Médico de Alta complejidad), Rosario.

- Procesamiento de las muestras

El procesamiento de las muestras incluyó extracción de ADN, amplificación de las regiones preC/C y pol, clonado y secuenciación de los amplicones obtenidos por PCR directa y de 15-25 clones obtenidos desde muestras seleccionadas.

La extracción de ADN, amplificación de preC/C y pol, secuenciación y posterior análisis de secuencias, se llevaron a cabo como fue descrito anteriormente.

- Medición de la concentración plasmática de tenofovir

Hacia el final del estudio longitudinal, se llevó a cabo la medición de la concentración plasmática de la droga tenofovir mediante la técnica de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) en 3 muestras consecutivas 20 horas posteriores a la administración de la droga, llegando a un valor promedio de 71.6 ng/ml \pm 47.6. Determinación realizada en el Laboratorio de Análisis Clínicos y Medicina Nuclear Dr. M. Schere.

- Evolución molecular de HBV a lo largo de 14 años

- Análisis de composición de cuasiespecies

A lo largo de los 14 años de seguimiento, se seleccionaron muestras colectadas durante las distintas terapias antivirales y se procedió a la amplificación del gen pol con posterior clonado y análisis de 15 clones por muestra, de la manera descrita más arriba. De este modo se determinó la composición de cuasiespecies virales bajo la presión de selección ejercida por las diferentes terapias.

- Análisis filogenético

El análisis filogenético de los aislamientos fue realizado mediante el método de ML bajo el modelo de evolución molecular seleccionado según el criterio de Akaike con secuencias directas y de clones de la región genómica pol a partir de muestras de suero seleccionadas, como fue descrito anteriormente.

- Análisis de la heterogeneidad de HBV en la región pol

Se evaluó de la heterogeneidad de cuasiespecies de HBV durante los 14 años mediante el estudio de la complejidad viral y la distancia genética en el primer y último tiempo. Para este análisis se utilizaron secuencias de clones de la región genómica pol del paciente bajo estudio. La distancia genética intrapaciente de HBV se estimó utilizando el modelo Tamura-Nei y la distribución Gamma para la heterogeneidad en la velocidad de cambios en cada sitio, como ya se indicó. La complejidad se midió mediante el cálculo de la Entropía de Shannon a nivel nucleotídico.

- Selección positiva y negativa

Se procedió a analizar los codones bajo presión de selección positiva y negativa mediante el programa *Hyphy* como ya se indicó previamente.

- Determinación de la tasa de evolución molecular de HBV y tMRCA

Utilizando el programa BEAST v1.4.8, mediante el mismo análisis de coalescencia por el método Bayesiano se procedió a calcular el tiempo de ancestro común más cercano (tMRCA) y la tasa de evolución molecular. Se eligió calcular el tMRCA en este paciente dada la disponibilidad de muestras seriadas, a distintos tiempos, durante un tiempo prolongado. De esta manera se puede calcular con mayor fidelidad la ancestralidad de HBV. El tMRCA es una distribución de probabilidades que utiliza distintos marcadores, entre ellos, la tasa de sustitución nucleotídica de HBV. Si se utilizan más marcadores o más valores de los mismos, esta distribución se estima con mayor precisión [172].

El set de secuencias fue analizado bajo el modelo demográfico de tamaño poblacional constante y el reloj molecular relajado. En cada caso las cadenas MCMC se corrieron el tiempo suficiente de manera de llegar a la convergencia mediante el programa TRACER. El modelo de sustitución nucleotídica fue

seleccionado usando el criterio de Akaike que provee el modelo con la mejor descripción de la evolución viral de las secuencias seleccionadas. Los parámetros se estimaron con una incertidumbre reflejada en el 95% de mayor densidad probabilística (HPD).

- Análisis estadístico

El análisis estadístico comparativo entre los diferentes parámetros evaluados a lo largo del tiempo se realizó mediante el estadístico Student t-test, tal como se indicó previamente.

3.3 Prevalencia de variantes de HBV con resistencia basal al tratamiento antiviral

- Población bajo estudio e inspección de mutantes de resistencia

Durante el período 2008-2010 se colectaron muestras de suero de 14 pacientes monoinfectados con HBV, atendidos en el Servicio de Hepatología del Hospital Francisco J. Muñiz. Dichas muestras se tomaron de forma previa al inicio del tratamiento anti HBV.

Desde los 14 pacientes bajo estudio se obtuvieron entre 1 y 3 muestras de suero posteriores a la considerada basal (sin tratamiento con análogos de nucleósidos/ nucleótidos) de 4 pacientes para realizar un estudio longitudinal de las secuencias. De estos 4 pacientes, 2 de ellos iniciaron tratamiento con IFN previo a la extracción de la segunda o tercera muestra de suero (tabla 3.4) y otro de los pacientes es el mismo que fue descrito en la sección anterior de esta tesis y que recibió tratamiento con distintas drogas (RB 753).

Nombre	Fecha	HBsAg	HBeAg	Anti HBe	Tratamiento	CV UI/ml
RB 900	21/04/2006	POS	POS	NEG	NO	
598	07/09/2010	POS	POS	NEG	NO	> 110000000
495	17/12/2010	POS	POS	NEG	SI	> 110000000
116	12/01/2011	POS	POS	NEG	SI	> 110000000
RB 536	04/05/2009	POS	POS	NEG	NO	> 110000000
818	13/04/2010	POS	POS	NEG	SI	7090000
RB 523	03/11/2009	POS	POS	NEG	NO	> 110000000
222	14/07/2010	POS	POS	NEG	NO	> 110000000

Tabla 3.4: Pacientes *naïve* de tratamiento con muestras de seguimiento. NEG: negativo, POS: positivo.

Se procedió a la extracción de ADN, amplificación por PCR del gen pol, secuenciación directa de los productos de PCR e inspección visual de mutaciones de resistencia ampliamente descritas [72, 173-174]. Además se seleccionaron muestras de los genotipos prevalentes en Argentina (A y F) y se procedió a clonar el producto de PCR. Se analizaron 25 clones de 3 aislamientos genotipo A y 3 genotipo F como muestras representativas de los genotipos prevalentes en coinfectados y mono infectados, respectivamente, en Argentina.

Se realizó la genotipificación de todas las secuencias de HBV mediante el análisis filogenético por ML, utilizando el programa PhyML utilizando como modelo de evolución molecular aquel que más se adecuó a los datos analizados, según el criterio de Akaike, como se describió anteriormente

Todos los estudios incluidos en la presente tesis fueron aprobados por el Comité de Ética de la Fundación Huésped y todos los pacientes dieron su consentimiento para participar de los mismos.

RESULTADOS

4 Resultados

4.1 Distribución de genotipos de HBV en el contexto de la coinfección con HIV

La genotipificación de HBV se realizó sobre los aislamientos de los 4 grupos de pacientes estudiados (n=269): (i) pacientes virémicos para HBV con HBsAg detectable (n=22), (ii) pacientes con anticuerpos anti HBc como único marcador serológico (n=72), (iii) pacientes que no muestran marcadores serológicos para HBV pero presentan niveles de alanino-amino-transaminasa elevada en suero (n=23) y (iv) pacientes con anticuerpos anti HBs y anti HBc (n=152).

La detección de viremia en estas 4 instancias, arrojó los siguientes resultados (figura 4.1):

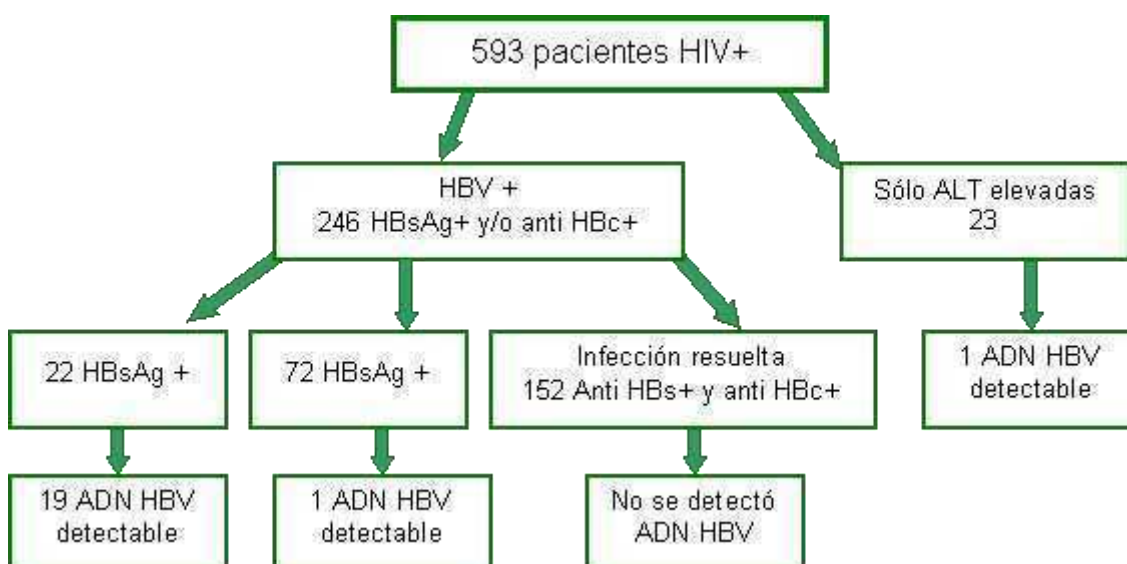


Figura 4.1: Esquema de la población bajo estudio con su correspondiente perfil serológico y detección de ADN de HBV por PCR de la región preC/C. HBsAg: antígeno superficie HBV, Anti HBc: anticuerpo anti core, Anti HBs: anticuerpo anti HBsAg, ALT: transaminasas hepáticas.

(i) Desde las 22 muestras con reactividad para HBsAg, se detectó ADN de HBV por PCR desde gen S en 19 de ellas. Las mismas fueron utilizadas para el estudio longitudinal y evolutivo (incluyendo muestras de tres tiempos T1, T2 y T3 implicando un período de 3 años para cada paciente). De ellas, se logró amplificar por PCR la región preC/C en el primer tiempo (T1) en todas. Sin embargo, 5 aislamientos desde pacientes coinfectados (P2, P10, P17, P22 y P24) y 7 (M10, M13, M14, M17, M18, M19 y M20) desde pacientes

monoinfectados no pudieron ser seguidos en el tiempo debido a que no se detectó ADN de HBV en tiempos posteriores a T1.

(ii) Se detectó por PCR de gen S, genoma de HBV en 4 muestras de los 72 individuos que presentaron el patrón de “core aislado”, demostrando una infección oculta por HBV. Sin embargo, sólo en una de ellas se logró amplificar la región preC/C. En ninguna de las dos regiones analizadas se detectaron mutaciones luego que los amplicones fueran secuenciados.

(iii) Se hallaron niveles anormales en los niveles de ALT, sin marcador serológico para HBV, en 23 de las 593 muestras. Sólo una de ellas resultó positiva para ADN de HBV (gen S y preC/C). (iv) No se encontraron pacientes virémicos entre aquellos que presentaron el perfil anti HBs y anti HBc detectables.

Dado el bajo número de sujetos de estos últimos 3 grupos y la imposibilidad de hacer análisis prospectivo, los aislamientos de HBV no ameritaron estudios de la región de preC/C.

La caracterización genómica no fue factible en aquellos pacientes no virémicos (ADN no detectable para HBV).

- Asignación de genotipos de HBV basada en la región preC/C en coinfectados (P)

Desde las 19 muestras con reactividad para HBsAg y ADN de HBV detectable (gen S), se logró amplificar por PCR la región preC/C en el primer tiempo (T1) en todas ellas. Sin embargo, como ya se mencionó, 5 aislamientos desde pacientes coinfectados y 7 desde pacientes monoinfectados no pudieron ser seguidos en el tiempo debido a que no se detectó ADN de HBV en tiempos posteriores a T1.

- Pacientes HBeAg (+)

La distribución de genotipos de los aislamientos de HBV desde los 12 pacientes HBeAg positivos, basada en el análisis filogenético por NJ en base a secuencias de la región preC/C en cada uno de los 3 tiempos analizados, no mostró diferencias con la obtenida empleando secuencias de la región S [154] (figura 4.2), a excepción de un aislamiento: P1 (figura 4.3).

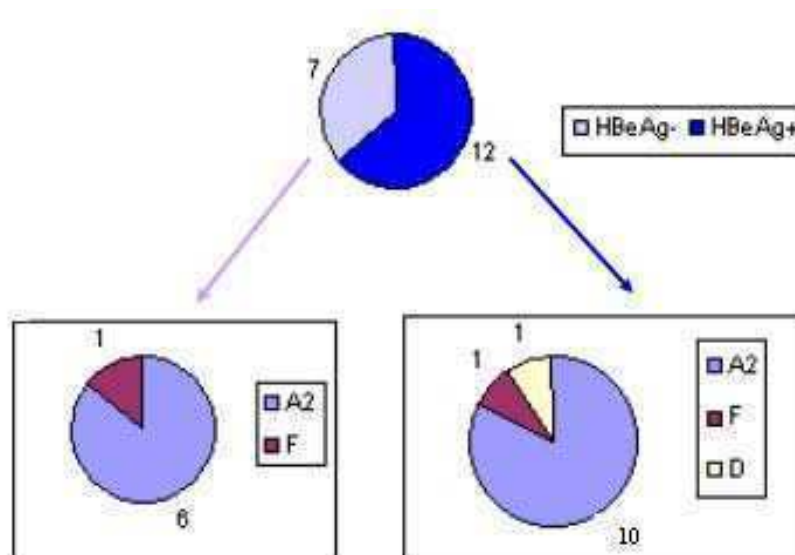
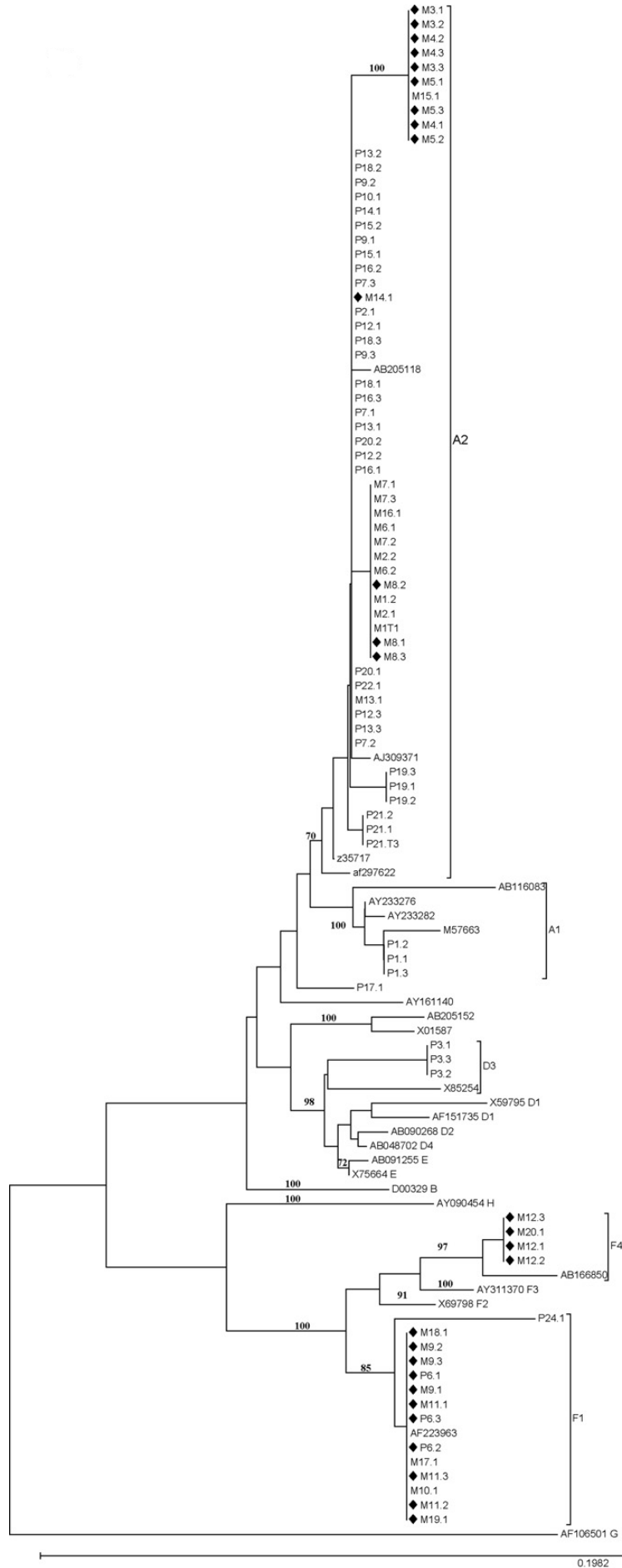


Figura 4.2: Esquema de la distribución de genotipos por NJ de la región S de los pacientes coinfectados bajo estudio según el perfil serológico HBeAg.

Considerando que todos los aislamientos fueron analizados por clonado de las regiones genómicas amplificadas por PCR de los genes S y preC/C y posterior secuenciación nucleotídica se permitió poner en evidencia una distribución de genotipos heterogénea o infección mixta en algunos pacientes. Así, P1, presentaba una infección mixta con los genotipos A, D y recombinante A-D cuando se analizó el gen S. Sin embargo, mediante el análisis filogenético de la región preC/C, se lo caracterizó como genotipo A1 puro (figura 4.4).

Figura 4.3: Relaciones filogenéticas establecidas por neighbor joining, basadas en el análisis de secuencias consenso de la región preC/C juntos con secuencias de los genotipos A-H obtenidas del GenBank. Los valores que se muestran indican el soporte de los nodos por análisis de *bootstrap* (> 50%).

Las secuencias de los aislamientos caracterizados desde distintos pacientes se nombran como está indicado en la tabla 3.1. Los aislamientos pertenecientes a los distintos tiempos (T) analizados se indican como números del 1 al 3 según corresponda.



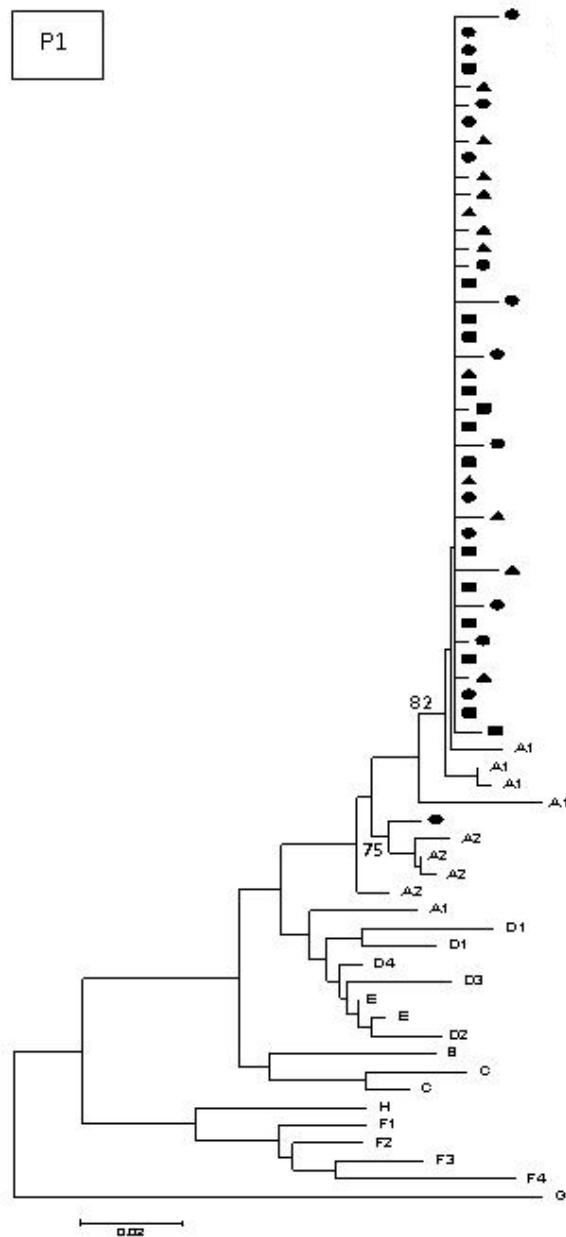


Figura 4.4: Relaciones filogenéticas del aislamiento P1 basado en el análisis de la región preC/C junto a secuencias representativas de los genotipos A-H obtenidos del GenBank. Los símbolos que acompañan a cada uno de los clones se asignaron según el tiempo de recolección de la muestra: (●) Primer tiempo; (■) segundo tiempo y (▲) tercer tiempo. Los valores que se muestran indican el soporte de los nodos por análisis de *bootstrap* de los clados que incluyen los clones de P1.

- Pacientes HBeAg (-)

Mientras que el análisis de la región S dio evidencia de genotipo A2 puro en 6 de los 7 aislamientos de HBV, la genotipificación en preC/C de los clones de

cada uno de los aislamientos, mostró poblaciones heterogéneas en dos de ellos: P10 y P22 y la asignación de un genotipo distinto para P17.

Los aislamientos P10 y P22 exhibieron unos pocos clones adscritos al genotipo D3, dando evidencia de infección mixta con dos genotipos distintos (figura 4.5A y B).

P17 que, por el gen S, fue adscrito al genotipo A, se describió como perteneciente al genotipo D3 al realizarse el análisis en la región preC/C (figura 4.5C).

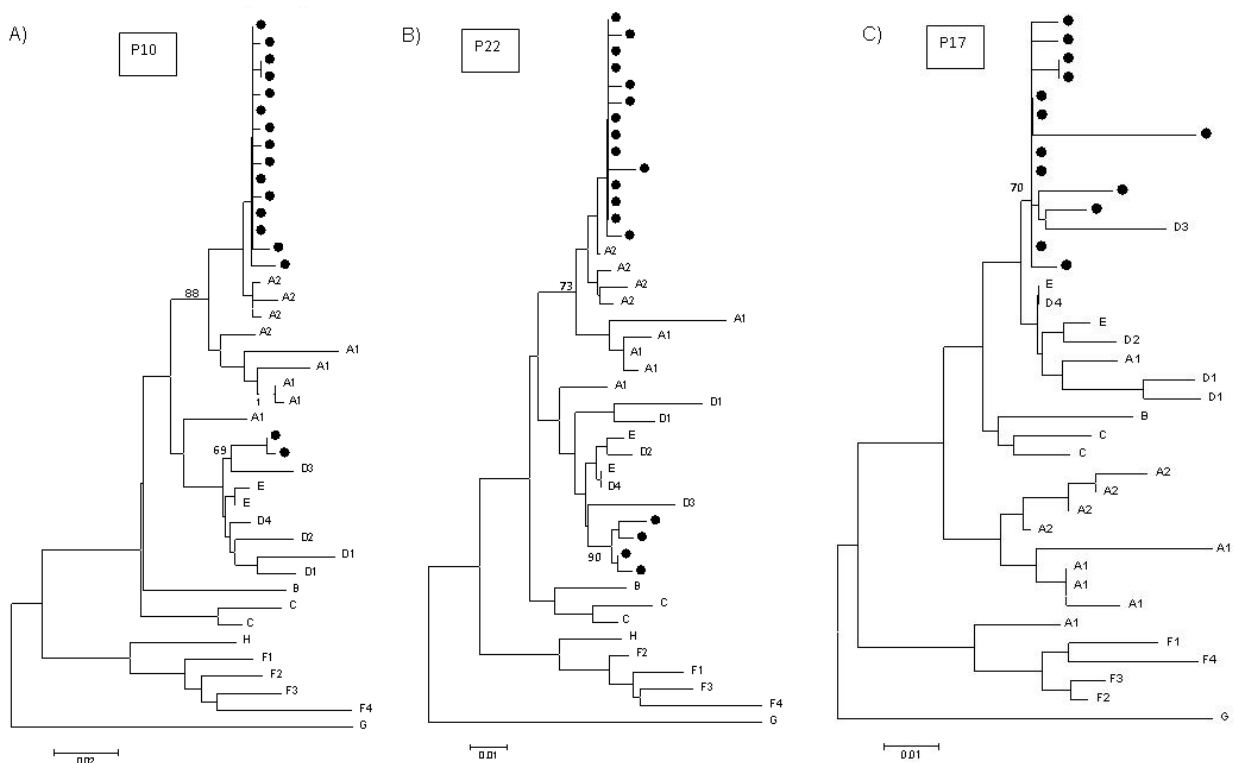


Figura 4.5: Relaciones filogenéticas de los aislamientos P10 (A), P22 (B) y P17 (C) basado en el análisis de la región preC/C junto a secuencias representativas de los genotipos A-H obtenidos del GenBank. El símbolo (●) que acompaña a cada uno de los clones se refieren al primer tiempo de recolección de la muestra. Los valores que se muestran indican el soporte de los nodos por análisis de *bootstrap* de los clados que incluyen los clones de P10 (A), P22 (B) y P17 (C), respectivamente.

- Asignación de genotipos de HBV basada en la región preC/C en mono infectados (M)
 - Pacientes HBeAg (+) y (-)

Entre los pacientes mono infectados (8 HBeAg positivos y 4 HBeAg negativos), la asignación de genotipos por análisis de S coincidió con el realizado en preC/C, siendo 8 aislamientos genotipo A y 4 genotipo F (figura 4.5).

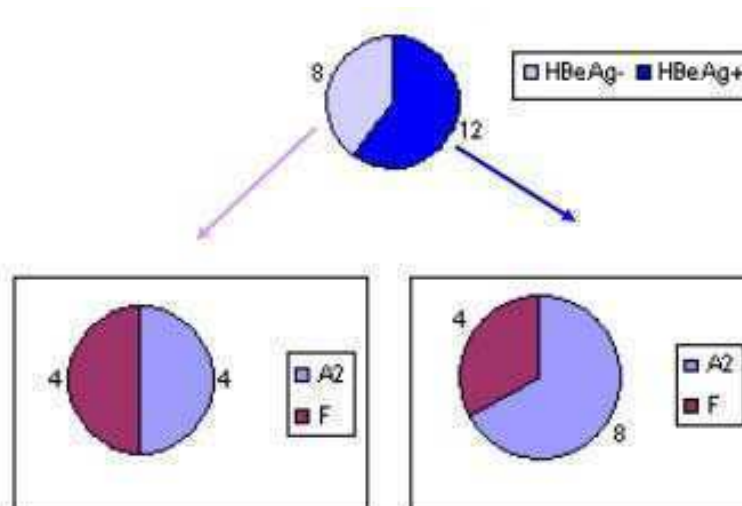


Figura 4.5: Esquema de la distribución de genotipos por NJ de la región S de los pacientes mono infectados bajo estudio según el perfil serológico HBeAg.

La genotipificación dio evidencia de una mayor prevalencia de genotipo A2 en pacientes coinfectados en comparación con pacientes mono infectados, tanto en el análisis de la región S como la de preC/C. Entre estos últimos, la distribución de los genotipos A2 y F1 coincide con la previamente reportada [88, 93].

Al considerar los aislamientos de los distintos tiempos de cada paciente como independientes, 32 aislamientos de 43 resultaron ser A2 en pacientes coinfectados, mientras que sólo 4 resultaron genotipo F1, 3 genotipo A1 y 4 genotipo D3. En cambio, en mono infectados, 25 resultaron A2 y 14 F1, de un total de 39 aislamientos.

- Impacto de la coinfección con HIV en la dinámica de variantes de las regiones genómicas preC/C y S en pacientes crónicamente infectados con HBV
 - Análisis de la estructura secundaria del RNA de la señal ε de encapsidación:

La estructura secundaria de ARN de la señal ε de encapsidación deducida a partir de la secuencia nucleotídica obtenida por secuencias consenso de la región preC/C, en el primer tiempo, no se vio alterada. Esto se debe a la elevada conservación de la secuencia obtenida y la ausencia de mutaciones en preC en la mayoría de los aislamientos.

En la figura 4.6 se muestra un esquema representativo de la estructura secundaria obtenida desde dos aislamientos de pacientes coinfectados: P1, que presentaba mutaciones en preC/C y P6, adscrito al genotipo F; y dos aislamientos desde pacientes mono infectados: M1, con genoma *wt* y perteneciente al genotipo A2 y M20, con la variación genómica A1896G.

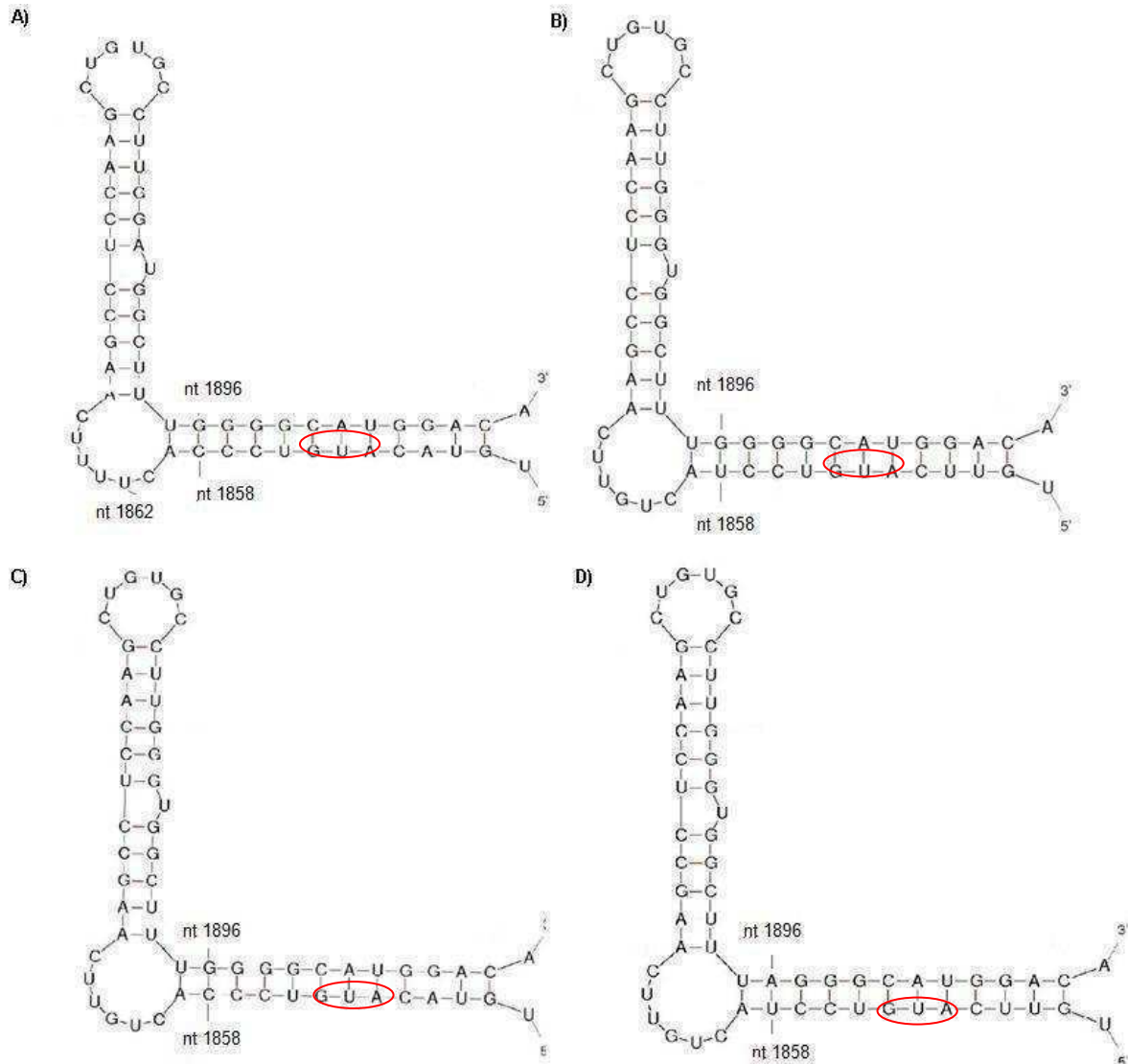


Figura 4.6: Esquema representativo de las estructuras secundarias ϵ , obtenidas desde pacientes coinfectados: P1 (A), P6 (B) y mono infectados: M1 (C) y M20 (D). Con un círculo rojo se muestra el codón de iniciación.

P1 exhibe una mutación (G1862T) río arriba del codón de iniciación para la transcripción del core y que afecta el *bulge* de la señal ϵ , generando una sustitución aminoacídica prohibida en la posición -3 del péptido señal de clivaje [175]. Si bien la estructura secundaria no se ve considerablemente alterada,

dicha mutación afectaría la replicación de HBV, alterando la expresión de la proteína del core [175].

- Prevalencia y dinámica de mutaciones y deleciones a lo largo de 3 años, en los ORFs preC/ C y pol y, su relación con parámetros virales y bioquímicos
 - Pacientes HBeAg (+), coinfectados

La mayoría de los aislamientos genotipo A2, con alta eficacia replicativa (alta carga viral) (tabla 2.1), no exhibieron mutaciones en la región del promotor basal y precore (BCP/Pc) (figura 4.7).



Figura 4.7: Alineamiento de secuencias nucleotídicas de la región preC/C de aislamientos de pacientes coinfectados. Se seleccionó una secuencia de referencia genotipo A2 obtenida desde el GenBank. Las secuencias idénticas se indican con puntos.

Sólo dos aislamientos A2 (P7 y P19) mostraron variaciones en BCP. La posición y abundancia relativa de clones con mutaciones/deleciones (con diferentes tamaños) fueron disímiles entre los dos aislamientos. P19 exhibió dos patrones de deleción diferentes; uno de 8pb (nt 1768-1775) y otro mayor de 20pb (nt 1753- 1772). El primero se evidenció de forma abundante en cada tiempo analizado y dicha proporción de clones delecionados se mantuvo en el tiempo (figura 4.8).

La deleción nt 1753-1772, sin embargo, sólo apareció en un clon de los 20 analizados y únicamente en la muestra del primer tiempo (figura 4.9 B).

Entre los aislamientos de P7, sólo en el primer tiempo se hallaron 2/18 clones con una delección de 8pb diferente a la exhibida por P19 (nt 1763- 1770). Esta delección se encontró acompañada de las mutaciones en BCP A1762T/ G1764A (figura 4.8). P7 revirtió a *wild type* en las dos muestras subsiguientes (P7T2 y P7T3, 6 y 15 meses más tarde respectivamente) (figura 4.9 A).

El único aislamiento adscrito al genotipo F1 (P6) dio evidencia de mutaciones en BCP.

	1755	1765	1775
		
P19T1 (9)	AGATTAGGTTGAAGGT	PTTTGTATTAGGAGG	
P19T1 (10)	-----
P19T1 (1)	...-----	-----
P19T2 (6)	G
P19T2 (14)	-----
P19T3 (12)	-----
P19T3 (8)	G
P7T1 (18)	A
P7T1 (2)	A -----
P7T2 (20)	A
P7T3 (20)	A

Figura 4.8: Delecciones en BCP. Secuencias parciales de ADN de HBV evidenciando la cantidad de clones con secuencia idéntica. Las delecciones se muestran con guiones. Cada secuencia se identifica con el nombre dado al paciente (P7 y P19) y el tiempo de recolección de la muestra (T1, T2 y T3).

El aislamiento P1, genotipo A1, mostró en la composición de cuasiespecies, una elevada proporción de clones con diversas variaciones en la región de precore: G1809T, C1812T, G1862T, G1888A. Éstas fueron observadas en las muestras de los tres tiempos consecutivos (P1T1, P1T2, P1T3), separados por 11 y 9 meses respectivamente.

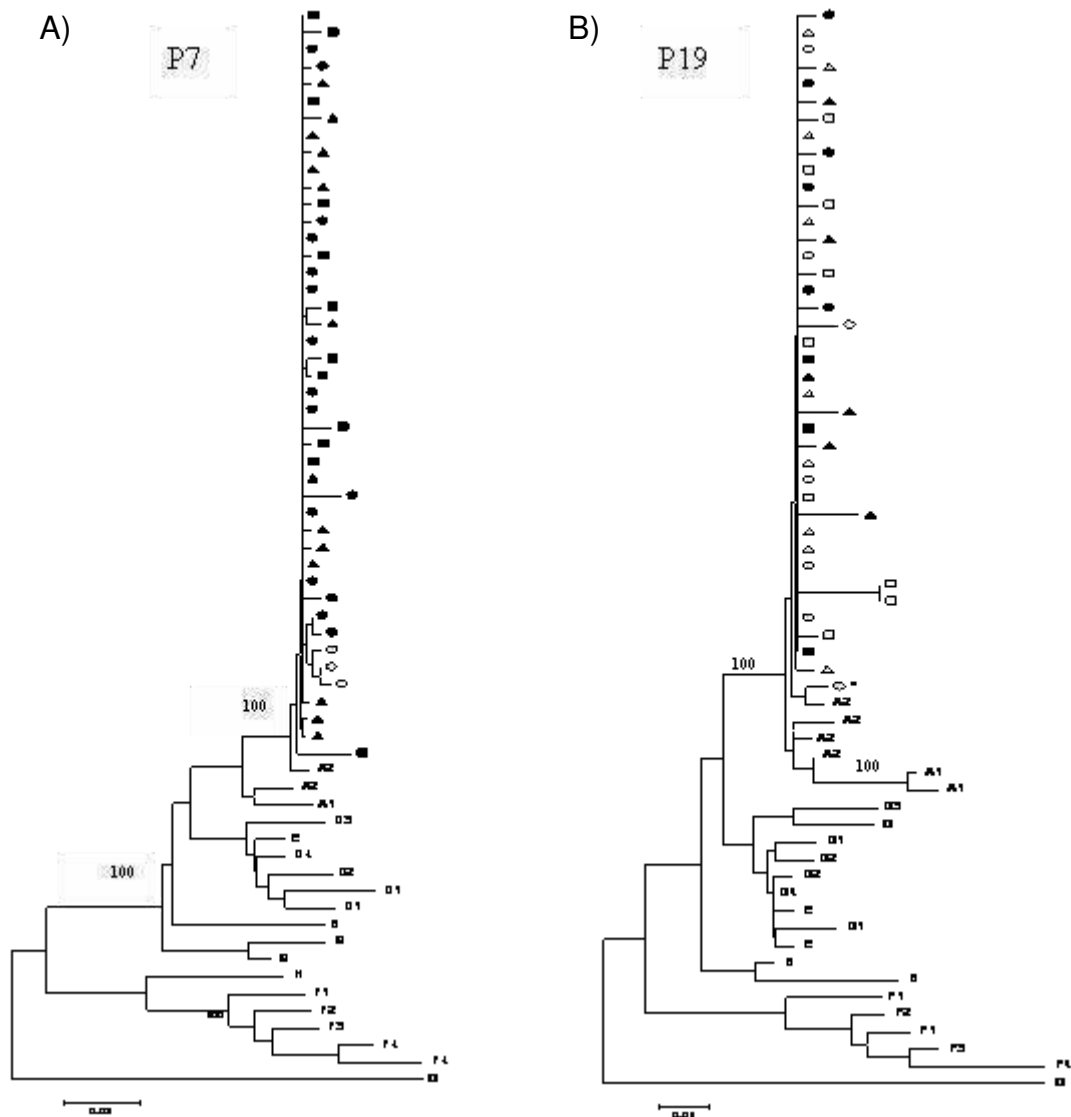


Figura 4.9: Análisis filogenético por NJ de secuencias de preC/C de los aislamientos que presentaban deleciones junto a secuencias representativas de los genotipos A-H obtenidos desde el GenBank (A) P7, (B) P19. Los símbolos (●, ■, ▲) que acompañan a cada secuencia indican el tiempo de obtención de la muestra (T1, T2 o T3). Los símbolos vacíos indican que la secuencia presenta una deleción. Los valores que se muestran indican el soporte de los nodos por análisis de *bootstrap* de los clados que incluyen los clones de P7 (A) y P19 (B).

- Pacientes HBeAg (-), coinfectados

Seis de los 7 aislamientos desde pacientes coinfectados fueron caracterizados como genotipo A2 pero ninguno evidenció variaciones en BCP. Dos de los aislamientos (P10 y P22) exhibieron clones, en baja proporción, con variaciones en Pc: A1850T/C1858T. Como ya se mencionó, estos clones fueron caracterizados como pertenecientes al genotipo D3. De esta manera se puede asumir que esas variaciones son polimorfismos genotipo-dependientes.

Entre el único aislamiento caracterizado como genotipo F (P24) se halló un clon con la mutación G1896A que genera un codón de *stop* en Pc.

- Pacientes HBeAg (+), mono infectados

Entre los mono infectados, 4 aislamientos pertenecientes al genotipo A2 (M3, M4, M6 y M8) exhibieron las mutaciones A1762T/ G1764A en BCP en la primera muestra y mantuvieron la proporción de clones mutados respecto de los *wt* a lo largo de los 3 años de seguimiento. Uno de ellos, M6, exhibió además una delección de 8pb (nt 1768-1775) en 2/10 clones en la muestra correspondiente al primer tiempo analizado.

Un aislamiento, M5, mostró variaciones en BCP y Pc únicamente en la muestra perteneciente al tercer tiempo.

Los aislamientos desde pacientes mono infectados correspondientes al genotipo F (M9, M10, M11 y M12), exhibieron mutaciones en BCP. Se observó que la proporción de clones mutados varió entre los 4 aislamientos a lo largo del tiempo. Así, M12 evidenció una baja proporción de clones mutados a lo largo de los 3 años de seguimiento mientras que M10 presentó todos los clones mutados en la única muestra analizada ya que el genoma de HBV no fue detectable en muestras posteriores. Los aislamientos M9 y M11 variaron la composición de cuasiespecies a lo largo del tiempo.

- Pacientes HBeAg (-), mono infectados

Dos de los aislamientos de HBV desde pacientes mono infectados que no expresaban HBeAg y caracterizados como A2, resultaron *wt*. M14 y M13 evidenciaron una contribución menor de mutaciones en BCP y Pc, respectivamente.

Aquellos aislamientos adscritos al genotipo F (M17, M18, M19 y M20) mostraron una alta tasa de mutaciones en BCP y Pc.

En la tabla 4.1 se resumen las mutaciones y/o delecciones encontradas en aquellos aislamientos desde coinfectados o mono infectados, analizados a lo largo de 3 años.

		1st	2nd	3rd
P1 (A1)	HBe+	16/17: [G1809T/ C1812T/ G1862T/G1888A]	15/15: [G1809T/ C1812T/ G1862T/G1888A]	15/15: [G1809T/ C1812T/ G1862T/G1888A]
P6 (F)		19/24: [A1762T/G1764A]	9/11: [A1762T/G1764A]	14/16: [A1762T/G1764A]
P7 (A2)		4/24: [G1764A/C1766T/T1768A]	2/11: [G1764A/C1766T/T1768A]	2/16: [G1764A/C1766T/T1768A]
P19 (A2)	HBe-	2/18: [del 1763-1770 , 1764A/ 1766T]	wt	wt
P10 (A2)		6/12: [del 1768-1775], 1/12: [del 1763-1772]	10/14: [del 1768-1775]	9/15: [del 1768-1775]
P22 (A2)		2/18: [A1850T/C1858T]	ND	ND
P24 (F)		4/18: [A1850T/C1858T]	ND	ND
		1/16: [G1896A]	ND	ND
M3 (A2)	HBe+	3/10: [A1762T/G1764A]	6/10: [A1762T/G1764A]	1/10: [A1762T/G1764A]
M4 (A2)		1/10: [A1762T]	1/10: [A1762T/G1764A]	2/10: [A1762T/G1764A]
M5 (A2)		wt	wt	5/10: [A1762T/G1764A], 1/10: [C1858T]
M6 (A2)		2/10: [del 1768-1775]	1/10:[G1764A]	ND
M8 (F)		3/10: [A1762T/G1764A]	4/10: [A1762T/G1764A]	3/10: [A1762T/G1764A]
M9 (F)		3/10: [A1762T/G1764A]	3/10: [A1762T/G1764A], 1/10: [A1762T]	10/11: [A1762T/G1764A], 1/11: [G1764A]
M10 (F)		10/10: [A1762T/G1764A]	ND	ND
M11 (F)		5/10: [A1762T/G1764A]	6/7: [A1762T/G1764A]	1/11: [A1762T/G1764A], 1/11: [C1858T]
M12 (A2)		1/8: [A1762T/G1764A], 1/8 [A1762T]	1/11: [A1762T/G1764A]	1/7: [A1762T/G1764A], 1/7: [A1762T]
M13 (A2)		1/10: [C1850T, C1858T, G1896A]	ND	ND
M14 (A2)		1/11: [A1762T/G1764A]	ND	ND
M17 (F)		10/10: [A1762T/G1764A]	ND	ND
M18 (F)	HBe-	8/10: [A1762T/G1764A]		
		5/10: [C1858T], 3/10: [G1896A]	ND	ND
M19 (F)		8/12: [A1762T/G1764A] 2/12: [A1762T]	ND	ND
	1/12: [G1764A], 6/12: [G1896A], 1/12: [C1858T]			
M20 (F)		3/10: [A1762T/G1764A], 1/10: [C1858T]	ND	ND
		9/10: [G1896A]	ND	ND

Tabla 4.1: Variaciones en BCP/Pc encontradas y proporción de clones mutados en los 3 tiempos analizados durante el seguimiento en aislamientos coinfectados (P) y mono infectados (M). Entre paréntesis se indica el genotipo del aislamiento de HBV correspondiente. ND: no detectable, *wt*: *wild type*.

En resumen, las mutaciones en BCP fueron significativamente más frecuentes en aquellos aislamientos de HBV desde pacientes mono infectados ($p < 0,001$). Entre los individuos mono infectados que expresan HBeAg, 21 aislamientos de 31 exhibieron mutaciones en BCP. Mientras que 30 de 33 aislamientos desde coinfectados resultaron ser *wt* en la región analizada. Solamente 3 aislamientos, de un único paciente perteneciente al genotipo F (P6) dio evidencia de mutaciones en BCP a lo largo de los 3 años de seguimiento.

Entre los pacientes que no expresan HBeAg, la mayoría de los aislamientos desde coinfectados resultaron *wt*, irrespectivamente del genotipo. Contrariamente, se observó que 6 de 8 aislamientos desde mono infectados contenían mutaciones en la región analizada entre sus cuasiespecies.

- Resistencia a LMV y eficiencia replicativa

La mayoría de los aislamientos genotipo A2 desde pacientes HBeAg (+), coinfectados, con alta eficiencia replicativa no mostraron mutaciones en BCP/Pc a pesar que algunos recibieron tratamiento con LMV y presentan mutaciones de resistencia a dicha droga.

En aquellos aislamientos que presentan deleciones (P7 y P19), en el primer tiempo analizado, no se evidenciaron mutaciones de resistencia y ambos presentaron elevada replicación viral que se sostuvo en el tiempo.

Cinco de los pacientes HBeAg (-) coinfectados, estuvieron expuestos a tratamiento con LMV desde la primera muestra analizada pero todos exhibieron niveles de carga viral indetectables.

Entre los pacientes coinfectados, 6 de ellos no exhibieron mutaciones de resistencia a LMV en la primera muestra analizada pero sí evidenciaron al menos una variante de resistencia a dicha droga en los aislamientos obtenidos desde la última muestra de suero. De ellos, 5 se encontraban en tratamiento en el momento de la obtención de la primera muestra analizada.

Entre los individuos monoinfectados, 7 de los 12 HBeAg (+), evidenciaron mutaciones de resistencia a LMV. No se hallaron mutaciones de resistencia, aún, en ausencia de tratamiento, entre aquellos pacientes que no expresan HBeAg.

Paciente	Mutaciones de resistencia a LMV en T1	Mutaciones de resistencia a LMV en T3
P1	<i>wt</i>	V173L/L180M/M204I/V/S
P2	<i>wt</i>	<i>wt</i>
P3	<i>wt</i>	<i>wt</i>
P6	L180M/M204V	L180M/M204V
P7	<i>wt</i>	L180M/M204V
P9	V173L/L180M/M204I/V/S	V173L/L180M/M204I/V/S
P12	<i>wt</i>	L180M/M204V
P13	L180M/M204V/S	L180M/M204V/S
P16	<i>wt</i>	L180M/M204V/S
P19	<i>wt</i>	L180M/M204V/S
P20	<i>wt</i>	<i>wt</i>
P21	L180M/M204V/S	L180M/M204V/S
P10	<i>wt</i>	NC
P14	<i>wt</i>	<i>wt</i>
P15	<i>wt</i>	V173L/L180M/M204I/V/S
P17	ND	ND
P18	<i>wt</i>	<i>wt</i>
P22	ND	ND
P24	<i>wt</i>	<i>wt</i>
M1	<i>wt</i>	<i>wt</i>
M2	<i>wt</i>	<i>wt</i>
M3	L80V/V173L/L180M/M204V	L80V/ V173L/L180M/M204V

M4	L80V/V173L/L180M/M204V	L80V/ V173L/L180M/M204V
M5	V173L/L180M/M204V	V173L/L180M/M204V
M6	M204V	M204V
M7	L180M/M204V	L180M/M204V
M8	L80V/V173L/L180M/M204V	L80V/ V173L/L180M/M204V
M9	V173L/L180M/M204V	V173L/L180M/M204V
M10	<i>wt</i>	<i>wt</i>
M11	V173L/M204V	V173L/L180M/M204V
M12	L180M/M204V	V173L/L180M/M204V
M13	ND	ND
M14	ND	ND
M15	ND	ND
M16	ND	ND
M17	ND	ND
M18	ND	ND
M19	ND	ND
M20	ND	ND

Tabla 4.2: Mutaciones de resistencia a LMV en el primer y último tiempo analizados. ND: no detectable, *wt*: *wild type*

4.2 Estudio de la evolución molecular de HBV en el contexto de la coinfección con HIV:

- Análisis filogenético

Se realizó el análisis filogenético por ML de las secuencias nucleotídicas de S y preC/C desde pacientes mono infectados y coinfectados en el primer y último tiempo. Las mismas fueron analizadas de manera separada o en forma concatenada de manera de obtener mayor información filogenética. Dicho análisis reveló que no se formaron *clusters* diferentes de aislamientos de pacientes bajo terapia antiviral, independientemente de la presencia o no de mutaciones de resistencia a la misma (figura 4.10 y 4.11).

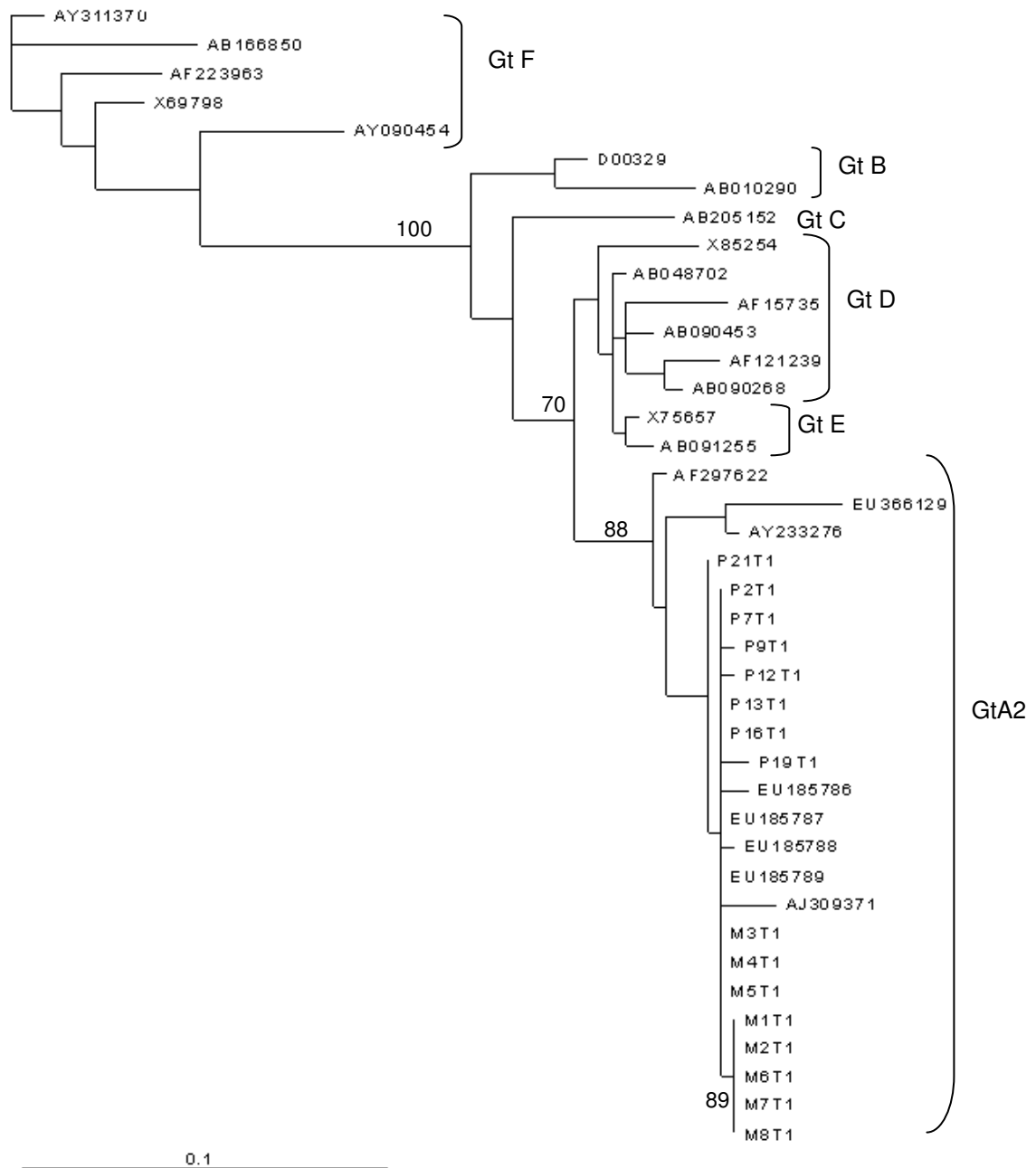


Figura 4.10: Árbol filogenético construido por ML con secuencias de preC/C del primer y último tiempo (T1 y T3, respectivamente) de pacientes mono (M) y coinfectados (P). Se muestran los valores de *bootstrap* mayores al 70%.

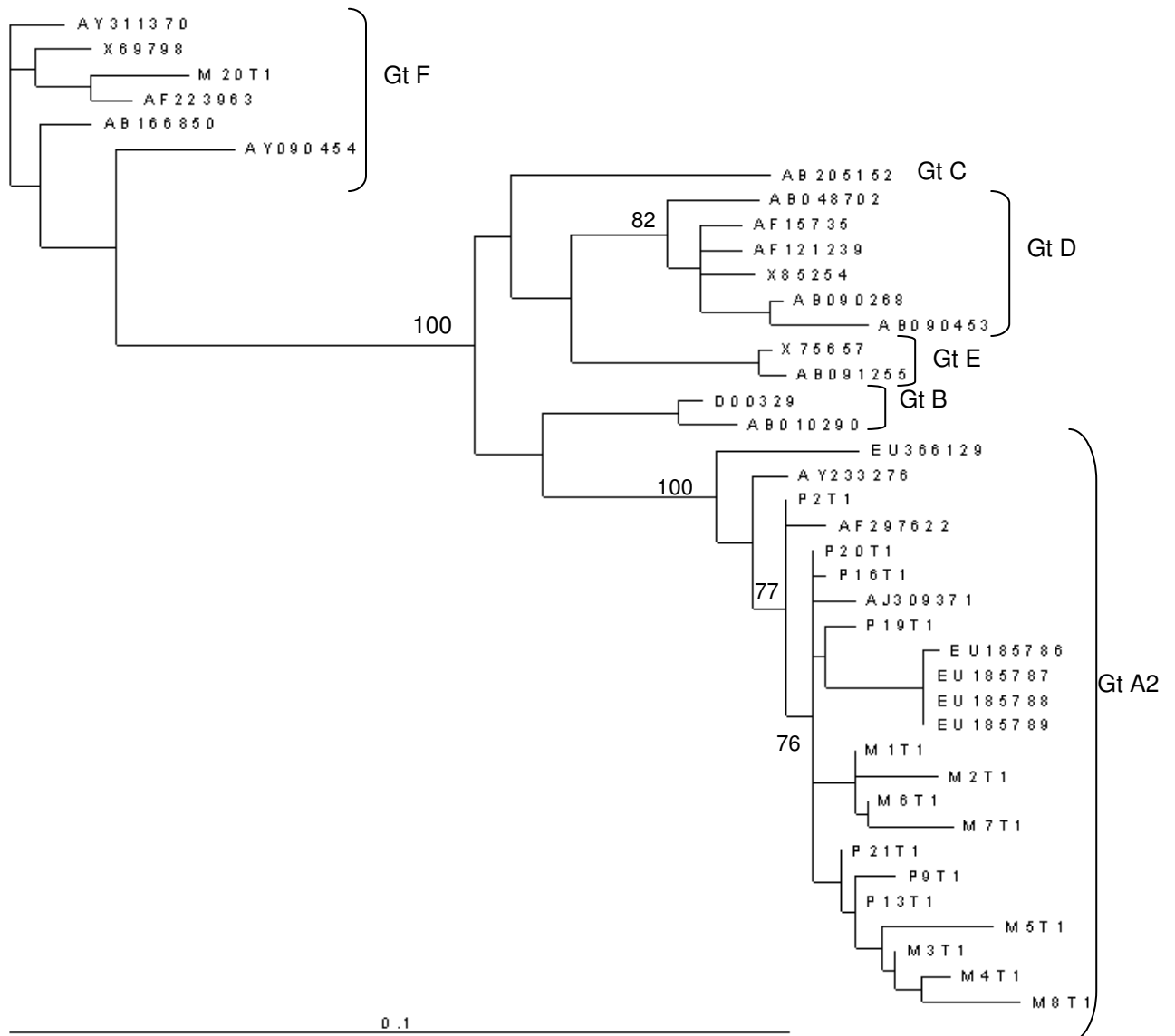


Figura 4.11: Árbol filogenético construido por ML con secuencias S del primer y último tiempo (T1 y T3, respectivamente) de pacientes mono (M) y coinfectados (P). Se muestran los valores de *bootstrap* mayores al 70%.

En la figura 4.12 se muestra el árbol filogenético de las secuencias de S-preC/C concatenadas donde se confirma que todos los aislamientos están adscritos al subgenotipo A2 y se encuentran dentro de un mismo grupo junto a secuencias de dicho genotipo provenientes de Argentina y otros países. Sin embargo, las secuencias obtenidas desde mono infectados forman un grupo separado de las provenientes de coinfectados, a pesar que el soporte de ramas (*bootstrap*) es bajo.

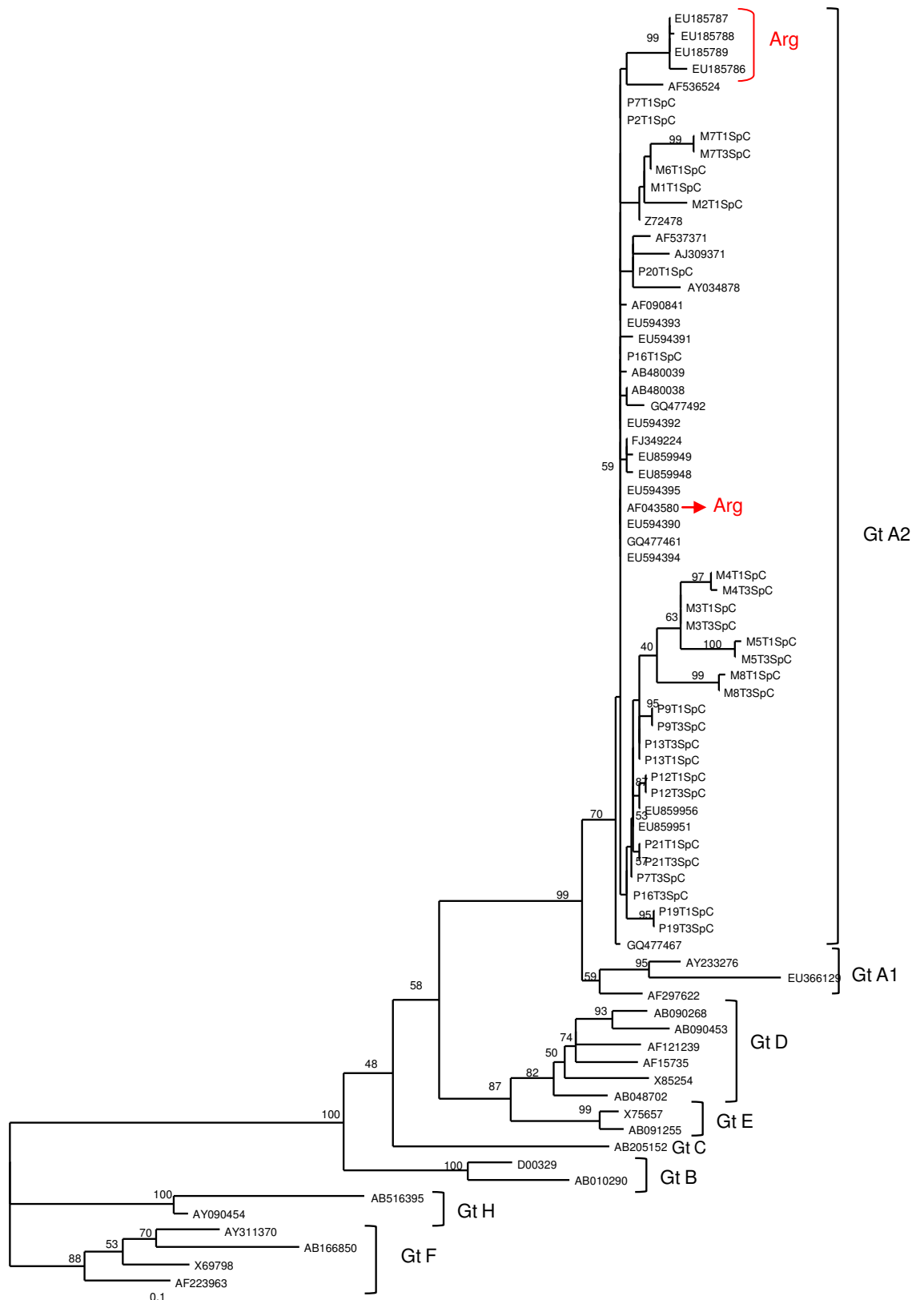


Figura 4.12: Árbol filogenético construido por ML con secuencias concatenadas S-preC/C del primer y último tiempo (T1 y T3, respectivamente) de pacientes mono (M) y coinfectados (P). Se muestran los valores de *bootstrap* de cada nodo. En rojo se muestran las secuencias obtenidas de Argentina.

- Análisis de tasa de evolución molecular

El cálculo de las tasas de sustitución en las regiones S y preC/C a partir de las secuencias nucleotídicas dio evidencia de mayor tasa en la región genómica S comparada con preC/C en ambos grupos de pacientes.

Las tasas calculadas, basadas en S o en preC/C arrojaron resultados en consonancia con las reportadas previamente por otros grupos de investigación y que se encuentran dentro del rango de $2,6 \times 10^{-4}$ a 2×10^{-5} sustituciones/sitio/año.

Al comparar las tasas estimadas a partir de aislamientos de HBV de ambos grupos de pacientes, se pudo observar que aquellas calculadas desde pacientes mono infectados resultaron cinco y dos veces mayor en S y preC/C, respectivamente, que aquellos desde coinfectados (tabla 4.3) aunque dicha diferencia no resultó estadísticamente significativa.

Región genómica (mono/co)	Tasa de sustitución (sustitución.sitio ⁻¹ . año ⁻¹)	HPD menor	HPD mayor
preC/C (mono)	$3,11 \times 10^{-4}$	$1,92 \times 10^{-7}$	$1,02 \times 10^{-3}$
preC/C (co)	$1,63 \times 10^{-4}$	$4,49 \times 10^{-9}$	$5,1 \times 10^{-4}$
S (mono)	$4,5 \times 10^{-4}$	$6,64 \times 10^{-8}$	$1,32 \times 10^{-3}$
S (co)	$7,86 \times 10^{-5}$	$4,47 \times 10^{-8}$	$2,48 \times 10^{-4}$

Tabla 4.3: Tasa de evolución molecular, calculadas para las regiones S y preC/C, de aislamientos de HBV de pacientes mono infectados (mono) y coinfectados (co). HPD: mayor densidad probabilística.

- Análisis de secuencias a nivel interpaciente

El análisis de diversidad genética o distancia (d) se realizó de manera comparativa entre aislamientos de HBV desde pacientes mono infectados y coinfectados. Los valores de d para la región S dieron evidencia de mayor distancia genética en aislamientos provenientes de pacientes mono infectados, en el primer y último tiempo analizado ($p < 0,0001$).

En cambio, en la región genómica preC/C, los valores de distancia fueron significativamente mayores ($p < 0,0001$) en aislamientos de mono infectados en el primer tiempo de análisis (tabla 4.4).

	Pacientes HBV-HIV coinfectedos		Pacientes HBV mono infectados	
	Primer tiempo	Último tiempo	Primer tiempo	Último tiempo
S	0,0069 ± 0,0030	0,0028 ± 0,0016	0,018 ± 0,0070	0,0200 ± 0,0054
preC/C	0,004 ± 0,0030	0,004 ± 0,0030	0,010 ± 0,0050	0,0020 ± 0,0017

Tabla 4.4: Distancia genética de aislamientos de HBV de pacientes mono y coinfectados

- Análisis de secuencias a nivel intrapaciente

La observación de los cambios en la complejidad y diversidad de cuasiespecies dentro de un mismo hospedador implicó el análisis de heterogeneidad de la población viral y distancias, dentro de un mismo hospedador, basado en secuencias de los genes S y preC/C.

Al analizar la heterogeneidad de cuasiespecies en la región de preC/C, en el primer y último tiempo, se observó que aquellos aislamientos desde pacientes mono infectados exhibieron una tendencia hacia mayor complejidad (mayores valores de S_n) que aquellos provenientes de individuos coinfectados ($p=0,059$ para el tiempo uno y $p=0,018$ para el último tiempo) (tabla 4.5).

Resultados similares fueron obtenidos al realizar el análisis basado en la región S. Nuevamente, los aislamientos desde pacientes mono infectados exhibieron mayor heterogeneidad que aquellos desde coinfectados. Sin embargo, estas diferencias resultaron estadísticamente significativas sólo en los valores de S_n obtenidos en el primer tiempo de análisis ($p=0,041$) (tabla 4.5).

	Pacientes HBV-HIV coinfectedos		Pacientes HBV mono infectados	
	Primer tiempo	Último tiempo	Primer tiempo	Último tiempo
S	0,45 ± 0,16	0,47 ± 0,19	0,66 ± 0,21	0,64 ± 0,15
preC/C	0,72 ± 0,18	0,73 ± 0,14	0,82 ± 0,12	0,9 ± 0,81

Tabla 4.5: Análisis de complejidad de cuasiespecies (entropía de Shannon) de HBV de pacientes mono y coinfectados, en el primer y último tiempo.

El estudio longitudinal de la heterogeneidad viral a lo largo del período de 3 años reveló que, en general, los valores de S_n entre los aislamientos de HBV de un mismo paciente irrespectivamente de la coexistencia o no de HIV, no exhibieron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (tabla 4.6).

a) Paciente	Sn S T1	Sn S T3	b) Paciente	Sn preC/C T1	Sn preC/C T3
M1	0,36	NC	M1	0,651	NC
M2	0,774	NC	M2	0,857	NC
M3	0,328	0,665	M3	0,857	0,759
M4	0,722	0,708	M4	0,759	0,939
M5	0,927	0,842	M5	0,651	0,939
M6	0,742	NC	M6	0,939	NC
M7	0,787	0,531	M7	0,939	0,939
M8	0,616	0,456	M8	0,939	0,939

c) Paciente	Sn S T1	Sn S T3	d) Paciente	Sn preC/C T1	Sn preC/C T3
P2	0,463	NC	P2	0,782	NC
P7	0,534	0,465	P7	0,407	0,839
P9	0,356	0,479	P9	1	0,631
P12	0,645	0,449	P12	0,695	0,554
P13	0,517	0,631	P13	0,665	0,912
P16	0,137	0,23	P16	0,522	0,617
P19	0,671	0,849	P19	0,843	0,735
P20	0,36	0,317	P20	0,693	0,792
P21	0,389	0,349	P21	0,916	0,843

Tabla 4.6: Valores de entropía de Shannon (Sn) de HBV de pacientes mono infectados (M) y coinfectados (P), en el primer y último tiempo (T1 y T3, respectivamente) calculados en las regiones genómicas S (a y c) y preC/C (b y d). NC: no corresponde.

El análisis de distancias genéticas reveló que los valores calculados en preC/C desde pacientes mono infectados resultaron mayores que los obtenidos desde pacientes coinfectados en el primer y último tiempo ($p= 0,0132$ y $p= 0,0149$; respectivamente). Sin embargo, las distancias calculadas a partir del gen S no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de pacientes, en ambos tiempos (tabla 4.7).

	Pacientes HBV-HIV coinfectados		Pacientes HBV mono infectados	
	Primer tiempo	Último tiempo	Primer tiempo	Último tiempo
S	0,0022 ± 0,0015	0,0045 ± 0,0041	0,0032 ± 0,0010	0,0026 ± 0,0010
preC/C	0,0045 ± 0,0024	0,0037 ± 0,0011	0,0084 ± 0,0030	0,0082 ± 0,0026

Tabla 4.7: Análisis de distancias genéticas de aislamientos de HBV de pacientes mono infectados y coinfectados.

- Análisis de la relación dN/dS

Se calcularon las sustituciones sinónimas y no sinónimas en los 4 ORFs: preC/C, X, S y pol. Los valores de dS y dN fueron analizados en secuencias obtenidas desde los aislamientos de HBV de individuos mono infectados y

coinfectados en el primer y último tiempo. Se calculó la relación dN/dS (tabla 4.8).

Se observó que los valores de dN/dS, en general, fueron menores a 1 en las 4 regiones codificantes analizadas. No se observó variación de esta relación a lo largo de los 3 años de estudio. Así, la cantidad de aislamientos con $dN/dS < 1$ no varió significativamente entre el primer y último tiempo ($p > 0,05$) en ambos grupos de pacientes analizados. Esto indicaría la selección predominantemente negativa a lo largo del tiempo, en todo el genoma de HBV, tanto en pacientes mono infectados como coinfectados.

ORF prec/C

Paciente	Primer tiempo				Ultimo tiempo			
	dS	dN	dN/dS		dS	dN	dN/dS	
P7	0,000	0,002	0,000	<1	0,002	0,001	0,500	<1
P9	0,002	0,010	4,409		0,002	0,004	1,818	
P12	0,005	0,001	0,220	<1	0,000	0,003		<1
P13	0,003	0,000	0,000	<1	0,009	0,004	0,389	<1
P16	0,011	0,001	0,125	<1	0,008	0,003	0,383	<1
P19	0,007	0,004	0,500	<1	0,008	0,008	0,988	<1
P20	0,002	0,005	2,824		0,000	0,003		<1
P21	0,012	0,005	0,450	<1	0,003	0,004	1,296	

Paciente	Primer tiempo				Ultimo tiempo			
	dS	dN	dN/dS		dS	dN	dN/dS	
M1	0,000	0,010	0,000	<1	0,000	0,008		<1
M2	0,003	0,016	4,875		0,008	0,012	1,526	
M3	0,000	0,005		<1	0,004	0,010	2,632	
M4	0,003	0,007	2,680		0,000	0,008		<1
M5	0,001	0,008	7,636		0,002	0,006	2,522	
M6	0,005	0,010	1,846		0,000	0,009		<1
M7	0,003	0,018	5,500		0,003	0,015	4,531	
M8	0,005	0,016	3,413		0,005	0,010	2,000	

ORF X

Paciente	Primer tiempo				Ultimo tiempo			
	dS	dN	dN/Ds		dS	dN	dN/dS	
P7	0,004	0,004	1,135		0,006	0,005	0,814	<1
P9	0,010	0,008	0,750	<1	0,000	0,001		<1
P12	0,005	0,001	0,259	<1	0,002	0,000	0,000	<1
P13	0,002	0,003	2,000		0,002	0,003	1,824	
P16	0,007	0,005	0,740	<1	0,007	0,002	0,235	<1
P18	0,028	0,011	0,391	<1	0,033	0,013	0,385	<1
P19	0,012	0,004	0,298	<1	0,002	0,004	2,375	
P21	0,003	0,009	2,529		0,010	0,000	0,000	<1

Paciente	Primer tiempo				Ultimo tiempo			
	dS	dN	dN/Ds		dS	dN	dN/dS	
M1	0,014	0,009	0,647	<1	0,020	0,013	0,680	<1
M2	0,013	0,006	0,448	<1	0,004	0,009	2,244	<1
M3	0,012	0,008	0,642	<1	0,006	0,004	0,764	<1
M4	0,006	0,002	0,273	<1	0,012	0,008	0,670	<1
M5	0,006	0,002	0,273	<1	0,006	0,017	2,949	<1
M6	0,019	0,006	0,285	<1	0,007	0,010	1,431	<1
M7	0,019	0,000	0,000	<1	0,000	0,020		<1
M8	0,014	0,014	1,029		0,015	0,014	0,912	<1

ORF S

Paciente	Primer tiempo				Ultimo tiempo			
	dS	dN	dN/dS		dS	dN	dN/dS	
P2	0,010	0,002	0,200		NR	NR		
P7	0,003	0,003	0,758	<1	0,004	0,006	1,302	
P9	0,001	0,001	1,273		0,007	0,004	0,646	<1
P12	0,001	0,002	2,500		0,002	0,003	1,409	
P13	0,005	0,004	0,891	<1	0,007	0,003	0,500	<1
P16	0,000	0,000	0,000		0,000	0,001	0,000	
P19	0,008	0,003	0,447	<1	0,014	0,013	0,923	<1
P20	0,000	0,001		<1	0,004	0,002	0,375	<1
P21	0,001	0,001	1,571		0,001	0,001	1,333	

Paciente	Primer tiempo				Ultimo tiempo			
	dS	dN	dN/dS		dS	dN	dN/dS	
M1	0,000	0,001		<1	0,000	0,002		<1
M2	0,000	0,005		<1	0,000	0,004		<1
M3	0,004	0,002	0,410		0,004	0,002	0,010	
M4	0,007	0,002	0,294		0,001	0,004	0,004	
M5	0,008	0,003	0,368		0,010	0,002	0,026	
M6	0,000	0,004		<1	0,000	0,003		<1
M7	0,004	0,003	0,805		0,002	0,002	0,002	
M8	0,006	0,004	0,633		0,001	0,002	0,002	

ORF POL

paciente	Primer tiempo				Ultimo tiempo			
	dS	dN	dN/dS		dS	dN	dN/dS	
P7	0,004	0,002	0,678	<1	0,005	0,000	0,000	<1
P9	0,001	0,001	2,003		0,005	0,005	1,022	
P12	0,003	0,001	0,393	<1	0,000	0,004		<1
P13	0,005	0,004	0,867	<1	0,004	0,005	1,238	
P16	0,000	0,000		<1	0,000	0,001		<1
P19	0,006	0,004	0,737	<1	0,017	0,013	0,753	<1
P20	0,002	0,000	0,000	<1	0,001	0,003	2,071	
P21	0,002	0,000	0,180	<1	0,002	0,001	0,350	<1

paciente	Primer tiempo				Ultimo tiempo			
	dS	dN	dN/dS		dS	dN	dN/dS	
M1	0,002	0,001	0,563	<1	0,003	0,001	0,252	<1
M2	0,006	0,004	0,587	<1	0,005	0,003	0,553	<1
M3	0,000	0,003		<1	0,003	0,002	0,815	<1
M4	0,002	0,004	2,294		0,006	0,003	0,492	<1
M5	0,003	0,004	1,333		0,009	0,003	0,352	<1
M6	0,006	0,003	0,464	<1	0,005	0,002	0,333	<1
M7	0,008	0,003	0,354	<1	0,005	0,000	0,000	<1
M8	0,001	0,005	4,417		0,000	0,003		

Tabla 4.8: Valores de sustituciones sinónimas (dS) y no sinónimas (dN) y relación dN/dS calculados en los 4 ORFs: preC/C, S, X y pol para aislamientos desde coinfectados (P) y mono infectados (M). Se indican aquellos valores de dN/dS menores a 1.

- Análisis de evolución molecular en epitopes antigénicos de linfocitos T citotóxicos y T helper

A partir de las secuencias de preC/C, se estudió la dinámica de mutaciones en epitopes reconocidos por linfocitos T citotóxicos (aminoácidos –aa- 18-27 de HBcAg) y T helper (aa 1-20) [176] derivados del core, y de epitopes CTL del X (aa 92-100 y aa 134-141) [170]. Se observó que las variaciones halladas en dichas regiones se distribuyeron al azar tanto en mono infectados como en coinfectados, no obstante se advierte un amplio predominio de epitopes *wild type*. Entre mono infectados, si bien se halló mayor cantidad de clones exhibiendo variaciones aminoacídicas en dichos epitopes antigénicos, las mismas, también se distribuyeron al azar. En la figura se muestran las secuencias aminoacídicas de los epitopes de HBcAg en 4 aislamientos a modo de ejemplo (figura 4.13).

En las secuencias aminoacídicas parciales de S y pol se analizaron epitopes de linfocitos T citotóxicos previamente descritos: aa 41-49, 88-96, 95-104, 97-106, 172-180 y 184-94 para S y aa 455-463 para pol [170]. Las variaciones halladas fueron escasas y, al igual que en epitopes de HBcAg, se distribuyeron aleatoriamente en ambos grupos de pacientes.

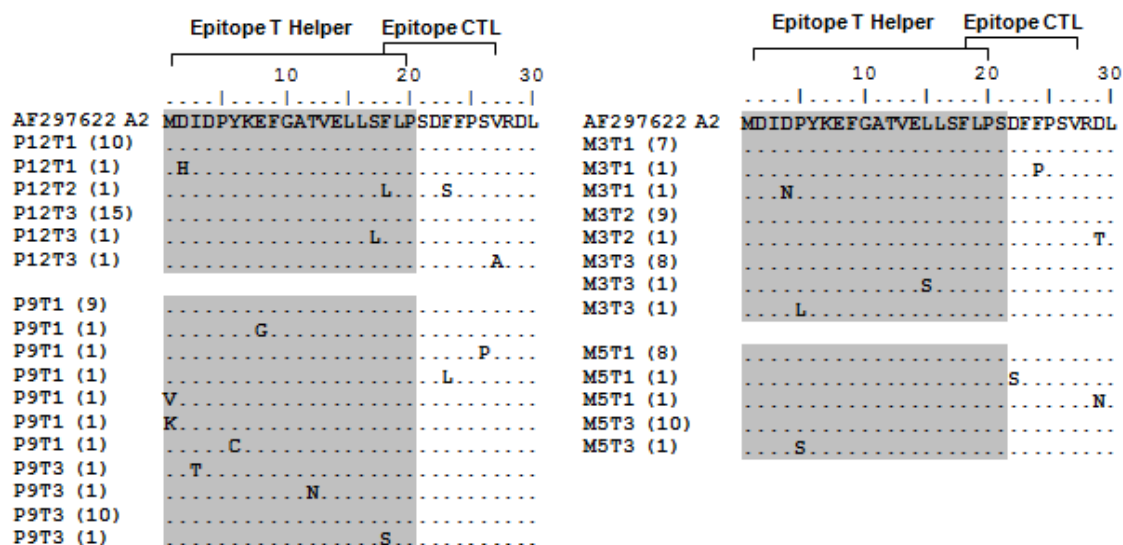


Figura 4.13: Secuencias aminoacídicas de HBcAg conteniendo dos epitopes T: T helper (aa 1-20), marcados en gris, y CTL (aa 18-27) para 2 aislamientos de pacientes coinfectados (P12 y P9) y 2 de pacientes mono infectados (M3 y M5). Se muestran las secuencias de cada uno de los tiempos analizados (T1 y T3). Entre paréntesis se indica el número de clones con idéntica secuencia. Como secuencia de referencia, se seleccionó una genotipo A2 desde GenBank. Los puntos indican identidad de aminoácidos.

En uno de los epitopes analizados en el gen S (aa 41-49: FLGGSPVCLL) se evidenciaron variaciones genotípicas definidas como reemplazo de un aminoácido por otro en las secuencias del mismo genotipo tanto en clones provenientes de aislamientos de pacientes mono infectados como coinfectados. En general, en cada aislamiento donde se hallaron cambios, los mismos no se seleccionaron en el período de estudio, independientemente del recuento de linfocitos T CD4+.

- Selección positiva y negativa

El análisis de la presión de selección en cada codón de las cuatro regiones codificantes (S, pol, core y X) no dio evidencia de codones bajo presión de selección positiva en aislamientos de pacientes mono infectados o coinfectados. Al realizarse el análisis intrapaciente se pudieron identificar 10 codones bajo presión de selección negativa en 4 de los 8 pacientes mono infectados. Estos aminoácidos se localizaron en los genes S y pol como se muestra en la siguiente tabla:

Paciente	ORF	Ubicación del codón seleccionado
M4	pol	aa 110 (RT)
M5		aa 370 (RNAsa H)
M7		aa 367 (RNAsa H)
M4	S	aa 94, 122, 165
M5		aa 85
M8		aa 71, 164

Tabla 4.9: Aislamientos de pacientes con codones seleccionados negativamente. Entre paréntesis se indica el dominio de la polimerasa que contiene al mencionado codón.

De esos codones seleccionados, dos están localizados en epitopes T. En los aislamientos M5 y M7 se seleccionó el codón 370 que se encuentra incluido dentro del epítipo de la polimerasa viral comprendido entre los aa 367 y 376. En M4 y M5 se seleccionó el codón 94, incluido en el epítipo S aa 81-99. Ninguno de los restantes codones seleccionados se localizó en algún epítipo T previamente descrito [170].

A nivel interpaciente, solo aislamientos desde pacientes mono infectados exhibieron, también, codones bajo presión de selección negativa. Seis de ellos ubicados en el gen S (aa 42, 71, 94, 122, 171 y 202) y uno en el gen pol (aa 153).

4.3 Análisis de la dinámica de cuasiespecies virales a lo largo de 14 años bajo diferentes terapias antivirales

- Análisis de mutaciones de resistencia al tratamiento antiviral

El análisis de composición de cuasiespecies en el gen pol reveló la presencia de mutaciones de resistencia.

Al inicio de la terapia con LMV, todos los clones obtenidos resultaron *wt*. Luego de dos años de tratamiento con dicha droga, la población viral *wt* fue reemplazada por cuasiespecies que exhibían la mutación asociada a resistencia M204I.

La terapia con LMV fue interrumpida por 6 meses. Durante ese período, la composición de cuasiespecies fue mayoritariamente *wt* a excepción de algunos clones (2/15) que contenían la mutante I233V asociada a resistencia a ADV.

Una vez reinstaurada la monoterapia con LMV, la población viral exhibió las mutaciones L180M y M204I. Las mismas se detectaron hasta la última muestra,

incluso bajo la terapia con ETV y TDF. Luego de la terapia con LMV, el paciente fue tratado, durante aproximadamente un año, con ADV. Bajo dicha terapia, solo exhibió las mutaciones L180M y M204I. Una vez iniciado el tratamiento con ETV y TDF, las cuasiespecies virales fueron casi íntegramente mutantes (L180M y M204I/V), con una contribución menor de clones (5%) exhibiendo las mutantes A181T y T184L. Estas últimas fueron descritas como mutantes asociadas a resistencia a LMV-ADV y ETV, respectivamente.

En el momento de aparición de las mutaciones de resistencia a LMV, se evidenciaron, también, las variaciones A200V, A219V y I253V, presentes en el dominio de la transcriptasa reversa de la polimerasa viral. Estas dos variantes fueron detectadas también durante la terapia con ETV y TDF (figura 4.14)

Adicionalmente, se detectó la variante L217R en todas las secuencias analizadas bajo los distintos esquemas antivirales.

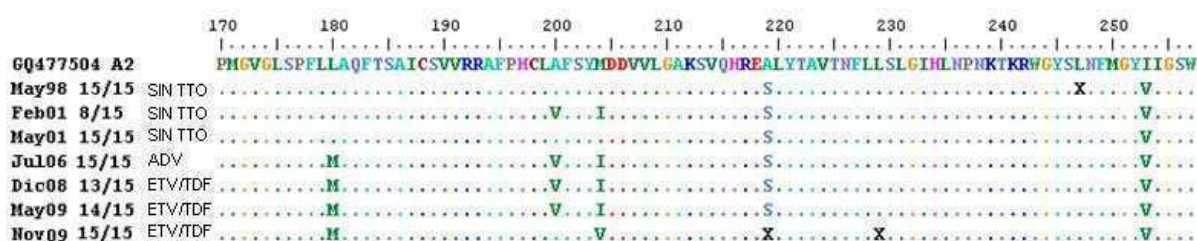


Figura 4.14: Secuencias aminoacídicas de una porción del dominio RT de la polimerasa de aislamientos del paciente bajo estudio bajo las distintas terapias antivirales. Al lado de la fecha de obtención de la muestra se indica la proporción de clones que presentan la secuencia representada. Como secuencia de referencia, se seleccionó un genotipo A2 desde GenBank. Los puntos indican identidad de aminoácidos. SIN TTO: sin tratamiento, ADV: adefovir, ETV: entecavir, TDF: tenofovir.

- Análisis de variaciones en preC/C

Se realizó la caracterización genómica a nivel de preC/C en muestras seleccionadas a lo largo del tiempo, bajo diferentes tratamientos.

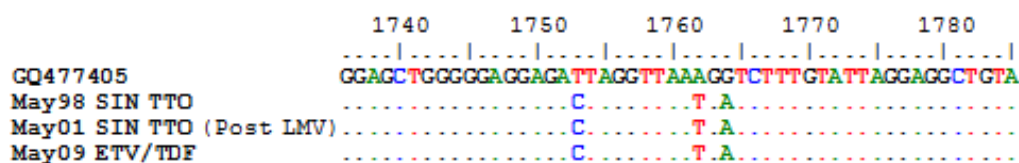


Figura 4.15: Secuencias nucleotídicas de una porción de la región genómica preC/C en muestras seleccionadas del paciente bajo estudio. Como secuencia de referencia, se seleccionó un genotipo A2 desde GenBank. Los puntos indican identidad de aminoácidos. SIN TTO: sin tratamiento, LMV: lamivudina, ETV: entecavir, TDF: tenofovir.

Se observó la presencia de las mutaciones A1762T y G1764A desde la primera muestra analizada, cuando el paciente aún no se encontraba bajo terapia antiviral (figura 4.15).

- Evolución molecular de HBV a lo largo de 14 años
 - Análisis filogenético

El análisis filogenético de la región pol por ML, tanto para las secuencias directas como con las secuencias de clones, reveló que todos los aislamientos de HBV del paciente bajo estudio fueron adscritos al genotipo A2 (figura 4.16).

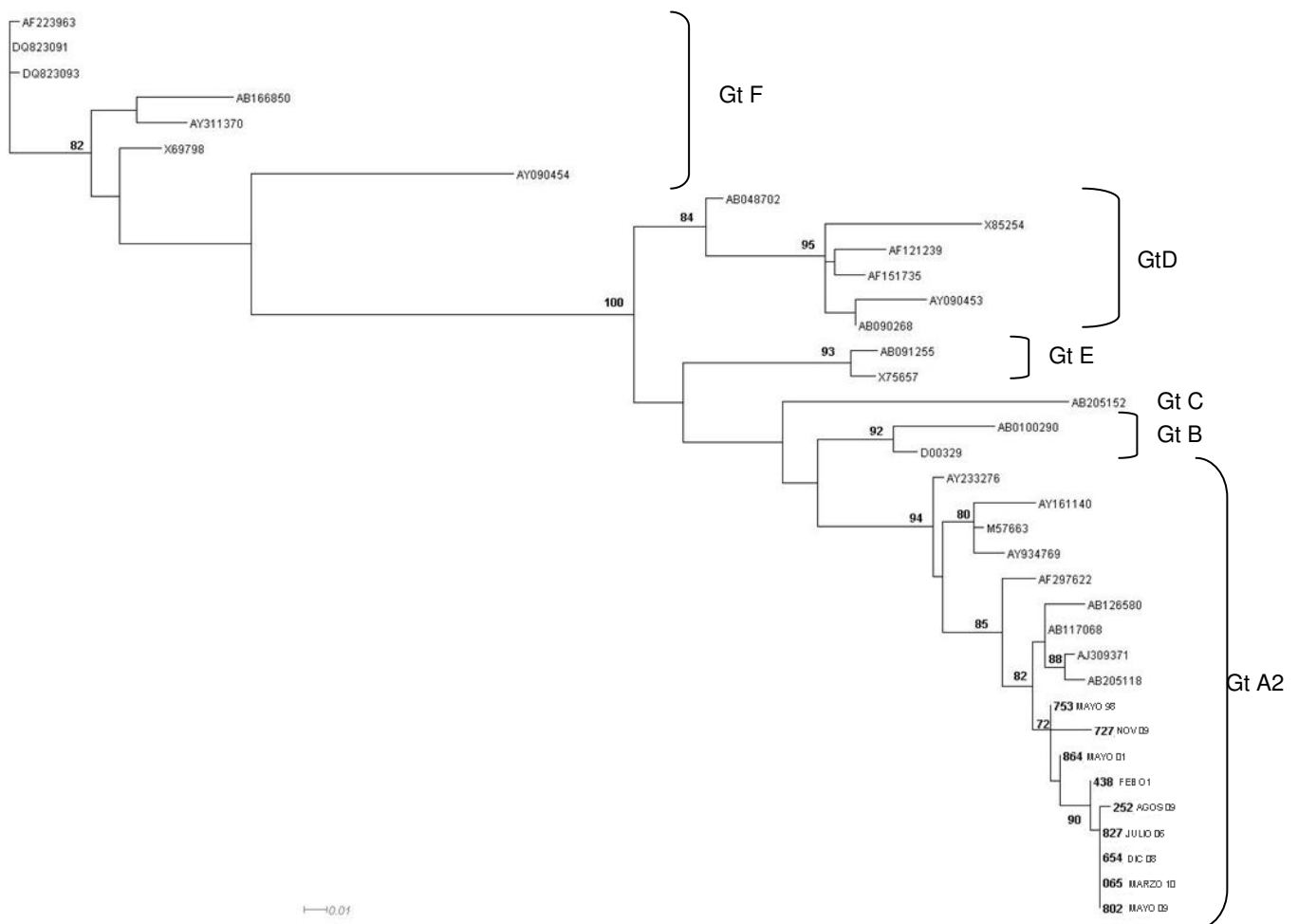


Figura 4.16: Árbol filogenético construido por ML con secuencias parciales del gen pol de muestras seleccionadas del paciente bajo estudio. Se muestran los valores de *bootstrap* mayores al 70%.

El filograma muestra, además, que aquellos aislamientos que presentan como variante la mutación en la posición aminoacídica 200 forman un *cluster* diferente.

El árbol filogenético realizado desde los clones de muestras de suero (figura 4.17) seleccionadas del paciente bajo estudio de HBV dio evidencia de una tendencia hacia una evolución divergente progresiva relacionada a la terapia a la que fue sometida el paciente.

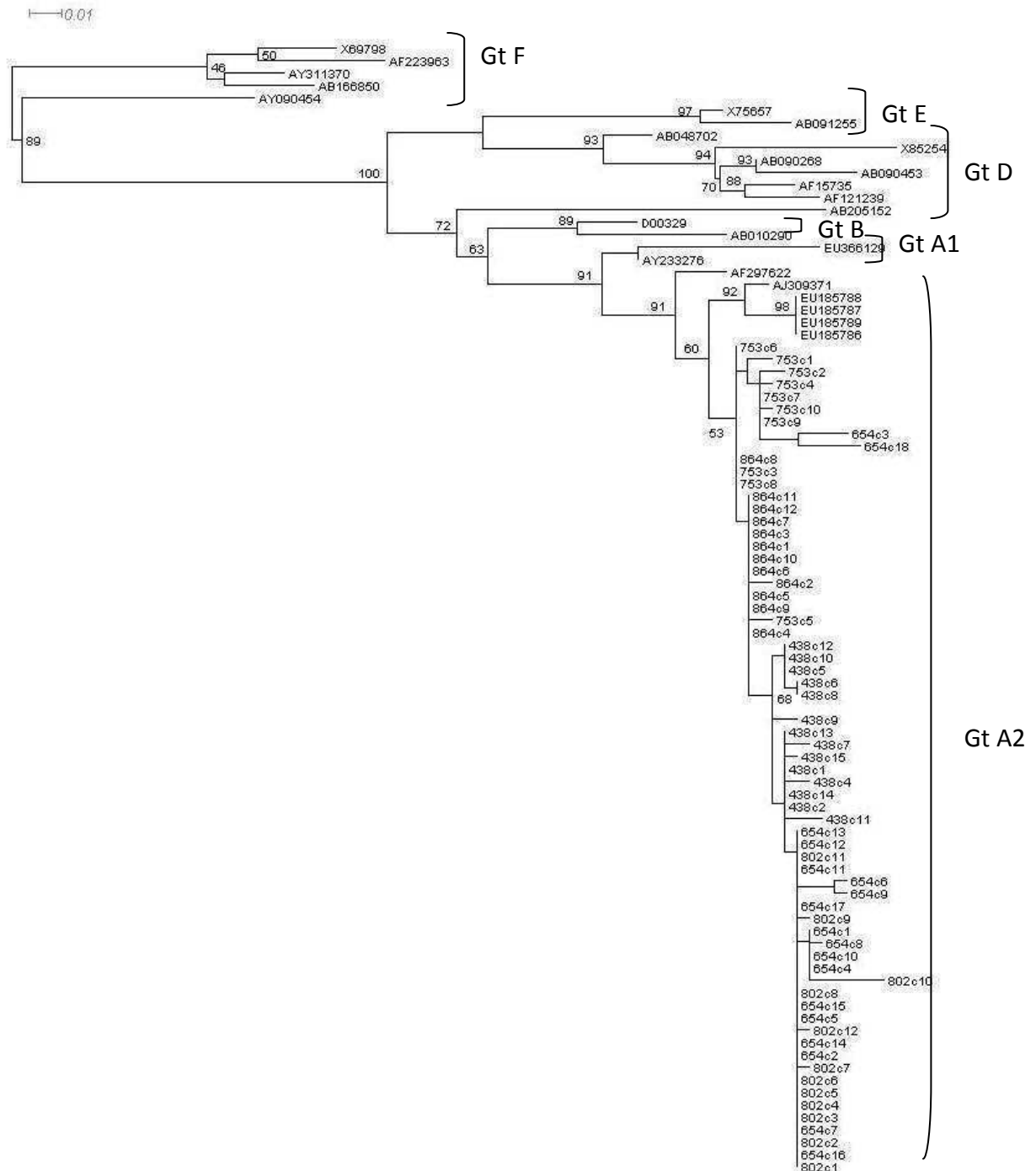


Figura 4.17: Árbol filogenético construido por ML con secuencias de clones del gen pol de muestras seleccionadas del paciente bajo estudio. Se muestran los valores de *bootstrap* mayores al 70% y de aquellos clados que incluyen los clones de las muestras del paciente bajo estudio.

No se hizo evidente la formación de clados acorde al tiempo de obtención de la muestra ya que existe una influencia de la presión de selección ejercida por la terapia.

Las secuencias del gen pol de los clones obtenidos de las muestras 753 (mayo de 1998) y 864 (mayo de 2001) resultaron ser *wt* mientras que las precedentes a éstas (muestra 438, febrero de 2001) presentaron mutantes de resistencia. Esta reversión a *wild type* se hizo evidente en el árbol filogenético donde se observa una tendencia a la formación de dos grandes *clusters*, aunque no soportados, uno de ellos agrupando secuencias *wt* y el otro con secuencias mutadas. Se pone en evidencia entonces la presión de selección ejercida por la terapia.

- Selección positiva y negativa

A lo largo de los 14 años de evolución, no se evidenciaron mutaciones bajo presión de selección positiva o negativa en la región genómica pol.

- Tasa de mutación y tMRCA

Con el objetivo de investigar la diversidad de HBV a lo largo de 14 años, a partir de las secuencias del gen pol, se procedió a realizar un análisis de coalescencia por el método bayesiano. El tiempo del ancestro común más cercano (tMRCA) para los aislamientos se estimó en 16,5 años (95% HPD: 13,2 - 20).

El análisis de tasa de evolución molecular arrojó un valor medio de $1,27 \times 10^{-3}$ sustituciones/ sitio/ año (95% HPD: $2,42 \times 10^{-4} - 2,72 \times 10^{-3}$).

- Heterogeneidad de HBV en la región genómica pol

Con el objetivo de analizar la heterogeneidad de cuasiespecies se analizó la región pol de HBV por su reconocida variabilidad en el genoma de HBV.

Se determinó la distancia genética media entre cuasiespecies del primer y último tiempo de análisis. Se observó una reducción significativa de la distancia genética en el último tiempo comparado con el primero: $d_1 = 0,0055 \pm 0,0039$ y $d_{\text{último tiempo}} = 0,0015 \pm 0,0018$ ($p < 0,001$).

El estudio de heterogeneidad de cuasiespecies arrojó un resultado similar, observándose un valor de entropía de Shannon mayor en la primera muestra ($Sn_1 = 0,65$ y $Sn_{\text{último tiempo}} = 0,36$) ($p < 0,001$).

Luego de analizar dN y dS en ambos tiempos, se observó que las tasas de sustituciones no sinónimas no varían en el tiempo $dN_1 = 0,0032$ y $dN_{\text{último tiempo}} = 0,0048$ ($p > 0,05$). Sin embargo, las relaciones dN/dS resultaron ser significativamente mayor en el último tiempo respecto del primero (4,8 y 0,32, respectivamente; $p < 0,001$).

4.4 Prevalencia de variantes de HBV con resistencia basal al tratamiento antiviral

Se realizó el análisis de prevalencia de variantes de HBV con resistencia natural a drogas antivirales en pacientes crónicamente infectados con HBV naïve de tratamiento antiviral.

La genotipificación de las muestras, realizada mediante el análisis filogenético por ML determinó que, de las 15 muestras estudiadas, 6 aislamientos resultaron genotipo F1, 1 genotipo F4, 1 genotipo D, 2 genotipo C, 1 genotipo A1 y 4 genotipo A2 (figura 4.18).

Se observó que la prevalencia de mutaciones de resistencia en secuencias directas, es baja dado que, del total de pacientes analizados ($n=15$), sólo uno de ellos (genotipo F) evidenció mutaciones descritas como de resistencia al tratamiento con LMV y ETV (L180M + M204V + S202G) (figura 4.19).

Tras analizar 25 clones de muestras naïve seleccionadas se advirtió que 4 de las muestras basales (2 genotipo A y 2 genotipo F) no evidenciaron clones con mutaciones de resistencia primaria y/o secundaria. De aquellas muestras de las que se disponía de seguimiento se observaron muy pocos clones con mutaciones de resistencia basal como se muestra en la tabla 4.10 (prevalencia 4-8%).

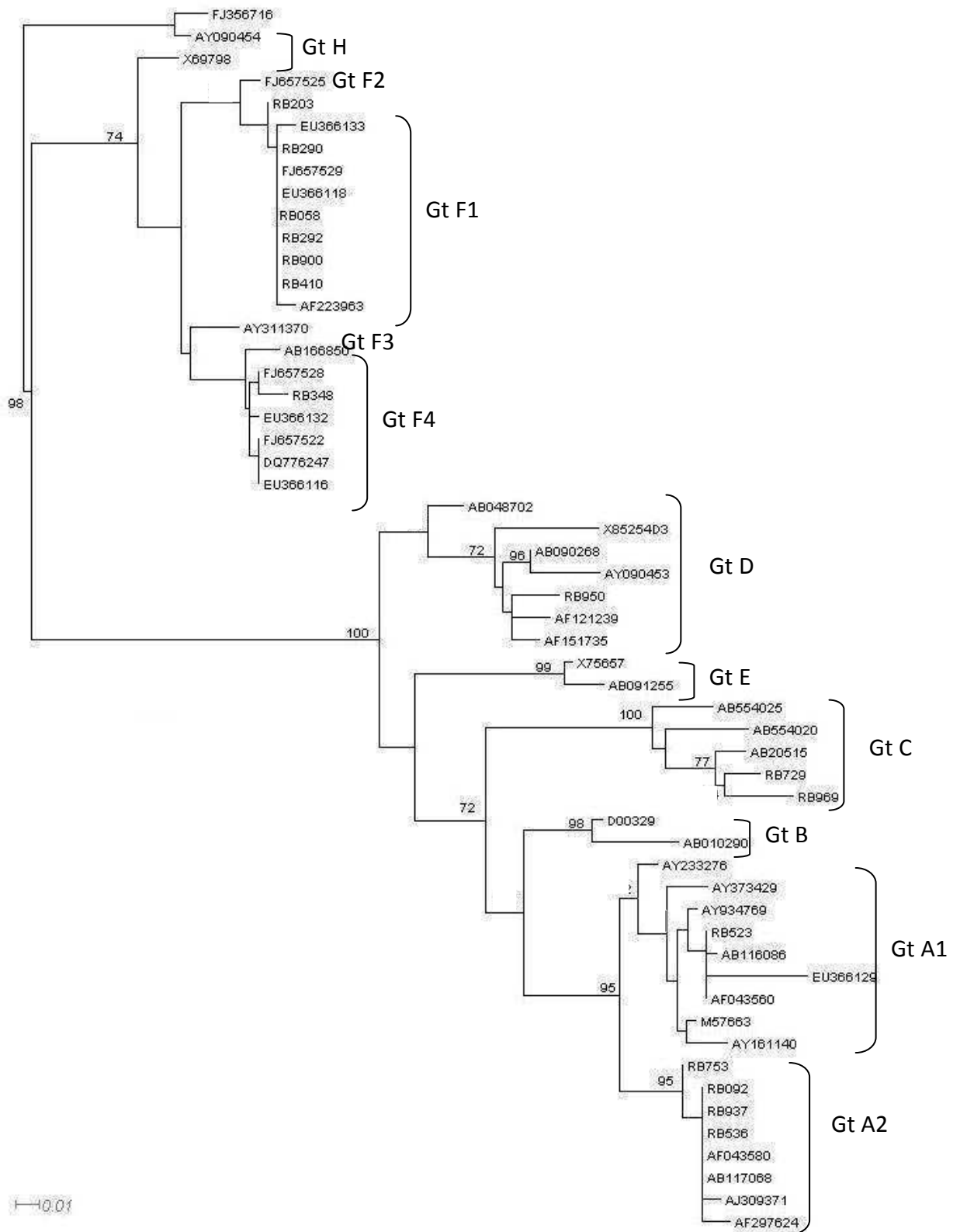


Figura 4.18: Árbol filogenético construido por ML con secuencias directas del gen pol de muestras de pacientes *naïve* de tratamiento. Se muestran los valores de *bootstrap* mayores al 50%.



Figura 4.19: Alineamiento de la secuencia aminoacídica del aislamiento de HBV con mutaciones de resistencia junto a secuencias de referencia obtenidas del GenBank.

En la tabla se puede ver que la muestra 438 da evidencia de resistencia primaria en la posición 204. Este resultado era esperable dado que el paciente se encuentra bajo tratamiento con LMV como ya se mostró en la sección anterior.

En todas las secuencias de los aislamientos ascriptos al genotipo A se pudo apreciar rt217L en lugar de la arginina que se observa en el resto de los genotipos.

Se realizó la secuencia consenso de los 25 clones de los distintos tiempos de cada una de las muestras que presentaban análisis por clonado. Se pudo apreciar que la secuencia nucleotídica obtenida no varió con el transcurso del tiempo, aun en aquellas muestras tomadas cuando se hubieran iniciado tratamiento con IFN.

En la figura 4.20 se muestra, a modo de ejemplo, el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de una porción de la polimersa de un paciente con HBV genotipo F que inicia tratamiento con IFN entre la toma de la primera y la segunda muestra de suero.

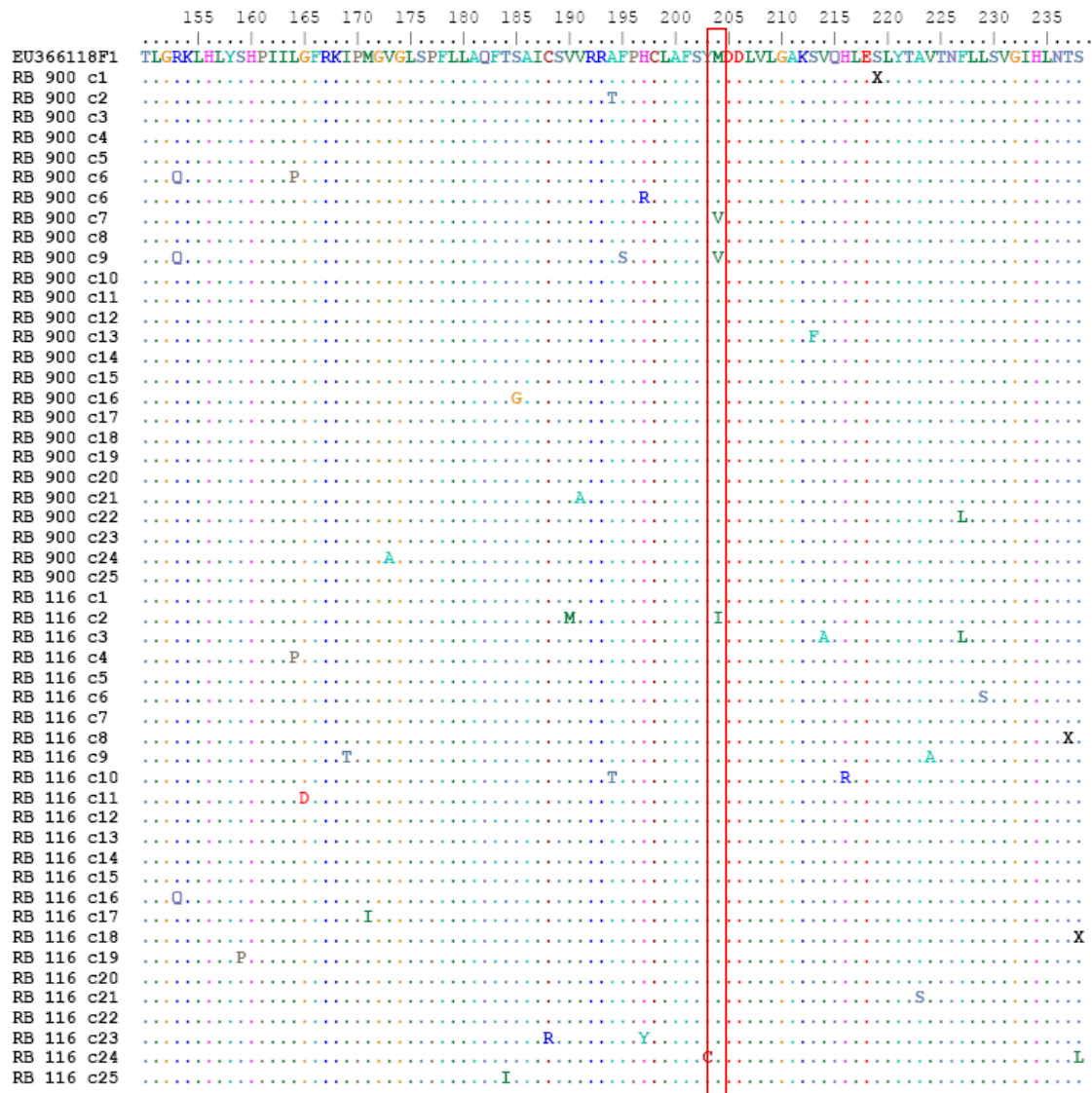


Figura 4.20: Alineamiento de 50 secuencias aminoacídicas de una porción de la polimerasa viral. 25 clones corresponden a la muestra basal (RB 900) y los siguientes 25 a la muestra post inicio del tratamiento del paciente con IFN (RB 116). En un rectángulo en rojo se muestra la posición rt204 donde reside una mutación asociada a resistencia primaria a LMV.

Tabla 4. 10: Número de clones con variaciones asociadas a resistencia primaria o secundaria al tratamiento con HBV para aquellos aislamientos que presentan seguimiento longitudinal y posterior clonado. Con un asterisco (*) se señalan las variaciones asociadas a resistencia secundaria.

Muestra	Fecha	I169T*	V173L*	L180M*	A181T	T184S*	T184AII/L/F/G	A194T	S202G/I*	M204V/I	V214A*	Q215S*	I233V	N236T	P237H*
basal 900	jun-06							1		2					
598	sept-10					no hay mutaciones									
495	dic-10			1		T184A 3		1	1	1	1				
						T184S1									
116	ene-11	1				T184I 1		1		1	1				
						T184I 1									
basal 536	sep-09		1			T184A 1		1		1I	1				
										1V					
818	abr-10									3V	1	1	1	1	1
										2I					
basal 523	febr-10					no hay mutaciones									
222	jul-10	1				T184A 1			1 1V						
										1I					
basal 753	may-98		1												
438	febr-01			2	1	T184A 2			3	25					
						T184S 1									

DISCUSIÓN

5 Discusión

La coinfección HIV-HBV es frecuente en virtud de las similares vías de transmisión que presentan ambos virus: sexual, vertical y parenteral. La tasa de coinfección por HBV se encuentra relacionada con la vía de transmisión y la prevalencia del HBV de la región geográfica [177]. La infección por HIV influye en la historia natural de hepatitis B, habiéndose observado una incidencia menor de enfermedad icterica y una tasa de portación crónica del 25% (siendo del 5% de los pacientes inmunocompetentes) [178]. En los pacientes con infección crónica por HBV, hay una tendencia a una menor tasa de eliminación del HBeAg así como la presencia de niveles más elevados de ADN de HBV [179]. La inmunosupresión inducida por el HIV podría ser la causa de una respuesta inmune alterada, que determina una menor lesión hepática y explicaría los valores disminuidos de transaminasas que se observan en esta población [180]. La TARV podría provocar episodios de aumento de las transaminasas adjudicables a la injuria celular inducida desde la reconstitución inmune y/o a la toxicidad por las mismas drogas [181].

Estudios anteriores de nuestro grupo de trabajo han demostrado que, en la zona Metropolitana de nuestro país, la infección crónica por HBV tiene una baja prevalencia (<5%) entre individuos coinfectados con HIV y se encuentra asociada a una mayor tasa de positividad de HBeAg [154].

Además, nuestro y otros grupos, han reportado una elevada prevalencia del genotipo A2 entre pacientes coinfectados en Buenos Aires, comparada con la prevalencia similar de los genotipos D, F y A [90, 93] en pacientes mono infectados.

En este contexto y, considerando que HIV alteraría el microambiente celular a favor de la replicación y/o la heterogeneidad genómica de HBV [141], el objetivo del presente trabajo fue establecer el impacto de la coexistencia de HIV sobre regiones genómicas regulatorias de la replicación de HBV.

5.1 Distribución de genotipos de HBV en el contexto de la coinfección con HIV

En concordancia con lo reportado, en su extensa mayoría las infecciones crónicas por HBV en pacientes infectados con HIV pudieron ser detectadas por serología.

Todavía no existe un consenso sobre la indicación y necesidad de la búsqueda con técnicas moleculares de la presencia de infecciones ocultas por HBV en los sujetos viviendo con HIV/sida. Se han reportado tasas de HBV oculta en pacientes HIV positivos de 0% [182] a 89,5% [183]. Según nuestros hallazgos, la búsqueda de rutina de ADN de HBV en los pacientes HIV positivos en el contexto de alteración de transaminasas hepáticas no estaría recomendado, dado que solo hemos reportado un caso positivo de ADN de HBV desde 23 pacientes con niveles anormales en los niveles de ALT, no haciendo posible la genotipificación por S o preC/C. Paralelamente, desde aquellos pacientes que exhibían reactividad para anti HBc se detectó únicamente por PCR de gen S, ADN de HBV en 4 muestras de los 72 individuos que presentaron el patrón de “core aislado”, demostrando una infección oculta por HBV. Este tipo de infección por HBV puede presentarse como secundaria a una eliminación espontánea o inducida por tratamiento de la hepatitis B en pacientes con diferentes estadios de infección crónica; incluyendo cirrosis y hepatocarcinoma [184]. Desde dichos pacientes solo se logró amplificar por PCR de preC/C, una de ellas; haciendo evidente la baja carga viral que presentan estas muestras. Dentro del estudio de la distribución de genotipos en 19 pacientes infectados con HIV virémicos para HBV, se evidenció una diferencia en la distribución de genotipos de HBV mediante el análisis de la región preC/C. Se observó un *switch* genotípico del genotipo F, más prevalente entre mono infectados [90], al genotipo A (77%). Estos resultados concuerdan con la genotipificación por amplificación del gen S, donde la prevalencia de genotipo A en pacientes coinfectados fue del 83% [154]. Estos resultados están en consonancia con el reporte de que el genotipo A es el más comúnmente hallado entre pacientes HIV-HBV coinfectados [133]. Sin embargo, en el grupo estudiado, un aislamiento fue adscrito al genotipo A1 puro cuando el análisis se realizó en preC/C pero mostró infección mixta cuando el mismo se realizó a partir de secuencias del gen S. En dicho análisis, este aislamiento presentaba clones adscritos al genotipo A2, D y recombinante A/D. Esta discrepancia puede deberse a que los puntos calientes de recombinación se encuentran en las regiones cercanas a DR1 (nt 1640-1900), la región preS1/S2 (nt 3150-100) y los extremos 3' de la región preC/C (nt 2330-2450) y 3' del gen S (nt 650-830) [185].

Nuestro grupo y otros han reportado que el genotipo de HBV podría estar relacionado con la conducta de riesgo asociada [133, 154].

- Prevalencia y dinámica de mutaciones y deleciones a lo largo de 3 años, en los ORFs preC/ C y pol y su relación con parámetros virales y bioquímicos

En individuos coinfectados HIV-HBV, el aumento en la replicación de HBV y las menores tasas de seroconversión comparada con individuos mono infectados sugiere que el HIV alteraría el microambiente celular a favor de la replicación de HBV y/o que el genoma de HBV podría diferir en individuos coinfectados con HIV [141].

La progresión a cronicidad en individuos mono infectados con HBV está asociada con la acumulación de virus con genomas mutados. Entre la población viral, se destacan aquellos con mutaciones y/o deleciones en la región de preC/C y en el gen de la envoltura con impacto en otras regiones solapadas [186].

Hasta la fecha existen escasos estudios acerca de la influencia de HIV en la heterogeneidad genómica de HBV [146]. Las mutaciones en el BCP (A1762T/G1764A) y las de la región de precore (principalmente G1896A) han sido previamente reportadas asociadas con la seroconversión del HBeAg y la producción de la progenie viral, además de estar implicadas en la replicación de las variantes resistentes a LMV [67].

La presente tesis provee evidencia que la heterogeneidad genética de HBV en preC/C, el gen pol y sus correspondientes genes solapados, es diferente ante la coexistencia del HIV, guardando ello una posible correlación con el genotipo de HBV prevalente en tal situación. En este sentido, se halló que la prevalencia de las variaciones en preC/C entre individuos coinfectados fue significativamente menor que en aquellos mono infectados ($p < 0,001$); las secuencias adscriptas al genotipo A2 de pacientes mono infectados presentarían más mutaciones que aquellas desde pacientes coinfectados y las secuencias de HBV pertenecientes al genotipo F consistentemente exhiben variaciones en PreC/C. Considerando el pequeño número de secuencias

pertenecientes al genotipo F, el análisis comparativo de variaciones genómicas acorde al genotipo no pudo ser realizado.

Originalmente se ha propuesto que las mutaciones A1762T/G1764A en el BCP tienen como efecto la reducción de la expresión del HBeAg en aislamientos de HBV pertenecientes al genotipo A, que no puede exhibir la mutaciones G1896A debido a que se debe mantener la estructura secundaria de la señal ϵ de encapsidación [66]. Sin embargo, dado que estas mutaciones fueron halladas en alta proporción en individuos mono infectados (genotipo A y F), la reducción de los niveles de HBeAg podría no ser la principal explicación para la emergencia de estas mutantes, en consonancia con lo reportado por Laras y colaboradores [187]. La aparición de estas mutaciones en el BCP se seleccionaría de manera de disminuir la síntesis del ARN mensajero de preC, sugiriendo que habría una ventaja replicativa del virus e induciría la producción del ARNpg.

Al realizarse el análisis longitudinal se pudo apreciar que los aislamientos pertenecientes al genotipo A desde pacientes coinfectados exhibieron escasas mutaciones en BCP y precore, mostrando la mayoría de ellos, una elevada replicación viral.

Considerando que el promotor del core modula la replicación de HBV y la expresión del HBeAg a nivel transcripcional, la baja prevalencia de mutaciones encontradas en los aislamientos genotipo A2 con alta replicación viral de pacientes coinfectados podría corresponderse con la persistencia del HBeAg. Sin embargo, la expresión del HBeAg de varios de los aislamientos de HBV no se vio afectada a pesar de presentar clones con mutaciones en el BCP, no obstante ante la imposibilidad vigente de cuantificar los niveles de tal antígeno, queda aún por dilucidar en modo definitivo el impacto cuantitativo. Las mutantes de BCP halladas podrían haber sido seleccionadas durante la fase inmuno competente de la infección crónica por HBV [188]. La prevalencia de estas mutantes en muestras con baja viremia sugiere que estos pacientes podrían estar cerca de la seroconversión a anti HBe, lo cual está asociado con la emergencia de mutantes en BCP y una disminución en la viremia [64].

Debido a que dichas variantes fueron halladas en pacientes que expresaban el HBeAg, resulta aceptable que las mismas llevarían al aumento de la replicación de HBV mediante la alteración de la unión de factores de transcripción al

promotor [67]. La doble mutación A1762T/G1764A crea un nuevo sitio de unión del factor de transcripción HNF1 que, específicamente, aumenta la transcripción de ARNpg [189]. El efecto supresor de HNF1 en la expresión del ARN de precore está mediado por la unión al genoma mutado con la doble mutación y no tiene efecto en el genoma *wild type*. La supresión por parte de HNF1 no es completa, lo que lleva a una baja expresión del HBeAg [190]. Las mutaciones en BCP, A1762T y G1764A aparecieron consistentemente en alta proporción de clones genotipo F de pacientes mono infectados y en el único aislamiento adscrito al genotipo F desde un paciente HBeAg positivo coinfectado (P6). Este aislamiento mostró la mayoría de sus clones con mutaciones en BCP A1762T/ G1764A y G1764A/C1766T/T1768A.

Entre los aislamientos desde mono infectados, si bien tanto los pertenecientes al genotipo A como al F evidenciaron variaciones en BCP/Pc, todos los aislamientos genotipo F mostraron estas mutaciones en distinta proporción.

La posible diferencia en prevalencia y efecto de las mutaciones en BCP entre genotipo A y F podría estar relacionada con un *background* genotípico diferente dado que se han reportado efectos diferentes en genotipo A y C [191]. Además existen evidencias que las tasas de prevalencia de mutaciones en preC/C varía entre pacientes infectados con cepas de HBV de distintos genotipos [66]. Sin embargo, el tamaño poblacional pequeño y la baja proporción de muestras genotipo F de pacientes coinfectados (2/19) impide la realización de un análisis estadístico sobre un posible impacto del genotipo viral en estas variaciones.

La mutación G1896A en el ORF precore crea un codón stop que impide la expresión del HBeAg [59, 62] por lo tanto, es un hallazgo raro entre clones pertenecientes al genotipo A2 considerando que debe complementarse con C1858 para estabilizar el *stem* de la señal ϵ de encapsidación. Como fue descrito anteriormente en Argentina, la mayoría de los aislamientos genotipo F de individuos mono infectados presentan la variante G1896A entre sus cuasiespecies [90].

Las variaciones G1809T/C1812T/G1862T/G1888A se encontraron en el único aislamiento genotipo A1. Estas variaciones son consideradas polimorfismos relacionados al genotipo A1 pero no se ha dilucidado su rol en la replicación y/o patogénesis de HBV [175]. Dado que aparecen juntas, se ha propuesto que

coevolucionan en el genotipo A1 y no son resultado de cambios debido a la presión inmunológica [192].

Además de mutaciones en el BCP y Pc, se evidenciaron 3 tipos de deleciones en aislamientos desde pacientes mono infectados y coinfectados. Dos de ellas implicaron deleciones de 8pb (nt 1763-1770 y 1768-1775) y otra de 20pb (nt 1753-1772). Los genomas conteniendo deleciones coexisten con genomas *wt* dentro de una misma población. La existencia de estos genomas sin variaciones sería un mecanismo compensatorio para el *fitness* viral dado que los aislamientos desde coinfectados con deleciones (P7 y P19) presentan elevados niveles de carga viral de HBV. Estos resultados fueron soportados por experimentos *in vitro* [193-194].

Los genomas con deleciones en BCP podrían implicar una disminución en la producción de HBsAg, HBcAg y/o HBeAg llevando al virus mutante a poder escapar a la detección por parte del sistema inmune. Estos mutantes podrían haber aumentado en proporción luego de una infección con una población viral mixta (virus *wt* y deleccionados) o mediante la infección con cuasiespecies *wt* con posterior emergencia de progenie mutante durante la infección crónica [193].

La contribución de las variantes con deleciones a la composición de cuasiespecies y la duración de las mismas a lo largo del análisis fue diferente entre ellas. Las variantes deleccionadas no son competentes para llevar a cabo un proceso de replicación eficiente de manera autónoma. Sin embargo, su presencia y la interacción con genomas *wt* podría contribuir a la progresión y persistencia de la infección [195]. La cinética diferente de estas deleciones podría explicarse acorde al impacto que las mismas pueden tener en las secuencias ricas en TA y, consecuentemente, en su capacidad replicativa [21].

La deleción nt1768-1775 implica la pérdida de la región TA3 (nt1771-1775) que podría alterar la función en *cis* del promotor, suprimiendo su función. Entre las cuasiespecies virales, esta deleción en BCP se preservó a lo largo del tiempo, lo que estaría indicando un mecanismo compensatorio de la misma frente a la capacidad replicativa reducida que presentan de las mutantes resistentes a LMV luego de una larga terapia [196]. Tal como fue demostrado para las mutaciones A1762T/G1764A. En contraste, la otra deleción de 8pb (nt 1763–1770) y la de 20pb (nt 1753–1772) afectan la secuencia entre TA2 y TA3 y

sitios de unión a factores de transcripción tales como LEF (*liver-enriched factor*). Al afectar la secuencia entre TA2 y TA3 se genera una nueva secuencia rica en TA llevando a un posible aumento en la transcripción del ARNpg [194]. Todas las deleciones en el BCP tendrían influencia en la expresión la proteína X de HBV [193]. Las 3 deleciones descritas resultan en un cambio en el marco de lectura y el truncamiento del extremos C terminal de la proteína. De esta manera se ve removido el dominio inhibidor de la serin-proteasa que es esencial para la actividad transactivadora [197]. En aislamientos desde pacientes coinfectados con HIV podría implicar la pérdida total o parcial de la capacidad de interactuar con la secuencia promotora LTR de HIV [146].

En individuos mono infectados, se ha visto que el efecto antiviral de la terapia con LMV es más potente sobre virus mutantes en precore o core respecto de los *wt*. Tacke y colaboradores también demostraron que la combinación de mutaciones en BCP y de resistencia a LMV tiene como consecuencia un aumento en la replicación intracelular de HBV y en la liberación del virión comparado con el virus con mutantes a LMV únicamente. De esta manera, cuando la terapia con LMV es prolongada, las mutaciones en BCP ofrecerían un mecanismo compensatorio a la ineficiencia replicativa inducida por las mutaciones de resistencia [198]. Debido a que el mayor efecto de esta droga es suprimir la replicación viral, se requiere de la respuesta inmune para la eliminación de los hepatocitos infectados. Por lo tanto, los resultados pueden ser diferentes entre pacientes coinfectados con HIV debido a que estos individuos pueden tener el sistema inmune comprometido, afectando la limitación de la infección.

Otro factor importante a considerar es la interacción directa entre HIV y HBV. La proteína X de HBV induce la replicación de HIV mediante la transactivación del LTR de HIV [199]. Esta función transactivadora de HBx podría requerir que las secuencias de BCP y precore sean *wt*. Esto es debido que la doble mutación en BCP A1762T/G1764A podría afectar la estructura de la proteína X dado que se producen los cambios aminoacídicos L130M/V131I y de esa manera se estaría alterando la capacidad de interacción con HIV, disminuyendo la inducción de la replicación. Este tipo de interacción entre

ambos virus podría implicar un cuello de botella en la presión de selección ejercida en el gen preC/C.

- Análisis de la estructura secundaria del RNA de la señal ϵ de encapsidación:

El inicio de la retrotranscripción y del ensamblaje de la nucleocápside del HBV depende del reconocimiento específico de la señal ϵ de encapsidación en el ARNpg por la transcriptasa reversa [25].

El posible efecto de HIV sobre la replicación de HBV no se apreció en una alteración de la estructura secundaria de la señal ϵ de encapsidación. Esto estaría relacionado con la elevada conservación de la secuencia en pacientes coinfectados, principalmente en el genotipo A2, no detectándose mutaciones que alteren la estructura secundaria necesaria para que la señal sea reconocida por la enzima RT, en particular posiciones específicas en el *bulge* [25].

Debido a que la estructura de *hairpin* es esencial para el empaquetamiento del ARN pregenómico viral, las mutaciones en dicha secuencia se ven restringidas. Son de importancia la posición nucleotídica 1858 que presenta complementariedad con la posición 1896. La presencia de una citosina en la posición nucleotídica 1858 evitaría la aparición de un codón *stop* debido al efecto desestabilizante en el tallo o *stem* de la señal de encapsidación [200]. Los aislamientos pertenecientes al genotipo A generalmente llevan C1858; por lo tanto, la mutación G1896A es muy infrecuente en este genotipo. Era de esperar entonces, que no apareciera esta mutación que genera un codón stop en la población en estudio (mayoritariamente genotipo A2), aun en aquellos pacientes que no expresaban HBeAg. Dando sustento a ello, los aislamientos en los que se encontraron clones exhibiendo las mutaciones A1850T/C1858T (P10; P22) fueron filogenéticamente asignados al genotipo D de HBV, desde pacientes HIV-infectados en los que coexistía además el genotipo A de HBV. Tal variante T1858 da a lugar en el genotipo D a la presencia de la mutación G1896A [200].

- Relación con parámetros virales y bioquímicos

En relación a los parámetros demográficos de los 22 pacientes que presentaban HBsAg positivo, la edad y el sexo de los pacientes no difirieron significativamente entre individuos mono infectados (15 de 20 fueron hombres; $35,6 \pm 7,4$ años) y aquellos coinfectados con HBV y HIV (16 de 19 fueron hombres; $33,6 \pm 6,3$ años).

Los niveles de ALT como medida del daño hepático podría estar relacionado con el recuento de LT CD4+, considerando al mismo como una medida de la respuesta inmune celular frente a células infectadas que presentan antígenos virales. Sin embargo, a pesar que los valores de recuentos de LT CD4+ difirieron significativamente entre ambos grupos de pacientes, no fue tal la diferencia para los valores de ALT entre ambos grupos de pacientes, hallándose similares proporciones de pacientes con ALT elevadas.

La inmunosupresión inducida por el HIV podría ser la causa de una respuesta inmune alterada, que determina una menor lesión hepática y explicaría los valores disminuidos de transaminasas que se observan en esta población [180]. Además la TARV podría provocar episodios de aumento de las transaminasas que podrían deberse a una reconstitución inmune y/o a toxicidad por las mismas drogas [181].

Entre los pacientes expuestos al tratamiento con LMV, se observó una alta tasa de aparición de mutantes de resistencia independientemente de la coinfección con HIV, indicando que el tratamiento con dicha droga por un largo período favorecería la aparición de mutaciones [201]. En aquellos pacientes que no se encontraban bajo tratamiento con LMV o llevaban un período corto de tratamiento al momento de la toma de la primera muestra analizada, no se observaron mutaciones de resistencia. Sin embargo, tras 3 años bajo tratamiento, desarrollaron resistencia, debiéndose considerar la baja barrera genética que presenta esta droga. Los pacientes que se encontraban bajo tratamiento en la primera muestra analizada desarrollaron mutaciones de resistencia en el tiempo entre la segunda y la tercera muestra analizada (aproximadamente 2 años). Estos resultados podrían estar relacionados con la co-existencia de HIV dado que diversos estudios han reportado el desarrollo

más rápido de estas variantes en individuos coinfectados que en mono infectados con HBV [202-204].

El posible rol de las mutaciones a LMV en la aparición de mutaciones en BCP/Pc no está aún dilucidada y requiere mayor investigación.

Se ha observado que aquellos pacientes con alta carga viral y mutaciones en BCP tienen peor pronóstico en la enfermedad hepática pero podrían verse beneficiados con adecuado tratamiento antiviral [205], por este motivo es importante la selección del tratamiento, evitando la monoterapia con LMV dada la antes mencionada baja barrera genética [206].

5.2 Estudio de la evolución molecular de HBV en el contexto de la coinfección con HIV:

El tamaño pequeño de la población bajo estudio y las pocas secuencias obtenidas desde pacientes que no expresaban el HBeAg o aquellos adscriptos a genotipo no A, implicó hacer el análisis de evolución molecular a lo largo del tiempo sólo en aislamientos pertenecientes al genotipo A2 desde pacientes HBeAg positivos. Se seleccionaron dichos pacientes debido a que, en Argentina, como se ha mencionado anteriormente, el genotipo de HBV más prevalente entre pacientes coinfectados con HIV es el A [154, 207]. Esta prevalencia se observó en individuos infectados con HIV de otras partes del mundo [208-210], guardando relación con la vía de infección [208-211]. Se ha reportado que la infección con HBV genotipo A está asociada con una tasa de respuesta bioquímica sostenida significativamente mayor, mayor erradicación del HBsAg y del ADN viral en pacientes crónicamente infectados con HBV, comparado con la infección con genotipo D [212].

El objetivo de esta parte de la tesis fue inferir el posible impacto de la presencia de HIV en la evolución molecular de HBV a lo largo de un período de 3 años. Se pudo observar que, el virus HBV de pacientes mono infectados presentó parámetros evolutivos diferentes lo que llevarían a inferir una posible influencia de HIV cuando ambos virus cohabitan un mismo microambiente celular.

El análisis filogenético por ML tanto de las secuencias concatenadas S-preC/C como de ambas regiones por separado, en primer lugar, confirmó que las secuencias de HBV tanto de mono infectados como de coinfectados son genotipo A2 y se encuentran mezcladas, dentro de un mismo *cluster*, con

secuencias de dicho genotipo de diferentes partes del mundo, no formando un *cluster* diferencial junto con secuencias argentinas. El hecho que estén entremezcladas descarta cualquier tipo de asociación epidemiológica entre los pacientes. Se observó que las secuencias de pacientes mono infectados tendieron a agruparse juntas a pesar que el soporte de dichos clados no fue significativo (valores de *bootstrap* <70). Estos grupos tendieron a presentar ramas más alejadas del nodo, lo que podría estar relacionado con la tasa de sustitución diferente en secuencias de HBV de este grupo de individuos. Este tipo de topología del árbol filogenético llevó a hipotetizar sobre una posible evolución independiente de HBV en individuos mono infectados respecto de aquellos coinfectados con HIV. Para verificar esto se procedió a investigar la posible contribución de cuasiespecies a la evolución molecular de HBV.

La elevada variabilidad genética es característica de HBV dado que la polimerasa viral carece de actividad *proofreading* y utiliza un ARN intermediario que es molde para la retrotranscripción [41]. Estos dos aspectos llevan al desarrollo de diversas variantes genéticas en un mismo hospedador (cuasiespecies).

La composición de cuasiespecies virales parece ser diferente cuando coexisten HIV y HBV en un mismo hospedador; como se ha descrito anteriormente, HBV desde mono infectados presenta menos variantes en su población viral [168].

La evaluación de la dinámica y tasas de evolución molecular de las distintas poblaciones virales, realizada mediante el análisis bayesiano de coalescencia, mostró que los valores de las tasas de mutación, basadas en las regiones genómicas S y preC/C están en consonancia con valores reportados previamente. Estos estudios han sugerido que las tasas de evolución van desde $2,6 \times 10^{-4}$ a $7,9 \times 10^{-5}$ sustituciones nucleotídicas/sitio/año [95-99]. Se encontró que, las tasas estimadas de aislamientos de HBV desde mono infectados fueron 5 y 2 veces mayor en S y preC/C respectivamente, que aquellos desde pacientes coinfectados. Además se evidenció que los aislamientos desde mono infectados revelan una tendencia a una mayor complejidad en las regiones genómicas S y preC/C; con valores más cercanos a 1 para el gen S. Estos valores de Entropía de Shannon tendiendo a 1 podrían estar indicando una mayor heterogeneidad de estas secuencias en pacientes

monoinfectados, principalmente en el gen S posiblemente debido a la presión ejercida por el sistema inmune que se ve afectado en pacientes con infección concomitante de HIV.

Durante el seguimiento de cada paciente, se observó que el comportamiento de las cuasiespecies no se modifica a lo largo de los 3 años de seguimiento, irrespectivamente de la coexistencia de HIV o la presencia de tratamiento antiviral. La presencia del *constraint* genético de HBV podría ser una posible explicación de esta dinámica poblacional del virus. Esto se debe a que, a pesar de que la RT de HBV podría ser responsable de una elevada tasa de sustitución nucleotídica comparada con otros virus cuyo genoma es ADN, el genoma de HBV es compacto con ORFs solapados, lo que limita la plasticidad genética del virus [213].

En resumen, los resultados del análisis de la heterogeneidad y diversidad de cuasiespecies presentados en esta tesis muestran que los aislamientos de HBV desde pacientes monoinfectados presentan una mayor complejidad y diversidad que aquellos desde coinfectados con HIV. Esto estaría sugiriendo una posible selección de una composición de cuasiespecies con mayor diversidad en individuos monoinfectados.

Esta estructura poblacional con diferentes variantes genómicas y distintas tasas de sustitución en HBV de monoinfectados y coinfectados, podría ser consecuencia de la respuesta inmune. La presión inmune en monoinfectados con HBV es mayor que en coinfectados con HIV dado que el recuento de LT CD4+ resultó ser significativamente menor en pacientes coinfectados con HIV. Esto se ve soportado por los hallazgos de Chang y colaboradores [214] que ha descrito que la magnitud, frecuencia y calidad de la respuesta específica T contra HBV (policlonal, multiespecífica y vigorosa) disminuye con los menores valores de recuento de LT CD4+ que se hallan en pacientes coinfectados con HIV (oligoclonal y débil). En ambos grupos de pacientes, mono y coinfectados, la detección de respuesta está significativamente correlacionada con el recuento de linfocitos T CD4+. En tal sentido, estudios han referido que los cambios en la presión de selección en el hospedador puede afectar significativamente las tasas de sustitución de HBV [101].

Sin embargo, esta presión de selección no siguió un patrón común en los pacientes monoinfectados dado que ningún aminoácido de los 4 marcos

abiertos de lectura analizados, fueron seleccionados positivamente. Al mismo tiempo, se detectaron mutaciones en diferentes epitopes de HBV tanto en pacientes mono infectados como coinfectados. El número de cambios aminoacídicos no fue significativamente mayor en aislamientos virales de pacientes coinfectados. Los cambios de codones en los diferentes epitopes CTL y T helper importantes, se distribuyeron al azar entre los distintos clones de un mismo aislamiento y no se conservaron a lo largo del tiempo, independientemente del recuento de LT CD4+. La respuesta inmune disminuída puede ser una de las causas de la emergencia de las variaciones pero no la única dado que se observaron algunos individuos con aislamientos con variaciones a pesar de tener reconstitución inmune debido a la TARV. Asimismo, el *background* genético de los pacientes (variantes HLA) juega un rol importante al modular la respuesta específica T. La habilidad de un epitope peptídico para inducir la respuesta T CD8+ puede verse influenciada por su conformación sin necesidad de alterar su habilidad para unirse a la molécula HLA [215]. Debido a esto, mutaciones tales como la mutación de resistencia rtM204V/I no alteran el reconocimiento por parte de las células T y no se evidencian cambios en la unión a HLA-A2.

Esta frecuencia de mutaciones baja era esperable dado que todos los pacientes bajo estudio expresaban el HBeAg, tal como fue previamente reportado por Audsley [168], que asoció la expresión de dicho antígeno con una disminución en la frecuencia de mutaciones, independientemente de la coexistencia o no de HIV. Una baja tasa de mutación en pacientes HBeAg positivos ha sido observada previamente utilizando diferentes metodologías y podría ser consecuencia de una presión inmunológica menor en pacientes que no han seroconvertido a anti HBe [95], probablemente relacionado al rol inmunomodulador del HBeAg capaz de perfilar la respuesta hacia Th2 [16]. Sin embargo, se detectaron diversas mutaciones bajo presión de selección negativa, lo que estaría apoyando hallazgos anteriores que, en HBV, predomina tal presión. Estos mismos resultados fueron observados al realizarse el análisis de sustituciones sinónimas versus no sinónimas en los distintos ORFs de HBV de coinfectados y mono infectados. En este estudio, los mayores valores de dN/dS se observaron en el ORF preC/C y S. Estas dos regiones son importantes blancos de la respuesta inmune y, por lo tanto,

cambios en esta región podrían corresponder a una forma de evasión de la presión inmune por parte del virus. Las regiones pol y X, en cambio, tanto en aislamientos de pacientes mono infectados como coinfectados, presentaron en su mayoría valores de $dN/dS < 1$; reforzando la idea que dichas regiones son esenciales durante la replicación viral y, por ende, las sustituciones nucleotídicas en ellas están limitadas [98].

La presencia de un número pequeño de codones ($n=10$) bajo presión de selección negativa en los genes S, pol y X de HBV de individuos mono infectados implica *constraints* funcionales en los aminoácidos que dichos codones codifican [168]. Éstos corresponden a regiones esenciales para la replicación e infectividad de HBV tales como los dominios B y C de la transcriptasa reversa, el dominio transactivador de X y el determinante antigénico mayor “a” del HBsAg.

Por otro lado, las diferencias observadas en entropía y distancia genética entre las regiones S y preC/C podrían deberse a presiones de selección diferentes y *constraints* funcionales como fuera sugerido por Hoffman para HIV [216]. Tal comportamiento de cuasiespecies, estaría reflejando una adaptación de HBV a un entorno adverso como la terapia antiviral o la presión ejercida por el sistema inmune humoral y celular [217-218].

El estudio comparativo de la evolución molecular de HBV, genotipo A, en pacientes mono infectados y coinfectados, presentó algunas limitaciones. Las tasas de sustitución nucleotídicas en HBV han sido calculadas a partir de secuencias obtenidas de muestras de suero consecutivas de distintos pacientes infectados con HBV por períodos disímiles. En consecuencia, estos resultados son sólo indicativos en el corto plazo en individuos crónicamente infectados con HBV, lo que no necesariamente refleja el proceso de sustitución nucleotídica a largo plazo. Por lo tanto, sería necesario un análisis de diversidad genética intrapaciente a lo largo de un tiempo considerablemente mayor [98]. A pesar de ello y considerando además que todos los pacientes están infectados con HBV genotipo A, que presenta una marcada diferencia en las tasas de evolución y complejidad filogenética comparado con otros genotipos [219], los valores obtenidos de tasas de mutación de HBV se ven validados por los valores hallados previamente por otros autores.

Sin embargo, como se describió antes, se han seleccionado pacientes infectados con HBV genotipo A de manera de poder hacer un análisis genotipo-específico debido a que se ha observado que los pacientes infectados con HBV genotipo A probablemente han adquirido la infección mediante contacto sexual o por sangre, generando una corta duración de la infección por HBV [168].

5.3 Análisis de la dinámica de cuasiespecies virales a lo largo de 14 años bajo diferentes terapias antivirales

En el estudio de evolución molecular de HBV a lo largo de 3 años, los aislamientos de HBV parecieron estar bajo poca presión de selección dado que sólo se investigó HBV de pacientes durante la fase inmutolarente (con detección de HBeAg).

Por lo tanto, se consideró que el análisis de los cambios en el genoma viral a lo largo de 14 años de seguimiento en un paciente mono infectado con HBV constituye un ejemplo y una mejor representación de la evolución molecular del virus.

Además, en contraste con las secuencias de HBV analizadas anteriormente donde se consideró que el tiempo de infección fue corto debido a la adquisición de la infección por vía sexual o por sangre, el virus del paciente bajo estudio parecería tener mayor tiempo de evolución debido a su probable infección a través de la vía vertical.

Como primer análisis se procedió a describir la dinámica de los cambios en la región pol de HBV y su relación con distintos parámetros serológicos y bioquímicos durante un período de 14 años bajo distintas terapias antivirales que incluyeron: lamivudina, adefovir, entecavir y posteriormente entecavir-tenofovir.

- Dinámica de las mutaciones de resistencia a la terapia antiviral

El paciente bajo estudio, inicialmente tratado con interferón y, consecutivamente con adefovir y entecavir como monoterapia o combinado con entecavir, mostró evidencia de resistencia con elevados niveles de ADN de HBV y sólo disminución de la replicación viral de modo transiente.

Se esperaba encontrar una disminución de la replicación viral cuando se detectó la mutación rtA181T mientras el paciente se encontraba bajo

tratamiento con adefovir como monoterapia. Esto se puede deducir dado que esta variante presenta un defecto en la secreción y ejerce un efecto negativo en la liberación del virión *wt*. Por ello, la misma se presenta como parte de una población mixta junto a virus *wt* [79].

El paciente bajo estudio presentó replicación viral persistente. Este factor resultó ser de importancia en la emergencia de mutantes. Se observó en determinados momentos, una disminución temporaria de la carga viral, sin embargo, ésta fue lenta o efímera en el tiempo, lo que pudo haber permitido la aparición de algunas variantes genómicas [71, 220].

La droga ETV es un inhibidor de la polimerasa viral 100-300 veces más potente que la LMV. Estudios en cultivos celulares han demostrado que exhibe capacidad inhibitoria aún en mutantes resistentes a LMV a pesar que, en este caso, sus efectividad disminuye entre 20 y 150 veces [221-222]

En el contexto clínico, se ha probado que ETV 1mg/día es efectivo en el tratamiento de pacientes que presentan resistencia a la terapia con LMV [223-224]. En presencia de las mutaciones rtL180M y rtM204V y mutaciones asociadas a ETV, la susceptibilidad de la terapia con ETV disminuye dramáticamente como se ha observado en ensayos donde hubo un aumento de la concentración inhibitoria 50% (IC_{50}) desde 280 a 1500 veces [159].

Como se mencionó más arriba, una replicación viral persistente, sumado a la elevada tasa de error de la transcriptasa reversa de HBV (aproximadamente de 10^{-4} nucleótidos/ciclo de replicación), son factores importantes que influyen en el desarrollo de la resistencia [225].

La caracterización del gen *pol* de los distintos aislamientos del paciente bajo estudio mostró las mutaciones L180M y M204V/I en su composición de cuasiespecies, durante las terapias con ADV, ETV y ETV-TDF.

La presencia de LMV por un tiempo prolongado en el tratamiento generó una presión de selección en mutantes resistentes a dicha droga, previniendo la reversión a virus *wt* [226]. Luego de esta terapia prolongada con LMV, el paciente sólo dio evidencia de las mutaciones L180M y M204V/I. Frente a la baja respuesta, se decidió el cambio al tratamiento con ADV. Es importante considerar que, a pesar que el tratamiento tanto con ADV como con TDF, son efectivos aún en presencia de mutantes de resistencia a LMV, su actividad es menor. Se ha reportado un aumento del IC_{50} de 2,8 a 16 veces en presencia de

estas mutaciones [222, 227-229]. La monoterapia con ADV en pacientes que han estado bajo tratamiento con LMV, es un esquema de tratamiento que puede llevar a la aparición de resistencia en el largo plazo [230].

Cuando el paciente se encontró bajo monoterapia con ETV, no se observó supresión de la replicación viral. Se agregó TDF 300mg/día, resultando en una rápida caída de la carga viral de 2 log. Este nivel de carga viral se mantuvo durante aproximadamente 7 meses hasta que se evidenció un rebote de la replicación, acompañado por un aumento de los niveles de las ALT hepáticas. En la composición de cuasiespecies, se encontraban presentes las variantes A181T y T184L, mutaciones de resistencia a ADV y ETV, respectivamente. Sin embargo, el aporte de estas variantes a la población viral fue menor. Dichas variantes emergieron una vez que se agregó TDF en dos veces consecutivas, separadas por un intervalo de 5 meses.

La mutación en el codón rt181 ha sido encontrada en pacientes refractarios a LMV. La selección de esta mutación se detectó bajo la terapia con ETV [231]. El aminoácido alanina en la posición 181 parece ser crítica en el desarrollo de la resistencia a análogos de nucleósidos/ nucleótidos, dado que está localizada en la α -hélice adyacente al sitio de unión nucleotídico [69].

Se considera que una mutante de resistencia lleva un tiempo considerable para convertirse en la variante dominante entre la población viral y, por ende, llevar a un aumento en el ADN viral. Como consecuencia, la cinética de emergencia de mutantes de resistencia a drogas es lenta, debido a que es necesario un contexto donde el virus mutante se disperse libremente [232].

Sin embargo, ninguna de las dos variantes se convirtió en el virus dominante dentro de las cuasiespecies virales a pesar de la elevada carga viral como reflejo de una población viral con alta eficiencia replicativa. El bajo *fitness* de la mutante podría influir el tiempo de su emergencia clínica como así también su baja contribución a las cuasiespecies virales. Es importante considerar, además, que el análisis por clonado se realizó en determinadas muestras a lo largo del tiempo. Muchas de ellas presentaban baja carga viral, lo que podría estar influyendo en la detección de un mayor número de variantes virales con mutaciones.

Se pudo comprobar que el comportamiento de HBV del paciente bajo estudio fue considerablemente diferente a otros reportados, donde pacientes

resistentes a múltiples terapias, resultaron responder a la terapia con tenofovir, aún siendo resistentes a ETV [226, 231]. En estos trabajos, entre la población viral que presentaba mutaciones L180M y M204V, se encontraron otras mutaciones que aumentarían la capacidad replicativa de estas variantes, incluso hasta niveles similares al del virus *wt*. Estas variantes (rtV173L y rtP177S) no fueron encontradas en los aislamientos de HBV del paciente bajo estudio.

Se ha observado que, una vez instaurada la mutación M204I, aparece en la composición de cuasiespecies, las mutantes A200V y A219S. Se evidenció también la mutante I253V, todas ellas ubicadas en el sitio catalítico de la polimerasa viral y sostenidas durante la monoterapia con ETV y la terapia combinada ETV-TDV. De ellas, A219S y I253V no han sido descritas aún a nivel fenotípico. El rol de A200V durante la terapia con LMV no está claro. Su impacto en la sensibilidad y en la eficacia replicativa es aún desconocido pero se la considera una posible mutación de resistencia a drogas. Se ha observado una asociación significativa entre ella y L-nucleósidos. Se encontró que los virus que presentan A200V presentan una mutación nucleosídica que estabiliza (L180M y/o M204I/V) [173].

Se evidenció también, en todas las secuencias de pol analizadas, la variante L217R que fue descrita como polimorfismo asociado al subgenotipo A2 y que podría llevar a una menor respuesta al tratamiento con ADV. Sin embargo, no se han llevado a cabo aun experimentos *in vitro* para comprobar la capacidad replicativa de dicha variante en presencia de la droga [233].

La carga viral de HBV exhibió fluctuaciones a lo largo del tiempo, permaneciendo alta a pesar que el paciente se encontraba bajo constante terapia antiviral. Se puede considerar entonces que hubo otros factores que podrían haber influido en la falla al tratamiento. Entre ellos es menester considerar que la absorción y/o metabolismo (biodisponibilidad, metabolismo de la prodroga a sus metabolitos activos o fosforilación) de la droga fueran inadecuados. En principio tal argumento, dadas las concentraciones halladas en plasma, podría excluirse; no obstante será necesario re-evaluar las concentraciones a tiempos bien definidos previo y posterior a la toma [234]. Adicionalmente se advirtió que una vez administrada la droga, la caída en la carga viral fue rápida; lo que verificaría un adecuado metabolismo.

En resumen, a pesar que el tratamiento con TDV se considera una terapia alternativa para pacientes con resistencia a ETV, como se discutió anteriormente, en el caso del paciente bajo estudio, dicha droga no fue eficaz para disminuir la carga viral de HBV.

- Perfil serológico HBeAg- Anti HBe

Hacia el año 2006, cuando se instauró la terapia con ADV, se pudo observar que el paciente mostró simultáneamente HBeAg y su correspondiente anticuerpo. A pesar que esta coexistencia de antígeno- anticuerpo parecería ser rara, no parece ser infrecuente entre pacientes naïve de tratamiento pero su prevalencia en pacientes que han estado bajo terapia antiviral permanece aún sin dilucidarse [235]. La reactivación de la replicación viral era esperable dada la simultaneidad de HBeAg y anti HBe [236].

Los elevados niveles de ALT hepáticas hallados en pacientes con este patrón serológico indicarían extensivo daño de hepatocitos además de injuria hepática severa debido a mayores niveles de inflamación [235].

Se considera que la co-presencia de HBeAg-anti HBe indica que los títulos de ambos parámetros se encuentran cercanos a sus valores de *cut off*. La concentración relativamente baja de HBeAg sería el resultado de una respuesta inmune elevada en este tipo de pacientes [237].

Se debe considerar que el paciente en estudio evidenció las variantes A1762T/G1764A en la región preC/C desde la primera muestra analizada y se mantuvieron a lo largo de todo el tiempo de análisis. Como se detalló anteriormente, estas mutaciones pueden generar una disminución de la expresión de HBeAg.

Existen en la bibliografía otras hipótesis para explicar la simultaneidad. Una de ellas sería la formación reversible del complejo antígeno-anticuerpo, haciendo posible solamente la detección de las moléculas libres. Las fracciones menores libres corresponden a los bajos niveles de HBeAg y anti HBe hallados en pacientes con este perfil serológico. Otra posible hipótesis sería una disminución en la afinidad ente HBeAg y su correspondiente anticuerpo por diversas variantes a nivel de la secuencia genómica, como se reportó para el HBsAg y anti HBs [228].

Debido a estos hallazgos, los aspectos clínicos y la respuesta al tratamiento de los pacientes con este perfil serológico podría ser diferente a aquellos HBeAg o anti HBe positivos. Este aspecto podría ser uno de los factores que influiría en la falta de respuesta hallada en el paciente estudiado.

Luego de cierto tiempo en el que el paciente presentó concomitantemente HBeAg y su correspondiente anticuerpo, hubo una seroreversión hacia HBeAg positivo, sin detectarse anticuerpos anti HBe. Este perfil serológico indicaría una reactivación de la replicación viral, que se evidencia por el aumento de la carga viral plasmática. Esta reactivación de la replicación no condice con lo que se observa en pacientes crónicamente infectados que adquirieron la infección por transmisión vertical. Este es otro factor, junto con la ancestralidad calculada, que afianza la idea que el paciente se infectó por otra vía diferente a la materna.

- Evolución molecular y dinámica de mutaciones en pol y preC/C

En esta parte del análisis de la evolución molecular de HBV se pudo verificar, mediante inferencia filogenética por ML, que todos los aislamientos obtenidos desde las distintas muestras de suero del paciente agruparon dentro del genotipo A2. Como se hizo referencia anteriormente, se observó una alta homogeneidad en las cuasiespecies virales tras el análisis de las regiones pol y preC/C.

La observación que determinadas secuencias de HBV del paciente bajo estudio formen un grupo diferente podría estar relacionada con una competencia “darwiniana” de cuasiespecies. En tal escenario, habría un reemplazo de la población viral dominante observada en primera instancia por otra, en principio minoritaria, debido a una ventaja adaptativa de esta última durante la infección crónica. La variación en el codón 200 del ORF pol fue la única diferencia hallada en las secuencias que forman un *cluster* diferente en el árbol filogenético y sería una posible ventaja adaptativa que le permitiría al virus que la porta, convertirse en la cepa dominante [238]. No obstante ello, la importancia de dicha variante a nivel epidemiológico o su influencia en la respuesta al tratamiento es aún desconocida.

Las mutaciones en el BCP (A1762T y G1764A) se hallaron consistentemente en todas las muestras analizadas, aún en aquella en la que el paciente se

encontraba sin tratamiento antiviral. Esto estaría indicando que la infección inicial fue con una población viral con una elevada proporción de cuasiespecies mutadas. Otra opción es que dichas mutaciones emergieron tempranamente durante la infección crónica, mientras el paciente expresaba el HBeAg, dado que se ha descrito que la doble mutación aparece previamente o durante la seroconversión a anti HBe [66]. La presencia de estas mutaciones, ya sea por una infección por una población heterogénea de HBV como por la seroconversión a anti HBe, influirían en la pobre respuesta al tratamiento dado que se ha reportado una correlación entre estas mutaciones y una pobre respuesta a IFN.

De manera de poder estimar la historia evolutiva del virus circulante en el paciente, se estimó el tMRCA para 8 de los distintos aislamientos de HBV obtenidos a lo largo de los 14 años.

Se estima que el ancestro viral en base a las secuencias analizadas habría aparecido a comienzos de los años 90 (tMRCA 16,5 años; 95% HPD: 13,2-20). Este tiempo estimado encuadra dentro del rango obtenido por Zehender y colaboradores que estimaron un tMRCA hacia el año 1943 (1893-1993) para el genotipo A2, a partir de secuencias del gen de la polimerasa [219].

Los hallazgos indican una relación genética muy cercana entre los aislamientos de los distintos tiempos. Además se considera que el tiempo de evolución obtenido es acorde a la hipótesis que la primera muestra contiene a los ancestros de las variantes de muestras sucesivas, descartando una reinfección. Esta idea se ve reforzada por el hallazgo que los aislamientos *wt* y mutados tienen un ancestro común, sugiriendo que los virus mutados surgieron de ancestros *wt*.

Wang describió que los tMRCAs calculados a partir del genoma completo tenían valores mayores a las edades de los pacientes en el momento de la toma de la primera muestra. Sugirió que parte de la diversidad viral presente en estos pacientes podría haber sido heredada desde el donante (probablemente desde la madre a través de transmisión vertical) [239].

En el caso del paciente presentado, el tMRCA no fue mayor a la edad del paciente al momento de la extracción de la primera muestra analizada (1998), sugiriendo que la diversidad genética no fue heredada sino que fue consecuencia de la presión inmune y/o de la terapia antiviral. Además se

podría especular con que el paciente no se infectó con HBV a través de transmisión vertical debido a que, contrariamente a lo hallado por Wang, el tMRCA da menor que la edad del paciente. Wang halló que los tiempos estimados de origen viral para 5 de 7 pacientes que adquirieron la infección a través de la vía perinatal, eran mayores que las edades en las que se adquirió la muestra. Esto favorecería el escenario en el que la diversidad viral es heredada por vía materna y decrece gradualmente durante la fase inmunotolerante debido a la competencia viral [239]. Podría decirse entonces que, posiblemente, el paciente pudo haberse infectado con HBV hacia principios de los años '90.

La tasa de mutación calculada a partir de secuencias directas de pol del paciente arrojó un valor de $1,27 \times 10^{-3}$ sustituciones/ sitio/ año. Este valor es resultó ser un log mayor que el obtenido a partir del análisis de secuencias de preC/C y S a lo largo de 3 años. Tal como se discutió oportunamente, la inferencia de las tasas evolutivas de HBV son difíciles debido al solapamiento en los marcos abiertos de lectura. Por este motivo, en este caso, se focaliza no sólo en el valor medio sino también en el valor inferior al 95% HPD dado que representa la menor (más conservativa) tasa de evolución viral. El valor estimado es de $2,43 \times 10^{-4}$ sustituciones/sitio/año. Este valor es más cercano a los valores referidos anteriormente ($2,6 \times 10^{-4}$ a $7,9 \times 10^{-5}$) [51, 95-99] y cercanos a las tasas de sustitución observadas en virus ARN [240]. Notablemente similares y mayores tasas de sustitución se han observado en regiones del genoma con baja tasa de recombinación ($2,60 - 4,30 \times 10^{-4}$) [99]. o a partir de secuencias obtenidas intrapaciente como describieron López y col. en secuencias obtenidas de un paciente infectado con HBV genotipo F a lo largo de 3 años [195]. La diferencia en las tasas de sustitución calculadas y las reportadas en la bibliografía podría deberse a la forma en que las mismas fueron calculadas. Algunos de los factores que podrían afectar el cálculo de la tasa de mutación de HBV son: la región genómica involucrada, el tamaño de la secuencia nucleotídica, la presencia del solapamiento de ORFs y la respuesta inmune acorde a la etapa de la infección crónica en la que se encuentre el paciente (inmunoreactiva o inmunotolerante). Esta última (atribuible a la seroconversión y seroreversión HBe-anti HBe) genera una presión de selección que influye en la composición de cuasiespecies virales. La misma, sumada a la

terapia antiviral, contribuyó a una disminución en la heterogeneidad (complejidad y diversidad) de la población viral, haciéndose evidente con la ausencia de codones bajo presión de selección positiva o negativa, principalmente mientras el paciente es HBeAg positivo.

La presión generó un cuello de botella que permitió que el *pool* de cuasiespecies más diverso hallado en la primera muestra experimentara competencia durante el período de seguimiento, de manera de alcanzar una población con mayor *fitness* y de esa forma convertirse en dominante [51].

Las posibles diferencias obtenidas en la tasa de evolución calculada en el estudio comparativo de pacientes genotipo A2 y en el seguimiento del paciente a lo largo de 14 años, podría deberse a que en el primer grupo, todos los pacientes expresaban HBeAg mientras que el paciente mono infectado mostró un patrón serológico variable de HBeAg-anti HBe. De esta manera, la presión inmune de los pacientes de ambos estudios es diferente, impactando en la obtención de la tasa de evolución molecular.

5.4 Prevalencia de variantes de HBV con resistencia basal al tratamiento antiviral

Uno de los factores más importantes en el fracaso al tratamiento para HBV usando análogos de nucleósidos/ nucleótidos es la resistencia antiviral. La resistencia primaria se refiere a cambios aminoacídicos en la polimerasa viral que trae como consecuencia una reducción en la susceptibilidad a agentes antivirales. La mayoría de las mutaciones que se encuentran en pacientes que no han sido sometidos a tratamiento antiviral pueden deberse a cambios polimórficos naturales sin que exista *per se* una relevancia clínica o biológica [241].

La secuenciación directa es la técnica no comercial más aceptada para realizar caracterización genotípica de las poblaciones virales de HBV mayoritarias [242]. Debido a esto se decidió utilizarla para investigar la posible existencia de variaciones en la polimerasa viral en pacientes *naïve* de tratamiento, atendidos en la zona metropolitana de Argentina. Sin embargo, el hallazgo de mutaciones de resistencia basal fue muy infrecuente dado que sólo se observaron mutaciones de resistencia en uno sólo de los aislamientos analizados.

La presencia de mutaciones de resistencia primaria en la polimerasa de HBV ha sido reportada con frecuencias variables y/o con significancia clínica poco clara en distintos estudios [243-245]. En su mayoría reportan baja prevalencia de mutaciones que conferirían resistencia.

En nuestro país, Cuestas y colaboradores reportaron la existencia de variantes naturales que conferirían resistencia a LMV y ADV. Ellos adjudican una elevada prevalencia de resistencia basal a la existencia de la variante L217R y variaciones en la posición 202 de la polimerasa viral [246].

En la presente tesis se ha reportado que todos los aislamientos pertenecientes al genotipo A2 presentan L217R. Sin embargo, se considera que dicha variante es un polimorfismo característico del genotipo A2 que posiblemente esté relacionado con resistencia al tratamiento con ADV [233] aunque aún no se han hecho los respectivos análisis fenotípicos.

Debido a la baja prevalencia de mutaciones encontradas por secuenciación directa se decidió clonar algunas de las muestras de manera de tener una perspectiva de la posible utilidad de analizar clones para determinar poblaciones minoritarias.

La prevalencia de mutaciones fue muy baja incluso en aquellas muestras en las que se obtuvo secuencias posteriores. Se consideraría relevante el proceso de clonado o la posibilidad de realizar análisis por pirosecuenciación ultraprofunda (UDPS) si, en el tiempo, aumentara la proporción de poblaciones minoritarias resistentes.

Aún en trabajos donde se utiliza la UDPS como método para detectar variantes minoritarias en pacientes no tratados, la frecuencia fue baja. Se encontraron variantes nuevas con posible resistencia con frecuencia variable [247]. Específicamente la variante rtM204I/V se detectó con muy baja frecuencia al igual que lo que se reporta en la presente tesis.

Trabajos recientes sugieren que la preexistencia de mutaciones de resistencia a LMV en aquellos pacientes que no han recibido tratamiento con tal droga aumentaría la posibilidad de desarrollar mutaciones asociadas al tratamiento con ETV [248].

Por lo antedicho, contrariamente a lo que recomiendan Cuestas y colaboradores, en principio, la búsqueda de dichas variantes previo al inicio de la terapia antiviral tendría poca importancia en la Salud Pública. Sin embargo,

para aseverar esto es importante considerar que nuestro estudio implicó un número reducido de pacientes debido a la baja prevalencia de infección por HBV en Argentina.

Otra limitación fue la imposibilidad de realizar el estudio comparativo con pacientes coinfectados con HIV sin tratamiento debido a que, en general, los pacientes se encuentran con tratamiento antirretroviral. Dentro del esquema terapéutico anti-retroviral existen drogas con impacto dual sobre ambos virus (tales como la LMV), impidiendo un análisis de variantes virales de HBV.

Es importante considerar que el IFN, utilizado como tratamiento para la infección por HBV, no tiene impacto en la composición de variantes virales, al menos en el corto plazo. Esto estaría indicando que, aun bajo dicho tratamiento, solo influye en la variabilidad viral la presión del sistema inmune, la alta tasa de replicación viral y la retrotranscripción como parte de la replicación viral de HBV.

CONCLUSIÓN

6 Conclusión

La coinfección con HBV en pacientes infectados por HIV es un hallazgo frecuente en virtud de las similares vías de transmisión que presentan estos agentes (sexual, parenteral y vertical).

La presencia de HIV modifica la historia natural de la infección por HBV. En pacientes coinfectados se ha observado un aumento en la tasa de evolución a cronicidad de hepatitis B aguda y mayor tasa de replicación de HBV.

La presente tesis tuvo como objetivo entender el impacto de HIV sobre la variabilidad genómica y la evolución molecular de HBV.

Se observó que los aislamientos de HBV caracterizados desde pacientes coinfectados con HIV exhibirían un patrón genómico *wild type* en la región genómica regulatoria del preC/C respecto de aquellos mono infectados con HBV.

La elevada conservación de la secuencia de la región preC/C de HBV de pacientes coinfectados con HIV fue inesperada reflejando una posible adquisición reciente de la infección por HBV en individuos coinfectados con HIV [146].

Se observó también que HBV genotipo A, hallado con mayor prevalencia en pacientes coinfectados con HIV, parecería ser más conservada pero, considerando la pequeña proporción de aislamientos genotipo F encontrados en pacientes coinfectados, amerita determinar a futuro fehacientemente si el grado de conservación nucleotídica es genotipo específico en el mencionado grupo de pacientes.

El estudio comparativo de evolución molecular entre aislamientos de HBV adscritos al genotipo A a nivel intra e interpaciente dieron como resultado que la misma varía acorde a la región analizada y que la misma presenta valores elevados y dentro un amplio rango.

En conclusión, cuando HIV está presente, HBV evoluciona con diferentes tasas de evolución y menor heterogeneidad y diversidad de cuasiespecies, sugiriendo que la coinfección impactaría en la evolución molecular de HBV posiblemente debido a la respuesta inmune celular debilitada.

En relación al hallazgo de mutaciones de resistencia basal, si bien esta tesis no tenía como objetivo hacer un estudio epidemiológico de mutantes de

resistencia, se reportó una muy baja prevalencia de variantes naturales de HBV con resistencia. Por lo tanto, la detección de las mismas previo al tratamiento antiviral, no sería recomendable como método diagnóstico.

La prevalencia de dichas variantes en pacientes coinfectados de manera de determinar un posible impacto de HIV en la población de HBV en individuos naïve de tratamiento queda aún por ser dilucidada.

BIBLIOGRAFÍA

7 Bibliografía

1. Murray, R., *Viral hepatitis*. Bull N Y Acad Med, 1955. 31(5): p. 341-58.
2. Krugman, S., J.P. Giles, and J. Hammond, *Viral hepatitis, type B (MS-2 strain). Studies on active immunization*. Jama, 1971. 217(1): p. 41-5.
3. Krugman, S., et al., *Viral hepatitis, type B, DNA polymerase activity and antibody to hepatitis B core antigen*. N Engl J Med, 1974. 290(24): p. 1331-5.
4. Okochi, K. and S. Murakami, *Observations on Australia antigen in Japanese*. Vox Sang, 1968. 15(5): p. 374-85.
5. Dane, D.S., C.H. Cameron, and M. Briggs, *Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis*. Lancet, 1970. 1(7649): p. 695-8.
6. Liang, T.J., *Hepatitis B: the virus and disease*. Hepatology, 2009. 49(5 Suppl): p. S13-21.
7. Gavilanes, F., J.M. Gonzalez-Ros, and D.L. Peterson, *Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins*. J Biol Chem, 1982. 257(13): p. 7770-7.
8. Flint, S.J., et al., *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control*. 2004: Washington, D. C. : ASM Press.
9. Gerlich, W.H. and W.S. Robinson, *Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand*. Cell, 1980. 21(3): p. 801-9.
10. Moraleda, G., et al., *Lack of effect of antiviral therapy in nondividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of woodchuck hepatitis virus*. J Virol, 1997. 71(12): p. 9392-9.
11. Beck, J. and M. Nassal, *Hepatitis B virus replication*. World J Gastroenterol, 2007. 13(1): p. 48-64.
12. Nassal, M. and H. Schaller, *Hepatitis B virus replication--an update*. J Viral Hepat, 1996. 3(5): p. 217-26.
13. Ganem, D., *Hepadnaviridae: The viruses and their replication.*, in *Knipe D, Howley P. Fundamental Virology*, P.L.W. Wilkins, Editor. 2001. p. 1285-1331.
14. Hollinger, F., *Hepatitis B virus*, in *Fields Virology*, L.-R. Publishers, Editor. 2001. p. 2971-3036.
15. Hatton, T., S. Zhou, and D.N. Standring, *RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication*. J Virol, 1992. 66(9): p. 5232-41.
16. Milich, D.R., et al., *The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence*. J Immunol, 1998. 160(4): p. 2013-21.
17. Zhang, Z., et al., *X-deficient woodchuck hepatitis virus mutants behave like attenuated viruses and induce protective immunity in vivo*. J Clin Invest, 2001. 108(10): p. 1523-31.
18. Bouchard, M.J. and R.J. Schneider, *The enigmatic X gene of hepatitis B virus*. J Virol, 2004. 78(23): p. 12725-34.

19. Yee, J.K., *A liver-specific enhancer in the core promoter region of human hepatitis B virus*. Science, 1989. 246(4930): p. 658-61.
20. Tur-Kaspa, R., et al., *Hepatitis B virus DNA contains a glucocorticoid-responsive element*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(6): p. 1627-31.
21. Kramvis, A. and M.C. Kew, *The core promoter of hepatitis B virus*. J Viral Hepat, 1999. 6(6): p. 415-27.
22. Seeger, C., D. Ganem, and H.E. Varmus, *Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy*. Science, 1986. 232(4749): p. 477-84.
23. Huang, J. and T.J. Liang, *A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products*. Mol Cell Biol, 1993. 13(12): p. 7476-86.
24. Junker-Niepmann, M., R. Bartenschlager, and H. Schaller, *A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA*. Embo J, 1990. 9(10): p. 3389-96.
25. Hu, J. and M. Boyer, *Hepatitis B virus reverse transcriptase and epsilon RNA sequences required for specific interaction in vitro*. J Virol, 2006. 80(5): p. 2141-50.
26. Glebe, D. and S. Urban, *Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry*. World J Gastroenterol, 2007. 13(1): p. 22-38.
27. Lee, J.Y. and S. Locarnini, *Hepatitis B virus: pathogenesis, viral intermediates, and viral replication*. Clin Liver Dis, 2004. 8(2): p. 301-20.
28. Jean-Jean, O., et al., *Internal entry of ribosomes and ribosomal scanning involved in hepatitis B virus P gene expression*. J Virol, 1989. 63(12): p. 5451-4.
29. Nassal, M., *Hepatitis B virus replication: novel roles for virus-host interactions*. Intervirology, 1999. 42(2-3): p. 100-16.
30. Kidd, A.H. and K. Kidd-Ljunggren, *A revised secondary structure model for the 3'-end of hepatitis B virus pregenomic RNA*. Nucleic Acids Res, 1996. 24(17): p. 3295-301.
31. Will, H., et al., *Replication strategy of human hepatitis B virus*. J Virol, 1987. 61(3): p. 904-11.
32. Sugiyama, M., et al., *Direct cytopathic effects of particular hepatitis B virus genotypes in severe combined immunodeficiency transgenic with urokinase-type plasminogen activator mouse with human hepatocytes*. Gastroenterology, 2009. 136(2): p. 652-62 e3.
33. Stevens, C.E., et al., *Vertical transmission of hepatitis B antigen in Taiwan*. N Engl J Med, 1975. 292(15): p. 771-4.
34. Chisari, F.V. and C. Ferrari, *Hepatitis B virus immunopathogenesis*. Annu Rev Immunol, 1995. 13: p. 29-60.
35. Baron, J.L., et al., *Activation of a nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection*. Immunity, 2002. 16(4): p. 583-94.
36. Guidotti, L.G., et al., *Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes*. Immunity, 1996. 4(1): p. 25-36.
37. Guidotti, L.G., et al., *Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection*. Science, 1999. 284(5415): p. 825-9.

38. Kakimi, K., et al., *Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo*. J Exp Med, 2000. 192(7): p. 921-30.
39. Heise, T., L.G. Guidotti, and F.V. Chisari, *Characterization of nuclear RNases that cleave hepatitis B virus RNA near the La protein binding site*. J Virol, 2001. 75(15): p. 6874-83.
40. Wieland, S.F., L.G. Guidotti, and F.V. Chisari, *Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA-containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice*. J Virol, 2000. 74(9): p. 4165-73.
41. Ganem, D. and A.M. Prince, *Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences*. N Engl J Med, 2004. 350(11): p. 1118-29.
42. Wright, T.L. and J.Y. Lau, *Clinical aspects of hepatitis B virus infection*. Lancet, 1993. 342(8883): p. 1340-4.
43. Ribeiro, R.M., A. Lo, and A.S. Perelson, *Dynamics of hepatitis B virus infection*. Microbes Infect, 2002. 4(8): p. 829-35.
44. Hadziyannis, S.J. and G.V. Papatheodoridis, *Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B: natural history and treatment*. Semin Liver Dis, 2006. 26(2): p. 130-41.
45. Liaw, Y.F., et al., *Clinical and histological events preceding hepatitis B e antigen seroconversion in chronic type B hepatitis*. Gastroenterology, 1983. 84(2): p. 216-9.
46. Lavanchy, D., *Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures*. J Viral Hepat, 2004. 11(2): p. 97-107.
47. Lee, W.M., *Hepatitis B virus infection*. N Engl J Med, 1997. 337(24): p. 1733-45.
48. Kay, A. and F. Zoulim, *Hepatitis B virus genetic variability and evolution*. Virus Res, 2007. 127(2): p. 164-76.
49. Bartholomeusz, A. and S. Schaefer, *Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods*. Rev Med Virol, 2004. 14(1): p. 3-16.
50. Olinger, C.M., et al., *Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia*. Emerg Infect Dis, 2008. 14(11): p. 1777-80.
51. Osiowy, C., et al., *Molecular characterization of hepatitis B virus and a 9-year clinical profile in a patient infected with genotype I*. J Med Virol, 2010. 82(6): p. 942-8.
52. Tatematsu, K., et al., *A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J*. J Virol, 2009. 83(20): p. 10538-47.
53. Kurbanov, F., Y. Tanaka, and M. Mizokami, *Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus*. Hepatol Res. 40(1): p. 14-30.
54. Chu, C.J., M. Hussain, and A.S. Lok, *Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier HBeAg seroconversion compared with hepatitis B virus genotype C*. Gastroenterology, 2002. 122(7): p. 1756-62.
55. Sumi, H., et al., *Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease*. Hepatology, 2003. 37(1): p. 19-26.
56. Lee, C.M., et al., *Prevalence and clinical implications of hepatitis B virus genotypes in southern Taiwan*. Scand J Gastroenterol, 2003. 38(1): p. 95-101.

57. Sanchez-Tapias, J.M., et al., *Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients*. Gastroenterology, 2002. 123(6): p. 1848-56.
58. Janssen, H.L., et al., *Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial*. Lancet, 2005. 365(9454): p. 123-9.
59. Carman, W.F., et al., *Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection*. Lancet, 1989. 2(8663): p. 588-91.
60. Kramvis, A., et al., *Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus*. J Med Virol, 2008. 80(1): p. 27-46.
61. Schaefer, S., *Hepatitis B virus: significance of genotypes*. J Viral Hepat, 2005. 12(2): p. 111-24.
62. Lok, A.S., U. Akarca, and S. Greene, *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(9): p. 4077-81.
63. Gunther, S., N. Piwon, and H. Will, *Wild-type levels of pregenomic RNA and replication but reduced pre-C RNA and e-antigen synthesis of hepatitis B virus with C(1653) --> T, A(1762) --> T and G(1764) --> A mutations in the core promoter*. J Gen Virol, 1998. 79 (Pt 2): p. 375-80.
64. Parekh, S., et al., *Genome replication, virion secretion, and e antigen expression of naturally occurring hepatitis B virus core promoter mutants*. J Virol, 2003. 77(12): p. 6601-12.
65. Buckwold, V.E., et al., *Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication*. J Virol, 1996. 70(9): p. 5845-51.
66. Chan, H.L., M. Hussain, and A.S. Lok, *Different hepatitis B virus genotypes are associated with different mutations in the core promoter and precore regions during hepatitis B e antigen seroconversion*. Hepatology, 1999. 29(3): p. 976-84.
67. Tacke, F., et al., *Basal core promoter and precore mutations in the hepatitis B virus genome enhance replication efficacy of Lamivudine-resistant mutants*. J Virol, 2004. 78(16): p. 8524-35.
68. Melegari, M., P.P. Scaglioni, and J.R. Wands, *Hepatitis B virus mutants associated with 3TC and famciclovir administration are replication defective*. Hepatology, 1998. 27(2): p. 628-33.
69. Das, K., et al., *Molecular modeling and biochemical characterization reveal the mechanism of hepatitis B virus polymerase resistance to lamivudine (3TC) and emtricitabine (FTC)*. J Virol, 2001. 75(10): p. 4771-9.
70. Shaw, T., A. Bartholomeusz, and S. Locarnini, *HBV drug resistance: mechanisms, detection and interpretation*. J Hepatol, 2006. 44(3): p. 593-606.
71. Angus, P., et al., *Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase*. Gastroenterology, 2003. 125(2): p. 292-7.

72. Bartholomeusz, A. and S.A. Locarnini, *Antiviral drug resistance: clinical consequences and molecular aspects*. Semin Liver Dis, 2006. 26(2): p. 162-70.
73. Rodriguez-Frias, F. and R. Jardi, *[Molecular virology of the hepatitis B virus]*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2008. 26 Suppl 7: p. 2-10.
74. Durantel, D., et al., *Resistance of human hepatitis B virus to reverse transcriptase inhibitors: from genotypic to phenotypic testing*. J Clin Virol, 2005. 34 Suppl 1: p. S34-43.
75. Sheldon, J., et al., *Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir*. Antivir Ther, 2005. 10(6): p. 727-34.
76. Delaney, W.E.t., et al., *Intracellular metabolism and in vitro activity of tenofovir against hepatitis B virus*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. 50(7): p. 2471-7.
77. Pawlotsky, J.M., *The concept of hepatitis B virus mutant escape*. J Clin Virol, 2005. 34 Suppl 1: p. S125-9.
78. Torresi, J., et al., *Reduced antigenicity of the hepatitis B virus HBsAg protein arising as a consequence of sequence changes in the overlapping polymerase gene that are selected by lamivudine therapy*. Virology, 2002. 293(2): p. 305-13.
79. Warner, N. and S. Locarnini, *The antiviral drug selected hepatitis B virus rtA181T/sW172* mutant has a dominant negative secretion defect and alters the typical profile of viral rebound*. Hepatology, 2008. 48(1): p. 88-98.
80. Goldstein, S.T., et al., *A mathematical model to estimate global hepatitis B disease burden and vaccination impact*. Int J Epidemiol, 2005. 34(6): p. 1329-39.
81. Daniels, D., S. Grytdal, and A. Wasley, *Surveillance for acute viral hepatitis - United States, 2007*. MMWR Surveill Summ, 2009. 58(3): p. 1-27.
82. Rantala, M. and M.J. van de Laar, *Surveillance and epidemiology of hepatitis B and C in Europe - a review*. Euro Surveill, 2008. 13(21).
83. Gomaa, A.I., et al., *Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis*. World J Gastroenterol, 2008. 14(27): p. 4300-8.
84. Belongia, E.A., et al., *NIH consensus development statement on management of hepatitis B*. NIH Consens State Sci Statements, 2008. 25(2): p. 1-29.
85. Parana, R. and D. Almeida, *HBV epidemiology in Latin America*. J Clin Virol, 2005. 34 Suppl 1: p. S130-3.
86. Mbayed, V.A., et al., *Distribution of hepatitis B virus genotypes in two different pediatric populations from Argentina*. J Clin Microbiol, 1998. 36(11): p. 3362-5.
87. Osiowy, C., et al., *Molecular characterization of hepatitis B virus and a 9-year clinical profile in a patient infected with genotype I*. J Med Virol. 82(6): p. 942-8.
88. Pineiro, Y.L.F.G., et al., *Hepatitis B virus genetic diversity in Argentina: dissimilar genotype distribution in two different geographical regions; description of hepatitis B surface antigen variants*. J Clin Virol, 2008. 42(4): p. 381-8.
89. Telenta, P.F., et al., *Increased prevalence of genotype F hepatitis B virus isolates in Buenos Aires, Argentina*. J Clin Microbiol, 1997. 35(7): p. 1873-5.
90. Franca, P.H., et al., *Strong association between genotype F and hepatitis B virus (HBV) e antigen-negative variants among HBV-infected argentinean blood donors*. J Clin Microbiol, 2004. 42(11): p. 5015-21.

91. Nakano, T., et al., *Characterization of hepatitis B virus genotypes among Yucpa Indians in Venezuela*. J Gen Virol, 2001. 82(Pt 2): p. 359-65.
92. Devesa, M. and F.H. Pujol, *Hepatitis B virus genetic diversity in Latin America*. Virus Res, 2007. 127(2): p. 177-84.
93. Pezzano, S.C., et al., *Hepatitis B virus in Buenos Aires, Argentina: genotypes, virological characteristics and clinical outcomes*. Clin Microbiol Infect, 2010.
94. Chu, C.J. and A.S. Lok, *Clinical significance of hepatitis B virus genotypes*. Hepatology, 2002. 35(5): p. 1274-6.
95. Lim, S.G., et al., *Viral quasi-species evolution during hepatitis Be antigen seroconversion*. Gastroenterology, 2007. 133(3): p. 951-8.
96. Fares, M.A. and E.C. Holmes, *A revised evolutionary history of hepatitis B virus (HBV)*. J Mol Evol, 2002. 54(6): p. 807-14.
97. Hannoun, C., P. Horal, and M. Lindh, *Long-term mutation rates in the hepatitis B virus genome*. J Gen Virol, 2000. 81(Pt 1): p. 75-83.
98. Osiowy, C., et al., *Molecular evolution of hepatitis B virus over 25 years*. J Virol, 2006. 80(21): p. 10307-14.
99. Zhou, Y. and E.C. Holmes, *Bayesian estimates of the evolutionary rate and age of hepatitis B virus*. J Mol Evol, 2007. 65(2): p. 197-205.
100. Simmonds, P. and S. Midgley, *Recombination in the genesis and evolution of hepatitis B virus genotypes*. J Virol, 2005. 79(24): p. 15467-76.
101. Jazayeri, S.M., S.M. Alavian, and W.F. Carman, *Hepatitis B virus: origin and evolution*. J Viral Hepat, 2010. 17(4): p. 229-35.
102. Yang, Z., I.J. Lauder, and H.J. Lin, *Molecular evolution of the hepatitis B virus genome*. J Mol Evol, 1995. 41(5): p. 587-96.
103. Feld, J.J. and E.J. Heathcote, *Hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B: natural history and treatment*. Semin Liver Dis, 2006. 26(2): p. 116-29.
104. Shi, Y.H. and C.H. Shi, *Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection*. World J Gastroenterol, 2009. 15(25): p. 3099-105.
105. Gagnieu, M.C., et al., *Population pharmacokinetics of tenofovir in AIDS patients*. J Clin Pharmacol, 2008. 48(11): p. 1282-8.
106. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. MMWR Morb Mortal Wkly Rep.
107. Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, p.-.
108. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. 220(4599): p. 868-71.
109. Gallo, R.C., et al., *Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS*. Science, 1984. 224(4648): p. 500-3.
110. Gallo, R.C., et al., *Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. 220(4599): p. 865-7.
111. Levy, J.A., et al., *Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS*. Science, 1984. 225(4664): p. 840-2.

112. Ratner, L., R.C. Gallo, and F. Wong-Staal, *HTLV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus*. *Nature*, 1985. 313(6004): p. 636-7.
113. Coffin, J.M., S.H. Hughes, and H.E. Varmus, *Retroviruses*. 1997: Cold Spring Harbor Cold Spring Harbor Laboratory Press.
114. Klatzmann, D., et al., *T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV*. *Nature*, 1984. 312(5996): p. 767-8.
115. Chan, D.C. and P.S. Kim, *HIV entry and its inhibition*. *Cell*, 1998. 93(5): p. 681-4.
116. Jacobo-Molina, A., et al., *Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(13): p. 6320-4.
117. Greene, W.C. and B.M. Peterlin, *Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy*. *Nat Med*, 2002. 8(7): p. 673-80.
118. Basu, V.P., et al., *Strand transfer events during HIV-1 reverse transcription*. *Virus Res*, 2008. 134(1-2): p. 19-38.
119. Bieniasz, P.D., *The cell biology of HIV-1 virion genesis*. *Cell Host Microbe*, 2009. 5(6): p. 550-8.
120. Fields, B., *Fields Virology, Third ed.* 1996: Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia. New York
121. Moss, A.R., et al., *Risk factors for AIDS and HIV seropositivity in homosexual men*. *Am J Epidemiol*, 1987. 125(6): p. 1035-47.
122. Rothenberg, R.B., et al., *Oral transmission of HIV*. *Aids*, 1998. 12(16): p. 2095-105.
123. Page-Shafer, K., et al., *Risk of HIV infection attributable to oral sex among men who have sex with men and in the population of men who have sex with men*. *Aids*, 2002. 16(17): p. 2350-2.
124. Control., C.f.D. *CDC Management of possible sexual, injection drugs use or ever non occupational exposure to HIV*. .
125. Strathdee, S.A., et al., *HIV and risk environment for injecting drug users: the past, present, and future*. *Lancet*. 376(9737): p. 268-84.
126. Kuhn, L., et al., *Potential impact of new WHO criteria for antiretroviral treatment for prevention of mother-to-child HIV transmission*. *AIDS*. 24(9): p. 1374-7.
127. Schacker, T., et al., *Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection*. *Ann Intern Med*, 1996. 125(4): p. 257-64.
128. Koup, R.A., et al., *Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome*. *J Virol*, 1994. 68(7): p. 4650-5.
129. Musey, L., et al., *Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection*. *N Engl J Med*, 1997. 337(18): p. 1267-74.
130. Pantaleo, G., et al., *HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease*. *Nature*, 1993. 362(6418): p. 355-8.

131. Perelson, A.S., et al., *HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time*. Science, 1996. 271(5255): p. 1582-6.
132. http://www.unaids.org/documents/20101123_GlobalReport_Chap2_em.pdf.
133. *Boletín sobre VIH/SIDA en la Argentina*. <http://www.msal.gov.ar/sida/pdf/Boletin-E-2009.pdf>. Año XII, vol 26.
134. Soriano, V., et al., *Care of HIV patients with chronic hepatitis B: updated recommendations from the HIV-Hepatitis B Virus International Panel*. Aids, 2008. 22(12): p. 1399-410.
135. Thio, C.L., *Hepatitis B and human immunodeficiency virus coinfection*. Hepatology, 2009. 49(5 Suppl): p. S138-45.
136. Charpentier, C., et al., *Role of minority populations of human immunodeficiency virus type 1 in the evolution of viral resistance to protease inhibitors*. J Virol, 2004. 78(8): p. 4234-47.
137. Alter, M.J., *Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection*. J Hepatol, 2006. 44(1 Suppl): p. S6-9.
138. Lee, H.C., et al., *Seroprevalence of viral hepatitis and sexually transmitted disease among adults with recently diagnosed HIV infection in Southern Taiwan, 2000-2005: upsurge in hepatitis C virus infections among injection drug users*. J Formos Med Assoc, 2008. 107(5): p. 404-11.
139. Nyirenda, M., et al., *Prevalence of infection with hepatitis B and C virus and coinfection with HIV in medical inpatients in Malawi*. J Infect, 2008. 57(1): p. 72-7.
140. Puoti, M., et al., *Natural history of chronic hepatitis B in co-infected patients*. J Hepatol, 2006. 44(1 Suppl): p. S65-70.
141. Colin, J.F., et al., *Influence of human immunodeficiency virus infection on chronic hepatitis B in homosexual men*. Hepatology, 1999. 29(4): p. 1306-10.
142. Bodsworth, N.J., D.A. Cooper, and B. Donovan, *The influence of human immunodeficiency virus type 1 infection on the development of the hepatitis B virus carrier state*. J Infect Dis, 1991. 163(5): p. 1138-40.
143. Hadler, S.C., et al., *Outcome of hepatitis B virus infection in homosexual men and its relation to prior human immunodeficiency virus infection*. J Infect Dis, 1991. 163(3): p. 454-9.
144. Bodsworth, N., B. Donovan, and B.N. Nightingale, *The effect of concurrent human immunodeficiency virus infection on chronic hepatitis B: a study of 150 homosexual men*. J Infect Dis, 1989. 160(4): p. 577-82.
145. Fang, J.W., T.L. Wright, and J.Y. Lau, *Fibrosing cholestatic hepatitis in patient with HIV and hepatitis B*. Lancet, 1993. 342(8880): p. 1175.
146. Revill, P.A., et al., *Identification of a novel hepatitis B virus precore/core deletion mutant in HIV/hepatitis B virus co-infected individuals*. AIDS, 2007. 21(13): p. 1701-10.
147. Mathurin, P., et al., *Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin in rats*. Hepatology, 2000. 32(5): p. 1008-17.
148. Mialhes, P., et al., *Impact of highly active antiretroviral therapy (HAART) on the natural history of hepatitis B virus (HBV) and HIV coinfection: relationship*

- between prolonged efficacy of HAART and HBV surface and early antigen seroconversion.* Clin Infect Dis, 2007. 45(5): p. 624-32.
149. Benhamou, Y., *Hepatitis B in the HIV-coinfected patient.* J Acquir Immune Defic Syndr, 2007. 45 Suppl 2: p. S57-65; discussion S66-7.
 150. *Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services.* . 3 November 2008; Available from: [<http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>].
 151. Shire, N.J., et al., *The prevalence and significance of occult hepatitis B virus in a prospective cohort of HIV-infected patients.* J Acquir Immune Defic Syndr, 2007. 44(3): p. 309-14.
 152. Schmeltzer, P. and K.E. Sherman, *Occult hepatitis B: clinical implications and treatment decisions.* Dig Dis Sci, 2010. 55(12): p. 3328-35.
 153. Mast, E.E., et al., *A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Part II: immunization of adults.* MMWR Recomm Rep, 2006. 55(RR-16): p. 1-33; quiz CE1-4.
 154. Quarleri, J., et al., *Hepatitis B virus genotype distribution and its lamivudine-resistant mutants in HIV-coinfected patients with chronic and occult hepatitis B.* AIDS Res Hum Retroviruses, 2007. 23(4): p. 525-31.
 155. Torres-Puente, M., et al., *Sampling and repeatability in the evaluation of hepatitis C virus genetic variability.* J Gen Virol, 2003. 84(Pt 9): p. 2343-50.
 156. Hall, T., *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.* Nucl Acids Symp Ser, 1999. 41: p. 95-98.
 157. Zuker, M., *Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction.* Nucleic Acids Res, 2003. 31(13): p. 3406-15.
 158. Mathews, D.H., et al., *Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure.* J Mol Biol, 1999. 288(5): p. 911-40.
 159. Tenney, D.J., et al., *Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to Lamivudine.* Antimicrob Agents Chemother, 2004. 48(9): p. 3498-507.
 160. Guindon, S., et al., *New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0.* Syst Biol, 2010. 59(3): p. 307-21.
 161. Posada, D. and K.A. Crandall, *MODELTEST: testing the model of DNA substitution.* Bioinformatics, 1998. 14(9): p. 817-8.
 162. Drummond, A.J. and A. Rambaut, *BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees.* BMC Evol Biol, 2007. 7: p. 214.
 163. Duffy, S., L.A. Shackelton, and E.C. Holmes, *Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants.* Nat Rev Genet, 2008. 9(4): p. 267-76.

164. Shapiro, B., A. Rambaut, and A.J. Drummond, *Choosing appropriate substitution models for the phylogenetic analysis of protein-coding sequences*. Mol Biol Evol, 2006. 23(1): p. 7-9.
165. Tamura, K., et al., *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. Mol Biol Evol, 2007. 24(8): p. 1596-9.
166. Volkenstein, M., *Physical approaches to biological evolution*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1994.
167. Pond, S.L., S.D. Frost, and S.V. Muse, *HyPhy: hypothesis testing using phylogenies*. Bioinformatics, 2005. 21(5): p. 676-9.
168. Audsley, J., et al., *HBV mutations in untreated HIV-HBV co-infection using genomic length sequencing*. Virology, 2010. 405(2): p. 539-47.
169. Kosakovsky Pond, S.L. and S.D. Frost, *Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection*. Mol Biol Evol, 2005. 22(5): p. 1208-22.
170. Desmond, C.P., et al., *A systematic review of T-cell epitopes in hepatitis B virus: identification, genotypic variation and relevance to antiviral therapeutics*. Antivir Ther, 2008. 13(2): p. 161-75.
171. Gordillo, R.M., J. Gutierrez, and M. Casal, *Evaluation of the COBAS TaqMan 48 real-time PCR system for quantitation of hepatitis B virus DNA*. J Clin Microbiol, 2005. 43(7): p. 3504-7.
172. Walsh, B., *Estimating the time to the most recent common ancestor for the Y chromosome or mitochondrial DNA for a pair of individuals*. Genetics, 2001. 158(2): p. 897-912.
173. Rhee, S.Y., et al., *Hepatitis B virus reverse transcriptase sequence variant database for sequence analysis and mutation discovery*. Antiviral Res, 2010. 88(3): p. 269-75.
174. Bartholomeusz, A. and S. Locarnini, *Hepatitis B virus mutations associated with antiviral therapy*. J Med Virol, 2006. 78 Suppl 1: p. S52-5.
175. Guarnieri, M., et al., *Point mutations upstream of hepatitis B virus core gene affect DNA replication at the step of core protein expression*. J Virol, 2006. 80(2): p. 587-95.
176. McMillan, J.S., et al., *Mutations in the hepatitis B virus precore/core gene and core promoter in patients with severe recurrent disease following liver transplantation*. Hepatology, 1996. 24(6): p. 1371-8.
177. Thio, C.L., *Hepatitis B in the human immunodeficiency virus-infected patient: epidemiology, natural history, and treatment*. Semin Liver Dis, 2003. 23(2): p. 125-36.
178. Gatanaga, H., et al., *Influence of prior HIV-1 infection on the development of chronic hepatitis B infection*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2000. 19(3): p. 237-9.
179. Weller, I.V., et al., *Spontaneous loss of HBeAg and the prevalence of HTLV-III/LAV infection in a cohort of homosexual hepatitis B virus carriers and the implications for antiviral therapy*. J Hepatol, 1986. 3 Suppl 2: p. S9-16.
180. Krogsgaard, K., et al., *The influence of HTLV-III infection on the natural history of hepatitis B virus infection in male homosexual HBsAg carriers*. Hepatology, 1987. 7(1): p. 37-41.

181. Alberti, A., et al., *Short statement of the first European Consensus Conference on the treatment of chronic hepatitis B and C in HIV co-infected patients.* J Hepatol, 2005. 42(5): p. 615-24.
182. Rodriguez-Torres, M., et al., *Occult hepatitis B virus infection in the setting of hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV) co-infection: clinically relevant or a diagnostic problem?* J Med Virol, 2007. 79(6): p. 694-700.
183. Hofer, M., et al., *Frequent chronic hepatitis B virus infection in HIV-infected patients positive for antibody to hepatitis B core antigen only. Swiss HIV Cohort Study.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1998. 17(1): p. 6-13.
184. Hu, K.Q., *Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications.* J Viral Hepat, 2002. 9(4): p. 243-57.
185. Yang, J., et al., *Identification of Hepatitis B virus putative intergenotype recombinants by using fragment typing.* J Gen Virol, 2006. 87(Pt 8): p. 2203-15.
186. Du, H., et al., *Correlation of hepatitis B virus (HBV) genotypes and mutations in basal core promoter/precore with clinical features of chronic HBV infection.* Liver Int, 2007. 27(2): p. 240-6.
187. Laras, A., J. Koskinas, and S.J. Hadziyannis, *In vivo suppression of precore mRNA synthesis is associated with mutations in the hepatitis B virus core promoter.* Virology, 2002. 295(1): p. 86-96.
188. Volz, T., et al., *Impaired intrahepatic hepatitis B virus productivity contributes to low viremia in most HBeAg-negative patients.* Gastroenterology, 2007. 133(3): p. 843-52.
189. Li, J., et al., *Mechanism of suppression of hepatitis B virus precore RNA transcription by a frequent double mutation.* J Virol, 1999. 73(2): p. 1239-44.
190. Zheng, Y., J. Li, and J.H. Ou, *Regulation of hepatitis B virus core promoter by transcription factors HNF1 and HNF4 and the viral X protein.* J Virol, 2004. 78(13): p. 6908-14.
191. Jammeh, S., et al., *Effect of basal core promoter and pre-core mutations on hepatitis B virus replication.* J Gen Virol, 2008. 89(Pt 4): p. 901-9.
192. Ahn, S.H., et al., *Sequence variation upstream of precore translation initiation codon reduces hepatitis B virus e antigen production.* Gastroenterology, 2003. 125(5): p. 1370-8.
193. Moriyama, K., *Reduced antigen production by hepatitis B virus harbouring nucleotide deletions in the overlapping X gene and precore-core promoter.* J Gen Virol, 1997. 78 (Pt 6): p. 1479-86.
194. Kohno, K., et al., *Reduced transcription and progeny virus production of hepatitis B virus containing an 8-bp deletion in basic core promoter.* J Med Virol, 2000. 61(1): p. 15-22.
195. Lopez, J.L., et al., *Intrahost evolution of HBe antigen-negative hepatitis B virus genomes ascribed to the F genotype: a longitudinal 3 year retrospective study.* J Gen Virol, 2007. 88(Pt 1): p. 86-91.
196. Marschenz, S., et al., *Co-replication analyses of naturally occurring defective hepatitis B virus variants with wild-type.* Virology, 2008. 372(2): p. 247-59.
197. Arii, M., S. Takada, and K. Koike, *Identification of three essential regions of hepatitis B virus X protein for trans-activation function.* Oncogene, 1992. 7(3): p. 397-403.

198. Cho, S.W., K.B. Hahm, and J.H. Kim, *Reversion from precore/core promoter mutants to wild-type hepatitis B virus during the course of lamivudine therapy*. Hepatology, 2000. 32(5): p. 1163-9.
199. Gomez-Gonzalo, M., et al., *The hepatitis B virus X protein induces HIV-1 replication and transcription in synergy with T-cell activation signals: functional roles of NF-kappaB/NF-AT and SP1-binding sites in the HIV-1 long terminal repeat promoter*. J Biol Chem, 2001. 276(38): p. 35435-43.
200. Kramvis, A. and M.C. Kew, *Structure and function of the encapsidation signal of hepadnaviridae*. J Viral Hepat, 1998. 5(6): p. 357-67.
201. Leung, N.W., et al., *Extended lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B enhances hepatitis B e antigen seroconversion rates: results after 3 years of therapy*. Hepatology, 2001. 33(6): p. 1527-32.
202. Benhamou, Y., et al., *Long-term incidence of hepatitis B virus resistance to lamivudine in human immunodeficiency virus-infected patients*. Hepatology, 1999. 30(5): p. 1302-6.
203. Lok, A.S., et al., *Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B*. Gastroenterology, 2003. 125(6): p. 1714-22.
204. Matthews, G.V., et al., *Characteristics of drug resistant HBV in an international collaborative study of HIV-HBV-infected individuals on extended lamivudine therapy*. AIDS, 2006. 20(6): p. 863-70.
205. Ferns, R.B., et al., *Presence of hepatitis B virus core promoter mutations pre-seroconversion predict persistent viral replication after HBeAg loss*. J Clin Virol, 2007. 39(3): p. 199-204.
206. Terrault, N.A., *Benefits and risks of combination therapy for hepatitis B*. Hepatology, 2009. 49(5 Suppl): p. S122-8.
207. Trinks, J., et al., *Two simultaneous hepatitis B virus epidemics among injecting drug users and men who have sex with men in Buenos Aires, Argentina: characterization of the first D/A recombinant from the American continent*. J Viral Hepat, 2008. 15(11): p. 827-38.
208. Aizawa, M., et al., *Highly active antiretroviral therapy improved persistent lamivudine-resistant viremia in acute hepatitis B virus genotype Ae infection with coinfection of human immunodeficiency virus*. Hepatol Res, 2010. 40(2): p. 229-35.
209. Lacombe, K., et al., *Major role of hepatitis B genotypes in liver fibrosis during coinfection with HIV*. Aids, 2006. 20(3): p. 419-27.
210. Perez-Olmeda, M., et al., *Distribution of hepatitis B virus genotypes in HIV-infected patients with chronic hepatitis B: therapeutic implications*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2003. 19(8): p. 657-9.
211. De Maddalena, C., et al., *High level of genetic heterogeneity in S and P genes of genotype D hepatitis B virus*. Virology, 2007. 365(1): p. 113-24.
212. McMahon, B.J., *The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B*. Hepatol Int, 2009. 3(2): p. 334-42.
213. Morozov, V., M. Pisareva, and M. Groudinin, *Homologous recombination between different genotypes of hepatitis B virus*. Gene, 2000. 260(1-2): p. 55-65.

214. Chang, J.J., et al., *Impaired quality of the hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell response in human immunodeficiency virus type 1-HBV coinfection*. J Virol, 2009. 83(15): p. 7649-58.
215. Tan, A.T., et al., *Host ethnicity and virus genotype shape the hepatitis B virus-specific T-cell repertoire*. J Virol, 2008. 82(22): p. 10986-97.
216. Hoffman, N.G., et al., *Variability in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 Env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop*. J Virol, 2002. 76(8): p. 3852-64.
217. Vignuzzi, M., et al., *Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population*. Nature, 2006. 439(7074): p. 344-8.
218. Westover, K.M. and A.L. Hughes, *Evolution of cytotoxic T-lymphocyte epitopes in hepatitis B virus*. Infect Genet Evol, 2007. 7(2): p. 254-62.
219. Zehender, G., et al., *Different evolutionary rates and epidemic growth of hepatitis B virus genotypes A and D*. Virology, 2008. 380(1): p. 84-90.
220. Yuen, M.F., et al., *Factors associated with hepatitis B virus DNA breakthrough in patients receiving prolonged lamivudine therapy*. Hepatology, 2001. 34(4 Pt 1): p. 785-91.
221. Levine, S., et al., *Efficacies of entecavir against lamivudine-resistant hepatitis B virus replication and recombinant polymerases in vitro*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. 46(8): p. 2525-32.
222. Ono, S.K., et al., *The polymerase L528M mutation cooperates with nucleotide binding-site mutations, increasing hepatitis B virus replication and drug resistance*. J Clin Invest, 2001. 107(4): p. 449-55.
223. Sherman, M., et al., *Entecavir therapy for lamivudine-refractory chronic hepatitis B: improved virologic, biochemical, and serology outcomes through 96 weeks*. Hepatology, 2008. 48(1): p. 99-108.
224. Chang, T.T., et al., *A dose-ranging study of the efficacy and tolerability of entecavir in Lamivudine-refractory chronic hepatitis B patients*. Gastroenterology, 2005. 129(4): p. 1198-209.
225. Doo, E. and T.J. Liang, *Molecular anatomy and pathophysiologic implications of drug resistance in hepatitis B virus infection*. Gastroenterology, 2001. 120(4): p. 1000-8.
226. Leemans, W.F., et al., *Selection of an entecavir-resistant mutant despite prolonged hepatitis B virus DNA suppression, in a chronic hepatitis B patient with preexistent lamivudine resistance: successful rescue therapy with tenofovir*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2008. 20(8): p. 773-7.
227. Seifer, M., et al., *Telbivudine, a nucleoside analog inhibitor of HBV polymerase, has a different in vitro cross-resistance profile than the nucleotide analog inhibitors adefovir and tenofovir*. Antiviral Res, 2009. 81(2): p. 147-55.
228. Lada, O., et al., *In vitro susceptibility of lamivudine-resistant hepatitis B virus to adefovir and tenofovir*. Antivir Ther, 2004. 9(3): p. 353-63.
229. Ying, C., et al., *Inhibition of the replication of the DNA polymerase M550V mutation variant of human hepatitis B virus by adefovir, tenofovir, L-FMAU, DAPD, penciclovir and lobucavir*. J Viral Hepat, 2000. 7(2): p. 161-5.

230. Lee, Y.S., et al., *Increased risk of adefovir resistance in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B after 48 weeks of adefovir dipivoxil monotherapy.* Hepatology, 2006. 43(6): p. 1385-91.
231. Villet, S., et al., *Stepwise process for the development of entecavir resistance in a chronic hepatitis B virus infected patient.* J Hepatol, 2007. 46(3): p. 531-8.
232. Zhou, T., et al., *Emergence of drug-resistant populations of woodchuck hepatitis virus in woodchucks treated with the antiviral nucleoside lamivudine.* Antimicrob Agents Chemother, 1999. 43(8): p. 1947-54.
233. Bottecchia, M., et al., *Hepatitis B virus genotype A2 harbours an L217R polymorphism which may account for a lower response to adefovir.* J Antimicrob Chemother, 2008. 62(3): p. 626-7.
234. Takahashi, M., et al., *Determination of plasma tenofovir concentrations using a conventional LC-MS method.* Biol Pharm Bull, 2007. 30(9): p. 1784-6.
235. Wang, J., et al., *Clinical and virological characteristics of chronic hepatitis B with concurrent hepatitis B E antigen and antibody detection.* J Viral Hepat, 2010.
236. de Vries-Sluijs, T.E., et al., *Long-term therapy with tenofovir is effective for patients co-infected with human immunodeficiency virus and hepatitis B virus.* Gastroenterology, 2010. 139(6): p. 1934-41.
237. Perrillo, R.P., *Acute flares in chronic hepatitis B: the natural and unnatural history of an immunologically mediated liver disease.* Gastroenterology, 2001. 120(4): p. 1009-22.
238. Gunther, S., *Genetic variation in HBV infection: genotypes and mutants.* J Clin Virol, 2006. 36 Suppl 1: p. S3-S11.
239. Wang, H.Y., et al., *Distinct hepatitis B virus dynamics in the immunotolerant and early immunoclearance phases.* J Virol, 2010. 84(7): p. 3454-63.
240. Hanada, K., Y. Suzuki, and T. Gojobori, *A large variation in the rates of synonymous substitution for RNA viruses and its relationship to a diversity of viral infection and transmission modes.* Mol Biol Evol, 2004. 21(6): p. 1074-80.
241. Pollicino, T., et al., *Variability of reverse transcriptase and overlapping S gene in hepatitis B virus isolates from untreated and lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients.* Antivir Ther, 2009. 14(5): p. 649-54.
242. Pawlotsky, J.M., et al., *Virologic monitoring of hepatitis B virus therapy in clinical trials and practice: recommendations for a standardized approach.* Gastroenterology, 2008. 134(2): p. 405-15.
243. Nguyen, M.H., et al., *Prevalence of hepatitis B virus DNA polymerase mutations in treatment-naive patients with chronic hepatitis B.* Aliment Pharmacol Ther, 2009. 30(11-12): p. 1150-8.
244. Matsuda, M., et al., *Low rate of YMDD motif mutations in polymerase gene of hepatitis B virus in chronically infected patients not treated with lamivudine.* J Gastroenterol, 2004. 39(1): p. 34-40.
245. Akarsu, M., et al., *YMDD motif variants in inactive hepatitis B carriers detected by Inno-Lipa HBV DR assay.* J Gastroenterol Hepatol, 2006. 21(12): p. 1783-8.
246. Cuestas, M.L., et al., *Naturally occurring hepatitis B virus (HBV) variants with primary resistance to antiviral therapy and S-mutants with potential primary resistance to adefovir in Argentina.* Antiviral Res, 2010. 87(1): p. 74-7.

247. Solmone, M., et al., *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): p. 1718-26.
248. Colonna, R.J., et al., *Entecavir resistance is rare in nucleoside naive patients with hepatitis B.* Hepatology, 2006. 44(6): p. 1656-65.